

**MICROCÁPSULAS DE ALGINATO-QUITOSANA CONTENDO
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PROGESTERONA**

MELINA VASCONCELOS LEITE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO – 2014**

**MICROCÁPSULAS DE ALGINATO-QUITOSANA CONTENDO
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PROGESTERONA**

MELINA VASCONCELOS LEITE

"Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção de título de
Mestre em Engenharia e Ciência dos
Materiais".

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

42/2015

Leite, Melina Vasconcelos

Microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona / Melina Vasconcelos Leite. – Campos dos Goytacazes, 2014.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos Goytacazes, 2014.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez.

Área de concentração: Polímeros e compósitos.

Bibliografia: f. 94-104.

1. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PROGESTERONA 2. QUITOSANA 3. ALGINATO 4. MAGNETITA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 620.192

**MICROCÁPSULAS DE ALGINATO-QUITOSANA CONTENDO
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PROGESTERONA**

MELINA VASCONCELOS LEITE

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Comissão Examinadora:

Prof. Camila Rodrigues Amaral (D.Sc., Engenharia e Ciência dos Materiais) - FAFISM

Prof. Nádia Rosa Pereira – UENF (D.Sc., Engenharia de Alimentos) - UENF

Prof. André Oliveira Guimarães (D. Sc., Física) - UENF

Prof. Rubén Sánchez Rodriguez (D. Sc., Ciências Químicas) – UENF/CCT- LAMAV (Orientador)

*Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui.
Nunca desista de seus objetivos,
mesmo que eles pareçam impossíveis.
A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.*

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Célia e Maurício
e aos meus irmãos Maurício Júnior e Mávio.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me ter me abençoado na minha trajetória no mestrado e por ter me amparado nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador, professor e amigo Rubén Sánchez pela sua orientação, ajuda, ensinamentos e paciência. À sua esposa Prof. Tereza pelo auxílio e amizade.

Aos meus pais Maurício e Célia pela dedicação, confiança, apoio e amor. Sem eles não teria sido possível.

Aos meus irmãos Mávio e Maurício Júnior por terem estado sempre ao meu lado e por terem me ajudado em todos os momentos que precisei.

Ao meu namorado Leandro por todo apoio, incentivo e por sempre me confortar nos momentos complicados.

À minha cunhada Flaviane, pois foi quem me abriu as portas da UENF. Se não fosse ela talvez não estaria aqui.

A todos os meus amigos do SEPOL que sempre estiveram de prontidão para me ajudar, seja com análises e/ou sábia palavras. Nunca esquecerei os momentos bons e tumultuados que tivemos. São muito especiais para mim: Darlan, Elaine, Camila, Letícia, Kátia, Lucivan, Djalma, Ellen, Martinha e a tantos outros que deixaram ótimas lembranças.

À Mayara, minha companheira de projeto, pela sua ajuda e amizade.

A Marlon, por suas explicações e soluções.

À Elaine pelas análises de DRX e à Bárbara e Michel pela análise de Confocal.

À Prof^a. Elisa Saitovich pelas análises de MAV e Espectroscopia Mössbauer.

Ao Prof. Flávio Miguens pela análise MEV e MET.

Ao Prof. Victor que nos abriu as portas do seu laboratório e a seus alunos Diana e Geovanny, e especialmente a Darli por ser tão atenciosa.

À Michel, Sílvio, Bruno e Carlan por toda sua ajuda na oficina e empenho em trazer soluções práticas e rápidas para os problemas que surgiram no decorrer deste trabalho. Foram fundamentais.

Ao técnico Marcelo pela ajuda nas análises de ultravioleta.

Aos professores que estiveram na minha trajetória, especialmente Prof. Atem, Prof. Angelus, Prof. Terrones e Prof. Daniel.

À Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS.....	XII
Resumo.....	13
Abstract.....	14
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivos gerais	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
1.2 Justificativa	18
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Liberação de fármacos	20
2.1.1 Liberação controlada de fármacos.....	20
2.2.2 Liberação Vetorizada de fármacos	23
2.2 Biopolímeros	24
2.2.1 Quitosana	24
2.2.2 Alginato de sódio	26
2.2.3 Complexo polimérico alginato-quitosana	30
2.3 Nanopartículas Magnéticas	34
2.3.1 Nanopartículas magnéticas na Liberação Vetorizada e Controlada de Fármacos.....	36
2.3.2 Magnetita(Fe_3O_4)	37
2.3.3 Metodologia de produção de nanopartículas de Fe_3O_4	38
2.4 Liberação controlada e vetorizada de fármacos através de microcápsulas de alginato-quitosana contendo magnetita (Fe_3O_4)	42
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Materiais	49
3.2 Especificação dos Equipamentos	50
3.3 Fluxograma do processo de preparo e caracterização das partículas	50
3.4 Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (magnetita)	51
3.5 Caracterização das nanopartículas magnéticas	52
3.5.1 Difração de Raios-X (DRX).....	52

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	53
3.5.3 Espectroscopia Mössbauer.....	53
3.5.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)	54
3.6 Metodologia de formulação das microcápsulas	54
3.7 Caracterização das microcápsulas	57
3.7.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	57
3.7.2 Análise de termogravimétrica (TGA).....	57
3.7.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	57
3.7.4 Determinação da Carga Efetiva (%) de progesterona na microcápsula alginato-quitosana	58
3.7.5 Distribuição de tamanho	59
3.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
3.7.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
3.8 Estudo de Liberação da progesterona	61
3.8.1 Elaboração da curva de calibração da progesterona em álcool/ água 60% (v/v).....	61
3.8.2 Estudo da influência do campo magnético na liberação da progesterona a partir de microcápsulas de alginato-quitosana/magnetita	62
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	66
4.1 Síntese da magnetita	66
4.2 Caracterização da magnetita (Fe₂O₄).....	67
4.2.1 Difração de Raios-X (DRX).....	67
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	69
4.2.3 Espectroscopia Mössbauer.....	69
4.2.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)	71
4.3 Síntese das microcápsulas alginato/quitosana contendo a carga magnética	72
4.4 Caracterização das microcápsulas	74
4.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	74
4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	76
4.4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	78
4.4.4 Determinação da carga total efetiva de progesterona na microcápsula alginato-quitosana/magnetita.....	81
4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das	82

4.4.6 Distribuição de tamanho das microcápsulas.....	83
4.4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das microcápsulas Alginato- Quitosana/magnetita-progesterona	85
4.5 Estudo do perfil de liberação da progesterona a partir da microcápsula alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas	86
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil do nível plasmático de um fármaco versus tempo, administrado da forma (A) controlada; e (B) convencional(Dash, A.K.; Cudworth II, 1998 - adaptado).	21
Figura 2: Diferença estrutural entre microcápsulas e micropartículas (Silva, C. <i>et al.</i> , 2003).	22
Figura 3: Estrutura da Quitosana (Aghinitori <i>et al.</i> , 2004).	25
Figura 4: Estrutura química do alginato de sódio (Yang <i>et al.</i> , 2011).	27
Figura 5: Esquema representativo do modelo “egg box”. Os pontos negros representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação com os íons cálcio (Braccini e Pérez, 2001).	28
Figura 6: Representação esquemática da interação entre o alginato com (a) íons cálcio e (b) quitosana (Lawrie <i>et al.</i> , 2007 – adaptado).	30
Figura 7: Configuração do dipolo atômico para um material superparamagnético livre de um campo magnético externo e sob a aplicação de um campo magnético externo (Yigit <i>et al.</i> , 2012 – adaptado).	36
Figura 8: MEV de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ (Hong <i>et al.</i> , 2007).	39
Figura 9: Imagens de MET de partículas de Fe ₃ O ₄ preparadas pelo método hidrotérmico (Li, G. <i>et al.</i> , 2008).	40
Figura 10: DRX de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ sintetizadas pelo método hidrotérmico (Chen <i>et al.</i> , 2009).	41
Figura 11: Imagens de MEV de partículas de Fe ₃ O ₄ preparadas pelo método hidrotérmico (Chen <i>et al.</i> , 2009).	41
Figura 12: Representação esquemática das possíveis disposições das NPM na micropartícula (Philippova <i>et al.</i> , 2011).	43
Figura 13: Esquema representativo de uma matriz polimérica de liberação de fármaco com NPM dispersas (Dash, A.K.; Cudworth II, 1998 - adaptado).	44
Figura 14: Mecanismo de liberação da droga por meio da resposta térmica mediante a atuação de um campo magnético aplicado (Liu <i>et al.</i> , 2009 – adaptado).	44
Figura 15: Estrutura química da progesterona (Brasil, 2010).	47
Figura 16: Fluxograma referente às etapas do procedimento.	51
Figura 17: Foto ilustrativa do reator utilizado para a síntese de magnetita.	52
Figura 18: Foto ilustrativa do equipamento utilizado para a formulação de microcápsulas.	55
Figura 19: Esquema ilustrativo do procedimento para preparação das (a) microcápsulas alginato-quitosana; (b) microcápsulas alginato-quitosana/magnetita; (c) microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Adaptado de Silva C.M. <i>et al.</i> , 2006 e Xiao e Fei, 2013).	56
Figura 20: Curva de calibração da progesterona em álcool/água 60%.	62
Figura 21: Imagem do equipamento utilizado para aplicar o campo magnético pulsante nas amostras. (a) Visão de cima; (b) Visão de frente.	64

Figura 22: Esquema representativo da reação de síntese da magnetita através do método hidrotérmico (Li, G. <i>et al.</i> , 2008).	66
Figura 23: Efeito do campo magnético na magnetita: a) ausência do campo magnético; b) presença do campo magnético.....	67
Figura 24: Espectro de DRX da magnetita (Fe_3O_4).	68
Figura 25: Imagem de TEM da magnetita.	69
Figura 26: Medida de Espectroscopia de Mössbauer da amostra de magnetita realizada a temperatura ambiente.....	70
Figura 27: Curva de magnetização das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) à temperatura ambiente.	72
Figura 28: Espectro de Infravermelho (a) alginato; (b) quitosana; e (c) Microcápsula alginato-quitosana/magnetita.	75
Figura 29: Espectro de Infravermelho da (a) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e da (b) progesterona.	76
Figura 30: Termograma de TGA da (a) progesterona; (b) quitosana; (c) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e (d) alginato.	77
Figura 31: Termograma DTGA da (a) progesterona; (b) quitosana; (c) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e (d) alginato.	77
Figura 32: Termograma da microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona.	78
Figura 33: DSC referente à (a) Microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona e às misturas física de progesterona e alginato (b) Prog/Alg= 0,026/0,1; c) Prog/Alg= 0,055/0,1; (d) Prog/Alg= 0,101/0,1; (e) Prog/Alg=0,16/0,1; (f) Prog/Alg= 0,102/0,05.....	79
Figura 34: Curva de calibração da Carga Percentual de progesterona (%) em relação á área do pico referente à fusão da progesterona.....	80
Figura 35: DSC referente Microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona.	80
Figura 36: Imagem de MEV da microcápsula de alginato-quitosana/magnetita-progesterona.	82
Figura 37: Distribuição de tamanho referente às microcápsulas (a) alginato-quitosana; (b) alginato-quitosana/magnetita; e (c) alginato-quitosana/magnetita - progesterona.....	84
Figura 38: Imagem de MET da microcápsula alginato-quitosana/magnetita progesterona.	86
Figura 39: Perfil de liberação da progesterona na presença e ausência do campo magnético pulsante.	87
Figura 40: Correlação linear entre diferentes ordens para a cinética de liberação da progesterona ((a) $n=0$; (b) $n=1$; (c) $t^{1/2}$ (Higuchi)).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores percentuais (%) de progesterona nas misturas físicas.	58
Tabela 2: Tempos estipulados para retirada das alíquotas da amostra para análise por espectroscopia no ultravioleta.	63
Tabela 3: Tempos estipulados para retirada das alíquotas do teste com o campo magnético para análise por espectroscopia no ultravioleta.	65
Tabela 4: Parâmetros hiperfinos obtidos no Espectro Mössbauer.	71
Tabela 5: Valores percentuais (%) de progesterona e área do pico referente à sua fusão.	79
Tabela 6: Dados referentes ao percentual (%) de Umidade e Massa Seca de Microcápsulas (*DP: Desvio Padrão).	81
Tabela 7: Dados referentes à progesterona liberada (%) em 72h na ausência do campo magnético e em 12 horas na presença do campo magnético pulsante.	87

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ALG: Alginato

CBB: Centro de Biociências e Biotecnologia

CCT: Centro de Ciências e Tecnologia

DRX: Difração de Raio-X

DSC: Calorimetria Diferencial Exploratória

EPON: Resina Epoxi

Fe₃O₄: Magnetita

IVTF: Infravermelho com Transformada de Fourier

LCQUI: Laboratório de Ciências Químicas

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MAV: Magnetometria de Amostra Vibrante

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NH₄OH: Hidróxido de amônio

NPM: Nanopartículas magnéticas

PHB: Poli-hidroxibutirato

PROG: Progesterona

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RPE: Ressonância Paramagnética Eletrônica

SEPOL: Setor de Polímeros

TGA: Análise Termogravimétrica

UENF: Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UV: Ultravioleta

Resumo de dissertação apresentada ao CCT-UENF como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais.

**MICROCÁPSULAS DE ALGINATO-QUITOSANA CONTENDO
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
PROGESTERONA.**

**Melina Vasconcelos Leite
03 de Setembro de 2014.**

Orientador: Rubén J. Sánchez Rodríguez

Palavras chave: Liberação controlada de progesterona, quitosana, alginato, magnetita

A utilização de polímeros biodegradáveis, tais como a quitosana e o alginato de sódio para a liberação controlada de fármacos está sendo bastante investigada. Uma das maneiras de se controlar a liberação de um fármaco é através de um campo magnético externo e a inserção de nanopartículas magnéticas formadas por óxidos de ferro é uma opção bastante promissora. No campo da veterinária, estes sistemas possuem uma grande aplicabilidade na hormonioterapia. A progesterona é um fármaco que tem ampla aplicabilidade na sincronização do estro de equinos e ainda são necessários estudos no intuito de melhorar os sistemas já existentes para sua liberação *in vivo*. Assim, este trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para uso como um sistema de liberação controlada de progesterona. A magnetita (Fe_3O_4) foi sintetizada pelo método hidrotérmico. A análise de DRX revelou os picos característicos da magnetita, cuja presença foi confirmada pela Espectroscopia de Mössbauer. A análise de VSM mostrou um comportamento reversível, sem histerese, o que é característico de um material superparamagnético. As microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona foram produzidas pelo método emulsificação/ gelificação interna. As imagens de MEV mostraram que as partículas adquiridas apresentaram forma esférica regular e com estrutura compacta. As imagens de MET demonstraram uma organização interna bastante complexa. Foi realizado também um estudo referente à Carga Efetiva (%) de progesterona e avaliou-se o perfil de liberação da progesterona mediante a presença e ausência do campo magnético pulsante. Percebeu-se que primeiramente houve um “burst” em ambos os casos, porém após 6h de experimento liberou-se mais progesterona na presença do campo magnético externo.

Abstract of dissertation presented to the CCT-UENF as part of the requirements for the degree of Master of Engineering and Materials Science.

MICROCAPSULES OF ALGINATE-CHITOSAN CONTAINING MAGNETIC NANOPARTICLES FOR CONTROLLED RELEASE OF PROGESTERONE.

Melina Vasconcelos Leite

September 03rd, 2014

Advisor: Rubén J. Sánchez Rodríguez

Keywords: Controlled release of progesterone, chitosan, alginate, magnetite

The use of biodegradable polymers such as chitosan and sodium alginate for the controlled release of drugs has been well investigated. One way of controlling the release of a drug is by an external magnetic field and the insert of magnetic nanoparticles of iron oxides is a very promising option. In the veterinary field, these systems have a wide applicability in hormonotherapy. Progesterone is a drug that has broad applicability for estrus synchronization of equine and studies are still needed in order to improve the systems that already exist. This work aims to produce and characterize alginate-chitosan microcapsules containing magnetic nanoparticles for use as controlled release system of progesterone. Was synthesized magnetite (Fe_3O_4) by hydrothermal method and alginate-chitosan/magnetite-progesterone microcapsules were produced by emulsification/internal gelation method. The magnetite was characterized by XRD, Mössbauer Spectroscopy, VSM and SEM methods. The microcapsules were characterized by FTIR, DSC, TGA, EPR, size distribution and SEM. A study on the Effective Charge (%) was done and was evaluated the interference exerted by the magnetic field on the release of progesterone by comparing the curves of release in the presence and absence of a pulsating magnetic field. The results were satisfactory and make it clear that the microcapsules studied shows great potential as delivery system for progesterone

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Em decorrência da possibilidade de incrementar as formas farmacêuticas já existentes, muitos estudos estão sendo realizados no campo da vetorização e liberação controlada de fármacos. Neste contexto, a nanotecnologia é uma ciência que está sendo intensamente investigada para uso no tratamento e diagnóstico de uma grande variedade de doenças.

A utilização de biopolímeros para uso biomédico, sobretudo no controle da liberação de fármacos é uma alternativa bastante promissora. A quitosana é um copolímero linear catiônico, obtida a partir da quitina, o qual possui alta biocompatibilidade (Agnihotri *et al.*, 2004). O alginato de sódio é um polissacarídeo extraído de algas marinhas pardas e algumas bactérias, sendo um polímero aniônico solúvel em água. Ele vem sendo utilizado a muitos anos na indústria alimentícia, mas apresenta também características que possibilitam a sua utilização como matriz para a liberação de fármacos (Reis, *et al.*, 2006). O complexo alginato-quitosana é formado através da interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxílicos do alginato de sódio (Li, S. *et al.*, 2002).

Para aprimorar os sistemas que utilizam os biopolímeros, a inserção de nanopartículas magnéticas em sistemas de liberação controlada ocupa uma posição de destaque, pois possibilita o controle da liberação do fármaco bem como este pode ser direcionado a um órgão alvo (Phillipova *et al.*, 2011). Quando se insere nanopartículas magnéticas ao complexo alginato-quitosana/agente ativo, o sistema adquire características inovadoras e aumentam as chances de um controle efetivo do sistema de liberação controlada.

Um dos grandes desafios no campo da veterinária é desenvolver formas de administração de fármacos sem causar estresse ao animal e garantir a eficácia do procedimento. No caso de éguas, procuram-se soluções mais adequadas para a administração de fármacos relacionados ao controle da reprodução (Faria e Gradela, 2010). A progesterona é um hormônio esteróide que dentre outras funções é responsável por regular o ciclo estral das éguas e viabilizar um controle maior sobre a sua reprodução (Jameela *et al.*, 1998).

A grande dificuldade, no entanto, é o desenvolvimento de metodologias viáveis financeiramente e de fácil reprodutibilidade. Assim, julgam-se extremamente

necessários os esforços para o incremento das técnicas já existentes e descoberta de novas metodologias mais eficazes para promover a liberação de progesterona em equinos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar microcápsulas de alginato-quitosana com um núcleo magnético (Fe_3O_4) para a liberação controlada e vetorizada de progesterona. A intenção é produzir um sistema para a liberação de progesterona para seu uso na sincronização do estro em equinos.

1.1.2 Objetivos específicos

Este trabalho possui como objetivos específicos:

- Desenvolver uma metodologia para a produção de nanopartículas magnéticas à base de óxido de ferro (Fe_3O_4);
- Caracterizar morfológicamente as nanopartículas magnéticas principalmente quanto ao tamanho e propriedades magnéticas;
- Desenvolver uma metodologia para formulação de microcápsulas de alginato-quitosana e inserção as nanopartículas magnéticas;
- Caracterizar as microcápsulas com núcleo magnético, especialmente quanto ao tamanho, forma e interação entre seus componentes;
- Fazer um estudo preliminar da liberação da progesterona na presença e na ausência de um campo magnético pulsante a fim de se avaliar a sua influência na taxa de liberação.

1.2 Justificativa

O uso das nanopartículas magnéticas vem se destacando nas áreas da biomedicina, biotecnologia, engenharia e meio ambiente. Ao se avaliar a evolução das novas técnicas de liberação controlada e vetorizada de fármacos, observa-se o advento da nanotecnologia. Neste contexto, a utilização de nanopartículas magnéticas inseridas em complexos poliméricos pode ser uma chance de revolucionar o tratamento de inúmeras patologias.

A linha de pesquisa do nosso grupo de trabalho, direcionada ao desenvolvimento de matrizes contendo cargas magnéticas, visa contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias para a formulação de micropartículas poliméricas com núcleo magnético e aperfeiçoar os procedimentos já existentes.

Estudos recentes demonstram a eficiência do controle da liberação de fármacos utilizando micropartículas poliméricas com núcleo magnético. São diversas as classes de agentes ativos que podem ser inseridas nas micropartículas poliméricas e devido à possibilidade de controlar seu tamanho, é possível realizar sua administração por diversas vias (Silva, C. *et al.*, 2003). Assim, o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e apuradas para a sua formulação são extremamente necessárias (Faraji, M. *et al.*, 2010).

O controle da liberação de fármacos com o auxílio de nanopartículas magnéticas com revestimento polimérico também é visada no campo da medicina veterinária. É extremamente necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos eficaz a fim de se reduzir a repetição da administração do medicamento e garantir uma concentração adequada e conhecida na corrente sanguínea do animal. Além disso, um sistema ideal de liberação controlada irá contribuir para tratamentos mais viáveis financeiramente, além de garantir um tempo menor despendido para o tratamento e reduzir a exposição humana a certos compostos veterinários que não são seguros de se lidar (Rothen-Weinhold *et al.*, 2000). São diversos os produtos veterinários capazes de serem vinculados às micropartículas, porém destacam-se aqui aqueles que são utilizados no controle da fertilidade em equinos, como por exemplo, o hormônio progesterona (Faria e Gradela, 2010).

O desafio nesta área é produzir um dispositivo que transporte de forma

direcionada o hormônio e controle a sua liberação para manter os níveis desejados na corrente sanguínea. Neste âmbito, nossos esforços serão concentrados em desenvolver uma formulação utilizando como veículo transportador micropartículas alginato-quitosana com um núcleo magnético que nos permita direcionar e controlar a liberação da progesterona por efeito de um campo magnético externo em equinos como parte da estratégia de controle do ciclo reprodutivo em éguas para estudos de melhoramento genético, realizados no Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias da UENF.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Liberação de fármacos

2.1.1 Liberação controlada de fármacos

A maneira como um fármaco é liberado organismo pode ter um grande efeito na sua eficácia terapêutica. Nos sistemas convencionais de liberação (Figura 1B), há uma mudança cíclica na concentração do fármaco, sendo que os seus níveis sofrem variações discrepantes, oscilando os níveis acima da qual é tóxica e abaixo da qual é eficaz. Assim, a concentração do fármaco no plasma pode sofrer com momentos de ineficiência e toxicidade, o que pode requerer a administração de várias doses ao dia.

Já a liberação controlada (Figura 1A) se refere às formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante, seja ela de forma lenta ou rápida, e as concentrações plasmáticas permanecem invariáveis com o tempo. Pode-se perceber que no sistema de liberação controlada, a concentração do agente ativo permanece constante no plasma por um longo período sem atingir o nível tóxico ou ficar abaixo do nível efetivo mínimo. Neste caso, a frequência de administração é diminuída e a adesão do paciente à terapia pode aumentar. Além disso, a quantidade do fármaco a ser administrada pode ser menor; há um controle maior da sua absorção; a margem de segurança pode ser aumentada e a incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos pode ser diminuída (Dash, A. e Cudworth II, 1998; Timko *et al.*, 2010).

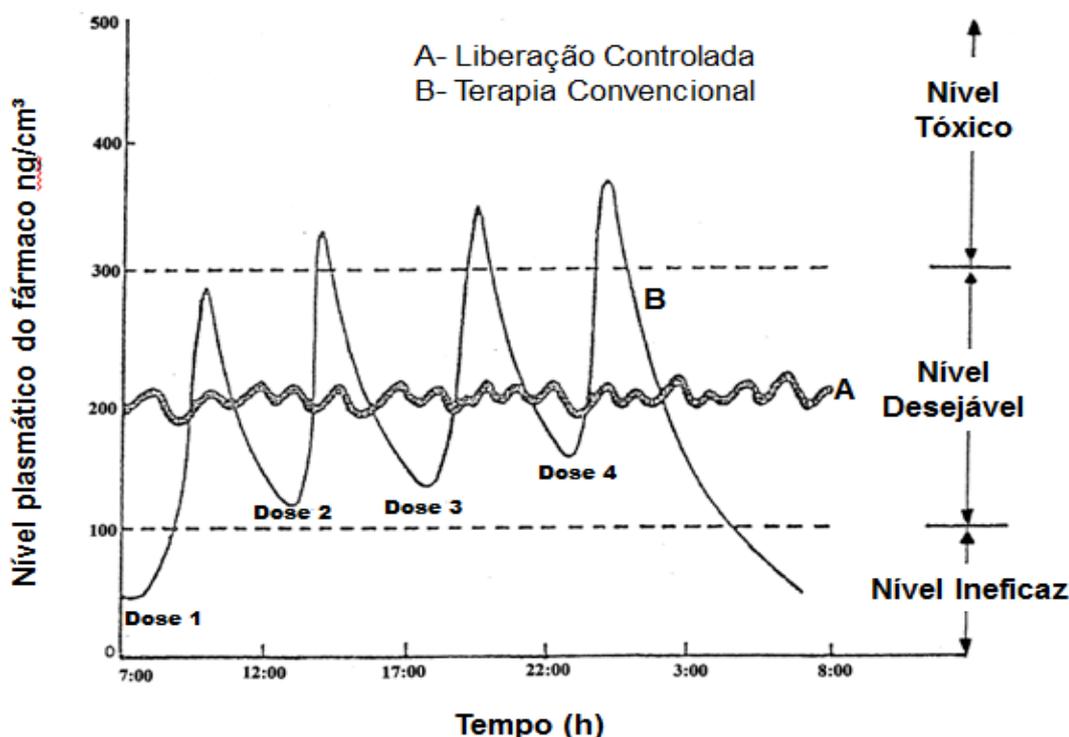


Figura 1: Perfil do nível plasmático de um fármaco versus tempo, administrado da forma (A) controlada; e (B) convencional (Dash, A. e Cudworth II, 1998 - adaptado).

A maioria dos fármacos apresenta diversas limitações, dentre elas pode-se citar baixa solubilidade, a qual facilita sua agregação; alta toxicidade; alta dosagem para produzir a resposta desejada; liberação inespecífica; sofre degradação em meios fisiológicos e possui uma meia-vida curta. Esses fatores contribuem para a necessidade de desenvolvimento de formas estratégicas de tecnologias de liberação. Novos sistemas estão sendo almejados a fim de se melhorar a eficácia e a farmacocinética do agente ativo e protegê-lo contra degradação *in vivo*.

Uma dessas opções é o desenvolvimento de micropartículas poliméricas. Elas apresentam uma grande potencialidade na liberação de fármacos, pois possui uma estrutura capaz de ser modificada e funcionalizada com ligantes; promove um controle sobre a cinética de liberação e é capaz de encapsular uma grande variedade de substâncias e com grande eficácia (Parveen *et al.*, 2012).

As micropartículas poliméricas podem ser divididas em microcápsulas e microesferas (Figura 2). As microcápsulas são sistemas reservatórios em que o fármaco fica retido em um núcleo, podendo a microcápsula ser mononuclear ou polinuclear. As microesferas são sistemas matriciais (sistema monolítico) e podem

ser divididas em soluções monolíticas (sistema homogêneo), em que o fármaco é solúvel na matriz, e em dispersões monolíticas (sistema heterogêneo), em que parte do fármaco é solúvel e a outra parte é dispersa na matriz (Siepmann e Siepmann, 2012; Silva, C. *et al.*, 2003).

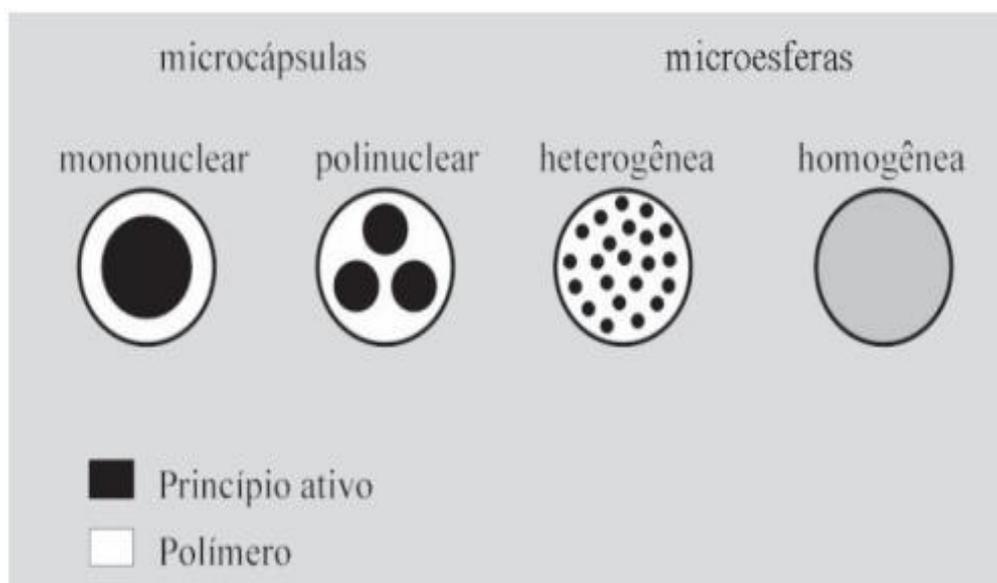


Figura 2: Diferença estrutural entre microcápsulas e micropartículas (Silva, C. *et al.*, 2003).

A liberação controlada de fármacos muitas vezes é estudada através de modelos matemáticos que descrevem as características da liberação. Por muitas vezes, o objetivo do sistema é promover uma liberação de ordem zero, no entanto, algumas doenças ou desequilíbrios fisiológicos necessitam de uma administração intermitente da droga a fim de manter uma variação dos níveis plasmáticos ou então uma administração periódica para mimetizar a variações fisiológicas normais (Edelman e Langer, 1993; Satarkar e Hilt, 2008).

Os principais modelos matemáticos utilizados são (Costa, P.J.C., 2002; Costa e Lobo, 2001):

- Cinética de Ordem Zero, em que a taxa de liberação é constante até que todo o fármaco seja liberado;
- Cinética de Higuchi ($t^{-1/2}$), em que a taxa de liberação diminui proporcionalmente em relação à raiz quadrada do tempo;
- Cinético de primeira ordem, em que a taxa de liberação diminui exponencialmente em relação ao tempo.

2.2.2 Liberação Vetorizada de fármacos

A ideia de um sistema vetorizado que pudesse entregar uma droga em um local determinado do corpo é datada do início do século XX, mais precisamente de 1906, quando o bacteriologista Paul Ehrlich propôs a ideia do “ZauberKugel”, termo que foi traduzido para o inglês como “Magic Bullet”, ou bala mágica. No modelo proposto por Paul Ehrlich, o fármaco é ligado a um agente transportador e sua ação terapêutica acontece apenas no órgão alvo (Santos e Castanho, 2002).

A grande importância de um sistema de liberação controlado e vetorizado é transportar o fármaco até o local desejado e tratar a doença sem provocar efeitos indesejáveis no restante do organismo (Chomoucka *et al.*, 2010). E neste contexto, os sistemas com tamanhos na ordem de nanômetros e micrometros possuem justamente a vantagem de conseguir chegar a um órgão alvo com maior facilidade e poder levar pequenas doses do agente ativo. Assim, os efeitos adversos são minimizados e a tolerância sistêmica e local do fármaco pode ser evitada (Parveen *et al.*, 2012; Yigit *et al.*, 2012).

Existem diversas formas de modular e direcionar a liberação de um fármaco, como por exemplo, a temperatura e o pH, que são estímulos biológicos, e o ultrassom e o campo magnético, que são estímulos externos. No caso da temperatura, podem ser desenvolvidas nanopartículas que liberem o fármaco apenas em temperaturas pré-determinadas. A droga encapsulada irá circular na corrente sanguínea, no entanto, a aplicação do estímulo hipertérmico irá ocorrer apenas no local onde se deseja a ação, causando a liberação apenas nesta região. Os valores de pH extracelular e intracelular em sistemas biológicos são extremamente influenciados pelas patologias. Devido a isso, sistemas carreadores de fármacos que sejam sensíveis às variações de pH podem ser utilizados para transportar e liberar substâncias em um local específico. O ultrassom é mais utilizado em micelas encapsuladoras de fármacos que, ao serem injetadas em um tumor, por exemplo, podem ser submetidas à sonicação, resultando na liberação do agente terapêutico. O campo magnético aplicado em microcápsulas contendo nanopartículas magnéticas pode direcionar fármacos para alvos específicos e controlar a sua liberação de acordo com a necessidade, com o auxílio de um campo magnético externo (Ganta *et al.*, 2008).

2.2 Biopolímeros

Os biopolímeros apresentam um grande potencial como agente de liberação de medicamentos. Os principais polímeros utilizados na preparação de carreadores são os naturais modificados, derivados da albumina, colágeno, ácido hialurônico, gelatina, celulose, quitosana e alginato de sódio, além dos polímeros sintéticos PHEMA (poli-(2-hidroxietil metacrilato), PVA (acetato de polivinila), PEG (polietilenoglicol) e a poli(acrilamida) (Villanova *et al.*, 2010).

Os polímeros que são adquiridos de fontes naturais de recursos renováveis são ainda mais interessantes, pois apresentam um baixo custo, solubilidade em água, biocompatibilidade, biodegradabilidade, habilidade de formar gel e boa disponibilidade (Reis *et al.*, 2006).

Algumas características intrínsecas dos polímeros são exploradas para o uso como sistemas de liberação de fármacos, tais como biodegradabilidade, bioadesão, capacidade de formar hidrogéis (estrutura tridimensionais com elevado teor de água), além de poderem ser biomiméticos e bioativos. Nos sistemas à base de polímeros, os mecanismos de liberação mais conhecidos são difusão, dissolução, intumescimento, precipitação, erosão e/ou degradação. Os principais polímeros naturais utilizados como carreadores de fármacos são os hidrogéis quitosana, alginato, sulfato de condroitina, gelatina, dextrina, hialuronana e poli(lisina) (Villanova *et al.*, 2010).

2.2.1 Quitosana

A quitosana (Figura 3) é um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-*N*-acetil-*D*-glucosamina e 2-desoxi-*D*-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β (1-4), obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina (nome que vem do grego *chiton*, o qual significa cobertura ou envoltura) é um polímero linear natural branco, duro, inelástico, obtido a partir do exoesqueleto de crustáceos, insetos, e alguns fungos, sendo insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, o que explica sua baixa reatividade química (Agnihotri *et al.*, 2004).

A quitosana é uma base fraca insolúvel em água e em solventes orgânicos. Os grupos amina presentes em toda a extensão da cadeia polimérica atuam como

polieletrólitos catiônicos em $\text{pH} < 6,5$, ou seja, possuem grupos catiônicos ionizáveis ao longo da cadeia. Assim, este biopolímero pode se dissolver facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, sendo o ácido acético o solvente mais empregado, formando uma solução viscosa. Por outro lado, conforme o pH é ajustado para valores acima de 6,5, os grupamentos amina se tornam desprotonados e o polímero perde suas cargas, tornando-se insolúvel em água e em solventes orgânicos (Dash, M. *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2004).

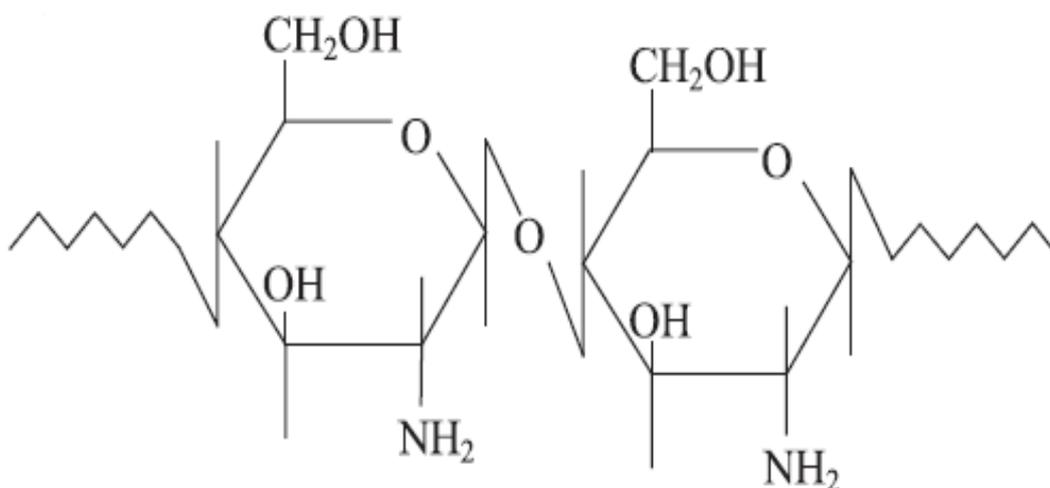


Figura 3: Estrutura da Quitosana (Aghinitori *et al.*, 2004).

O grau de desacetilação da quitosana é uma característica muito importante. Ele determina o número de ligações de hidrogênio intermoleculares, as quais são responsáveis pela propriedade de filme e formação de fibra pela quitosana. A extensão da dissociação das ligações de hidrogênio pode influenciar na cinética de formação do hidrogel de quitosana. Em pH baixo, a dissociação das ligações de hidrogênio devido a protonação dos grupos amina leva a uma expansão ainda mais rápida do gel formado (Hejazi e Amiji, 2003).

Nos últimos 25 anos, a quitosana vem sendo intensamente pesquisada devido às suas características intrínsecas. Dentre elas destacam-se a atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (Zhang, L. *et al.*, 2010), baixa imunogenicidade, policatiónica (Chen, J. *et al.*, 2011), capacidade de formar hidrogel, bioadesão, contem grupos reativos -OH e -NH₂, é um ótimo carreador para substâncias hidrofílicas (Sinha *et al.*, 2004) e possui elevada resistência mecânica (Bhatt *et al.*, 2010).

Ela pode ser degradada por diversas enzimas, dentre as quais muitas se encontram nas mucosas e outros fluidos fisiológicos, como por exemplo, lisozima, di-*N*-acetilquitobiase, *N*-acetil- β -*D*-glucosaminidase e quitotriosidade. Estudos demonstram que a quitosana possui uma boa retenção na corrente sanguínea e se acumula lentamente nos tecidos, característica importante no que diz respeito ao transporte de fármacos que são excretados rapidamente (Dash, M. *et al.*, 2011). A sua citotoxicidade é dependente da concentração. Testes clínicos conduzidos com biomateriais compostos por quitosana não relataram reações inflamatórias ou alérgicas após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (Sinha *et al.*, 2004).

Existem duas formas principais de produzir nanopartículas contendo quitosana, que são reticulação covalente e interação física. A reticulação necessita de um agente, como o glutaraldeído, epícloridrina e genipina, por exemplo. Já a interação física envolve diversos métodos como secagem por aspersão (“spray-drying”), gelificação iônica, microemulsão reversa, evaporação/difusão de solvente, complexação de polieletrólitos e coacervação/precipitação. A complexação de quitosana com poliânions como pectina, colágeno, copolímero de ácido maléico-polialquileneóxido e alginato de sódio mostra-se eficiente para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Sinha *et al.*, 2004; Agnihotri *et al.*, 2004).

Atualmente, a quitosana já vem sendo utilizada para encapsular diversos fármacos, como por exemplo, calcitonina, citostáticos, albumina bovina, hemoglobina, insulina, ciclosporina, antibióticos, ovoalbumina, mitoxantrona, antiinflamatórios e ácidos nucleicos (Bhattarai *et al.*, 2011).

2.2.2 Alginato de sódio

As indústrias farmacêuticas e biomédicas apresentam grande interesse no uso do alginato de sódio, principalmente, por ser biocompatível, hidrofílico, biodegradável em condições fisiológicas normais e ter um custo relativamente baixo, além de possuir propriedades de bioadesão e baixa toxicidade (Lee, K. Y. e Mooney, 2012).

O alginato de sódio (Figura 4) é um polissacarídeo não ramificado natural (extraído de algas marinhas pardas e algumas bactérias) formado por dois tipos de ácido poliurônico, o ácido β -*D*-manurônico (M) e ácido α -*L*-gulurônico (G) unidos por

ligações (1→4)-glicosídicas, de composição e sequência variada (Martins *et al.*, 2007). Estes monômeros são epímeros com orientações diferentes na cadeia polimérica e a unidade G é a responsável por permitir a ligação iônica cruzada (Lawrie *et al.*, 2007).

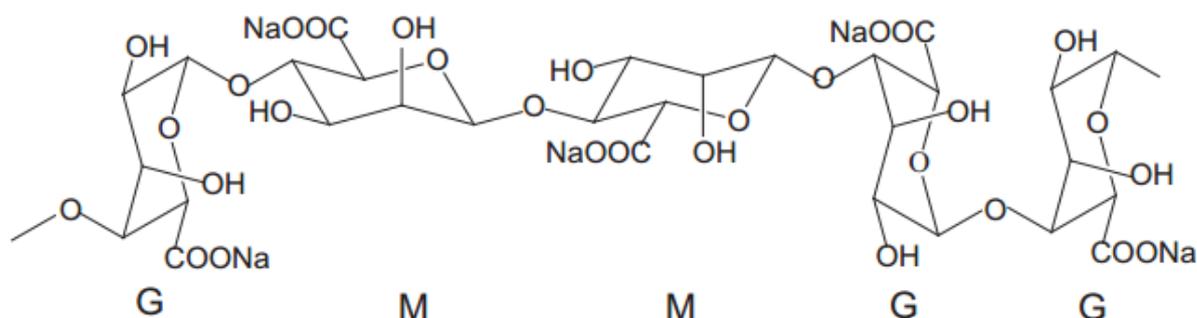


Figura 4: Estrutura química do alginato de sódio (Yang *et al.*, 2011).

O alginato é um polímero hidrofílico, insolúvel em etanol, em soluções hidroalcoólicas contendo mais de 30% (v/v) de etanol e em solventes orgânicos. Sabe-se que a solubilidade do alginato é decisivamente influenciada pelo pH do meio. Os valores de pKa (constante de dissociação do ácido) das unidades ácido manurônico e ácido gulurônico do alginato é de 3,38 e 3,65, respectivamente. Quando o pH é inferior ao pKa do alginato, este sofre precipitação levando à formação do ácido algínico, o qual é insolúvel em água. Quando o valor do pH se encontra acima desse valor, o alginato torna-se carregado negativamente. Ele é quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, sendo que valores muito ácidos causam sua descarboxilação. A viscosidade do polímero varia de acordo com os valores de pH, sendo que, a viscosidade aumenta à medida que o pH diminui. A massa molar do alginato comercial gira em torno de 32.000 e 400.000 g/mol (Lee, K.Y. e Mooney, 2012).

Os monômeros G e M são arranjados em estrutura de blocos, sendo que sua composição e distribuição variam com a fonte do alginato, isto é, das espécies de algas e bactérias, estações do ano, momento da colheita, parte da alga em que foi retirado e condições de crescimento (Vos *et al.*, 2006). A composição dos resíduos das unidades M e G e a extensão da sua sequência e o peso molecular determinam as características físico-químicas do alginato. A viscosidade varia proporcionalmente de acordo com o teor de resíduos G e principalmente, com o peso molecular do

polímero. Alguns estudos demonstram que quanto maior o teor de resíduos G, maior será a rigidez do gel formado (Lee, K.Y. e Mooney, 2012). Contudo, sabe-se que teores altos de resíduos G resultam em partículas com grande granulometria e elevada polidispersividade e em géis com alta porosidade. Já nos sistemas com elevado teor de M, nota-se a produção de géis mais fracos, elásticos e mais estáveis ao congelamento/descongelamento (Yang *et al.*, 2011).

A gelificação do alginato é convencionalmente descrita em termos do modelo de “egg box” (“caixa de ovo”) (Figura 5). Esta é uma estrutura tridimensional formada a partir da substituição dos íons de sódio pelos íons de cálcio dentro da macromolécula de alginato. Isso ocorre quando íons de cálcio são adicionados a uma dispersão contendo alginato, culminando na formação de uma membrana entre a estrutura do alginato e a solução de eletrólitos. Os íons de sódio produzidos na dissociação do sistema migram através da membrana para a solução de eletrólitos e os íons de cálcio ocupam seus espaços favorecendo a formação do gel. Deve-se ressaltar que as condições de formação do gel não são agressivas para o agente a ser encapsulado (Reis *et al.*, 2006).

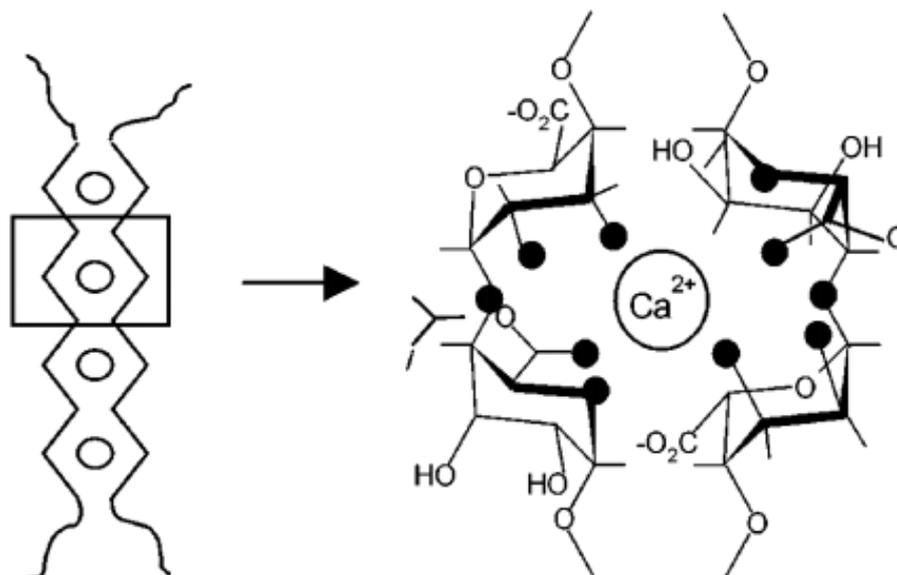


Figura 5: Esquema representativo do modelo “egg box”. Os pontos negros representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação com os íons cálcio (Braccini e Pérez, 2001).

A quantidade de cálcio no sistema determina se a associação entre as cadeias será temporária ou permanente. Quando os níveis de cálcio são reduzidos, há uma indução de um aumento da viscosidade, resultando em uma associação temporária. Em contrapartida, se há uma alta concentração de cálcio, a precipitação do sistema é favorecida, resultando em uma associação permanente (George e Abraham, 2006). A interação com o cálcio é estabelecida pelas unidades gulurônicas através de uma interação iônica, levando à formação de um forte gel termoestável (Reis *et al.*, 2006).

Existem diversas fontes de cálcio para estabelecer a interação com o alginato, dentre elas os sais de oxalato, tartarato, fosfato, citrato, cloreto e carbonato. Estudos anteriores demonstraram que os sais de oxalato, tartarato e fosfato apresentaram problemas que inviabilizaram o seu uso. O citrato de cálcio possibilitou a formação de partículas com alta polidispersividade e com instabilidade em determinados valores de pH. O cloreto de cálcio é a fonte de cálcio mais utilizada, porém possui a característica de ser extremamente solúvel em soluções aquosas, o que pode em alguns casos, ser um fator limitante. Isso por que promove uma gelificação imediata do alginato, contribuindo para a formação de partículas cujo tamanho não é possível controlar, bem como pode formar grandes aglomerados de massa de alginato. Já a suspensão de carbonato de cálcio-alginato, demonstrou estabilidade em uma grande quantidade de valores de pH e as nanopartículas produzidas se apresentaram mais esféricas e estáveis e com uma granulometria unimodal.

Outro fator importante é o tamanho do grão do sal de cálcio. Sabe-se que quanto menor for grão, mais quantidade de cálcio conseguirá difundir entre as cadeias do alginato. Assim, a rede polimérica formada será mais estável e as partículas resultantes serão mais esféricas e com menor tendência a se aglomerarem. Por isso, algumas vezes recorre-se à sonicação do sal de cálcio por um determinado período de tempo. Para que ocorra a solubilização dos sais de cálcio é necessária a adição de ácido, no caso, o mais utilizado é o ácido acético (Reis *et al.*, 2006; Lee K.Y. e Mooney, 2012; Poncelet *et al.*, 1995).

Inicialmente as partículas de alginato eram preparadas utilizando-se somente a metodologia da gelificação ionotrópica, porém diversas técnicas surgiram com o passar dos anos, como reticulação iônica, reticulação covalente e gelificação térmica (Lee, K.Y. e Mooney, 2012). Atualmente diversos fármacos convencionais são encapsulados utilizando o alginato, como por exemplo, a rifampicina, a isoniazida, a

pirazinamida, o etambutol e a doxorubicina (Reis *et al.*, 2006).

Freqüentemente, o alginato é utilizado juntamente com outro polímero a fim de se melhorar as suas propriedades. No caso do presente trabalho, utilizou-se a associação entre o alginato e a quitosana.

2.2.3 Complexo polimérico alginato-quitosana

O complexo alginato-quitosana é formado a partir da forte interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos do alginato (Figura 6). A estabilidade do complexo alginato-quitosana pode ser influenciada por parâmetros como o pH e força iônica, devido a protonação do grupo amino da quitosana e a ionização do grupo ácido carboxílico do alginato (Li, S. *et al.*, 2002).

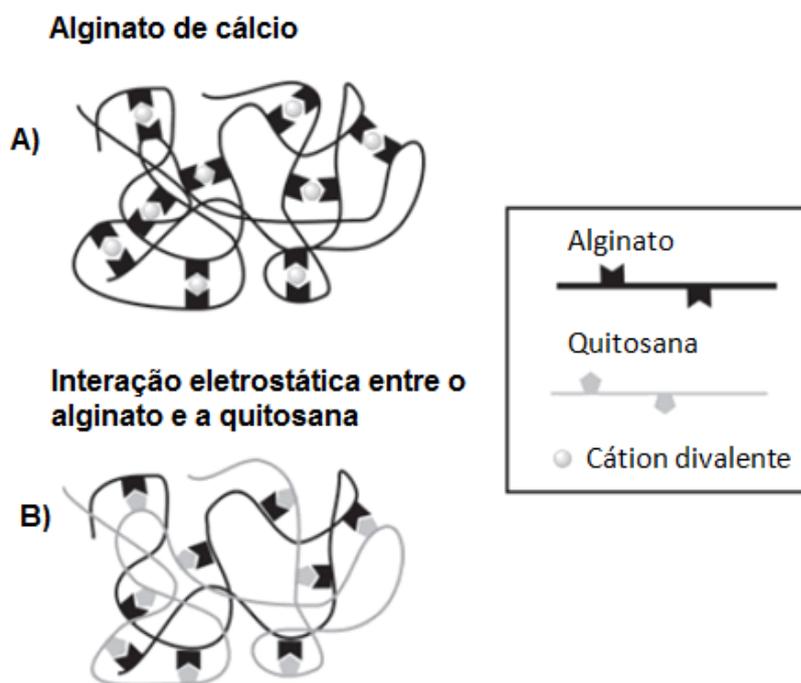


Figura 6: Representação esquemática da interação entre o alginato com (a) íons cálcio e (b) quitosana (Lawrie *et al.*, 2007 – adaptado).

Neste complexo, o alginato de sódio geralmente é o componente utilizado como matriz. Isso porque ele sofre uma gelificação rápida na presença de íons cálcio (Li, S. *et al.*, 2002). A quitosana é utilizada para reforçar a microcápsula de alginato, inibir a presença de cargas superficiais, aumentar a sua estabilidade,

favorecer a encapsulação do agente ativo (Ribeiro *et al.*, 2005) e impedir a erosão rápida do gel de alginato (Tønnesen e Karlsen, 2002). Outro fator importante, é que o alginato tem uma tendência a adquirir poros em sua estrutura, assim, a formação de uma membrana de quitosana na superfície da microcápsula tende a diminuir a taxa de liberação da substância presente em seu interior (Bhattarai *et al.*, 2011).

Além de ser biodegradável e biocompatível, o complexo polimérico é mecanicamente forte em baixos valores de pH em que a quitosana é solúvel, assim, a fácil dispersibilidade da quitosana em meio ácido é prevenida pela presença do alginato que é insolúvel em condições ácidas (Lucinda-Silva *et al.*, 2010).

O mecanismo de liberação do complexo alginato-quitosana depende do pH do meio. Em pH baixo, a taxa de liberação é aumentada devido à maior solubilidade do complexo. Quando ele se encontra em meio neutro, o complexo viscoso intumescce e o gel formado se desintegra liberando o fármaco lentamente. O grau de liberação é influenciado pelo nível de reticulação entre os dois polímeros, fator dependente do mecanismo usado para a produção do complexo (Tønnesen e Karlsen, 2002).

Os produtos de degradação do complexo alginato-quitosana são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou excretados na urina (Villanova *et al.*, 2010).

Wittaya-Areekul e colaboradores (2006) enfatizaram em seu trabalho outra propriedade importante do complexo alginato-quitosana que é a mucoadesividade. Eles compararam dois métodos diferentes de produção de micropartículas de quitosana e alginato contendo prednisolona e ressaltaram a grande importância da escolha da metodologia usada para a formação da partícula e a sua influência nas propriedades da superfície da mesma.

Gåserød e colaboradores (1998) desenvolveram um trabalho referente à interação existente entre a quitosana e o alginato. Foram avaliadas diversas metodologias sendo as amostras submetidas a diversas condições físicas diferentes. Segundo os autores, conhecendo profundamente os procedimentos a serem utilizados, facilita-se o controle das propriedades funcionais do complexo. Eles verificaram que é de suma importância alguns fatores, como: (1) conhecer a composição dos polímeros utilizados (como por exemplo, o grau de desacetilação e a massa molecular da quitosana e a quantidade de monômeros G e M presentes no alginato); (2) conhecer as propriedades da fonte dos íons de cálcio necessários na reação de gelificação do alginato; (3) o pH do sistema deve ser rigorosamente

controlado; (4) a etapa de lavagem das esferas deve ser cuidadosa; e (5) deve-se fazer um estudo minucioso à respeito das concentrações dos reagentes a serem utilizados.

Existem diversos procedimentos para a formulação de microcápsulas de alginato-quitosana, mas os principais métodos são a secagem por aspersão (“spray-drying”), gelificação externa e emulsificação/gelificação interna.

Mladenovska *et al.* (2007) utilizaram o método secagem por aspersão (“spray-drying”) para produzirem partículas de alginato-quitosana, porém apesar de terem adquirido partículas com o tamanho entre 3-6 μm , elas apresentaram-se achatadas, em formato de disco e com certa porosidade. Crcarevska *et al.* (2008), também utilizaram o secagem por aspersão (“spray-drying”) e obtiveram partículas sem uma esfericidade ideal, apresentando um colapso no seu centro. Rohani *et al.* (2014) obtiveram partículas com larga distribuição de tamanhos e formas, sendo que, uma parcela adquiriu forma achatada e a outra uma forma esférica, porém com “buracos” em sua superfície.

Honary e colaboradores (2009) descreveram duas formas de realizar o método de gelificação externa. Em uma delas, essencialmente, uma solução de alginato de sódio é gotejada diretamente sobre uma solução de quitosana contendo cloreto de cálcio (CaCl_2), formando uma membrana de um complexo coacervado na interface entre o alginato e a solução de quitosana. Um complexo alginato-quitosana é formado em volta de um núcleo líquido de alginato. Poderia também ser feito um tratamento do núcleo líquido com a adição de uma solução de cloreto de cálcio após a formação da membrana. Outra metodologia para a formação do complexo alginato-quitosana ocorre basicamente através de duas etapas. Primeiramente, são produzidas micropartículas de alginato de cálcio, as quais são lavadas em uma solução livre de íons cálcio e posteriormente são suspensas em uma solução de quitosana para a formação da membrana.

Lee, M. e colaboradores (2009) utilizaram o método de gelificação externa, no qual uma solução de alginato foi gotejada em uma solução de CaCl_2 contendo quitosana. Eles adquiriram micropartículas com distribuição de tamanho em torno de 10-60 μm e com o diâmetro médio de 27 μm .

Lim e colaboradores (2013) realizaram o procedimento de gelificação externa de maneira inversa. Eles gotejaram uma solução de quitosana com CaCl_2 em uma solução de alginato de sódio. Eles verificaram que o tamanho da partícula era

influenciado pela velocidade de agitação do sistema e do tipo de alginato presente. No entanto, em todos os casos eles obtiveram partículas deformadas e com diâmetro acima de 1 mm.

O método de emulsificação/gelificação interna se baseia, fundamentalmente, na adição (gotejamento) de uma fase aquosa contendo alginato de sódio e um sal de cálcio insolúvel (CaCO_3 , por exemplo) em uma fase oleosa formando uma emulsão água em óleo (A/O). O pH é ajustado para ácido para que ocorra a liberação de íons Ca^{2+} . Após a separação da suspensão aquosa, esta é adicionada a uma solução de quitosana onde permanece durante um tempo para a finalização da reação. Após esta etapa as microcápsulas são separadas, lavadas e secas (Li, C. *et al.*, 2002).

Poncelet *et al.* (1995) utilizaram o método emulsificação/gelificação interna e testou inúmeras variáveis. Eles obtiveram partículas esféricas e com diâmetros inferiores a $150\mu\text{m}$. Ribeiro, A.J. e colaboradores (1999) usaram a mesma técnica e obtiveram microesferas de alginato-quitosana com diâmetro variando entre 120 e $1600\mu\text{m}$, dependendo da concentração dos polímeros e das rotações utilizadas durante o processo.

Li, C. e colaboradores (2002) também utilizaram o procedimento emulsificação/gelificação interna e foram obtidas micropartículas de alginato-quitosana com forma esférica, boa dispersão e diâmetro médio de $77,28\mu\text{m}$. Outra característica importante observada foi que não se detectou a destruição da substância encapsulada durante o processo de síntese das micropartículas.

Song *et al.* (2013) compararam o método de gelificação externa, no qual utilizou CaCl_2 , com o método de emulsificação/gelificação interna, no qual utilizou CaCO_3 . No primeiro caso eles obtiveram partículas com menor esfericidade e sem uniformidade no tamanho. Eles alegaram que isso ocorreu devido à forma irregular de distribuição e difusão de Ca^{2+} adicionado, promovendo uma gelificação desuniforme antes do endurecimento da microcápsula. Em contrapartida, utilizando o método de emulsificação/gelificação interna eles conseguiram uma morfologia esférica muito melhor, uma superfície mais lisa e uma maior homogeneidade no tamanho.

Martín-Villena *et al.* (2013) utilizaram o método emulsificação/gelificação interna e adquiriram micropartículas com diâmetro em torno de $56\mu\text{m}$, com o aspecto homogêneo, relativamente esféricas e com uma superfície levemente

rugosa. Eles puderam perceber que a inserção do encapsulante não danificou a forma esférica da microcápsula.

2.3 Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPM) podem ser definidas como sólidos com propriedades magnéticas com tamanho abaixo de 100nm que podem ser manipuladas através da influencia de um campo magnético externo (Willard *et al.*, 2004). No campo da biotecnologia, a utilização de NPM está sendo estudada para muitas aplicações como: (1) imobilização de proteínas, peptídeos e enzimas; (2) bioseparação, imunoenaios, transporte e liberação controlada de fármacos ou genes (pois interage com os genes impedindo a degradação por nucleases); (2) biosensores, imagem de ressonância magnética (MRI) (Patel *et al.*, 2009; Mornet *et al.*, 2004); (3) hipertermia terapêutica (Bañobre-López *et al.*, 2013); e (4) diagnóstico *in vivo* e *in vitro* (Herea *et al.*, 2011).

Os parâmetros que definem o comportamento das NPM são principalmente superfície e o seu tamanho. A superfície é importante para se impedir a ação do sistema imunológico e aumentar o tempo de circulação na corrente sanguínea. Quando se liga a nanopartícula a uma molécula neutra ou hidrofílica, a meia vida do material pode aumentar de minutos para horas ou dias (Arruebo *et al.*, 2007).

O diâmetro médio das nanopartículas influencia, não só as propriedades magnéticas, como também o tempo de permanência no organismo, a velocidade que atravessam a barreira endotelial e o seu reconhecimento pelo sistema imuno fagocitário. Para aplicações biomédicas, o tamanho ideal para as NPM é em torno de 5 a 20nm podendo chegar até a 100nm dependendo do objetivo ao qual ela se propõe (Patel *et al.*, 2009), isso porque neste tamanho elas conseguem escapar do rápido clearance renal e da eliminação pelo sistema retículoendotelial (SER), além de ser possível atravessar as barreiras biológicas (Shubayev *et al.*, 2009). Sabe-se que quanto mais próxima de um formato esférico e maior for a uniformidade de tamanho, melhor será a eficiência e aplicabilidade da nanopartícula (Jain *et al.*, 2007).

As NPM podem ser manejadas de duas formas principais: um núcleo magnético envolto por um polímero biocompatível ou um polímero biocompatível poroso no qual as nanopartículas se precipitam nos poros. Muitas substâncias

bioativas como as enzimas, proteínas, antibióticos e agentes anticâncer têm sido usadas ligadas a estas estruturas magnéticas (Mahmoudi *et al.*, 2011). É importante salientar que para ocorrer essa interação de forma eficiente e promissora é necessário que as partículas possuam como características um tamanho adequado, forma esférica, boa dispersão em meio líquido, devem ter um alto momento magnético e mudar sua magnetização rapidamente (Willard *et al.*, 2010).

Um dos problemas enfrentados na síntese das NPM é sua intrínseca instabilidade durante longos períodos de tempo, assim elas tendem a se agregarem (Lu *et al.*, 2007). Essa aglomeração ocorre devido às forças de atração de Van der Waals combinada com a forte atração magnética dipolo-dipolo e à atração eletrostática existente (Ma *et al.*, 2007), além da necessidade de redução da energia associada à grande área de superfície. O problema mais sério é o perigo de acontecerem essas aglomerações no tratamento *in vivo* na corrente sanguínea (Willard *et al.*, 2010), apesar do risco de formação de aglomerados em temperatura ambiente serem menores (Lu *et al.*, 2007).

A aglomeração pode ocorrer em qualquer estágio do processo, tanto na síntese, secagem, manipulação e/ou pós-processamento. Existem diversas formas de se evitar este evento, mas as principais é a utilização de surfactantes durante a síntese, pois ele diminui a interação entre partículas através do aumento das forças de repulsão (Willard *et al.*, 2010) e o revestimento da estrutura magnética com tensoativos (Zhang *et al.*, 2010) e polímeros (Chen J. *et al.*, 2011; Li G. *et al.*, 2008; Finotelli *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2007).

As NPM são fisiologicamente inertes, mas quando na corrente sanguínea elas podem sofrer adsorção pelas proteínas do plasma, ou opsonização, como o primeiro passo na eliminação pelo sistema reticuloendotelial (SER). Assim, o revestimento das nanopartículas com uma camada hidrofílica de polissacarídeos diminui o recobrimento por componentes do plasma e assim permite manter-se no local onde foi inserida por um período mais longo de tempo (Chen, J. *et al.*, 2011).

A inserção das nanopartículas magnéticas em sistemas poliméricos é uma alternativa para a vetorização e o controle da liberação de medicamentos.

2.3.1 Nanopartículas magnéticas na Liberação Vetorizada e Controlada de Fármacos

O superparamagnetismo (Figura 7) é um comportamento observado em nanopartículas magnéticas e implica que a magnetização do material desaparece quando o campo magnético externo é removido, ou seja, quando o estímulo externo é retirado, não há magnetização remanescente (Gupta, A. K. e Gupta, M., 2005). Nos materiais superparamagnéticos, as características são parecidas com as dos materiais paramagnéticos, porém a magnetização possui uma intensidade muito maior. Isso porque as nanopartículas possuem um único domínio magnético e a sua magnetização é considerada como um único e enorme momento magnético, soma de todos os momentos magnéticos individuais carregados pelos átomos (Mornet *et al.*, 2004). As nanopartículas possuem um diâmetro crítico (D_c), característico de cada material, em que abaixo dessas dimensões elas não possuem multidomínios, mas sim um monodomínio (Sun, C. *et al.*, 2008). Os materiais superparamagnéticos são caracterizados pela ausência de histerese magnética na curva de magnetização, coercividade nula e susceptibilidade magnética elevada (Chomoucka *et al.*, 2010). Geralmente as partículas com tamanhos abaixo de 25nm apresentam um comportamento superparamagnético (Arruebo *et al.*, 2007).

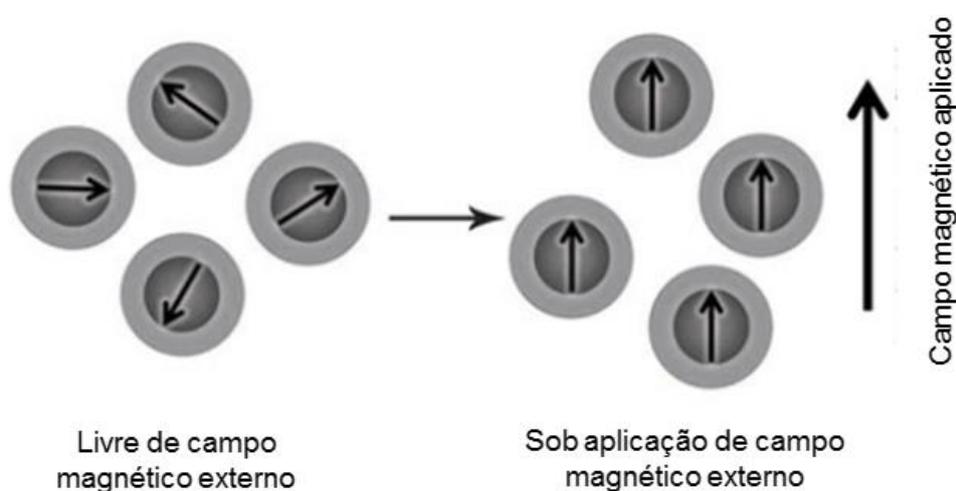


Figura 7: Configuração do dipolo atômico para um material superparamagnético livre de um campo magnético externo e sob a aplicação de um campo magnético externo (Yigit *et al.*, 2012 – adaptado).

Baseada nas características que as nanopartículas superparamagnéticas apresentam, é possível utilizá-las nos sistemas de liberação controlada e vetorizada de substâncias no organismo. Isso porque ela consegue ser transportada através do sistema vascular e se concentrar em um local específico do corpo através do auxílio de um campo magnético externo (Yigit *et al.*, 2012).

As nanopartículas magnéticas estão sendo investigadas, principalmente para uso no tratamento do câncer. Os quimioterápicos são fármacos não específicos e podem causar inúmeros efeitos adversos e agredir os tecidos saudáveis. Assim, com o auxílio das nanopartículas magnéticas, os quimioterápicos podem ser direcionados para os órgãos em que observa células cancerígenas evitando os seus efeitos sistêmicos (Sun C. *et al.*, 2008; Willard *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 2012).

As nanopartículas magnéticas também vêm sendo pesquisadas para utilização na terapia gênica. O RNA de interferência (RNAi), por exemplo, pode suprimir a expressão de alguns genes causadores de várias patologias, como tumores e doenças infecciosas. Assim, a associação do RNAi com nanopartículas magnéticas pode facilitar o tratamento, já que ele pode ser encaminhado diretamente ao local de ação (Sun C. *et al.*, 2008; Menck, 2010).

Finotelli *et al.* (2010) estudaram a liberação de insulina a partir de microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas. Eles objetivaram controlar a liberação do hormônio insulina através da aplicação de campo magnético externo.

2.3.2 Magnetita(Fe_3O_4)

Dentre as NPM, aquelas formadas por óxido de ferro vêm se destacando na área biomédica. O óxido de ferro (Fe_3O_4), também conhecido como magnetita é um minério de ferro de coloração preto metálica com brilho lustroso responsável pelas propriedades magnéticas das rochas. A magnetita possui uma estrutura cristalina do tipo espinélio invertido, com rede de Bravais cúbica de faces centradas. Ela apresenta o ferro em seus 2 estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} , sendo que ambos interagem com os íons O^{2-} . Os íons Fe^{3+} se encontram nos sítios octaédricos e tetraédricos, já os íons Fe^{2+} se encontram nos interstícios tetraédricos, sendo estes os responsáveis pelas características magnéticas do material (Oliveira, L. *et al.*, 2012). A composição da magnetita exhibe propriedades elétricas e magnéticas únicas

devido à transferência de elétrons entre o Fe^{2+} e Fe^{3+} nos sítios octaédricos da estrutura (Chen, J. *et al.*, 2009).

A magnetita se torna superparamagnética à temperatura ambiente se o tamanho crítico for em torno de 20nm (Rosen *et al.*, 2011). Recentemente, a magnetita (Fe_3O_4) tem sido intensivamente investigada devido à sua baixa citotoxicidade, maior estabilidade em condições fisiológicas, biocompatibilidade e baixo custo, características estas que são imprescindíveis para aplicações biomédicas (Shen *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2008).

2.3.3 Metodologia de produção de nanopartículas de Fe_3O_4

Sabe-se que as propriedades físicas e químicas das nanopartículas dependem fortemente do método de síntese e da sua estrutura química. Assim, devido ao aumento do uso de NPM na área da biomedicina, diversos métodos estão sendo estudados a fim de se adquirir estruturas com propriedades compatíveis com os meios fisiológicos (Petcharoen e Sirivat, 2012).

A síntese de NPM tem como objetivo a produção de um material uniforme (com domínio da morfologia, do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula), reprodutível e cujas propriedades físicas e químicas sejam controladas, boa dispersão sobre substratos e soluções e alta cristalinidade (Lu *et al.*, 2007). São inúmeros os métodos utilizados cada qual com sua peculiaridade, dentre eles destacam-se a decomposição térmica, co-precipitação e hidrotérmico.

O método de decomposição térmica ocorre em altas temperaturas e geralmente obtêm partículas monodispersas (Lin e Samia, 2006). Este método é baseado na decomposição térmica de um composto metalorgânico contendo o metal em um solvente orgânico com alto ponto de ebulição na presença de surfactantes (Lu *et al.*, 2007).

Sun, S. e colaboradores (2004) sintetizaram nanopartículas utilizando-se o método de decomposição térmica. O tamanho variou em torno de 20nm, sendo que eles fizeram diversos testes modificando algumas variáveis no método obtendo nanopartículas menores. Contudo o procedimento necessita de equipamentos mais sofisticados, uma vez que trabalha com altas temperaturas, além da formação das nanopartículas ocorrer de forma mais lenta que nos outros métodos.

Pinna e colaboradores (2005) também utilizaram o método de decomposição

térmica para a produção de nanomagnetita e obtiveram tamanhos de 8nm a 25nm, utilizando temperaturas entre 175°C e 200°C. Contudo, as nanopartículas apresentaram polidispersão e a necessidade de modificação da superfície após o procedimento.

O método da co-precipitação é processo baseado na co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução de sal aquosa pela adição de uma base. O tipo de sal utilizado (cloreto, sulfato, nitrato, etc.) e a taxa de Fe^{2+} e Fe^{3+} são os determinantes do tamanho, forma e composição da nanopartícula. Este método possui a limitação de não conseguir controlar o tamanho da nanopartícula e nem obter uma estreita distribuição de tamanho (Lu *et al.*, 2007).

Hong e seus colaboradores (2007) produziram nanopartículas de Fe_3O_4 através do método de co-precipitação e obtiveram partículas com tamanhos entre 50nm e 100nm, porém o grande problema foi a forte tendência em se aglomerarem, como pode ser avaliado através da Figura 8.

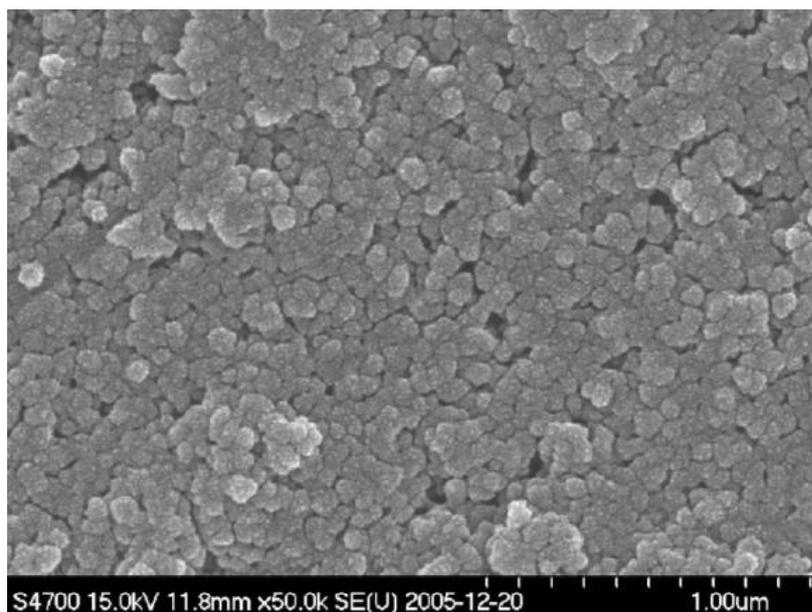


Figura 8: MEV de nanopartículas de Fe_3O_4 (Hong *et al.*, 2007).

Wei e colaboradores (2012) também sintetizaram nanopartículas de Fe_3O_4 pelo método de co-precipitação. Eles obtiveram partículas uniformes e com o diâmetro em torno de 12-15nm. O grande problema foi que as nanopartículas se agregaram em água deionizada, sendo necessária a adição de modificadores da superfície (ácido oleico e citrato de sódio) para controlar o processo de agregação. Qu e colaboradores (2010) também tiveram problemas ao utilizar o método de co-

precipitação. Eles adquiriram nanopartículas polidispersas e seriamente agregadas, sendo necessária a inserção de ácido oléico no sistema para diminuir esta tendência.

Como se pode notar, na grande maioria dos trabalhos realizados pelos métodos anteriores, adquiriram-se partículas de Fe_3O_4 na escala nanométrica, porém com algumas limitações como forte tendência a se agregarem, ampla distribuição de tamanho e baixa cristalinidade, o que limita o seu uso nos campos da biotecnologia e biomedicina.

Recentemente, o método hidrotérmico vem sendo adotado devido ao fato de produzirem nanopartículas com boa cristalização e boa dispersão (Chen, J. *et al.*, 2009). A técnica é baseada em reações em meio aquoso realizadas em autoclaves ou reatores em que a pressão pode chegar a 135atm e à temperatura até a 200°C. Através deste método é possível controlar a morfologia e o tamanho das partículas por meio do controle da temperatura e do tempo da reação. Devido ao sistema apresentar condições supercríticas de pressão e temperatura, a água presente atua acelerando o processo da cinética das reações de hidrólise (Wu *et al.*, 2008).

Li G. *et al.* (2008) utilizaram o método hidrotérmico e adquiriram partículas de Fe_3O_4 esféricas monodispersas com um diâmetro médio de 23nm como pode ser visto pela imagens fornecidos pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) presente na Figura9.

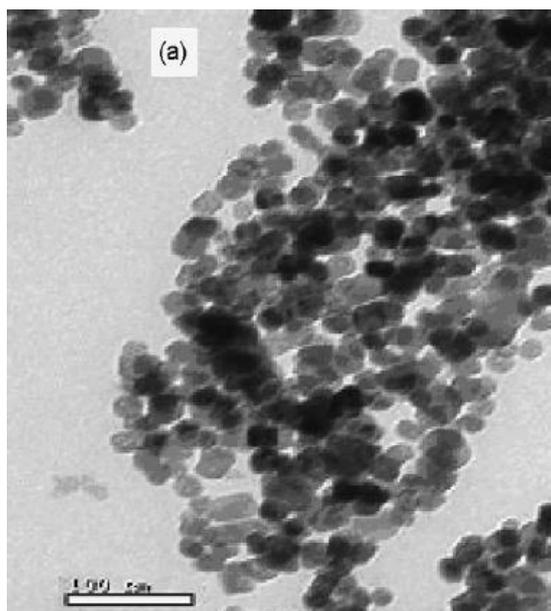


Figura 9: Imagens de MET de partículas de Fe_3O_4 preparadas pelo método hidrotérmico (Li, G. *et al.*, 2008).

Chen, J. *et al.* (2009) utilizaram também o método hidrotérmico. Eles verificaram através da análise de DRX (Figura 10) que o material formado não apresentou impurezas e a presença dos picos agudos indicou uma boa cristalização do produto. Além disso, eles adquiriram nanopartículas esféricas e com boa dispersão e com diâmetros uniformes em torno de 25nm (Figura 11).

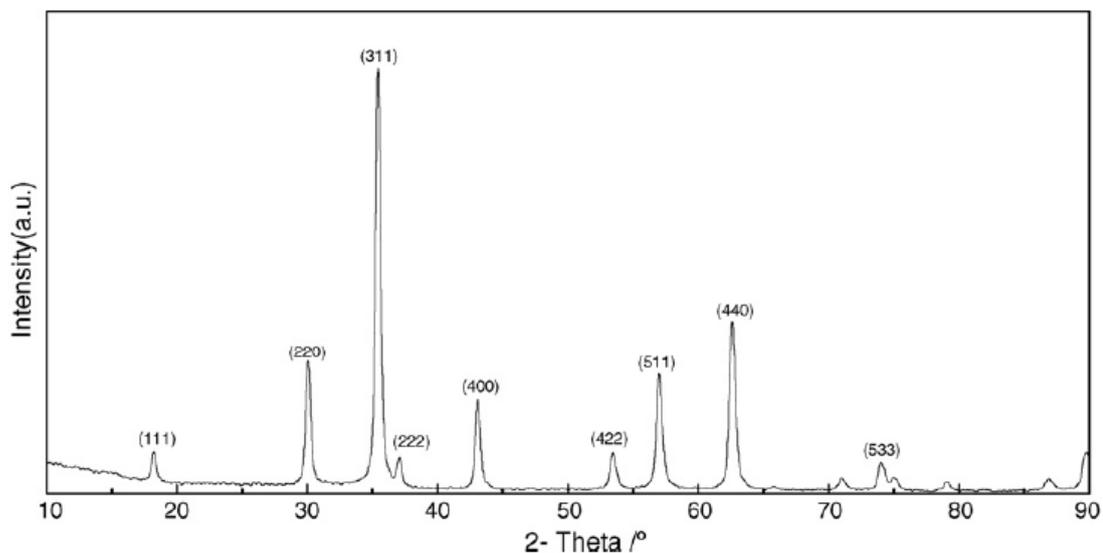


Figura 10: DRX de nanopartículas de Fe₃O₄ sintetizadas pelo método hidrotérmico (Chen J. *et al.*, 2009).

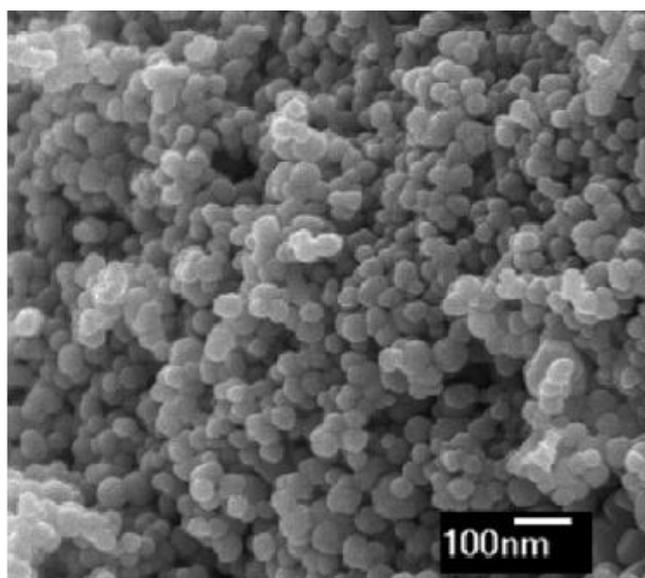


Figura 11: Imagens de MEV de partículas de Fe₃O₄ preparadas pelo método hidrotérmico (Chen J. *et al.*, 2009).

Os trabalhos realizados por Sun, S. *et al.* (2004), Pinna *et al.* (2005), Hong *et al.* (2007), Wei *et al.* (2012), Qu *et al.* (2010) e Fernandes e Kawachi (2006) obtiveram sucesso no que se diz respeito às dimensões das partículas, porém todos eles se depararam com problemas de séria agregação das partículas, baixa cristalização e/ou polidispersão. Assim, com o intuito de resolver esses problemas, Li, G. *et al.* (2009) e Chen *et al.* (2009) propuseram a utilização do método hidrotérmico, o qual adquiriu nanopartículas com tamanho adequado e com melhores resultados no que se diz respeito à menor agregação e à boa dispersão das partículas.

2.4 Liberação controlada e vetorizada de fármacos através de microcápsulas de alginato-quitosana contendo magnetita (Fe₃O₄)

Hoje em dia, as técnicas de microencapsulamento são as melhores formas de controlar a liberação de uma droga e permitir o uso daquelas cujas características inviabilizam a sua administração das formas convencionais (Estevinho *et al.*, 2013). O uso de microcápsulas de alginato-quitosana com um núcleo magnético para liberação controlada de fármacos vem sendo intensamente estudado. A incorporação das NPM à microcápsula polimérica é desejável em diversas aplicações biomédicas e veterinárias em que a precisão é imprescindível para controlar a taxa de liberação do fármaco e para o direcionamento rápido e fácil para áreas específicas (Zapata *et al.*, 2012). Edelman e Langer (1993) defendiam que a liberação de biomoléculas de uma matriz polimérica poderia ser regulada pela movimentação de partículas magnéticas presentes dentro da matriz, seja de forma pulsátil, contínua ou em determinadas fases do dia.

As nanopartículas magnéticas podem estar disposta de três formas diferentes na micropartícula, sendo na superfície (Figura 12a), no núcleo (Figura 12b) ou dispersa em toda matriz polimérica (Figura 12c), o que depende do método de formulação do sistema.

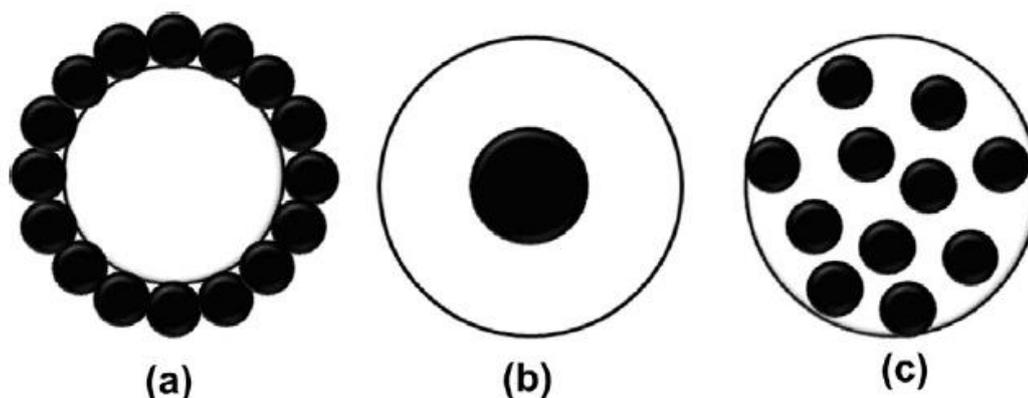


Figura 12: Representação esquemática das possíveis disposições das NPM na micropartícula (Philippova *et al.*, 2011).

Os principais mecanismos como o campo magnético atua estão associados à vibração das nanopartículas magnéticas (Figura 13) e à resposta térmica que ela promove de acordo com a intensidade do campo aplicado (Figura 14). O simples efeito vibratório que ocorre com as NPM quando sob influência de um campo magnético externo, promove a difusão da droga para o meio ao qual se encontra, podendo ser de forma mais lenta ou rápida (Dash, A.K.; Cudworth II, 1998). Dependendo da intensidade deste campo, pode haver um aquecimento da microcápsula fazendo com que o polímero reaja de forma diferente ao liberar a droga. Em se tratando de um polímero hidrofílico, a micropartícula geralmente possui mais de 90% de água em sua estrutura. Assim quando há uma agitação magnética suave, a água é liberada juntamente com o fármaco, causando uma retração do polímero. Em contrapartida, se houver uma agitação magnética intensa, a vibração promoverá um aquecimento local alterando a estrutura conformacional do polimérico podendo chegar ao seu rompimento (Liu *et al.*, 2009).

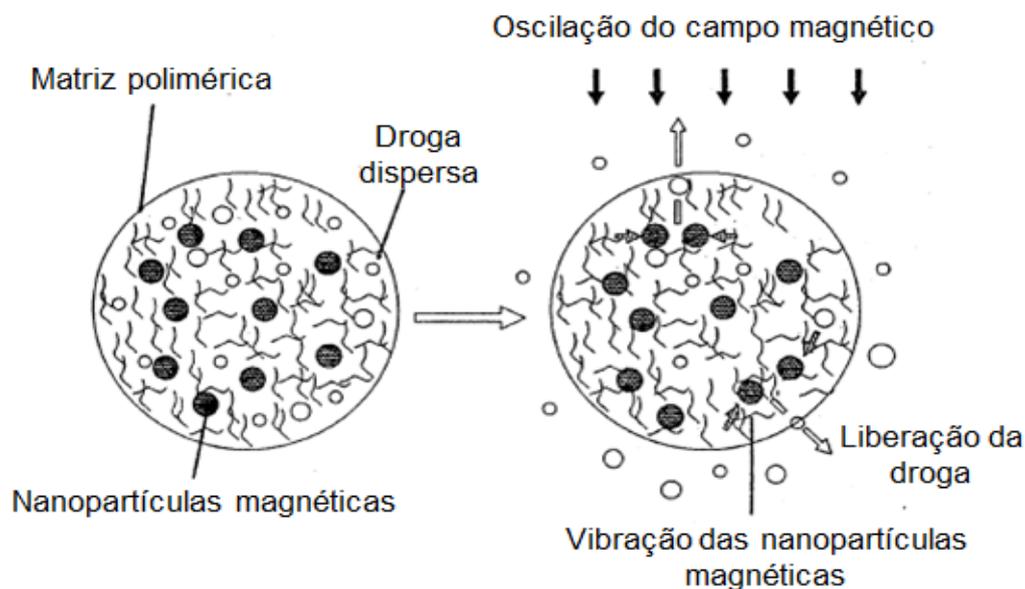


Figura 13: Esquema representativo de uma matriz polimérica de liberação de fármaco com NPM dispersas (Dash, A.K.; Cudworth II, 1998 - adaptado).

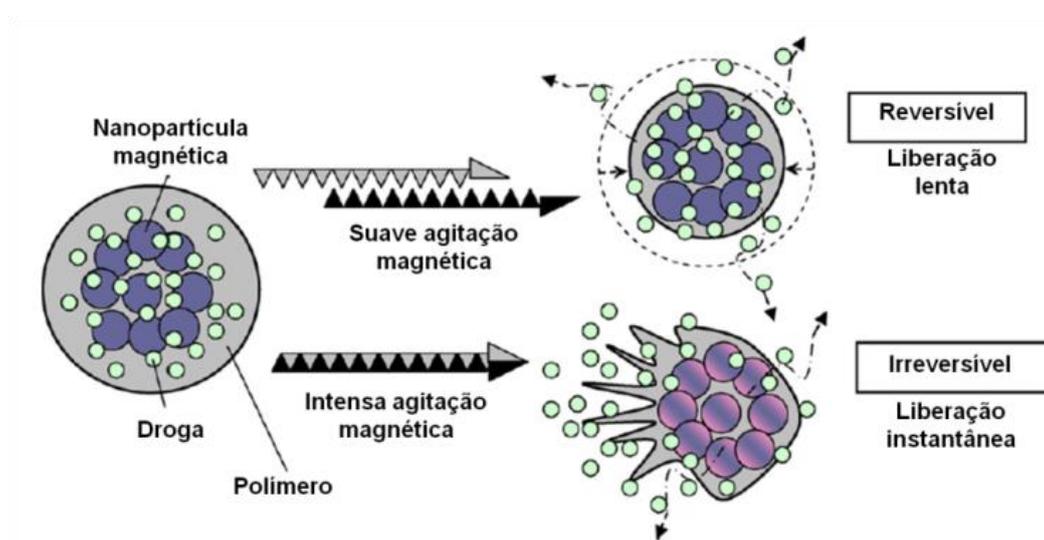


Figura 14: Mecanismo de liberação da droga por meio da resposta térmica mediante a atuação de um campo magnético aplicado (Liu *et al.*, 2009 – adaptado).

A incorporação do fármaco às microcápsulas pode ocorrer por diversos métodos, o agente ativo pode, por exemplo, ser disperso em uma matriz polimérica, podendo ficar retido no núcleo ou adsorvido na superfície. A distribuição do agente ativo depende fortemente do tamanho da partícula e tem uma forte influencia no

perfil de liberação da droga. Quando o diâmetro for de 10-20 μm , a droga tende a ficar distribuída homoganeamente na estrutura. Caso o diâmetro esteja acima de 40 μm , substâncias hidrofílicas tendem a ficar concentradas próximas à superfície e substâncias hidrofóbicas tendem a ficar no interior. Em relação à taxa de liberação, sabe-se que ela costuma ser mais rápida em partículas menores, uma vez que o agente ativo se encontra mais próximo da superfície. Enquanto que partículas maiores, com núcleos maiores, aumentam o comprimento de difusão e diminui o gradiente de concentração do fármaco, fazendo com que demore mais para que ela seja liberada (Tran *et al.*, 2011).

Cada via de administração do corpo humano necessita de um tamanho adequado de partícula. Para administração intravenosa, o tamanho ideal é em torno de 200nm de diâmetro. Sabe-se que tamanhos acima de 200nm podem ativar o sistema complemento no sangue e eliminar a partícula de forma mais acelerada. Já tamanhos menores do que 100nm sofrem uma rápida ação do sistema retículo endotelial (Kulkarni e Fend, 2013). Para administração oral, são preferíveis tamanhos entre 7,2 e 2,1 μm . Para administração via pulmonar, os tamanhos devem ser em torno de 3 μm para se alcançar bons resultados. Para a via subcutânea e intramuscular, o tamanho das partículas pode variar entre 10 e 250 μm , a fim de se evitar a incidência de fagocitose por macrófagos e minimizar possíveis reações inflamatórias (Tran *et al.*, 2011). No caso de animais, pode haver variações desses valores. Em eqüinos não foram encontradas nas literaturas pesquisadas referências aos tamanhos de partículas preconizados para cada via de administração.

Finotelli e colaboradores (2010) desenvolveram uma metodologia para a produção dessas partículas. Primeiramente eles prepararam partículas de alginato de sódio contendo insulina. Posteriormente, as nanopartículas foram inseridas em uma solução de quitosana onde ficou durante um tempo sob uma condição controlada. Então as partículas de alginato-quitosana/insulina foram misturadas a uma solução de ferro (contendo Fe^{3+} e Fe^{2+}) e depois se adicionou uma solução de hidróxido de amônio para manter o pH básico. Elas foram então lavadas e secas. Obteve-se nanopartículas esféricas e uma estrutura compacta. A superfície apresentou porosidade com poros medindo alguns micrômetros. As NPM apresentaram uma estreita distribuição de tamanho e ficaram distribuídas homoganeamente em toda área da micropartícula. Eles investigaram o potencial das partículas de alginato-quitosana contendo NPM como sistema de liberação

controlada de insulina. Segundo seus estudos, eles concluíram que a associação polimérica entre quitosana e alginato de sódio reforçou a estrutura das esferas aumentando sua impermeabilidade e diminuiu a liberação do agente ativo pesquisado. Em relação à adição das NPM, esta promoveu uma liberação mais intensa e controlada do fármaco quando o campo magnético externo foi aplicado.

Xiao e Sun (2013) desenvolveram microesferas de quitosana e alginato contendo Fe_3O_4 . O óxido de ferro foi produzido através do método de co-precipitação e foi inserido na microesfera a qual foi produzida pela técnica de emulsificação/gelificação interna. As esferas adquiridas foram regulares com tamanho em torno de $150\mu\text{m}$ e elas não se deformaram com a inserção das partículas de óxido de ferro mantendo a forma esférica.

2.5 Progesterona

A progesterona (Figura 15) é um hormônio esteróide secretado pelas células do corpo lúteo presente na placenta e nas glândulas adrenais. A progesterona, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$, possui peso molecular de 314,46 g/mol. Ela é uma droga lipossolúvel, altamente solúvel em solventes orgânicos, etanol e acetona e praticamente insolúvel em água (8,8 mg/L a 20°C) (Brasil, 2010). Ela é estável em temperaturas mais altas e ao ar (Rathbone *et al.*, 2002). A sua temperatura de fusão é $127\text{-}137^\circ\text{C}$ para forma α e 121°C para a forma β .

No campo da veterinária este hormônio apresenta ampla atuação, sobretudo em eqüinos. Suas funções primordiais são (1) encerrar com os sinais comuns ao estro; (2) regular o ciclo estral, através da inibição da liberação esporádica de LH (hormônio luteinizante) quando em níveis elevados; (3) tornar a fêmea irreceptiva ao macho; (4) preparar o útero para receber o embrião; (5) manter a gestação inicial; e (6) sincronizar o estro e controlar a ovulação em éguas cíclicas (Faria e Gradela, 2010).

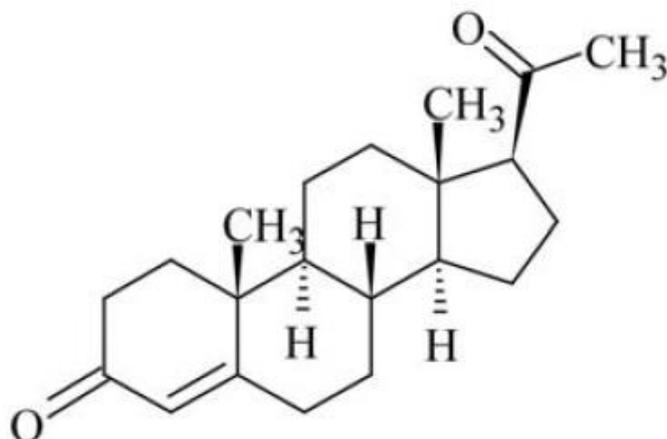


Figura 15: Estrutura química da progesterona (Brasil, 2010).

A ação terapêutica da progesterona pode ser observada na concentração de 2-5ng de progesterona por mL de plasma (2-5 ng/mL). Doses acima de 6 ng/mL não mostram ação e podem ser até tóxicas (Jameela *et al.*, 1998). A sua ingestão oral exige doses diárias e está sujeita a variações na concentração sanguínea, pois possui meia-vida curta (intenso metabolismo hepático). Além disso, ela não é tolerada em altas dosagens (Cerchiara *et al.*, 2003). Já existem sistemas para a liberação de progesterona, como injeções oleosas, o Altrenogest (progesterona sintética oral), o P₄LA[®] 150 (progesterona de longa ação) e progesterona em matrizes de PHB (poli-hidroxibutirato) (Faria e Gradela, 2010). No entanto, é necessário o estudo de sistemas mais eficazes que controlem a liberação da progesterona sem perda de sua ação e com mais facilidade de administração ao animal. Dessa forma, matrizespoliméricas associadas a vias de administração alternativas vêm sendo pesquisadas a fim de se resolver estes problemas inerentes à estrutura da progesterona.

Jameela *et al.* (1998) estudaram a liberação de progesterona utilizando microesferas de quitosana e o glutaraldeído como reticulante. Eles realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios em ratos, eles perceberam que nos animais que receberam a progesterona nas microesferas a concentração no sangue permaneceu por 5 meses, enquanto que nos ratos que receberam progesterona livre, esta permaneceu na corrente sanguínea por apenas por 4 dias, sendo assim, uma opção promissora.

Latha *et al.* (2000) estudaram a liberação da progesterona em matriz de caseína bovina utilizando o glutaraldeído como reticulante. Eles fizeram o teste *in*

vivo em ratos e detectaram que a liberação da progesterona permaneceu por um período prolongado. Assim, este sistema torna-se adequado para o controle da fertilidade com a probabilidade de que 2 aplicações ao ano seriam suficientes para manter o nível plasmático adequado.

Silva J. *et al.* (2006) produziram microcápsulas de polihidroxibutirato contendo progesterona para uso subcutâneo em éguas para avaliação da dinâmica útero-ovárica. Eles executaram testes *in vivo* em 8 éguas, sendo 4 tratadas (injetou-se a microcápsula com progesterona) e 4 controle (injetou-se apenas solução fisiológica). Foi verificado que os níveis de hormônio nas éguas tratadas foram significativos em relação às éguas controle. No entanto, eles perceberam que a via de administração interferiu nos níveis de progesterona na égua, pois houve uma reação inflamatória no local onde se implantou as microcápsulas interferindo na liberação da droga.

Oliveira J. *et al.* (2013) desenvolveram fibras de poli-(ácido láctico) (PLA) para a liberação de progesterona e estudaram a sua interação com o polímero. Eles conseguiram comprovar uma miscibilidade entre a progesterona e o polímero. Além disso, através das análises eles perceberam que a progesterona agiu como um plastificante quando adicionado na fibra de PLA e através do estudo de liberação concluíram que ela seguia um modelo de cinética de primeira ordem.

Como se pode perceber, já existe inúmeros trabalhos referentes a matrizes poliméricas para liberação controlada de progesterona. No entanto, ainda faltam estudos em relação a outras matrizes e a via de administração deve ser cuidadosamente escolhida a fim de não se interferir na liberação da droga. Na literatura pesquisada não foram encontrados estudos referentes à utilização do sistema alginato-quitosana/magnetita em associação com a progesterona. Assim, ele será nosso foco a fim de se aprimorar a sua utilização no controle do ciclo reprodutivo em éguas.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Sulfato de ferroso heptahidratado P.A. fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. Teor: Min. 99%.
- H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio) fornecido pela Synth; Teor: Min. 29%
- PEG (Polietilenoglicol) 20.000 fornecido pela Merck Schuchardt OHG
- NH₄OH P.A. fornecido pela Synth; Teor: Min. 27% de NH₃.
- Quitosana de médio peso molecular fornecida pela Sigma-Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80% e massa molar média igual a 161 g/mol.
- Alginato de sódio fornecido pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda.; Teor: Min. 90%
- Ácido acético fornecido pela Vetec Química Fina Ltda; Grau de Pureza: P.A.;
- Carbonato de cálcio P.A. fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. Teor 99%.
- Cloreto de Cálcio P.A. Dihidratado fornecido pela Vetec Química Fina Ltda.
- Hidróxido de sódio Lentilhas P.A. fornecido pela fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. Teor: Min. 97%.
- Óleo Mineral fornecido pela Vetec Química Fina Ltda, cód. 018.
- N-hexano P.A. 99% ACS fornecido pela Vetec Química Fina Ltda.
- Álcool Etilico fornecido pela Cromoline Química Fina Ltda; Grau de Pureza: P.A.
- Álcool Etilico P.A. 95% fornecido pela Proquímios
- Oleato de Sorbitano (Span) 80 fornecido pela Polytechno
- Progesterona (Preg-4-eno-3,20-diona) fornecido pela Sigma-Aldrich; Grau de Pureza: 99%.

Os produtos Quitosana (médio peso molecular), alginato de sódio e Progesterona foram caracterizados através da Espectrofotometria de Infravermelho. Cada amostra foi misturada ao KBr e depois compressa em um “comprimido” utilizando-se uma prensa manual a 80 toneladas. As medidas foram feitas através

de um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) Shimadzu, Modelo IRPrestige-21.

3.2 Especificação dos Equipamentos

- Chapa aquecedora Ceramag Midi IKA, modelo Q-261-A1.
- Centrífuga Macro Evlab EV025-M.
- Balança de precisão Sartorius, modelo TE 214S.
- Ultrassom Thornton, modelo T4.
- Ultrassom Ney 19H.
- Ultratúrax Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, modelo T25.
- Estufa Nova Ética, modelo 404-3D.
- Câmara Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital (Shaker) Markoni, modelo MA832.
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu, Modelo IRPrestige-21.
- Difratorômetro Shimadzu, modelo XRD 7000.
- Gaussímetro GM08 da Hirst-Magnétic Instrument Ltda.
- Microscópio Confocal Olympus, Lext 3D a laser, Modelo OLS4000.
- Microscópio Eletrônico ZEISS, modelo EVO 40 XVP.
- Espectrofotômetro de RPE Brunner Elexys Modelo E500.
- Magnetômetro de Amostra Vibrante da marca Quantum Design, Modelo Dynacool.
- Espectrofotômetro de UV Shimadzu, Modelo UV-1800, Feixe duplo.

3.3 Fluxograma do processo de preparo e caracterização das partículas

Foi elaborado um fluxograma (Figura 16) para facilitar a descrição das etapas do processo de síntese das NPM, das microcápsulas poliméricas e as suas devidas caracterizações.

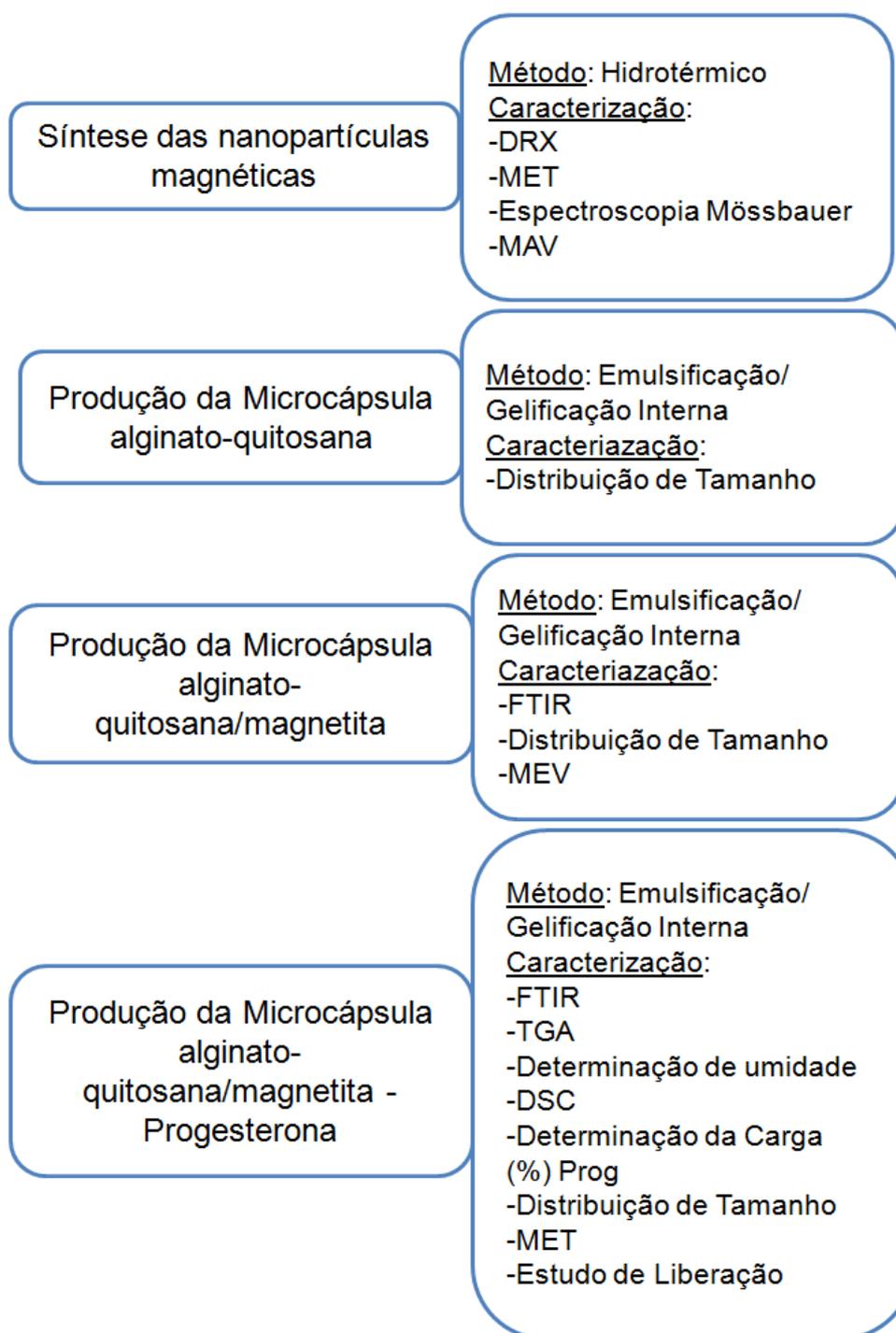


Figura 16: Fluxograma referente às etapas do procedimento.

3.4 Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (magnetita)

A magnetita foi preparada através do método hidrotérmico, utilizando-se H_2O_2 como oxidante, baseado na metodologia utilizada por Li, G. *et al.* (2008) e Chen J. *et al.* (2009). Primeiramente, foi dissolvido 2,502g de sulfato de ferro heptahidratado em 30ml de água deionizada, previamente desgaseificada. O procedimento foi

realizado com atmosfera de nitrogênio. Nesta solução foi adicionado 10ml de PEG 20000 50g/l e após agitação por 10 min. adicionou-se 30 ml de NH_4OH mantendo agitação vigorosa. Durante o processo, o pH foi mantido em 10. Após 5 min., 0,27ml de H_2O_2 29% foram adicionados vagarosamente e o sistema continuou com agitação vigorosa por 20 min. para se obter uma mistura homogênea. Decorrido este tempo, a mistura foi transferida para um reator hermeticamente fechado (autoclave) com parede interna revestida com teflon (Figura 17) e colocado em um forno no qual permaneceu a 160°C por 5h. Decorrido este tempo, o reator foi arrefecido naturalmente à temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo foi lavado várias vezes com etanol onde ficou armazenado sob temperatura aproximada de 4°C para inserção nas microcápsulas, sendo referida como magnetita “molhada”. Para análise, secou-se a magnetita à vácuo à temperatura ambiente.



Figura 17: Foto ilustrativa do reator utilizado para a síntese de magnetita.

3.5 Caracterização das nanopartículas magnéticas

3.5.1 Difração de Raios-X (DRX)

Esta análise foi realizada com as NPM com o intuito de identificar a estrutura cristalina e determinar a composição das fases, assim como determinar o tamanho médio do cristalito formado.

As análises foram realizadas em um Difratorômetro Shimadzu, modelo XRD 7000, presente no Setor de análise de DRX do Laboratório de Materiais Avançados da UENF (LAMAV/UENF), sob radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54178\text{\AA}$). A voltagem e a corrente de operação foram mantidas em 40Kv e 30 mA, respectivamente. As varreduras foram feitas na faixa do ângulo de difração $2\theta = 10-90^\circ$, com velocidade de $2^\circ/\text{min.}$.

O tamanho médio do cristalito foi calculado através da Equação de Scherrer (Equação 1), utilizando-se a largura a meia altura do pico de difração de maior intensidade (Li, G. *et al.*, 2008).

$$D=K\lambda/\beta\cos\theta$$

Equação 1

Sendo:

D = tamanho médio do cristalito;

K = constante referente à forma das partículas (esfera=0,94);

λ = comprimento de onda da radiação eletromagnética (1,54 \AA);

θ = ângulo de difração;

β = largura a meia altura do pico de difração.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O procedimento foi realizado em um Microscópio Eletrônico de transmissão ZEISS, Modelo EM 900, presente na Unidade de Microscopia do Centro de Bociência e Biotecnologia Universidade Estadual do Norte-Fluminense Darcy Ribeiro (CBB/UENF), com o intuito de determinar o tamanho e morfologia interna das nanopartículas de magnetita. Estas foram incorporadas em uma resina EPON e deixou-se secar por 72 horas. Decorridos este tempo, foi realizado um corte ultrafino usando um ultramicrotomo e levada para análise através do MET, em uma voltagem de aceleração de 50 kV.

3.5.3 Espectroscopia Mössbauer

As nanopartículas magnéticas foram avaliadas com o intuito de identificar e

quantificar os tipos de óxidos de ferro presentes na amostra, complementando as informações obtidas pelo DRX, e observar o comportamento magnético da partícula.

A análise de Mössbauer foi realizada no laboratório de Espectroscopia Mössbauer do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) (RJ). Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente, por meio de um espectrofotômetro convencional de transmissão, com aceleração constante, usando como fonte ^{57}Co dispersa em matriz de Rh.

3.5.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)

A magnetometria de amostra vibrante foi executada com o objetivo de caracterizar as propriedades magnéticas das nanopartículas. As curvas possibilitam informações à respeito do campo coercivo, a magnetização de saturação e a magnetização remanescente das amostras.

As medidas magnéticas foram feitas no Centro Brasileiro de Pesquisa Física (CBPF) (RJ). A caracterização magnética foi realizada através de um Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV), mais comumente conhecido como VSM (Vibrating Sample Magnetometer), da marca Quantum Design, Modelo Dynacool, à temperatura de 300K. A histerese da magnetização foi obtida mudando H entre -40kOe e 40kOe. Utilizou-se 10,77mg de amostra.

3.6 Metodologia de formulação das microcápsulas

Para a formulação das microcápsula utilizou-se o método emulsificação/gelificação interna baseado na metodologia de Silva, C.M. *et al.*, 2006 e Xiao e Fei, 2013.

Os procedimentos foram realizados com o auxílio de um agitador mecânico Fisatom Modelo 723, com um misturador mecânico e agitação de 400 rpm e a 0°C (Figura 18).



Figura 18: Foto ilustrativa do equipamento utilizado para a formulação de microcápsulas.

Para a preparação das microcápsulas alginato-quitosana (Figura 19a), uma solução de 15 mL de alginato de sódio 3% contendo 2 mL de CaCO_3 5% (fase aquosa) foi gotejada em uma emulsão contendo 40 mL de óleo mineral e 1% de Span 80 (fase oleosa). Este gotejamento foi realizado de forma manual, porém da forma mais constante possível. Uma solução contendo 10 mL de óleo mineral e aproximadamente 0,17 mL de ácido acético foi gotejada simultaneamente. Testou-se também o procedimento sem a presença do surfactante Span 80. Após o gotejamento o sistema ficou em agitação por 40 min.. Adicionou-se à emulsão 50 mL de uma solução de CaCl_2 0,05M contendo 1% de Tween 80, para separação das fases, e permaneceu a agitação por mais 10 min.. Posteriormente retirou-se a fase oleosa e lavou-se o conteúdo com a solução de CaCl_2 0,05M contendo 1% de Tween 80 e adicionou-se 10 mL de N-hexano para retirar todo o óleo residual. A retirada de todo óleo é extremamente necessária, pois poderia prejudicar a interação entre o alginato e quitosana. Após a retirada de todo o óleo, adicionou-se 50 mL de solução de quitosana 1%. Após 30 min. de agitação suave, as microcápsulas foram lavadas e armazenadas em tampão acetato pH 4,5 para análises.

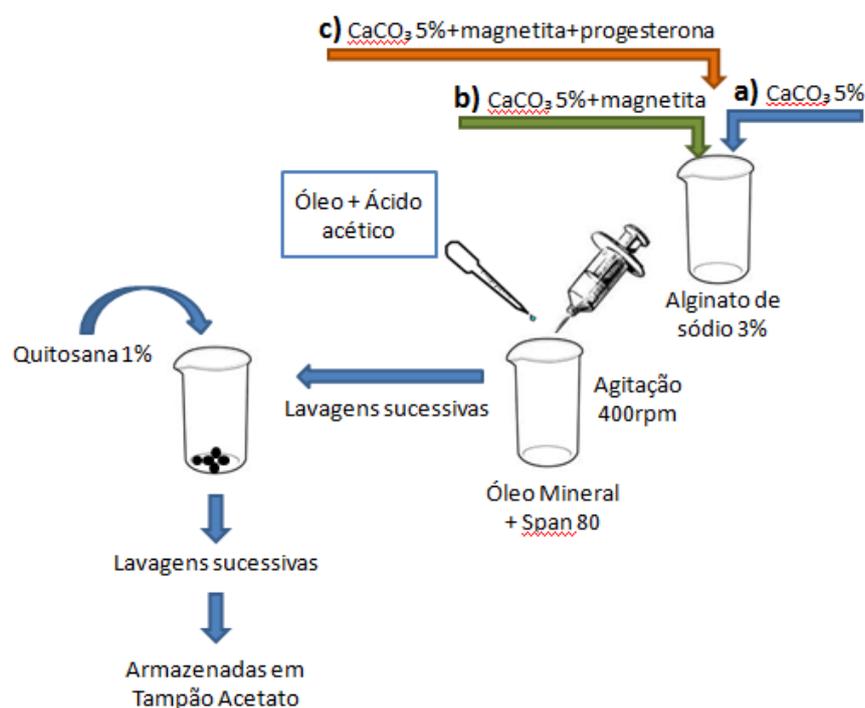


Figura 19: Esquema ilustrativo do procedimento para preparação das (a) microcápsulas alginato-quitosana; (b) microcápsulas alginato-quitosana/magnetita; (c) microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Adaptado de Silva C.M. *et al.*, 2006 e Xiao e Fei, 2013).

Para a formulação da microcápsula alginato-quitosana/magnetita (Figura 19b), seguiu-se o procedimento anterior, sendo que 0,28g de magnetita “molhada” foi inserida na solução de alginato de sódio 3% e dispersada com a ajuda do ultrassom, de forma a se promover a total desagregação das nanopartículas de magnetita. Antes de a magnetita ter sido adicionada, ela estava armazenada em álcool, então se retirou o máximo do álcool previamente. Após a adição da magnetita, prosseguiu-se com a adição da solução CaCO₃ 5% como exposto anteriormente.

Para a formulação da microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 19c), seguiu-se o procedimento anterior. Porém 0,45g de progesterona foi previamente diluída em uma pequena quantidade de álcool etílico, pois sua solubilidade em água é baixa, e adicionada na solução de alginato de sódio 3% (proporção Alg/Prog 1/1, m/m). A progesterona foi dispersa com a ajuda do

ultrassom até apresentar um aspecto homogêneo e após esta etapa, deu-se continuidade com a inserção da magnetita e da solução de CaCO_3 5%.

3.7 Caracterização das microcápsulas

3.7.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho foi realizada com as microcápsulas alginato-quitosana/magnetita e alginato-quitosana/magnetita-progesterona com o intuito a interação entre os componentes do sistema.

A amostra, previamente seca, foi misturada ao KBr e depois compressa em um “comprimido” utilizando-se uma prensa manual. As medidas foram feitas através de um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu, Modelo IRPrestige-2, na Unidade de Caracterização Térmica do SEPOL/LAMAV. Os dados obtidos foram compilados através do programa OriginPro 8.

3.7.2 Análise de termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada com o intuito de complementar a análise de possíveis interações nos componentes da microcápsula e delimitar a composição da microcápsula. Foram feitos os termogramas do alginato, quitosana e microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona.

As análises foram realizadas em um equipamento TGA Q-500 – TA Instruments, existente na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial (UCTS/SEPOL). A faixa de temperatura utilizada no ensaio foi de 20 à 850°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e um fluxo de ar sem nitrogênio de 25 mL/min. Para a determinação da composição da microcápsula utilizou-se nitrogênio.

3.7.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esta análise foi realizada com as microcápsulas de alginato-quitosana/magnetita-progesterona, alginato, quitosana e progesterona com o intuito de confirmar as interações entre o alginato, quitosana e progesterona.

Além disso, utilizou-se o método para calcular a Carga de progesterona encapsulada na microcápsula a partir de uma curva de calibração Área x Carga de progesterona (%). Para isso, realizou-se o DSC de 5 misturas físicas progesterona/alginato, sendo conhecidas as porcentagens de progesterona (Tabela 1). A área do pico referente à fusão da progesterona foi adquirida através do termograma de DSC e a curva de calibração foi elaborada em função das porcentagens de progesterona (%) presente em cada mistura.

Tabela 1: Valores percentuais (%) de progesterona nas misturas físicas.

Mistura física Progesterona/alginato (g/g)	% de progesterona
0,026/0,1	20,63
0,055/0,1	35,4
0,101/0,1	50,24
0,16/0,1	61,53
0,102/0,05	67

O procedimento foi realizado no Laboratório de Materiais Avançados no Setor de Polímeros na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy- Ribeiro (LAMAV/SEPOL/UCTS/UENF). Utilizou-se um equipamento de DSC-QDSC2000 da TA Instruments, com resfriamento controlado (LNCS).

As análises de DSC foram executadas em placas de alumínio hermeticamente fechadas com aproximadamente 14mg de amostra. A faixa de temperatura utilizada foi de -105 à 200°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera de nitrogênio dinâmica de 20mL/min.

3.7.4 Determinação da Carga Efetiva (%) de progesterona na microcápsula alginato-quitosana

Para a determinação da Carga Efetiva (%) da progesterona da microcápsula utilizou-se a técnica de Espectroscopia no Ultravioleta. O procedimento foi realizado

em triplicata (C1, C2 e C3). Primeiramente, 40mg de microcápsula foi inserida em 7 mL de solução álcool/água 60% e 2 mL de solução de EDTA 5 mM e proporcionou um ambiente básico (pH=10) com a adição de NaOH (Karewicz *et al.*, 2010). Deixou-se a solução em agitação por 24h, à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugou-se o conteúdo por 5 min. a 3600rpm. O sobrenadante foi retirado, sendo anotado este volume para cálculos posteriores, e a quantidade de progesterona foi determinada por espectrofotometria de UV com um Espectrofotômetro Shimadzu de feixe duplo, Modelo UV-1800, no comprimento de onda de 247nm. Foi utilizada a curva de calibração (ver à frente Figura 22) para o cálculo da quantidade de progesterona presente na microcápsula. O branco utilizado foi a solução obtida a partir do mesmo procedimento acima, porém com microcápsulas que não possuíam progesterona.

A Carga Percentual foi determinada pela Equação 2 (Ribeiro *et al.*, 2005-adaptada),

$$\text{Carga \%} = M_{\text{QRP}} / M_{\text{QM}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

sendo M_{QRP} a quantidade real de progesterona na microcápsula e M_{QM} a quantidade de microcápsula utilizada para o teste.

3.7.4.1 Determinação do Índice de Umidade (%)

O Índice de Umidade da microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona foi determinado com o intuito de auxiliar no cálculo da Carga Efetiva Percentual (%). Para isso pesou-se 3 quantidades de microcápsulas úmidas. Então elas foram secas e pesou-se novamente. Os valores das massas foram anotados e calculou-se a porcentagem correspondente à água e à microcápsula seca.

3.7.5 Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho e dimensões foi realizada com as microcápsulas alginato-quitosana, com as microcápsulas alginato-quitosana/magnetita e com as microcápsulas alginato-quitosana/magnetita por meio de micrografias confocal obtidas em um Microscópio Confocal, Lext 3D a laser OLS4000 da marca Olympus.

As microcápsulas alginato-quitosana foram secas em um dessecador à temperatura ambiente e posteriormente, foram dispostas em uma lâmina de vidro para observação. Foram utilizadas 3 micrografias, cada uma contendo aproximadamente 25-50 microcápsulas.

As microcápsulas alginato-quitosana/magnetita foram suspensas em 10 mL de álcool etílico e 1 gota de Tween 80. Posteriormente, elas foram aderidas em uma lâmina de vidro e deixou-se secar no dessecador por 24h. Foram utilizadas 5 micrografias, cada uma contendo aproximadamente 25-50 microcápsulas.

As microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona foram suspensas em 10 mL do próprio meio de armazenamento (tampão acetato pH 4,51) e adicionou 1 gota de ácido oléico. Posteriormente, elas foram aderidas em uma lâmina de vidro e deixou-se secar no dessecador por 24h. Foram utilizadas 6 micrografias, cada uma contendo aproximadamente 15-30 microcápsulas.

3.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta análise foi realizada com a microcápsula de alginato-quitosana/magnetita com o intuito de verificar a morfologia externa das partículas, sobretudo verificar a agregação das mesmas.

O procedimento foi realizado no Centro de Bociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte-Fluminense Darcy Ribeiro (CBB/UENF). As análises foram feitas em um Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS, modelo EVO 40 XVP, operando em uma voltagem de 30kV.

Para se executar as análises, as amostras foram depositadas em um porta-amostra com fita adesiva dupla-face e recobertas com ouro formando um filme de 20nm para que as amostras não sofressem descargas durante as análises.

3.7.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona foram observadas pela Microscopia de Transmissão com o intuito de verificar a sua morfologia interna e verificar o seu tamanho.

O procedimento foi realizado em um Microscópio Eletrônico de transmissão ZEISS, Modelo EM 900, presente na Unidade de Microscopia do Centro de

Biociência e Biotecnologia Universidade Estadual do Norte-Fluminense Darcy Ribeiro(CBB/UENF).

As microcápsulas foram incorporadas em uma resina EPON e deixou-se secar por 72 horas. Decorridos este tempo,foi realizado um corte ultrafino usando um ultramicrótomo e levada para análise através do MET, em uma voltagem de aceleração de 50 kV.

3.8 Estudo de Liberação da progesterona

3.8.1 Elaboração da curva de calibração da progesterona em álcool/água 60% (v/v)

Para que pudesse quantificar a concentração da progesterona liberada da microcápsula, primeiramente elaborou-se uma curva de calibração da progesterona em álcool/água 60% (v/v). Para isso, preparou-se 5 diluições volumétricas diferentes a partir de uma solução estoque com concentração conhecida, obtida levando-se em consideração a quantidade inicial de progesterona utilizada para a produção das micropartículas. As soluções foram medidas por espectrofotometria de UV com um Espectrofotômetro Shimadzu de feixe duplo, Modelo UV-1800, e os dados foram compilados através do programa OriginPro 8. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 247nm. O branco utilizado foi a solução de álcool/água 60%.

A curva de calibração da progesterona em álcool/água 60% (Figura 20) obteve a equação a partir da reta $y = 0,0717 + 0,01597x$ e o coeficiente de correlação (R^2) foi igual a 0,99845, indicando a linearidade da curva de calibração.

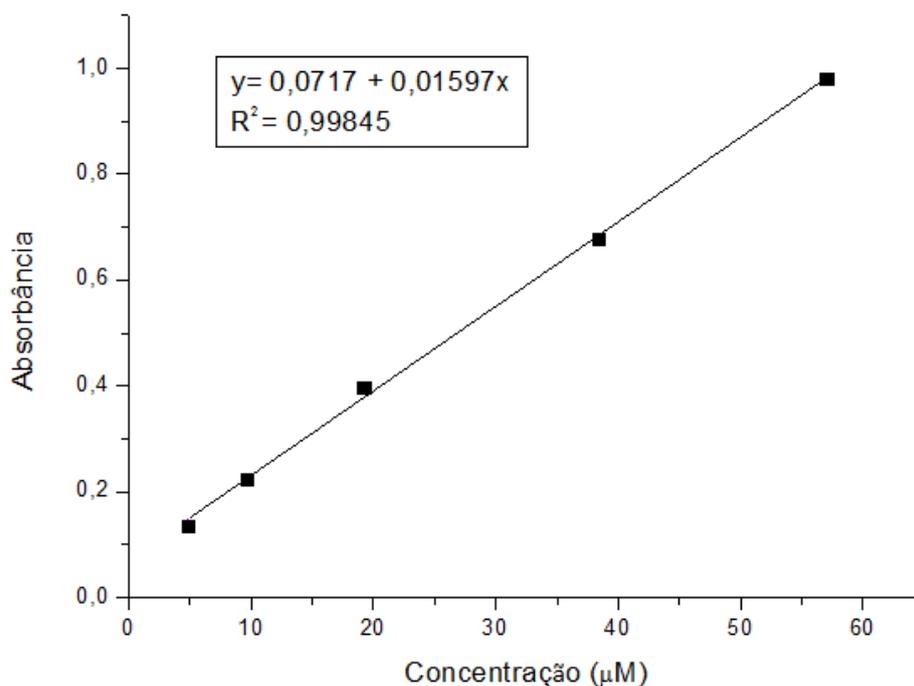


Figura 20: Curva de calibração da progesterona em álcool/água 60%.

3.8.2 Estudo da influência do campo magnético na liberação da progesterona a partir de microcápsulas de alginato-quitosana/magnetita

Para o estudo de liberação da progesterona utilizou-se uma solução álcool/água 60% (v/v) (Taghizadeh *et al.*, 2004 e Mashak e Taghizadeh, 2006). Foram separados 12 tubos de ensaio contendo cada um 40 mg de microcápsulas e 5 mL de solução álcool/água 60%. Os tubos de ensaio foram mantidos em repouso e à temperatura ambiente. Em intervalos previamente estipulados (Tabela 2) o sobrenadante foi retirado e a quantidade de progesterona nestas alíquotas foi determinada por espectrofotometria de UV com um Espectrofotômetro Shimadzu de feixe duplo, Modelo UV-1800, no comprimento de onda de 247nm e os dados foram compilados através do programa OriginPro 8. O branco utilizado foi a solução de álcool/água 60%.

Tabela 2: Tempos estipulados para retirada das alíquotas da amostra para análise por espectroscopia no ultravioleta.

Tubos de Ensaio	Tempo Decorrido
1	15 min.
2	30 min.
3	1h
4	2h
5	4h
6	6h
7	8h
8	10h
9	12h
10	24h
11	48h
12	72h

Para o estudo da liberação controlada da progesterona mediante a presença de um campo magnético, foi desenvolvido um protótipo especialmente para gerar um campo magnético pulsante (Figura 21). O dispositivo consiste de 2 ímas permanentes cilíndricos de Neodímio-Ferro-Boro (NdFeB, 0,3T- Dados do fabricante) fixados radialmente em uma polia, a qual foi conectada em um motor. Este gira a uma frequência de 35 Hz, promovendo um campo magnético pulsante.

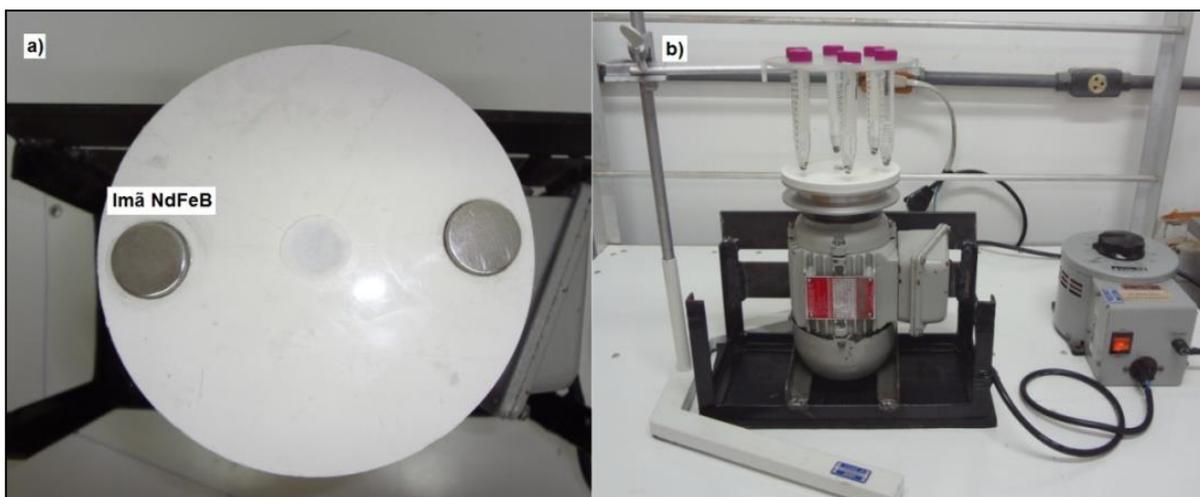


Figura 21: Imagem do equipamento utilizado para aplicar o campo magnético pulsante nas amostras. (a) Visão de cima; (b) Visão de frente.

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio e estes ficaram a uma distância de 0,5 cm dos ímas onde o campo magnético medido foi de aproximadamente 0,2 T. Para esta medição utilizou-se um Gaussímetro GM08 da Hirst-Magnétic Instrument Ltda, presente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Norte Fluminense (LTA/UENF). O teste de liberação foi feito utilizando-se 7 tubos. Pesou-se 40 mg de microcápsula e imergiu-as em 5 mL de solução álcool/água 60%. Após intervalos previamente estipulados (Tabela 3) o sobrenadante foi retirado e a quantidade de progesterona nestas alíquotas foi determinada por espectrofotometria de UV com um Espectrofotômetro Shimadzu de feixe duplo, Modelo UV-1800, no comprimento de onda de 247nm. Os dados foram compilados através do programa OriginPro 8. O branco utilizado foi a solução de álcool/água 60%.

Para a comparação da liberação na ausência e presença do campo magnético, foram consideradas as 7 amostras sem o campo cujos tempos correspondiam aos tempos estipulados para o teste na presença do campo magnético.

Tabela 3: Tempos estipulados para retirada das alíquotas do teste com o campo magnético para análise por espectroscopia no ultravioleta.

Tubos de Ensaio	Tempo Decorrido
1	30 min.
2	1h
3	2h
4	4h
5	6h
6	8h
7	12h

A determinação da concentração da progesterona foi feita através da curva de calibração (Figura 20) com o auxílio da equação $y = 0,0717 + 0,01597x$, $R^2 = 0,99845$. O percentual do conteúdo de progesterona liberado foi calculado em relação à carga total de progesterona que havia na microcápsula, medido previamente no procedimento para determinação da carga percentual.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Síntese da magnetita

Ao longo do procedimento experimental houve a mudança da coloração da solução. Ao se adicionar o NH_4OH , percebeu-se a mudança de tonalidade de amarelo claro para negro, isso ocorreu devido a formação do óxido de ferro. Ao se adicionar o agente oxidante H_2O_2 , a coloração mais escura se intensificou e é a etapa em que ocorre a formação da magnetita. A reação que ocorreu durante a síntese encontra-se na Figura 22.

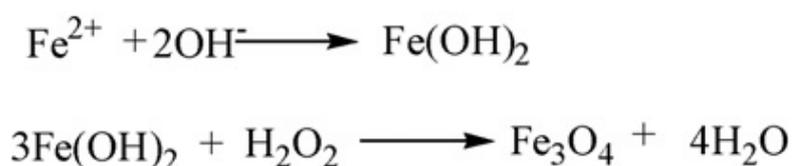


Figura 22: Esquema representativo da reação de síntese da magnetita através do método hidrotérmico (Li, G. *et al.*, 2008).

Para se evitar a oxidação indesejada da magnetita, a água deionizada utilizada no procedimento hidrotérmico foi levada à ebulição para retirada do oxigênio dissolvido. Além disso, borbulhou-se também nitrogênio a fim de se proporcionar um ambiente totalmente livre de oxigênio. Durante todo o procedimento manteve-se a atmosfera inerte. Após a síntese, constatou-se um comportamento magnético ao aproximar um ímã ao precipitado (Figura 23).

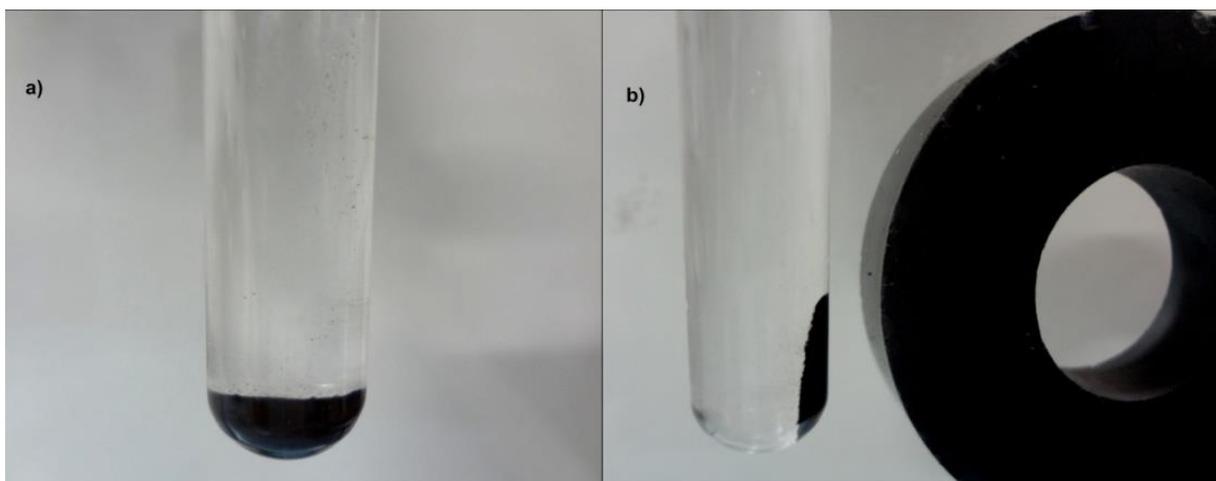


Figura 23: Efeito do campo magnético na magnetita: a) ausência do campo magnético; b) presença do campo magnético.

O método hidrotérmico se baseia em uma reação a alta temperatura e pressão. A temperatura utilizada de 160°C durante 5h foi extremamente importante para garantir o tamanho na escala nanométrica, boa dispersão e cristalinidade. Reportes anteriores (Chen, J. et al., 2009) indicaram o tempo de reação de 5 horas como apropriado para a formação de nano partículas menores e com maior esfericidade assim como a temperatura de 160°C (Li, G. et al., 2008) considerando que acima da temperatura de 160°C a supersaturação do fluido diminui e o tamanho da partícula aumenta.

4.2 Caracterização da magnetita (Fe_3O_4)

4.2.1 Difração de Raios-X (DRX)

Os picos identificados no difratograma (Figura 24) foram os referentes aos índices (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440) e (533). Eles são compatíveis com a ficha JCPDF (Powder Diffraction File) 19-0629, referente à magnetita e revelam uma estrutura cristalina do tipo espinélio invertido, com rede de Bravais cúbica de face centrada e parâmetro celular $a=8,396\text{Å}$. Pode-se perceber que os picos são intensos e estreitos, o que indica que a magnetita apresenta alta cristalinidade.

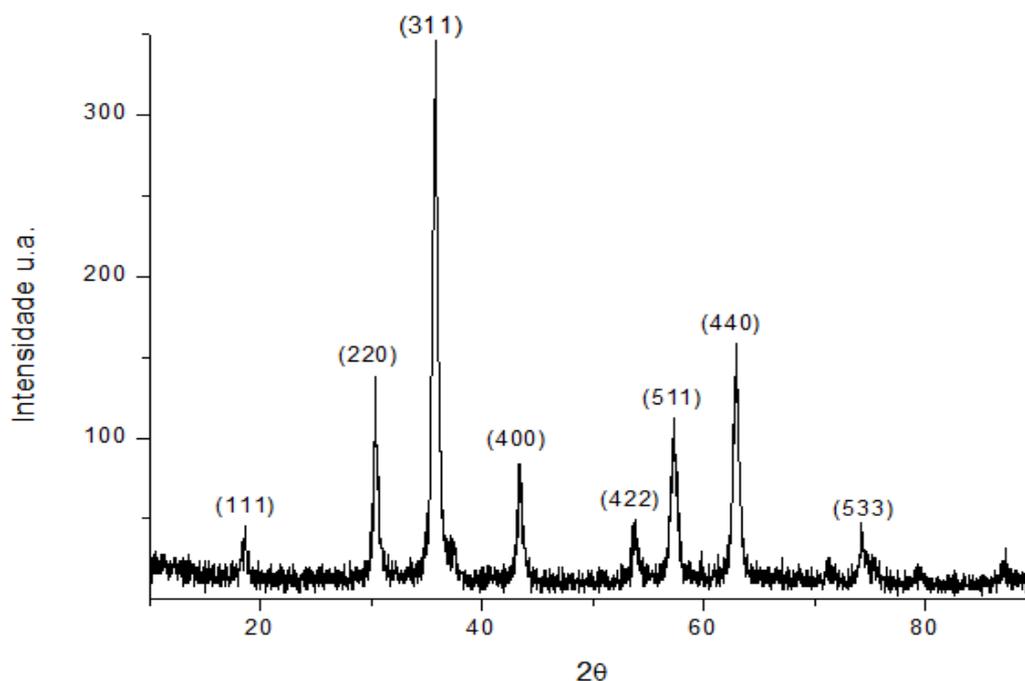


Figura 24: Espectro de DRX da magnetita (Fe_3O_4).

Os resultados DRX (Figura 24) para o óxido de ferro (magnetita) sintetizado pelo método hidrotérmico estão em correspondência com os resultados de Chen, J. *et al.* (2009), em que não houve a presença de picos de impurezas. Li, G. *et al.* (2008), que utilizaram o mesmo método, também obtiveram amostras de magnetita sem a presença de impurezas.

Através da Equação de Scherrer ($D = K\lambda/\beta\cos\theta$), utilizando o pico mais intenso (Figura 24) calculou-se o tamanho médio do cristal da magnetita, sendo ele 19nm. Este tamanho se encontra na faixa de 5 a 20nm característico de monodomínios que apresentam um comportamento superparamagnético.

Apesar do cálculo do tamanho médio do cristal através da Equação de Scherrer não ser suficiente para determinar o tamanho da partícula, é uma evidência importante na caracterização da magnetita sintetizada e está de acordo com os reportes de Goya *et al.* (2003), Li, G. *et al.* (2008) e Silva, V.A.J. *et al.* (2013).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Com o auxílio da MET foi determinado o tamanho médio das partículas de magnetita (Figura 25) de 10nm. Média ligeiramente inferior a dos cristais determinado com auxílio do DRX. As nanopartículas apresentaram um formato regular compacto. Se observa na imagem certa tendência a agregação.

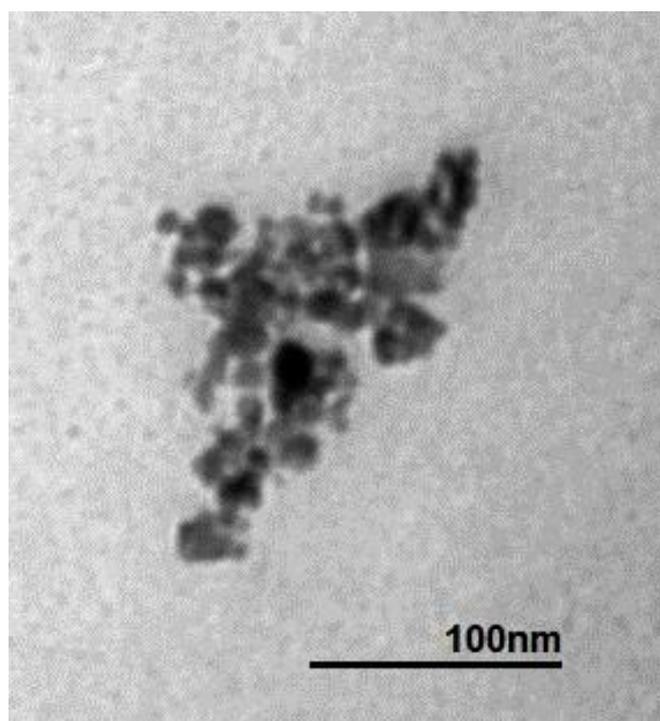


Figura 25: Imagem de TEM da magnetita.

4.2.3 Espectroscopia Mössbauer

O espectro de Mössbauer (Figura 26, Tabela 4), realizado à temperatura ambiente, apresenta basicamente 2 sextetos característicos da magnetita. Um deles mais amplo (Sítio A – traço rosa), correspondente ao sítio tetraédrico, apresentou campo magnético hiperfino (B_{hf}) de 48,9T, deslocamento isomérico (δ) de 0,30 mm/s^2 e deslocamento quadrupolar (2ϵ) de -0,002 mm/s^2 . O outro sexteto bem definido (Sítio B – azul), referente ao Fe octaédrico, apresentou campo magnético hiperfino (B_{hf}) de 45,9T, deslocamento isomérico (δ) de 0,45 mm/s^2 e deslocamento quadrupolar (2ϵ) de 0,001 mm/s^2 . Além disso, observou-se também a presença de

um parâmetro hiperfino referente a goethita, com um campo magnético hiperfino (B_{hf}) de 37,7 T, deslocamento isomérico (δ) de 0,36 mm/s² e deslocamento quadrupolar (2ε) de -0,286 mm/s², a qual representou 19% do espectro.

A componente de distribuição do campo magnético hiperfino apresentou um baixo campo magnético de 34,2T, o que pode ser interpretado como uma contribuição do efeito de superfície devido ao tamanho nanométrico da partícula o qual representou 60% do espectro.

Como não houve a formação de dubletos, não se pode afirmar as características superparamagnéticas da magnetita por esta análise. Pode-se inferir que ainda estavam presentes multidomínios na amostra. No entanto, a formação dos sextetos indica a presença de monodomínios, porém sem uma redução total do tamanho capaz de ocasionar uma transição de fase magnética (Moreto *et al.*, 2008; Goya *et al.*, 2003).

As porcentagens das fases explicitas na Tabela 5, representam uma proporção das áreas relativas do espectro, não sendo possível dizer exatamente o quanto de cada fase do Fe está presente.

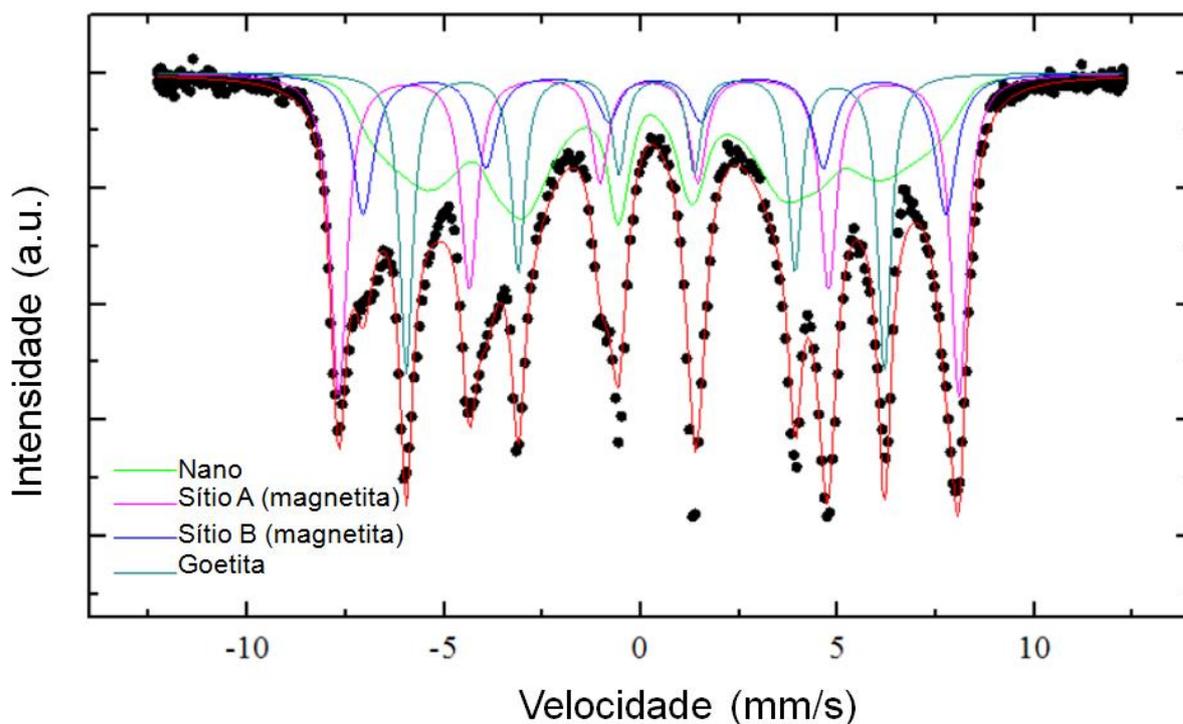


Figura 26: Medida de Espectroscopia de Mössbauer da amostra de magnetita realizada a temperatura ambiente.

Tabela 4: Parâmetros hiperfinos obtidos no Espectro Mössbauer.

Espectro	Parâmetro Hiperfinos	
Nano	$\langle \delta \rangle$ (mm/s)	0,44(23)
	$\langle B_{hf} \rangle$ (T)	34,2(3)
	Área (%)	60(2)
Magnetita (Sítio A)	$\langle \delta \rangle$ (mm/s)	0,30(2)
	$\langle B_{hf} \rangle$ (T)	48,9(1)
	2ε (mm/s)	-0,002(1)
	Área (%)	26(2)
Magnetita (Sítio B)	$\langle \delta \rangle$ (mm/s)	0,45(3)
	$\langle B_{hf} \rangle$ (T)	45,9(2)
	2ε (mm/s)	0,001(1)
	Área (%)	15(2)
Goethita	$\langle \delta \rangle$ (mm/s)	0,36(3)
	$\langle B_{hf} \rangle$ (T)	-0,286(3)
	2ε (mm/s)	37,7(2)
	Área (%)	19(2)

A análise de Mössbauer detectou a fase goethita não identificada pela análise de DRX. Isso provavelmente aconteceu pelo fato da maioria das partículas serem da ordem de nanômetros. Provavelmente a técnica de DRX não conseguiu detectar as partículas de goethita e elas poderiam não estar bem cristalizadas dificultando a sua detecção e diferenciação dos seus picos em relação à magnetita. Finotelli *et al.* (2004) também detectaram a fase goethita na análise de Mössbauer, porém esta não foi identificada no espectro de DRX do referido autor. A técnica de Mössbauer consegue identificar espécies mal cristalizadas e partículas muito pequenas tornando-se imprescindível para a identificação destas fases (Guskos *et al.*, 2002).

4.2.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)

A curva de magnetização (Figura 27) da amostra de Fe_3O_4 mostra um comportamento reversível, sem histerese, com uma coercividade nula, assim como a ausência de um campo magnético residual. Esse comportamento é característico, na maioria das vezes, de um material superparamagnético.

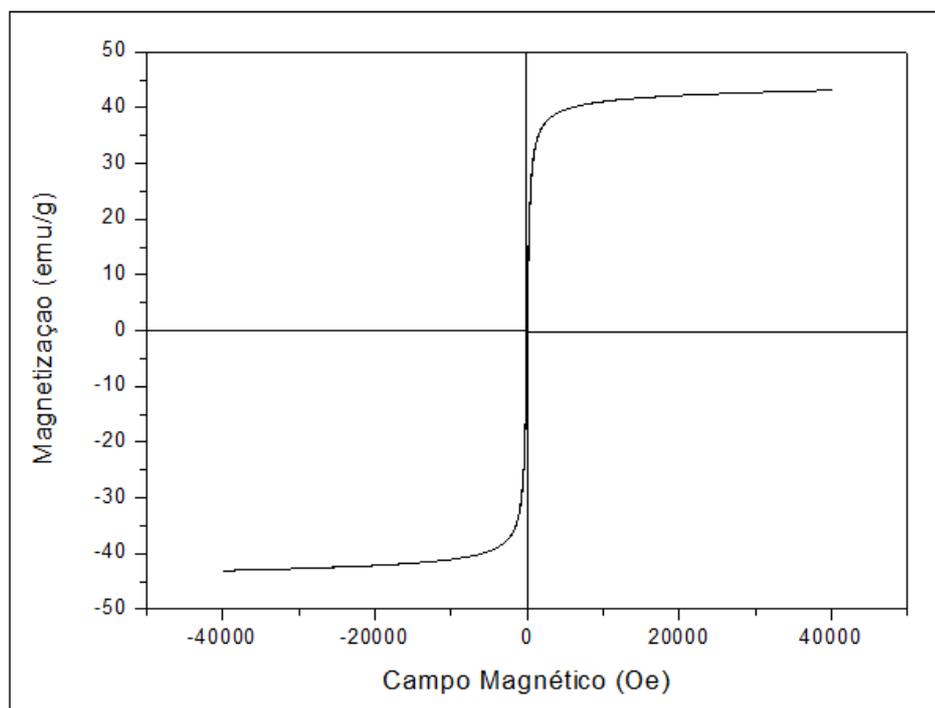


Figura 27: Curva de magnetização das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) à temperatura ambiente.

O superparamagnetismo é uma propriedade fundamental para aplicações biomédicas, já que as partículas são facilmente magnetizáveis e retidas em um local quando na presença de um campo magnético e facilmente redispersas quando retirado o campo magnético externo (Pankhurst *et al.*, 2003).

À temperatura ambiente, o valor da magnetização de saturação encontrado para a amostra foi de 43 emu/g. Cheng e colaboradores (2005) produziram nanopartículas de 9 nm, em média, e encontraram um valor de saturação próximo, sendo de 40 emu/g. Li, Y. e colaboradores (2014) obtiveram um valor de 69,1 emu/g para nanopartículas de 10nm. Estes últimos inseriram as nanopartículas em microfiores para tratamento de água residual e justificaram esse valor maior como sendo uma influência da estrutura na qual as nanopartículas estavam dispersas.

4.3 Síntese das microcápsulas alginato/quitosana contendo a carga magnética

No caso das microcápsulas alginato-quitosana, previamente foi testada a produção das microcápsulas sem o uso do surfactante (Span 80), porém não se

obteve partículas com tamanho e forma desejáveis, além de que elas se aglomeravam muito. Assim, julgou-se necessário o uso do surfactante em todas as microcápsulas. Ele foi utilizado com o intuito de diminuir a tensão da interface entre a fase aquosa e oleosa, facilitar a dispersão do alginato de sódio (solução viscosa) no óleo e para estabilizar a microcápsula evitando a agregação. Além disso, o surfactante ajuda na passagem das microcápsulas da fase oleosa para a fase aquosa (Poncelet *et al.*, 1992).

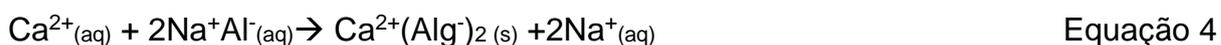
A concentração do alginato de sódio de 3% foi escolhida levando-se em consideração que em concentrações abaixo de 1% nota-se uma baixa formação de partículas esféricas. Isso ocorre devido à falta de grupos carboxílicos necessários para a gelificação, sendo que durante o processo de secagem isso fica ainda mais evidente. Já em concentrações acima de 3%, nota-se a formação de um gel extremamente viscoso, influenciando de forma prejudicial na granulometria, polidispersividade e forma da partícula (Reis *et al.*, 2006).

A agitação constante de 400 rpm é a responsável por garantir o tamanho da microcápsula. Ao entrar em contato com o ambiente ácido, os íons Ca^{2+} proveniente do CaCO_3 começam a ser solubilizados e a interagir com a estrutura do alginato promovendo a sua gelificação. O processo de gelificação ocorre em duas etapas, as quais estão explicitadas abaixo pelas equações 4 e 5 (Reis *et al.*, 2006). Deve-se ressaltar, que em meio ácido o CaCO_3 libera também a forma CO_3^{2-} que age como uma base regulando o pH no interior das microcápsulas (Tan e Takeuchi, 2007).

A reação global da solubilização do sal de cálcio é dada por (Reis *et al.*, 2006):



A reação de gelificação do alginato é dada por (Reis *et al.*, 2006):



Ao se adicionar as microcápsulas de alginato na solução de quitosana percebeu-se uma tendência a se aglomerar sendo necessária uma agitação constante do sistema para evitar a aglomeração das microcápsulas. Finotelli *et al.* (2010) também observaram este efeito e sugeriram que isto seria causado devido às

propriedades adesivas da quitosana.

4.4 Caracterização das microcápsulas

4.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 28 mostra os espectros infravermelho da quitosana, alginato e das microcápsula alginato-quitosana/magnetita. Os picos identificados em torno de 3440 cm^{-1} são referentes ao grupo -OH (Li, G. *et al.*, 2008), relativos à água adsorvida na amostra (Qu *et al.*, 2010). Na quitosana se observa os seus picos característicos, sendo os principais em 1654 cm^{-1} referente à vibração do grupo carbonila da amida acetilada e 1580 cm^{-1} o alongamento do grupo amino livre. Em 1065 cm^{-1} têm-se o estiramento do grupo N-H. No alginato observa-se a sua banda típica em 1620 cm^{-1} relativa à vibração do grupo C=O (Abruzzo *et al.*, 2013). A interação entre quitosana e alginato pode ser percebida através da mudança do pico 1654 cm^{-1} da quitosana para 1603 cm^{-1} na microcápsula, referente ao grupo carbonila da amida, assim como foi destacado também por Abruzzo *et al.*, 2013. Em aproximadamente 1350 cm^{-1} percebe-se também um pequeno pico (demarcado com a seta) o qual pode ser um indicativo dessa interação.

A interação eletrostática que ocorre entre a quitosana e o alginato torna a microcápsula mais resistente (Finotelli *et al.*, 2010) razão pela qual é relevante. A análise realizada com a técnica FTIR apenas é um indicativo desta possível interação, pelo que estudos posteriores com a própria técnica entre outras deverão aprofundar sobre o estudo da interação alginato-quitosana.

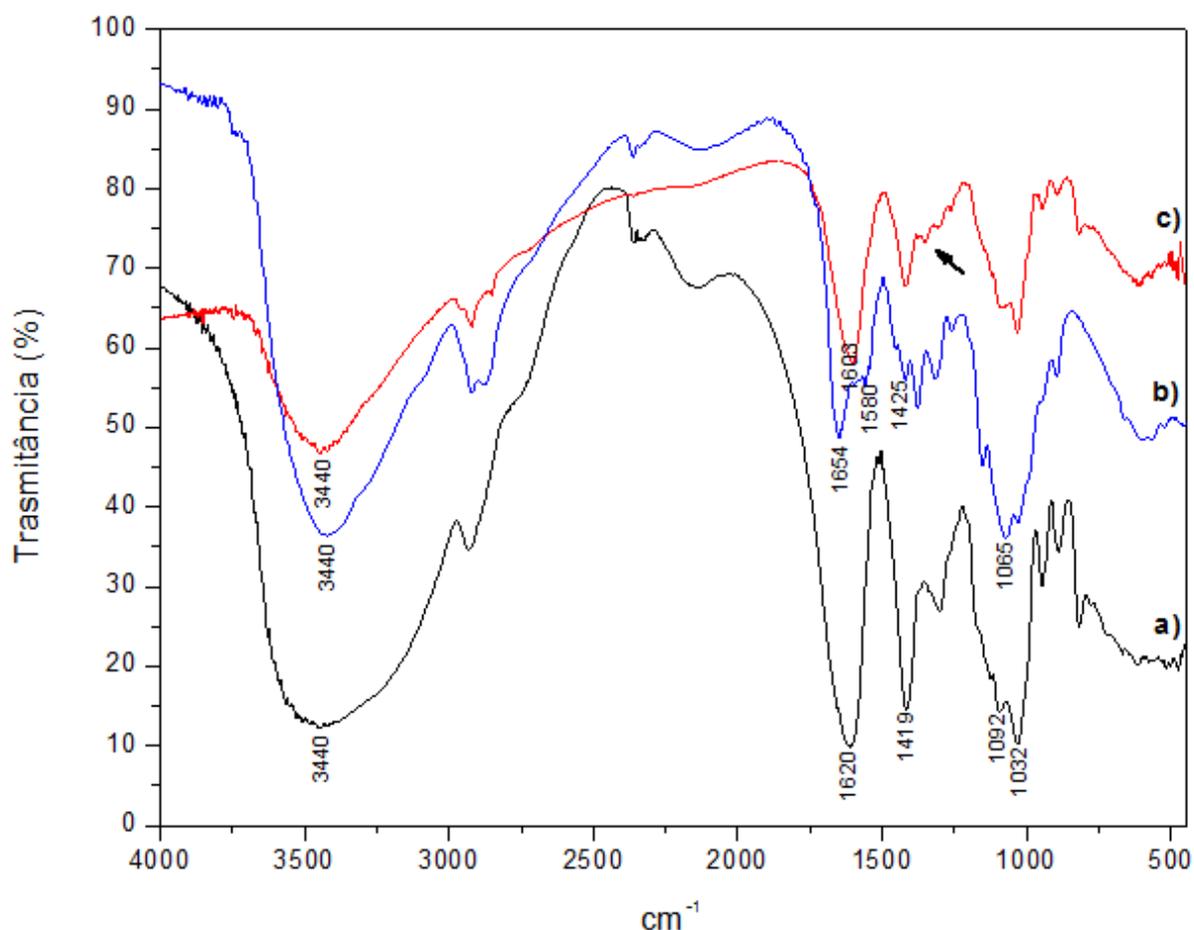


Figura 28: Espectro de Infravermelho (a) alginato; (b) quitosana; e (c) Microcápsula alginato-quitosana/magnetita.

O espectro infravermelho da progesterona (Figura 29b) apresentou os seus picos característicos, sendo o de 1661 cm^{-1} e 1698 cm^{-1} relativo ao estiramento da carbonila do carbono C_3 e C_{20} da progesterona, respectivamente (Cerchiara *et al.*, 2003). O espectro referente à microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 29a) apresentou os picos peculiares da progesterona, comprovando sua presença na microcápsula. Não é possível definir qual o tipo de interação existente entre o polímero e a progesterona.

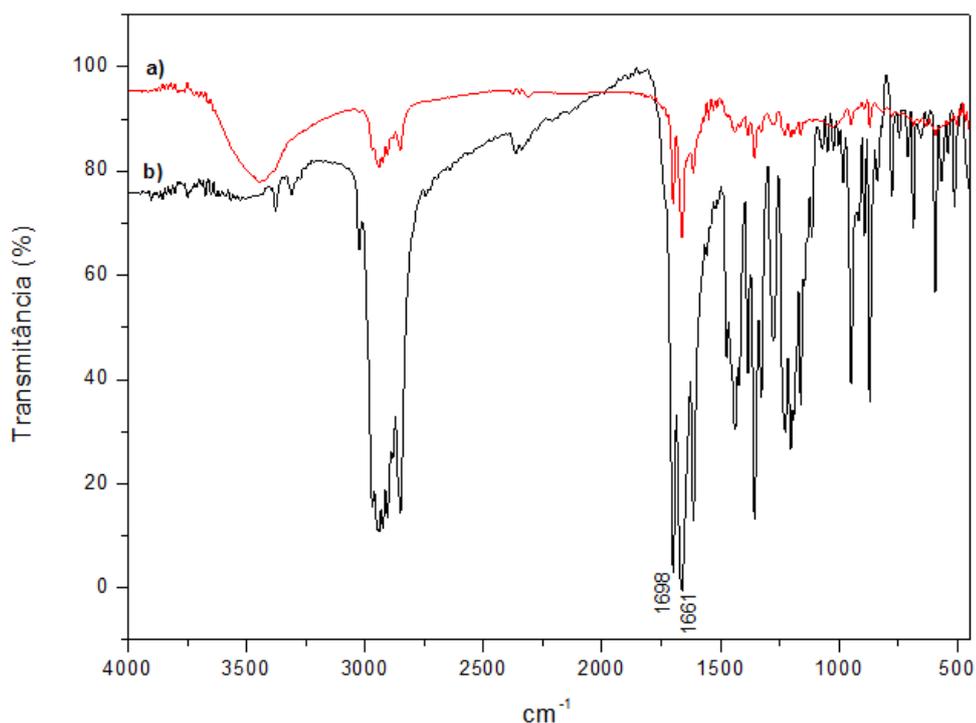


Figura 29: Espectro de Infravermelho da (a) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e da (b) progesterona.

4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 30 se refere ao termograma das amostras de progesterona, quitosana, alginato e microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona. A degradação da quitosana acontece em 293 °C e a do alginato ocorre em 238°C (Abruzzo *et al.*, 2013), como se observa no gráfico. Através da curva da derivada (DTGA) (Figura 31), se complementa a informação relativa ao perfil de degradação dos polímeros e das microcápsulas. O comportamento observado para a microcápsulas evidencia a diminuição da estabilidade térmica da quitosana na formulação o que pode ser considerado um indicativo da influencia da carga (Fe_3O_4) que aumenta a condutividade térmica em relação a quitosana pura e a uma possível interação entre as fases que desestabiliza a quitosana.

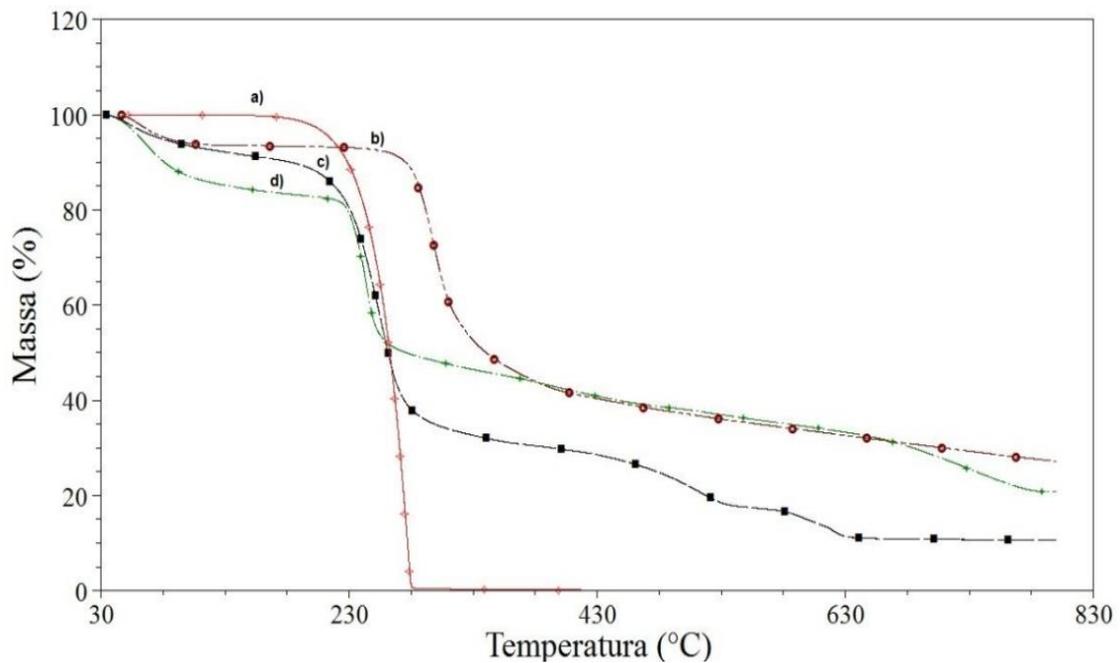


Figura 30: Termograma de TGA da (a) progesterona; (b) quitosana; (c) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e (d) alginato.

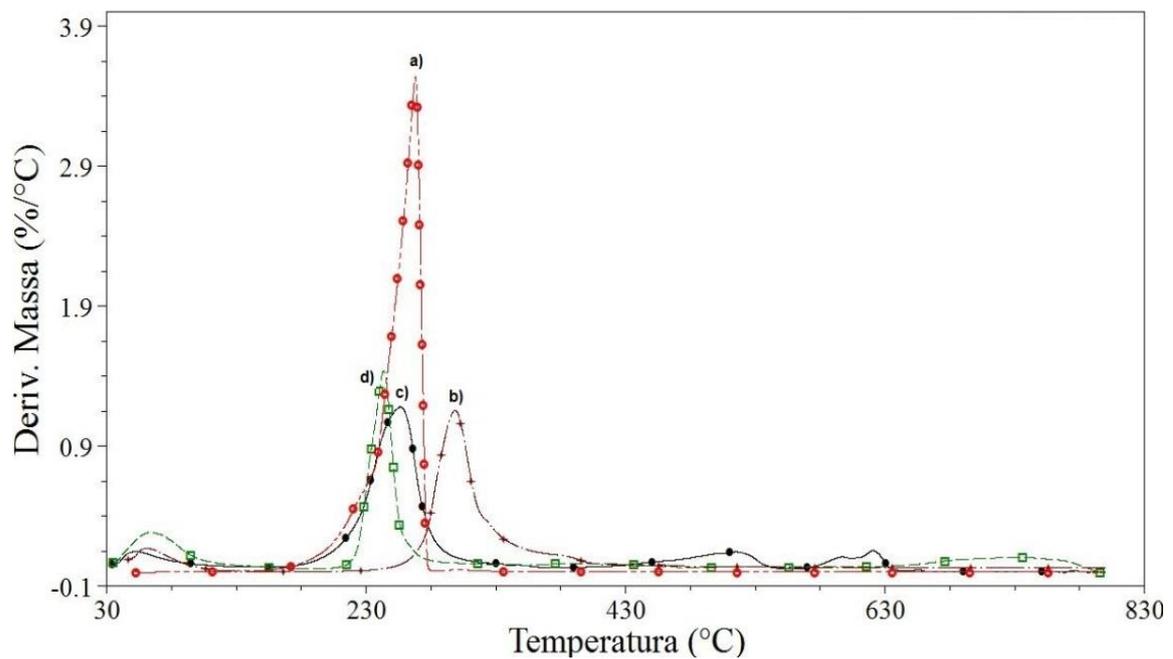


Figura 31: Termograma DTGA da (a) progesterona; (b) quitosana; (c) microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona; e (d) alginato.

Através do termograma de TGA (Figura 32), realizado com as microcápsulas secas, determinou a massa percentual da carga (magnetita) presente na

microcápsula a qual foi de 8,1%*m/m* (resíduo que permaneceu constante após $\approx 825^{\circ}\text{C}$).

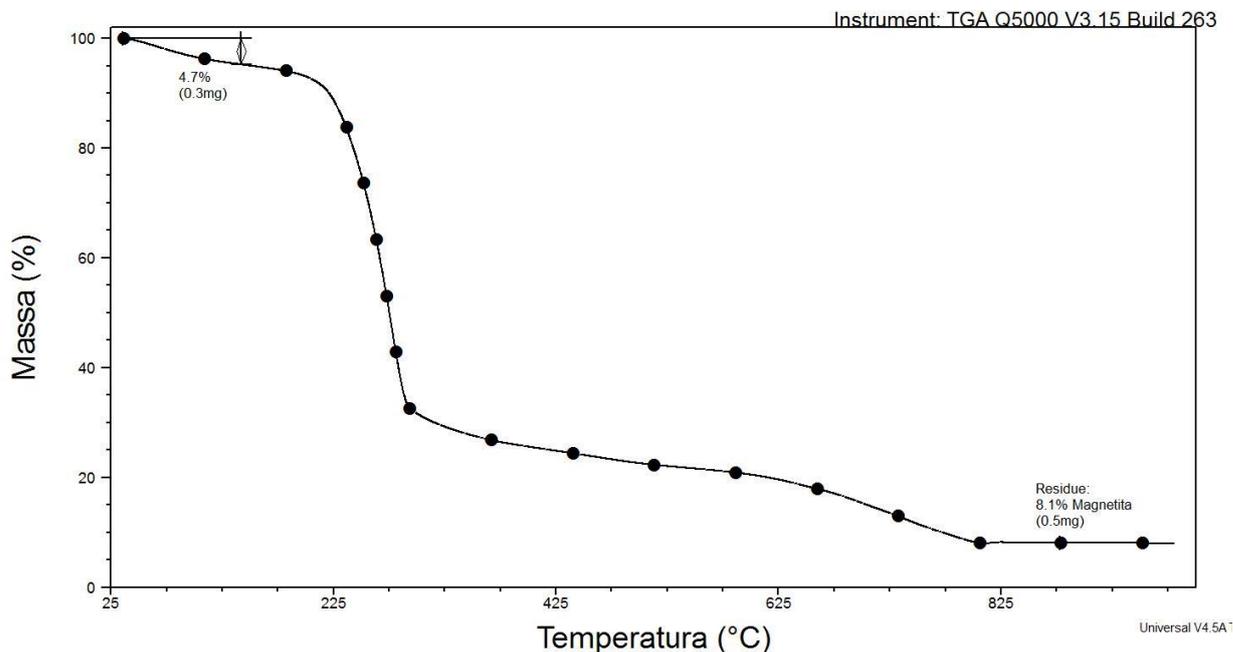


Figura 32: Termograma da microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona.

4.4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

O termograma de DSC da Figura 33 apresentou as 5 misturas físicas de progesterona e alginato e da microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona. Pode-se perceber que os picos referentes à fusão da progesterona e do alginato alteram sua intensidade em relação à mudança de proporção entre os dois. As áreas dos picos de fusão da progesterona das misturas foram obtidas (Tabela 6) e foi elaborada uma curva de calibração (% de prog liberada $\times \Delta H$ (J/g) – Figura 34). A equação da reta obtida foi $y=1,17289x$, com $R^2=0,99978$. Através desta curva de calibração foi possível calcular a quantidade de progesterona cristalina presente na microcápsula levando-se em consideração a área do pico de fusão da progesterona da amostra explicitada na Figura 35.

Tabela 5: Valores percentuais (%) de progesterona e área do pico referente à sua fusão.

Mistura física Progesterona/alginato (g/g)	% de progesterona	ΔH (J/g)
-	0	0
0,026/0,1	20,63	17,5
0,055/0,1	35,4	27,4
0,101/0,1	50,24	42,4
0,16/0,1	61,53	53,1
0,102/0,05	67	56,3
-	100	86,6

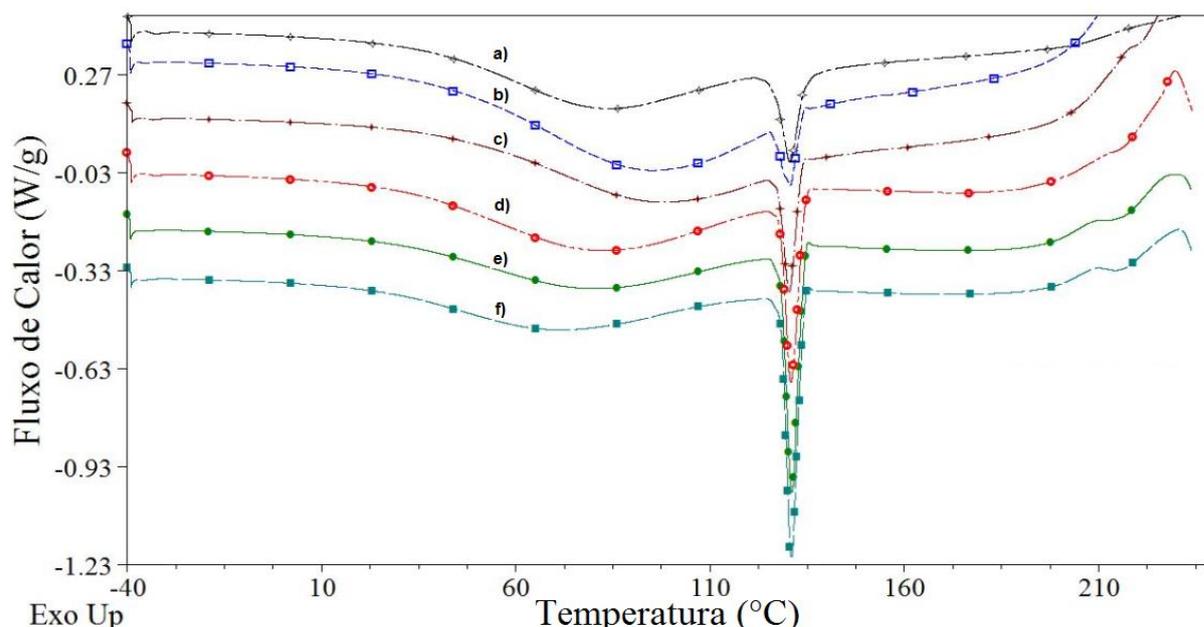


Figura 33: DSC referente à (a) Microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona e às misturas física de progesterona e alginato (b) Prog/Alg= 0,026/0,1; c) Prog/Alg= 0,055/0,1; (d) Prog/Alg= 0,101/0,1; (e) Prog/Alg=0,16/0,1; (f) Prog/Alg= 0,102/0,05.

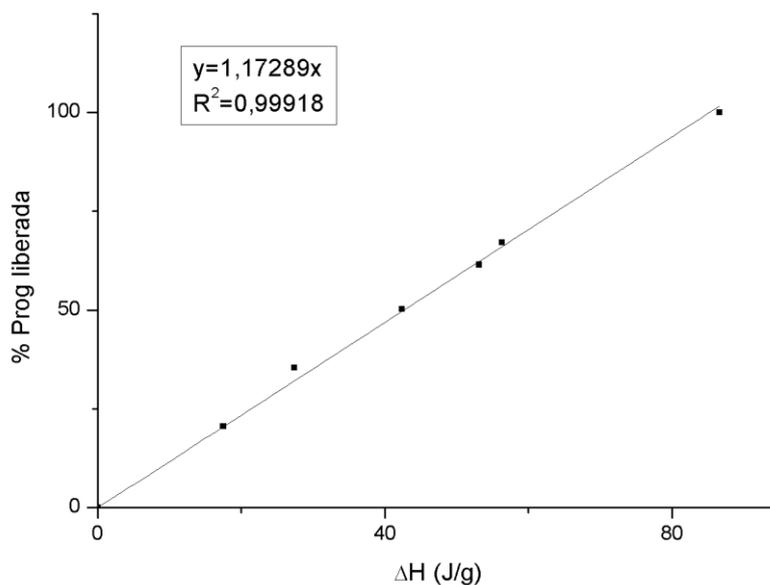


Figura 34: Curva de calibração da Carga Percentual de progesterona (%) em relação á área do pico referente à fusão da progesterona.

Sabendo-se que a área do pico da progesterona na microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 35) é 30,37 J/s, calculou-se a Carga percentual de progesterona na microcápsula através da equação $y = 1,17289x$, $R^2 = 0,99918$. A Carga Percentual de progesterona (%) encontrada foi de 35,62%.

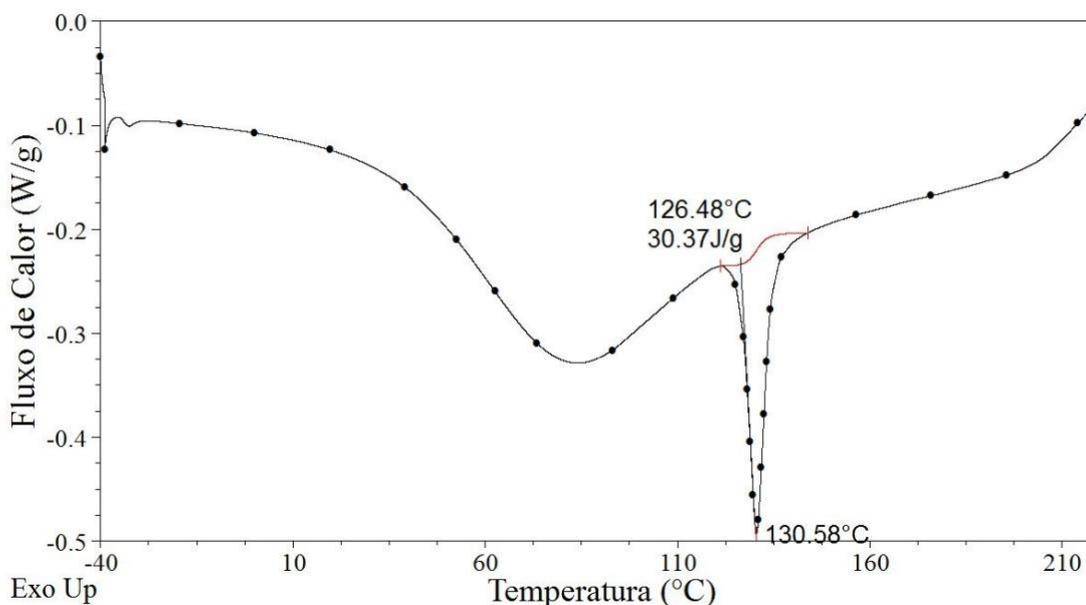


Figura 35: DSC referente Microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona.

O termograma da Figura 35 apresentou um pico endotérmico bem definido com uma temperatura de pico de 130,6°C referente à fusão da progesterona. Pode-se perceber que este pico endotérmico referente à progesterona indica sua presença na forma cristalina.

4.4.4 Determinação da carga total efetiva de progesterona na microcápsula alginato-quitosana/magnetita

4.4.4.1 Determinação do Índice de Umidade (%)

Para o cálculo do Índice de Umidade pesou-se três massas diferentes de microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona. As porcentagens de microcápsulas secas e úmidas foram calculadas e obteve-se a média e o desvio padrão, resultados que são da mesma ordem (4,74%) que o observado na análise termogravimétrica (Figura 32). Os dados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 6: Dados referentes ao percentual (%) de Umidade e Massa Seca de Microcápsulas (*DP: Desvio Padrão).

Amostra de Microcápsulas	Massa Úmida (g)	Massa Seca (g)	% Umidade	% Massa Seca
1	0,078	0,0039	95	5
2	0,1022	0,0049	95,21	4,79
3	0,0977	0,00051	94,87	5,22
Média±DP			95±0,2	5±0,2

4.4.4.2 Carga Total Efetiva (%)

A quantidade de progesterona foi calculada com o auxílio da equação $y = 0,0717 + 0,01597x$, $R^2 = 0,99845$ (curva de calibração - Figura 20). O procedimento havia sido feito em triplicata, porém uma amostra foi desconsiderada devido a problemas durante a análise. Após o cálculo da concentração molar da progesterona presente a partir da absorbância, identificou-se a massa (g) de progesterona presente na amostra.

Através da determinação do Índice de Umidade, pôde-se determinar a massa seca da microcápsula que foi utilizada primariamente no procedimento. Por meio da equação 2 ($\text{Carga \%} = M_{\text{QRP}}/M_{\text{QM}} \times 100$) calculou-se a Carga Efetiva (%) de progesterona na microcápsulas, a qual foi de $56,7\% \pm 1,8$.

Este valor foi maior do que o encontrado pelo cálculo de DSC (35,62%). Esta diferença entre os valores é devido à análise de DSC em que se detectou somente a fração cristalina da progesterona. Isso demonstra que no interior da microcápsula há uma quantidade de progesterona amorfa provavelmente distribuída na matriz e outra cristalina o que deve influenciar no perfil de liberação da progesterona.

4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microcápsulas Alginato-Quitossana/magnetita-progesterona

A imagem de MEV da microcápsula alginato-quitossana/magnetita-progesterona (Figura 36) revela uma partícula com geometria esférica com estrutura compacta e diâmetro médio aproximado de $5\text{-}10\mu\text{m}$. A forma esférica da microcápsula pode ser atribuída à alta taxa de reticulação ocorrida durante o processo de gelificação do alginato (Ribeiro *et al.*, 2005). A adição da quitossana proporciona um revestimento sobre o alginato aumentando a densidade de reticulação e diminuindo os poros, característicos da estrutura do alginato (Finotelli *et al.*, 2010).

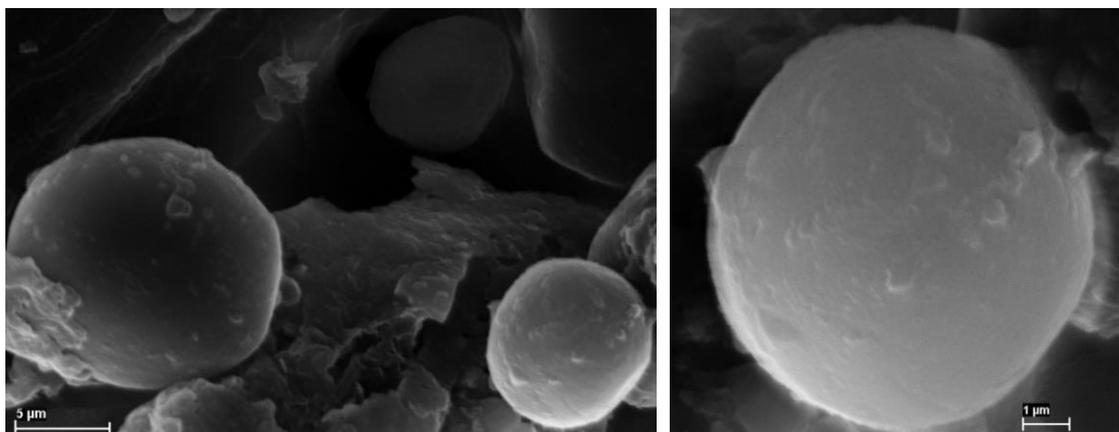


Figura 36: Imagem de MEV da microcápsula de alginato-quitossana/magnetita-progesterona.

4.4.6 Distribuição de tamanho das microcápsulas.

A distribuição de tamanho de partículas das amostras das microcápsulas alginato-quitosana, das microcápsulas alginato-quitosana/magnetita e alginato-quitosana/magnetita-progesterona foram determinadas com auxílio da Microscopia Confocal (Figura 37). As amostras foram preparadas de formas diferentes para o confocal devido ao fato das microcápsulas se comportarem de maneira diferente quando secas. Quando as microcápsulas contendo a magnetita foram colocadas na placa de vidro para secar no dessecador, elas parecem ter uma atração mais forte uma pelas outras e são mais fortemente aderidas ao vidro deformando-as e impossibilitando a sua análise pelo microscópio confocal. Por isso foi necessária a adição de um surfactante para que as microcápsulas não se aderissem umas as outras e na lâmina de vidro. Percebeu-se a formação de alguns agregados de microcápsulas, que não foi possível contabilizar este valor, então foram desconsiderados. O mesmo não ocorreu com as microcápsulas isentas de magnetita. Estas não se comportaram de forma a se agregar levando à perda de forma da esfera. Técnicas mais eficazes para o preparo das amostras estão sendo elaboradas a fim de se adquirir imagens mais representativas das microcápsulas através da técnica de confocal.

A distribuição de tamanho das microcápsulas alginato-quitosana (Figura 37a) esta localizada entre 9 e 88 μ m com um máximo de distribuição entre 39-55 μ m. 75% das microcápsulas apresentam um tamanho entre 23-55 μ m.

A distribuição de tamanho das microcápsulas alginato-quitosana/magnetita (Figura 37b) localizam o máximo de distribuição correspondente a 46,4% das microcápsulas entre 45-63 μ m.

A distribuição de tamanho das microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 37c) está deslocado para valores maiores que as microcápsulas sem a progesterona e magnetita com valores entorno a 97 μ m e um máximo de distribuição entre 53-75 μ m correspondente ao 59,3% das micropartículas.

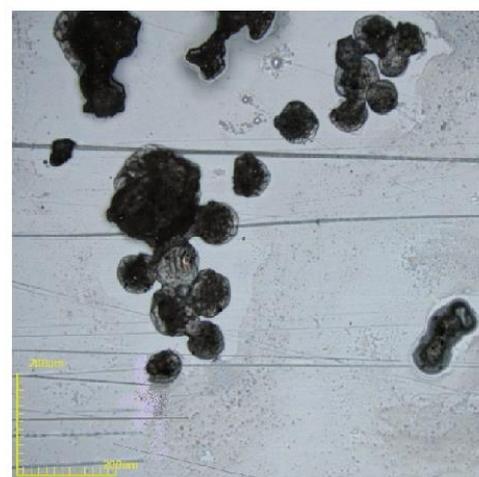
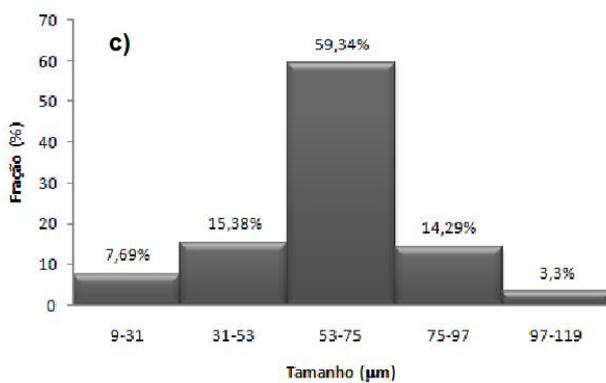
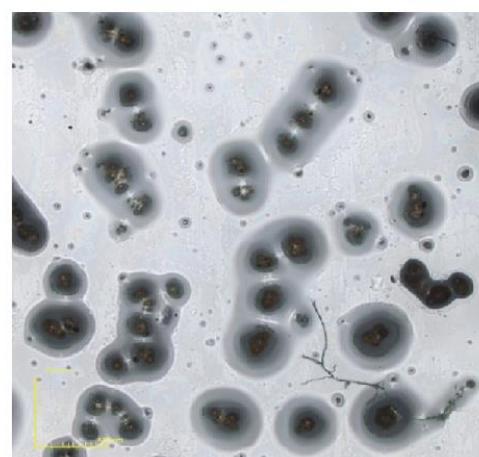
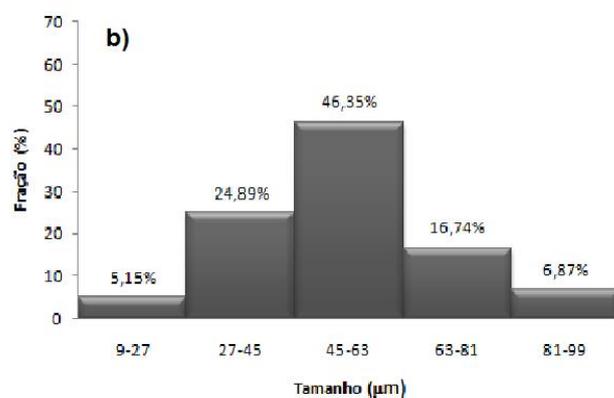
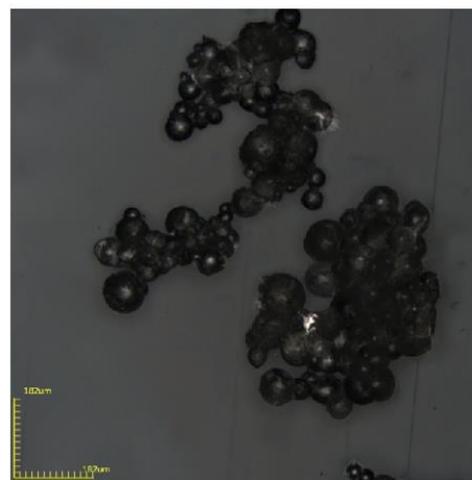
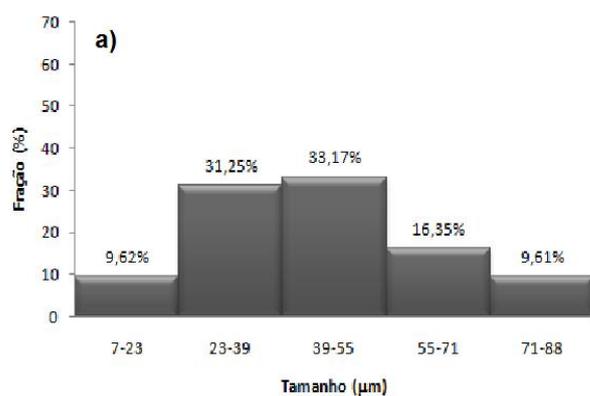


Figura 37: Distribuição de tamanho referente às microcápsulas (a) alginato-quitosana; (b) alginato-quitosana/magnetita; e (c) alginato-quitosana/magnetita-progesterona.

Pode-se inferir que em todos os casos a distribuição de tamanho apresenta um formato gaussiano e a faixa de tamanho obtida se encontra adequada para aplicações biomédicas utilizando a via intramuscular e subcutânea, as quais exigem um tamanho entre 10 e 250 μm (Tran *et al.*, 2011). Esta via de administração é uma alternativa plausível, uma vez que a progesterona será absorvida de forma controlada pela corrente sanguínea e a microcápsula polimérica será biodegradada no próprio tecido em que foi previamente inserida. No caso do uso em equinos, as partículas podem apresentar um tamanho maior devido ao porte do animal.

4.4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das microcápsulas Alginato-Quitosana/magnetita-progesterona.

A análise da morfologia interna das microcápsula alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 38) com auxílio da MET revela a distribuição heterogênea das fases e a dificuldade de identificação destas nas microcápsulas. Pode-se perceber que a microcápsula apresenta próximo à sua superfície uma região constituída por vários poros. Essa formação de poros é uma característica do alginato e contribui para uma baixa retenção do encapsulado, por isso se optou por revestir a microcápsula com a quitosana. Na imagem se observa na superfície uma fina camada densa que deve estar associada à quitosana utilizada para diminuir a taxa de liberação da progesterona em relação ao alginato e diminuir possíveis perdas da carga devido à menor retenção da matriz de alginato (Huguet e Dellacharie, 1996).

Estudos mais aprofundados serão realizados a fim de se determinar precisamente a localização da progesterona na microcápsula.

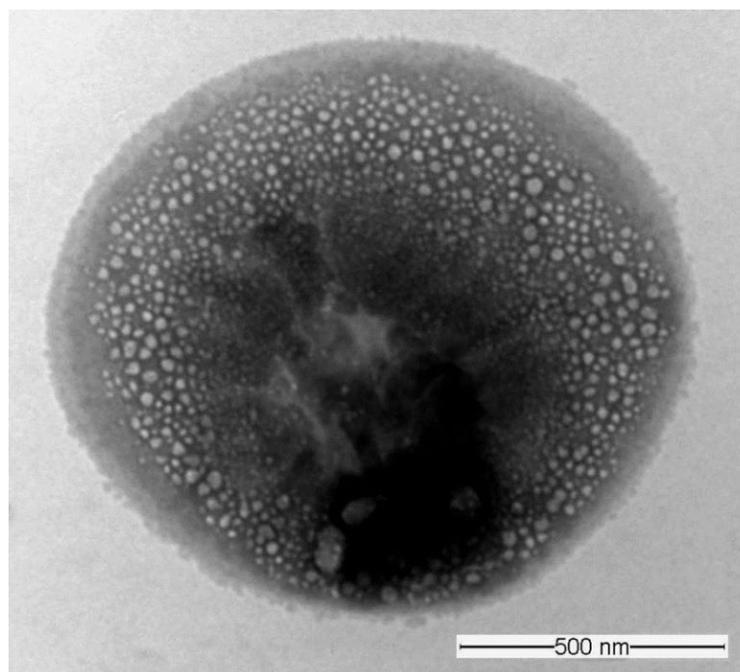


Figura 38: Imagem de MET da microcápsula alginato-quitosana/magnetita progesterona.

4.5 Estudo do perfil de liberação da progesterona a partir da microcápsula alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas

O perfil de liberação da progesterona a partir das microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona (Figura 39, Tabela 7) sem a presença do campo magnético externo mostra, primeiramente, um salto no perfil de liberação (“burst”) de aproximadamente 53 % do total de progesterona encapsulada. Esta característica também foi observada na experiência utilizando um campo magnético externo, já que o “burst” não depende do transporte interno de progesterona. Este comportamento está relacionado, principalmente, com a presença de progesterona na superfície ou próxima a ela, fenômeno que se dá mais pronunciado devido à relativa carga alta de progesterona, $56,7\% \pm 1,8$ (m/m), em relação à massa total das partículas. Nas primeiras 12 horas foram liberadas de forma controlada 14% da progesterona (após o burst) e no final do experimento (72 horas, Tabela 7) 26% em relação a progesterona total encapsulada.

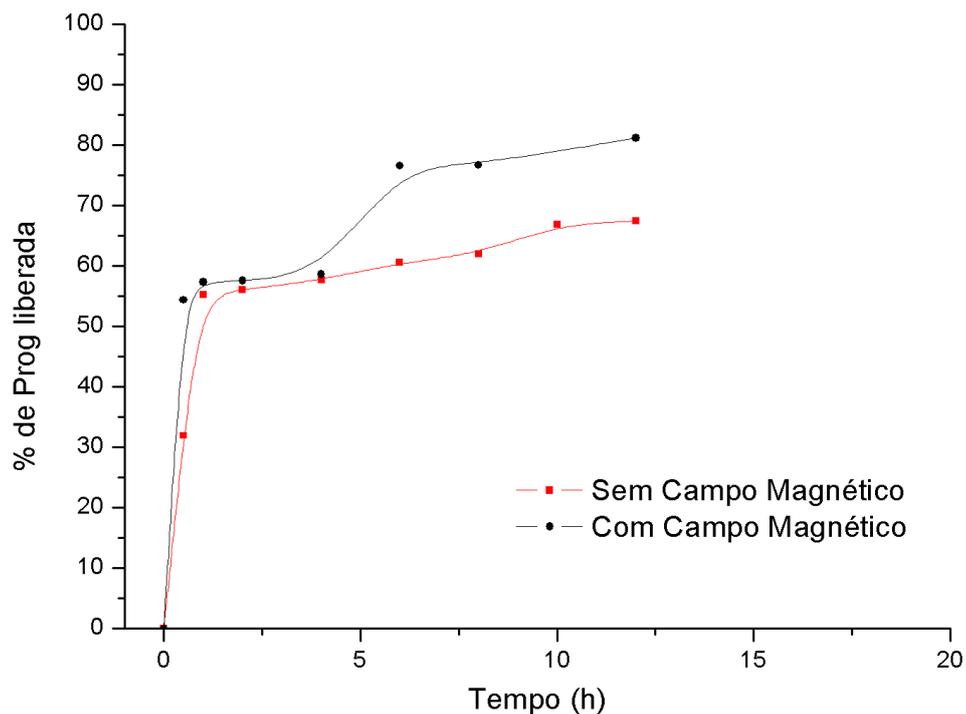


Figura 39: Perfil de liberação da progesterona na presença e ausência do campo magnético pulsante.

Tabela 7: Dados referentes à progesterona liberada (%) em 72h na ausência do campo magnético e em 12 horas na presença do campo magnético pulsante.

Amostras	Na presença do campo magnético pulsante		Na ausência do campo magnético pulsante
	Tempo (h)	% Prog liberada	% Prog liberada
1	1,25	-	28,39
2	0,5	54,39	31,94
3	1	57,33	53,23
4	2	57,60	56,13
5	4	58,61	57,65
6	6	76,61	60,57
7	8	76,73	61,97
8	10	-	66,88
9	12	81,18	67,43
10	24	-	71,45
11	48	-	73,89
12	72	-	78,71

O “burst” é um fenômeno frequente nos sistemas de liberação, que ocorre geralmente pela presença do fármaco na superfície da estrutura matricial (Lopes *et al.*, 2005). Decorrido este momento inicial, a liberação ocorrerá levando-se em consideração as características do sistema. O alginato, por ser uma matriz hidrofílica, dificulta a passagem da progesterona que é um fármaco lipofílico. A presença da quitosana, por sua vez, reforça esse controle na liberação já que o alginato possui uma tendência a formar poros. Cerchiara *et al.*, 2003, estudaram a liberação da progesterona de complexos de hidroxipropil- β -ciclodextrina incorporada com quitosana. Eles perceberam que a inserção da quitosana diminuiu a liberação em 24h. Este efeito foi explicado devido à difusão lenta da progesterona (fármaco lipofílico) através da quitosana que possui propriedades hidrofílicas.

A liberação da progesterona na presença do campo magnético pulsante apresentou um perfil de liberação similar do que na ausência do campo (Figura 39, Tabela 7), na primeira hora de liberação. Este comportamento observado está em correspondência como a interpretação dada para o perfil de liberação sem a presença do campo magnético considerando que é dependente da solubilidade e distribuição da droga na região próxima a superfície. Comportamento semelhante foi observado no trabalho de Finotelli *et al.*, 2010, para o estagio inicial em presença de um campo magnético e sem o campo, no estudo da liberação de um fármaco hidrofílico (insulina) na matriz alginato-quitosana. Eles perceberam que na presença do campo magnético oscilante o perfil de liberação foi mais intenso.

Nos tempos maiores (>5 h) é perceptível o aumento da taxa de liberação para as partículas expostas ao campo magnético liberando às 12 horas aproximadamente 14% a mais de progesterona. Este comportamento é consequência da modificação do coeficiente de difusão da matriz originado pela vibração das nanopartículas magnéticas que geram modificações conformacionais das cadeias poliméricas da matriz polimérica devido a sua maior mobilidade e conseqüentemente aumentando o transporte de progesterona (Souza, A. *et al.*, 2014; Edelman e Lander, 1993).

Por ser um sistema inovador, ainda não são encontrados muitas opções de trabalhos referentes ao uso da matriz alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas. Contudo, a liberação de fármacos de matrizes com outros polímeros já foram estudado. Hsieh *et al.* (1981) estudou a liberação de albumina bovina a partir de um disco do copolímero etileno-vinil-acetato (EVA) contendo partículas magnéticas e observou que quando o sistema era exposto a um campo magnético

oscilante (0,1T), o polímero liberou 100% a mais de albumina do que quando na ausência do campo magnético.

A formação de uma relação entre o perfil de liberação observado e a cinética de liberação depende das características da matriz transportadora, principalmente fatores tais como morfologia e difusividade das matrizes, mobilidade da cadeia, taxa de intumescimento, porosidade, cristalinidade e solubilidade da droga na matriz (Korsmeyer e Peppas, 1981).

O comportamento cinético observado para a formulação alginato-quitosana/magnetita-progesterona é complexo assim como sua morfologia interna (Figura 38). A matriz polimérica modula a liberação da progesterona o que depende da sua difusividade e solubilidade. Estas propriedades estão relacionadas com a geometria da progesterona, a flexibilidade das cadeias alginato-quitosana e cristalinidade das fases destes polímeros, por outro lado o coeficiente de solubilidade depende da presença de fase cristalina e interações que possam existir entre a progesterona e as fases poliméricas.

O análise cinético dos dados experimentais e seu ajuste aos comportamentos cinéticos clássicos, realizados para as primeiras 12 horas após o burst inicial, evidencia um comportamento diferenciado entre os sistemas com e sem influencia do campo magnético externo.

Caso a progesterona estivesse formando uma cápsula ou núcleo, a morfologia da microcápsulas seria capsular e a ordem esperada seria zero (Figura 40a) para o qual os dados das experiências sem aplicar o campo magnético externo se aproximam. Para estes mesmos dados, sem aplicar o campo magnético, se encontrou um ajuste similar para o ordem 1 que é próprio de formulações nas quais a concentração de droga contida na matriz é menor que a de saturação. No terceiro ajuste realizado assumindo uma ordem $t^{1/2}$, previsto por Higuchi para os casos em que a droga está distribuída em toda a matriz, também foi observado uma correlação similar. Estes resultados são condizentes com a morfologia heterogênea da matriz (parte da droga encapsulada e parte distribuída na fase de alginato) observada (Figura 38) assim como a existência da uma fração cristalina de progesterona que dificulta o ajuste a um modelo simples associado à morfologia e demais características da matriz e a carga.

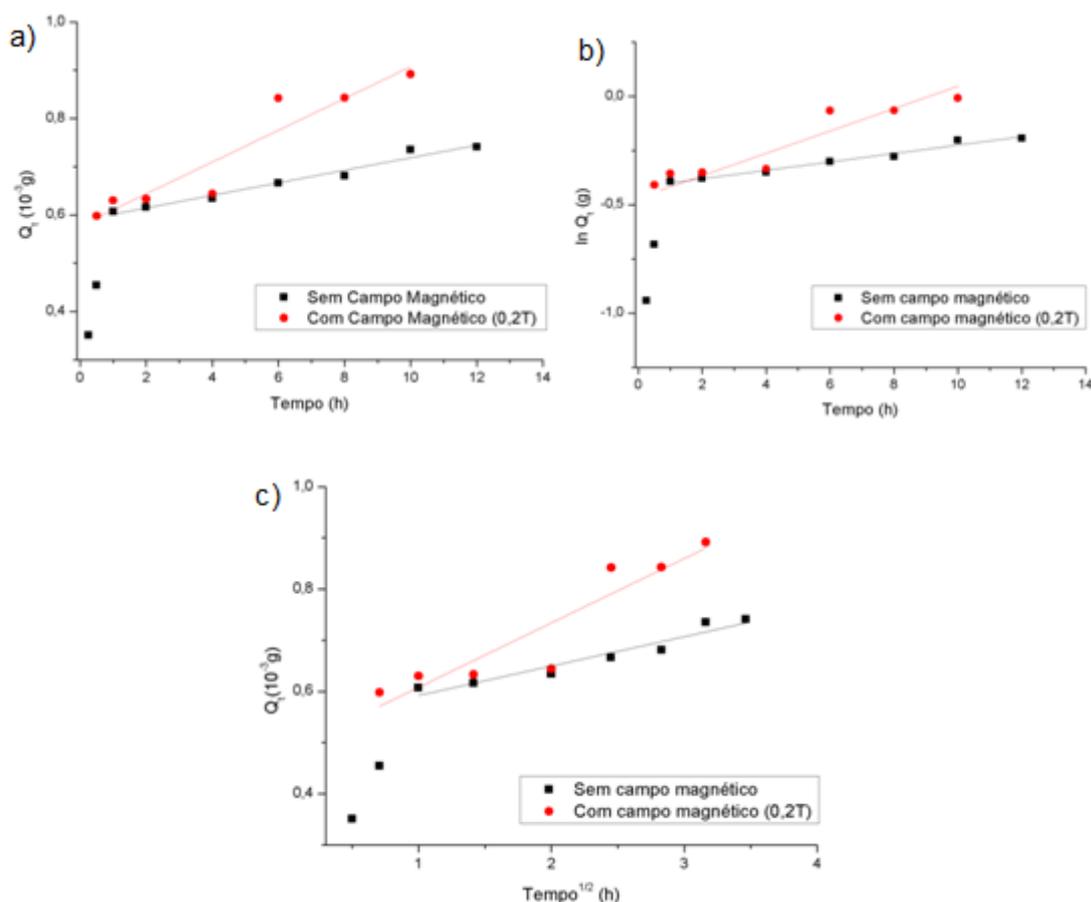


Figura 40: Correlação linear entre diferentes ordens para a cinética de liberação da progesterona ((a) $n=0$; (b) $n=1$; (c) $t^{1/2}$ (Higuchi)).

A progesterona cristalizada demorará mais tempo para ser solubilizada e ser capaz de se difundir através do polímero. Como apenas a droga solúvel na matriz irá contribuir para o mecanismo de difusão, parte da progesterona que não está solubilizada poderá ser liberada por intumescimento do polímero ao longo do tempo (Lopes *et al.*, 2007). O fato do polímero também possuir uma parte amorfa e uma cristalina promover uma migração irregular da droga no seu interior, influenciando no comportamento cinético de liberação (Carelli *et al.*, 1993).

Esta análise sustenta também a interpretação dos resultados observados no sistema alginato/quitosana/magnetita/progesterona ao aplicar o campo magnético externo. Existe uma apreciável dispersão de pontos experimentais em relação ao ajuste matemático realizado para as ordens zero, 1 e $t^{1/2}$ como consequência do efeito do campo magnético sobre o coeficiente de difusão e sobre as interações entre a progesterona e as fases poliméricas o que ocorre de forma diferenciada nas

diferentes regiões existentes nas microcápsulas. Isto afeta a difusão da progesterona e o tratamento matemático fica mais complexo (Siepmann e Siepmann, 2012) pelo que dificilmente acompanhara um comportamento cinético simples.

Orienti e Zecchi (1993) estudaram a diferença de liberação da progesterona através de microcápsulas e microesferas de albumina (polímero hidrofílico). Eles adquiriram micropartículas regulares e observaram que a liberação através da microesfera ocorreu por um mecanismo anômalo de difusão, enquanto que com as microcápsulas a liberação ocorreu de acordo com as tendências cinéticas que variam de acordo com o tempo. O procedimento de produção das microcápsulas influencia decisivamente no mecanismo de liberação da droga. A presença de poros, a intensidades da interação dos componentes, a solubilidade do fármaco na matriz e a presença de agentes reticulantes são fatores que determinam qual o modelo matemático que melhor se ajusta ao sistema ao sistema de liberação.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada (hidrotérmica) com uma temperatura de reação de 160°C e tempo de reação de 5 horas, foi adequada para a produção de nanopartículas regulares de óxidos de ferro, magnetita como fase maioritária, devidamente caracterizadas pelas técnicas de Difração de raios X e espectroscopia Mossbauer.
- A fase cristalina da magnetita produzida apresentou um tamanho médio de cristal de 19nm (DRX) coexistindo com partículas de menor tamanho (10µm) registradas com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão.
- A nanomagnetita apresentou uma curva de magnetização à temperatura ambiente sem a existência de histereses, uma coercividade nula e ausência de magnetização residual característico de um comportamento superparamagnético. A magnetização de saturação alcançada foi de 43 emu g⁻¹.
- As microcápsulas alginato-quitosana/magnetita-progesterona apresentaram um formato regular esférico com uma superfície densa sem aparente porosidade. A distribuição de tamanho é do tipo gaussiana com um máximo de distribuição em 53-75µms, uma carga magnética de 8% m/m e 56,7% m/m de progesterona destas aproximadamente 36% em fase cristalina.
- O perfil de liberação da progesterona a partir das microcápsulas formuladas apresentou um “burst” pronunciado (53% de progesterona) tanto nas experiências sem aplicar um campo magnético externo como nas que foi aplicado o campo de 0,1T. As principais diferenças observadas pelo efeito do campo magnético externo foram observadas a partir das 4 horas de liberação controlada.
- O campo magnético externo aplicado originou uma liberação de 10% m/m de progesterona a mais nas primeiras 12 horas em relação à liberação registrada sem aplicar o campo magnético externo.
- O comportamento cinético observado não correspondeu aos perfis clássicos cinéticos associados a morfologias capsulares (n=0), sistemas não saturados na carga (n=1) a distribuição da carga em toda a matriz (t^{1/2}) isto devido à morfologia complexa apresentada pelas microcápsulas como foi observado

nas imagens do corte polar das microcápsulas com auxílio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

- A liberação controlada da progesterona a partir da formulação alginato/quitosana/magnetita/progesterona, contendo uma carga com propriedades superparamagnética que permite a vetorização e aumento da taxa de liberação da progesterona como pretendido nos objetivos do presente trabalho resulta promissório para o controle da concentração plasmática do hormônio em eqüinos, deixando em aberto a necessidade de um maior controle da morfologia interna das microcápsulas.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abruzzo, A.; Bigucci, F.; Cerchiara, T.; Saladini, B.; Gallucci, M.C.; Cruciani, F.; Vitali, B.; Luppi, B. (2013) Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers*. 91:651–658.

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*. 100:5-28.

Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra M. R. Jesús Santamaría (2007) Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday*. 2(3): 22-32.

Bañobre-López, M.; Teijeiro, A.; Rivas, J. (2013) Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 18:397-400.

Bhattacharai, R.S.; Dhandapani, N.V.; Shrestha, A. (2011) Drug delivery using alginate and chitosan beads: An Overview. *Chronicles of Young Scientists*. 2(4):192-6.

Bhatt, A.S., Bhatt, D.K.; Santosh, M.S. (2010) Electrical and magnetic properties of chitosan-magnetite nanocomposites. *Physica B*. 405:2078-2082.

Braccini, I., Pérez, S. (2001) Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*. 2:1089-1096.

Brasil (2010) Farmacopéia Brasileira – Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA: Brasília. 904p.

Carelli, V.; Colo, G.D.; Nannipieri, E.; Serafini, M.F. (1993) A study of controlled-release systems for progesterone based on crosslinked poly(ethylene oxides). *International Journal of Pharmaceutics*. 94:103-113.

Cerchiara, T.; Luppi, B.; Bigucci, F.; Zecchi, V. (2003) Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 258:209-215.

Chen, D. e Liao M. (2002) Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 16:283-291.

Chen, J.; Wang, F.; Huang, K.; Liu, Y.; Liu, S. (2009) Preparation of Fe₃O₄ nanoparticles with adjustable morphology. *Journal of Alloys and Compounds*. 475:898–902.

Chen, J.; Yang, P.; Ma, Y.; Wu, T.(2011) Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator. *Carbohydrate Polymers*.84:364-372.

Cheng, F.; Su, C.; Yang, Y.; Yeh, C.; Tsai, C.; Wu, C.; Wu, M.; Shieh, D. (2005) Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials*. 26:729–738.

Chomoucka, J.; Drbohlavova, J.; Huska, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Hubalek, J. (2010) Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 62:144–149.

Costa, P.J.C. (2002) Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 38(2):141-153.

Costa, P. e Lobo, J.M.S. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.13:123–133.

Crcarevska, M.S.; Dodov, M.G.; Goracinova, K. (2008) Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 68:565–578.

Dash, A.K.; Cudworth II, G. C. (1998) Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 40:1-12.

Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E. (2011) Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*. 36:981-1014.

Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 67 (3):217-223.

Edelman, E.R.; Langer, R. (1993) Optimization of release magnetically controlled release devices from polymeric drug. *Biomaterials*. 14(6):621-626.

Estevinho, B.N.; Rocha, F.; Santos, L.; Alves, A. (2013) Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science & Technology*. 31:138-155.

Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. (2010) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization and Applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 7(1):1-37.

Faria, D.R. e Gradela A. (2010) Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. 34(2):114-122.

Fernandes, M.T.C.; Kawachi, E.Y. (2006) Estudo preliminar da obtenção de nanopartículas de óxido de ferro pelo método de microemulsão. *Anais do 12º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA - São José dos Campos, SP, Brasil*.

Finotelli, P. V.; Morales, M. A.; Rocha-Leão, M. H. R.; Baggio-Saitovitch, E. M.; Rossi, A. M. (2004) Magnetic studies of iron(III) nanoparticles in alginate polymer for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering C*. 24:625-629.

Finotelli, P. V.; Silva, D. D.; Penna M. S.; Rossi, A. M.; Farina, M.; Andrade, L. R.; Takeuchi, A. Y.; Rocha-Leão, M. H. (2010) Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 81:206-211.

Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. (2008) A review of stimuli-responsenanocarriers for drug and gene delivery. *Journal Controlled Release*. 126:187-204.

Gåserød, O.; Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk (1998) Microcapsules of alginate-chitosan – I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*. 19:1815-1825.

George, M. e Abraham, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*. 114:1-14.

Goya, G.F.; Berquó, T.S.; Fonseca, F.C.; Morales, M.P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles (2003). *Journal Of Applied Physics*. 94(5):3519-3528.

Gupta, A.K. e Gupta, M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 26:3995–4021.

Gusko, N.; Papadopoulos, G.J.; Likodimos, V.; Patapis, S.; Yarmis, D.; Przepiera, A.; Majszczyk, J.; Typek, J.; Wabia, M.; Aidinis, K.; Drazek, Z. (2002) Photoacoustic, EPR and electrical conductivity investigations of three synthetic mineral pigments: hematite, goethite and magnetite. *Materials Research Bulletin*. 37:1051-1061.

Hejazi, R. e Amiji, M. (2003) Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 89:151-165.

Herea, D.; Chiriac, H.; Lupu, N. (2011) Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with controlled magnetization. *J Nanopart Res*.13:4357–4369.

Honary, S.; Maleki, M.; Karami, M. (2009) The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/ chitosan microparticles containing prednisolone. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(1):53-61.

Hong, R.Y.; Pan, T.T.; Han, Y.P.; Li, H.Z.; Ding, J.; Han, S. (2007) Magnetic field synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles used as a precursor of ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 310:37-47.

Huguet, M.L., Dellacherie, E. (1996) Calcium Alginate Beads Coated with Chitosan: Effect of the Structure of Encapsulated Materials on Their Release. *Process Biochemist*. 31(8):745-751.

Jain, P.K.; El-Sayed, I.H.; El-Sayed, M.A. (2007) Au nanoparticles target cancer. *Nanotoday*. 2(1):18-29.

Jameela, S.R.; Kumary, T.V.; Lal, A.V.; Jayakrishnan, A. (1998) Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *Journal of Controlled Release*. 52:17-24.

Karewisk, A.; Zasada, K.; Szczubiatka, K.; Zapotoczny, S.; Lach, R.; Nowakowska, M. (2010). "Smart" alginate–hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin. *International Journal of Pharmaceutics*. 385:163–169.

Korsmeyer, R.W. e Peppas, N.A. (1981) Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science*. 9:211-227.

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.

Kulkarni, S.A.; Fend, S. (2013) Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. 30:2512–2522.

Latha, M.S.; Lal, A.V.; Kumary, T.V.; Sreekumar, R.; Jayakrishnan, A. (2000) Progesterone Release from Glutaraldehyde Cross-linked Casein Microspheres: In Vitro Studies and In Vivo Response in Rabbits. *Contraception*. 61:329-334.

Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L. (2007) Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 8:2533-2541.

Lee, K.Y.; Mooney, D.J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 37:106– 126.

Lee, M.; Li, W.; Siu, R.K.; Whang, J.; Zhang, X.; Soo, C.; Ting, K.; Wu, B.M. (2009) Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials*. 30:6094-6101.

Li, G.; Jiang, Y.; Huang, K.; Ding, P.; Chen, J. (2008) Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*. 466:451-456.

Li, S.; Wang, X.; Zhang, X.; Yang, R.; Zhang, H.; Zhu, L.; Hou, X. (2002) Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. *Journal of Controlled Release*. 84:87–98.

Li, Y.; Jiang, R.; Liu, T.; Lv, H.; Zhang, X. (2014) Single-microemulsion-based solvothermal synthesis of magnetite microflowers. *Ceramics International* 40:4791–4795.

Lim, G.; Ong, H.; Lee, B.; Ahmad, M.S.; Singh, H.; Ravindra, P. (2013) Formation Of Chitosan-Alginate Capsules Using Extrusion-Dripping Method: Effect Of Stirring Speed And Biopolymers Types. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 7(5):84-90.

Lin, X.M.; Samia, A.C.S. (2006) Synthesis, assembly and physical properties of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 305:100-109.

Liu, T.; Hu, S.; Liu, D.; Chen, S.; Chen, I. (2009) Biomedical nanoparticle carriers with combine thermal and magnetic responses. *Nano Today*. 4:52-65.

Lopes, C.M.; Lobo, J.M.S.; Costa, P. (2005) Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41(2):143-154.

Lu, A.; Salabas, E.L.; Schüth, F. (2007) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization and Application. *Angewandte Chemie International Edition*. 46:1222-1244.

Lucinda-Silva, R. M.(2010) Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*. 81:260–268.

Ma, H.; Qi, X.; Maitani, Y.; Nagai, T. (2007) Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *International Journal of Pharmaceutics*. 333:177-186.

Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. (2011) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63:24–46

Martín-Villena, M.J.; Fernández-Campos, F.; Calpena-Campmany, A.C.; Bozal-de Febrer, N.; Ruiz-Martínez, M.A.; Clares-Naveros, B. (2013) Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. *Carbohydrate Polymers*.94:1– 11.

Martins, S.; Sarmiento, B.; Souto, E.B.; (2007) Ferreira, D.C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. *Carbohydrate Polymers*. 69:725–731.

Mashak, A.; Taghizadeh, S.M. (2006) In vitro progesterone release from -irradiated cross-linked polydimethylsiloxane. *Radiation Physics and Chemistry*. 75:229–235.

Menck, C. F. M. (2010) A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. *Estudos Avançados*. 24(70):99-108.

Mladenovska

, K; Raicki, R.S.; Janevik, E.I.; Ristoski, T.; Pavlova, M.J.; Kavaskovski, Z.; Dodov, M.G.; Goracinova, K. (2007) Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 342:124–136.

Mi, F.L.; Sung, H.; Shyu, S. (2002) Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*. 48:61-72.

Morales, M.P; Veintemillas-Verdaguer, S.; Montero, M.I; Serna, C.J. (1999) Surface and Internal Spin Canting in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanoparticles. *Chem. Mater.* 11:3058-3064.

Moreto, J.A.; Szmoski, R.M.; Cótica, L.F.; Paesano Jr., A.; Santos, I.A.; Cunha, J.B.M. (2007) Espectroscopia Mössbauer e refinamento estrutural no sistema cerâmico isomórfico ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). *Cerâmica*. 53:175-179.

Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. (2004) Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry*. 14:2161-2175.

Oliveira, J.E; Medeiros, E.S.; Cardozo, L.; Voll, F.; Madureira, E.H.; Mattoso, L.H.C.; Assis, O.B.G. (2013) Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. *Materials Science and Engineering C*. 33:844-849.

Oliveira, L.C.A.; Fabris, J.D.; Pereira, M.C. (2012) Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: Uma Revisão. *Química Nova*. 36(1):123-130.

Oriente, I. e Zecchi, V. (1993) Progesterone-loaded albumin microparticles. *Journal of Controlled Release*. 21:1-7.

Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. (2003) Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 36:167-181.

Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S.K. (2012) Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 8:147–166.

Patel, D.; Chan, Y.; Lee, G.H. (2009) Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution. *Current Applied Physics*. 9:S32-S34.

Petcharoen, K.; Sirivat, A. (2012) Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Materials Science and Engineering B*. 177:421-427.

Philippova, O., Barabanova, A., Molchanov, V., Khokhlov, A. (2011) Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal*. 47:542–559.

Pinna, N.; Grancharov, S.; Beato, P.; Bonville, P.; Antonietti, M.; Niederberger, M. (2005) Magnetite Nanocrystals: Nonaqueous Synthesis, Characterization, and Solubility. *Chem. Mater*. 17:3044-3049.

Poncelet, D.; Lencki, R.; Beaulieu, C.; Halle, J.P.; Neufeld, R.J.; Fournier, A. (1992) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38:39-45.

Poncelet, D.; Poncelet De Smet, B.; Beaulieu, C.; Huguet, M.L.; Fournier, A.; Neufeld, R.J. (1995) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 43:644-650.

Predoi, D.; Clerac, R.; Raileanu, M.; Crisan, M.; Zaharescu, M. (2007) Structural and magnetic properties of Fe_xO_y nanoparticles dispersed in silica matrix. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 9(5):1495-1498.

Qu, J.; Liu, G.; Wang, Y.; Hong, R. (2010) Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia. *Advanced Powder Technology*. 21:461-467.

Rathbone, M.J.; Bunt, C.R.; Ogle, C.R.; Burggraaf, S.; Macmillan, K.L.; Pickering, K. (2002) Development of an injection molded poly(ε-caprolactone) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. *Journal of Controlled Release*. 85:61-71.

Reis, C.P.; Neufeld, R.J.; Vilela, S.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. (2006) Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*. 23(3):245-257.

Ribeiro, A.J.; Neufeld, R.J.; Arnaud, P.; Chaumeil, J.C. (1999) Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 187:115-123.

Ribeiro, A.J.; Silva, C.; Ferreira, D.; Veiga, F. (2005) Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation

technique. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 25:31-40.

Rohani, S.S.R.; Abnous, K.; Tafaghodi, M. (2014) Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of Insulin with regard to the selection of excipients. *International Journal of Pharmaceutics*. 465:464–478.

Rosen, J.E.; Chan, L.; Shieh, D.; Gu, F.X. (2012) Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8:275–290.

Rothen-Weinhold, A.; Gurny, R.; Dahn, M. (2000) Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. *Research Focus – Reviews*. 3(7):222-231.

Santos, N.C. e Castanho, M.A.R.B. (2002) Lipossomas: A bala mágica acertou? *Química Nova*. 25(6B):1181-1185.

Satarkar, N.S. e Hilt, J.Z. (2008) Magnetic hydrogel nanocomposites for remote controlled pulsatile drug release. *Journal of Controlled Release*. 130:246–251.

Shen, L; Qiao, Y.; Guo, Y.; Meng, S.; Yang, G.; Wu, M.; Zhao, J. (2014) Facile coprecipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. *Ceramics International*. 40: 1519–1524.

Shubayev, V.I.; Pisanic II, T.R.; Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61:467-477.

Siepmann, J. e Siepmann, F. (2012) Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 161:351–362.

Silva, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F. (2003) Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 39(1):1-20.

Silva, C.M.; Ribeiro, A.J.; Figueirido, M.; Ferreira, D.; Veiga, F. (2006) Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation. *The AAPS Journal*. 7(4):903-913.

Silva, J.F.S.; Cnop, F.P.; Sánchez, R.J.R.; Vianna, S.A.B.; Souza, G.V.; Eligio, C.T.; Ribas, J.A.S.; Costa, D.S. (2006) Avaliação da dinâmica útero-ovárica da égua sob o

efeito de um implante subcutâneo de micro-cápsulas de polihidroxibutirato contendo progesterona. *RPCV*. 101(559-560):225-230.

Silva, V.A.J.; Andrade, P.L.; Silva, M.P.C.; Bustamante, D.A.; Valladares, L.L.S.; Aguiar, J.A. (2013) Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 343:138–143.

Sinha, V.R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 274:1-33.

Song, H.; Yu, W.; Gao, M.; Liu, X.; Ma, X. (2013) Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*. 96:181-189.

Souza, A.; Souza, K.C.; Leite, P.M.S.; Souza, R.G.; Souza, E.M.B. (2014) A Dual Functional [SBA-15/Fe₃O₄/P(N-iPAAm)] Hybrid System as a Potential Nanoplatform for Biomedical Application. *Journal of Nanomaterials*. 2014:1-10. doi:10.1155/2014/293624.

Sun, C.; Lee, J.S.H.; Zhang, M. (2008) Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60:1252–1265.

Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D.B.; Raoux, S.; Rice, P.M.; Wang, S.X.; Li, G. (2004) Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 126:273-279.

Taghizadeh, S.M.; Mashak, A.; Jamshidi, A.; Imani, M. (2004) Study of Progesterone Release Mechanisms from a Silicone Matrix by a New Analytical Method. *Journal of Applied Polymer Science*. 91:3040–3044.

Tan, W. e Takeuchi, S. (2007) Monodisperse Alginate hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Advanced Materials*. 19:2696-2701.

Timko B.P.; Dvir, T.; Kohane, D.S. (2010) Remotely Triggerable Drug Delivery Systems. *Advanced Materials*. 22:4925–4943.

Tønnesen, H.H. e Karlsen, J. (2002) Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 28(6):621–630.

Tran, V.T.; Benoîte, J.; Venier-Julienne, M. (2011) Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy. *International Journal of Pharmaceutics*. 407:1-11.

Villanova, J.C.O.; Oréfice, R.L.; Cunha, A.S. (2010) Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 20(1):51-64.

Vos, P.; Faas, M.M.; Strand, B.; Calafiore, R.(2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*. 27:5603-5617.

Wei, Y.; Han, B.; Hu, X.; Lin, Y.; Wang, X.; Deng, X. (2012) Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Engineering*. 27:632-637.

Willard, M.A.; Kurihara, L.K.; Carpenter, R.R.; Calvin, S.; Harris, V.G. (2004) Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*. 49:125-170.

Wittaya-Areekul S.; Kruenate, J.; Praharn, C. (2006) Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *International Journal of Pharmaceutics*. 312:113-118.

Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*. 3:397–415.

Xiao, C. e Fei, S. (2013) Fabrication of distilled water-soluble chitosan/alginate functional multilayer composite microspheres. *Carbohydrate Polymers*.98:1366-1370.

Yang, J.; Xie, Y.; He, W. (2011) Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*. 84:33–39.

Yigit, M.V.; Moore, A.; Medarova, Z. (2012) Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharm Research*. 29:1180–1188.

Zapata, E.V.E.; Péres, C.A.M.; González, C.A.R.; Carmona, J.S.C.; Lopez, M.A.Q.; García-Casillas, P.E. (2012) Adherence of paclitaxel drug in magnetite chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*. 536:441-444.

Zhang, L.; Zhu, X.; Sun, H.; Chi, G.; Xu, J.; Sun, Y. (2010) Control synthesis of magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles under UV irradiation in aqueous system. *Current Applied Physics*.10:828-833.