



**Ana Luísa Duarte do Paço**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Preparação e caracterização de partículas de  
quitosano e seu derivado para libertação de  
fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM-  
FCT/UNL

Co-orientadora: Doutora Paula Soares, Investigadora em Pós-Doutoramento DCM-  
FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016



**Ana Luísa Duarte do Paço**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Preparação e caracterização de partículas de  
quitosano e seu derivado para libertação de  
fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM-  
FCT/UNL

Co-orientadora: Doutora Paula Soares, Investigadora em Pós-Doutoramento  
DCM-FCT/UNL

**Setembro, 2016**



## **Preparação e caracterização de partículas de quitosano e seu derivado para libertação de fármacos**

Copyright © Ana Luísa Duarte do Paço, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning”*

Albert Einstein



# Agradecimentos

Quero deixar o meu agradecimento a todos aqueles que por diversas formas fizeram com que este trabalho fosse possível.

Ao meu orientador, professor João Paulo Borges por ter aceite orientar a minha tese e pela disponibilidade demonstrada em iniciar este projeto.

À minha coorientadora, doutora Paula Soares pela grande disponibilidade demonstrada, por todo o empenho e apoio nos momentos mais críticos, por tudo o que me ensinou, pelos incentivos e dedicação demonstrados e pela revisão de todo este trabalho. Um obrigada gigante!

À D. Augusta pelas suas conversas e boa disposição que animaram sempre aquele laboratório.

Aos meus colegas de laboratório Inês Rosete, Jaime Machado, Gabriela Pereira e Mariana Amaro pela amizade, pelas conversas diárias, pelos momentos de diversão e pelo apoio que sempre demonstraram.

Aos meus colegas de biomédica que me acompanharam ao longo deste percurso académico, pela amizade demonstrada e pela partilha de conhecimentos.

Ao meu namorado por todo o carinho e apoio incondicional e por me fazer sorrir mesmo quando as coisas não corriam bem.

À minha família e amigos, em especial aos meus pais por todas as oportunidades que me proporcionaram ao longo de todos estes anos, por todos os conselhos que me deram, por me apoiarem sempre, por todos os valores que me transmitiram, que fizeram de mim o que sou hoje.



# Resumo

As terapias que existem hoje em dia para o tratamento do cancro não são totalmente eficazes pois provocam a destruição das células cancerígenas e das células saudáveis, levando a um défice no sistema imunitário do doente o que aumenta o risco de desenvolver infeções virais ou bacteriológicas. Para além disso esta doença acarreta elevados custos tanto para os doentes como para as instituições médicas devido à sua elevada incidência. Por isso, é necessário encontrar soluções e desenvolver novas técnicas mais eficazes para combater esta doença. Uma dessas técnicas consiste na libertação controlada de fármacos utilizando nanopartículas, sendo este o foco deste trabalho.

Foram produzidas partículas de quitosano a partir de quatro métodos diferentes; gelificação ionotrópica, água em óleo, método micelar inverso e precipitação. Foram utilizados diferentes tipos de polímero: quitosano com 470 kDa, 33 kDa e hidroxipropil quitosano. Para testar a eficácia destas partículas como veículos para libertação controlada de fármacos foi utilizada a doxorrubicina (DOX), um dos fármacos mais utilizados em quimioterapia que tem como principal consequência a cardiotoxicidade. O fármaco foi encapsulado nas partículas poliméricas produzidas pelos diferentes métodos e o seu perfil de libertação foi avaliado a pH 7,4 e a temperatura fisiológica. Para fazer a análise dos perfis de libertação procedeu-se à utilização de modelos matemáticos.

As principais conclusões deste trabalho foram que o método que permite obter partículas de menor dimensão é o de gelificação ionotrópica e que as partículas obtidas com CS despolimerizado apresentam uma maior homogeneidade de tamanhos. Observou-se que a libertação de DOX é mais eficiente para as partículas obtidas por gelificação ionotrópica. Verificou-se ainda que os modelos que melhor definem os perfis de libertação são o de Kormeyer-Peppas e o de Weibull e que a libertação de DOX deu-se maioritariamente por difusão de Fick, independentemente do polímero usado ou do método de produção das partículas.

**Palavras-chave:** Doxorrubicina, Hidroxipropil quitosano; Modelos matemáticos; Nanopartículas de quitosano; Sistemas de libertação de fármacos.



# Abstract

Current cancer treatments are not completely efficient because they cause not only destruction of cancer cells but also of the viable cells. This causes a deficit in the immune system increasing the risk of the patient developing viral and bacteriological infections. Furthermore, this disease is associated with high costs not only for the patients but also for the medical institutions due to its high incidence. That said, it is necessary to find new solutions and develop new techniques to fight this problem. One of those techniques consists in the use of nanoparticles to perform a controlled drug delivery, which is the focus of this work.

Chitosan particles were produced through four methods: ionic gelation; water-in-oil emulsion, reverse micellar and precipitation. Different types of polymer were also used: 470 kDa CS, 33 kDa CS and hydroxypropyl chitosan. Doxorubicin, one of the most used drug in chemotherapy that causes cardiotoxicity as a side effect, was encapsulated into the particles and *in vitro* drug release assays were performed at pH 7,4 and at physiological temperature. Mathematical models were used for a better understanding of the drug release profiles.

The main conclusions of this work were that the particles obtained with ionotropic gelation had the smaller size and the particles obtained using depolymerized chitosan had narrow size distribution. It was possible to observe that DOX release is more efficient in particles obtained by ionotropic gelation. The models that better fitted the drug releases profiles were Korsmeyer-Peppas and Weibull, whereas the release mechanism was mainly dictated by Fickian diffusion, independently of the type of chitosan or particle production method used.

**Keywords:** Chitosan nanoparticles; Doxorubicin; Drug delivery systems; Hydroxypropyl chitosan; Mathematical models.



# Índice

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. QUITOSANO .....	2
1.1.1. Derivado do quitosano: Hidroxipropil quitosano (HPCS) .....	3
1.1.2. Aplicações de CS e derivados.....	3
1.2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANO .....	4
1.2.1. Gelificação ionotrópica .....	4
1.2.2. Emulsões água em óleo .....	5
1.2.3. Método micelar inverso .....	5
1.2.4. Precipitação.....	6
1.3. LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS DE PARTÍCULAS DE CS .....	6
1.4. MODELOS MATEMÁTICOS PARA SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS.....	9
1.5. OBJETIVOS .....	12
<b>CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. DESPOLIMERIZAÇÃO DO QUITOSANO .....	13
2.1.1. Materiais .....	13
2.1.2. Procedimento .....	13
2.2. VISCOSIMETRIA CAPILAR .....	13
2.2.1. Materiais .....	13
2.2.2. Procedimento .....	13
2.3. SÍNTESE DE HIDROXIPROPIL QUITOSANO .....	14
2.3.1. Materiais .....	14
2.3.2. Procedimento .....	14
2.4. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA .....	14
2.4.1. Materiais .....	14
2.4.2. Procedimento .....	14
2.5. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO ATRAVÉS DO MÉTODO DE EMULSÕES DE ÁGUA EM ÓLEO (A/O) .....	15
2.5.1. Materiais .....	15
2.5.2. Procedimento .....	15
2.6. PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO ATRAVÉS DE UM SISTEMA MICELAR INVERSO .....	16
2.6.1. Materiais .....	16
2.6.2. Procedimento .....	16
2.7. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO POR PRECIPITAÇÃO .....	16
2.7.1. Materiais .....	16
2.7.2. Procedimento .....	16
2.8. CARACTERIZAÇÃO DO QUITOSANO, HPCS E SUAS PARTÍCULAS .....	17

2.8.1.	Dispersão Dinâmica de Luz e Potencial zeta.....	17
2.8.2.	Microscopia Eletrônica de Varrimento .....	17
2.8.3.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	17
2.8.4.	Análise termogravimétrica.....	18
2.9.	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO .....	18
2.9.1.	Materiais .....	18
2.9.2.	Procedimento .....	18
2.10.	ENSAIOS DE LIBERTAÇÃO DE DOX .....	20
2.10.1.	Materiais .....	20
2.10.2.	Procedimento .....	20
2.11.	MODELOS MATEMÁTICOS DOS PERFIS DE LIBERTAÇÃO .....	20
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>23</b>
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS UTILIZADOS .....	23
3.1.1.	Viscosimetria capilar.....	23
3.1.1.	Análise de FTIR .....	25
3.1.2.	Análise de TGA .....	27
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	28
3.2.1.	Análise de FTIR.....	28
3.2.2.	Análise de TGA .....	30
3.2.3.	Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta.....	32
3.2.4.	Análise por SEM.....	36
3.3.	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA DOX.....	38
3.4.	ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DA DOX .....	39
3.5.	MODELOS MATEMÁTICOS PARA ESTUDOS DOS PERFIS DE LIBERTAÇÃO.....	41
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....</b>		<b>45</b>

# Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO QUITOSANO (DD – GRAU DE DESACETILAÇÃO; 1-DD – GRAU DE ACETILAÇÃO). .....	2
FIGURA 1.2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO HPCS (ADAPTADO DE [21]). .....	3
FIGURA 1.3 - MECANISMOS DE LIBERTAÇÃO DO FÁRMACO (ADAPTADO DE [29]). .....	7
FIGURA 2.1 - <i>PELLET</i> RESULTANTE DE UM ENSAIO DE ENCAPSULAMENTO. ....	19
FIGURA 2.2 - PARTÍCULAS CARREGADAS COM DOX NO INTERIOR DA MEMBRANA DE DIÁLISE.....	20
FIGURA 3.1 - RELAÇÃO ENTRE A VISCOSIDADE REDUZIDA E INERENTE COM A CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANO CUJO LIMITE PERMITE DETERMINAR A VISCOSIDADE INTRÍNSECA $[\eta]$ . ....	25
FIGURA 3.2 - ESPECTRO DE FTIR DE CS 470 kDa, CS 33 kDa E HPCS. ....	26
FIGURA 3.3 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE FTIR DO HPCS .....	26
FIGURA 3.4 - GRÁFICO TGA E DTA DE CS 33kDa, CS 470 kDa E HPCS. ....	27
FIGURA 3.5 - ESPECTRO DE FTIR DE NP'S OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA USANDO CS 470 kDa (A) E HPCS (B). ....	28
FIGURA 3.6 - ESPECTRO DE FTIR DE NP'S OBTIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO A/O USANDO CS 470 kDa (A) E HPCS (B). ....	29
FIGURA 3.7 - ESPECTRO DE FTIR DAS PARTÍCULAS OBTIDAS PELO MÉTODO MICELAR INVERSO USANDO CS DE 470 kDa. ....	29
FIGURA 3.8 - ESPECTRO DE FTIR DAS PARTÍCULAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO, USANDO CS DE 470 kDa (A) E HPCS (B). ....	30
FIGURA 3.9 - GRÁFICO TGA E DTA DE PARTÍCULAS DE CS 470 kDa. ....	30
FIGURA 3.10 - AMPLIAÇÃO DO GRÁFICO DAS MEDIDAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DA AMOSTRA DE PARTÍCULAS DE CS 470 kDa OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO. ....	32
FIGURA 3.11 - CURVAS DE AUTOCORRELAÇÃO PARA PARTÍCULAS DE CS 470 kDa, CS 33 kDa E HPCS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA. ....	34
FIGURA 3.12 - POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA A) CS 470 kDa. B) CS 33 kDa. C) HPCS.....	34
FIGURA 3.13 - CURVAS DE AUTOCORRELAÇÃO PARA AS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA, ÁGUA EM ÓLEO, MÉTODO MICELAR INVERSO E PRECIPITAÇÃO. ....	35
FIGURA 3.14 - IMAGEM DE SEM DE PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA; A) CS 470 kDa B) CS 33 kDa C) HPCS. ....	36
FIGURA 3.15 - IMAGEM DE SEM DE PARTÍCULAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO ÁGUA EM ÓLEO COM CS 470 kDa. ....	37
FIGURA 3.16 - IMAGEM DE SEM DE PARTÍCULAS OBTIDAS PELO MÉTODO MICELAR INVERSO COM CS 470 kDa. ....	37
FIGURA 3.17 - IMAGEM DE SEM DE PARTÍCULAS OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO A) CS DE 470 kDa B) CS DE 33 kDa C) HPCS .....	38

FIGURA 3.18 - (A) PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE DOX PARA NANOPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA. (B) AMPLIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE DOX PARA AS PRIMEIRAS 10 H. ....	40
FIGURA 3.19 - (A) LIBERTAÇÃO DE DOX PARA NANOPARTÍCULAS OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO. (B) AMPLIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE DOX PARA AS PRIMEIRAS 10 H. ....	40
FIGURA 3.20 - (A) COMPARAÇÃO ENTRE A LIBERTAÇÃO DE DOX POR PARTE DE PARTÍCULAS DE CS 470 KDA OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA E POR PRECIPITAÇÃO A PH 7,4. (B) AMPLIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE DOX PARA AS PRIMEIRAS 10 H. ....	41
FIGURA 3.21 - EXEMPLO DO MODELO DE WEIBULL, COM VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS PARA LIBERTAÇÃO DE DOX A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA COM CS 470 KDA. ....	42

# Lista de Tabelas

TABELA 2.1 - QUANTIDADE DE DOX ADICIONADA EM CADA MÉTODO.....	18
TABELA 3.1 – TEMPERATURA E RESPETIVAS PERDAS DE MASSA OBTIDAS NA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS AMOSTRAS POLIMÉRICAS: CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS. ....	27
TABELA 3.2 - TEMPERATURA E RESPETIVAS PERDAS DE MASSA OBTIDAS NA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS NPs DE CS 470 kDa OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA, EMULSÃO A/O, MÉTODO MICELAR INVERSO E PRECIPITAÇÃO. ....	31
TABELA 3.3 - TAMANHO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DE PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA COM DIFERENTES TIPOS DE CS.....	32
TABELA 3.4 - TAMANHO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA, ÁGUA EM ÓLEO, MÉTODO MICELAR INVERSO E PRECIPITAÇÃO UTILIZANDO CS 470 kDa.....	35
TABELA 3.5 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (%) DE DOX NAS MICRO/NANOPARTÍCULAS DE CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS PREPARADAS PELOS 4 MÉTODOS DE SÍNTESE.....	38
TABELA 3.6 - MODELOS MATEMÁTICOS PARA AS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA..	44
TABELA 3.7 - MODELOS MATEMÁTICOS PARA AS PARTÍCULAS OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO.....	44



# Abreviaturas

A/O	Água em óleo
AOT	Dioctil sulfosuccionato de sódio
CS	Quitosano
CS NP's	Nanopartículas de quitosano
DA	Grau de acetilação
DD	Grau de desacetilação
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DOX	Doxorrubicina
DTA	Derivada termogravimétrica
EE	Eficiência de encapsulamento
HCl	Ácido clorídrico
HPCS	Hidroxipropil quitosano
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Solução tampão de fosfato salino
PI	Índice de polidispersão
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
TGA	Análise termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato de sódio



# Capítulo 1. Introdução

O cancro é uma doença que tem colocado desafios crescentes aos sistemas de saúde, pois afeta todas as pessoas, independentemente da sua idade e género, sendo que os indivíduos com idades entre os 55 e os 60 anos são os que apresentam uma maior probabilidade de desenvolver a doença. Prevê-se que em Portugal até 2030 o número de pessoas com cancro seja superior a 50 000 [1]. As terapêuticas que existem atualmente para o tratamento do cancro não são as ideais, pois apesar de destruírem as células cancerígenas também destroem as células saudáveis, provocando um défice no sistema imunitário do doente o que aumenta o risco de desenvolver infeções virais ou bacteriológicas [2].

Os fármacos utilizados em quimioterapia podem ser divididos em vários grupos tendo em conta vários fatores como a sua composição química e a função. Neste trabalho o fármaco que vai ser utilizado é a doxorubicina (DOX) que pertence à família das antraciclinas. Este fármaco possui um grande potencial no tratamento do cancro e é um dos mais utilizados em quimioterapia, devido à sua capacidade de ação contra um grande número de tumores. No entanto a sua eficiência no tratamento do cancro é limitada, pois apresenta baixa solubilidade sanguínea, má farmacocinética, não distingue entre células saudáveis e células cancerígenas, causa cardiotoxicidade e para além disso o tumor pode tornar-se resistente à DOX [3].

Nos últimos anos têm sido realizados estudos para melhorar a eficiência da DOX utilizando transportadores, nomeadamente lipossomas, transportadores poliméricos não covalentes ou conjugados poliméricos [4]. Ninomiya *et al.* [5] estudaram a utilização de lipossomas como transportadores de DOX juntamente com irradiação por ultrassons, mostrando bons resultados na libertação da doxorubicina. Também têm sido feitos vários estudos utilizando partículas para a libertação da DOX. Por exemplo, Mastria *et al.* [6] utilizaram um conjugado de DOX com polipéptido mostrando inibição no desenvolvimento de metástases e aumento da sobrevivência, pois foi possível evitar a disseminação de células tumorais a partir do tumor primário. Existem também estudos em que utilizam sistemas poliméricos, como por exemplo o quitosano. No estudo realizado por Shi *et al.* [7] em que utilizaram nanopartículas de carboximetil quitosano carregadas com DOX, concluíram que as partículas mostraram potencial de encapsulamento e libertação do fármaco.

Neste trabalho serão utilizadas micro/nanopartículas à base de quitosano para libertação da DOX não só devido à eficiência demonstrada na libertação do fármaco, mas também por estas serem biocompatíveis, biodegradáveis e por reduzirem os efeitos colaterais do fármaco [7].

## 1.1. Quitosano

O quitosano (Figura 1.1) é o polissacárido natural mais utilizado a seguir à celulose [8] e tem sido muito investigado para aplicações biomédicas nos últimos anos. A utilização de quitosano possui várias vantagens devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, bioadesividade e a sua capacidade de se ligar às membranas celulares, através da abertura de junções de células epiteliais [9]. O quitosano é um heteropolissacárido composto de ligações de glucosamina  $\beta$ -1,4 com vários graus de acetilação nos resíduos de glucosamina [10, 11].

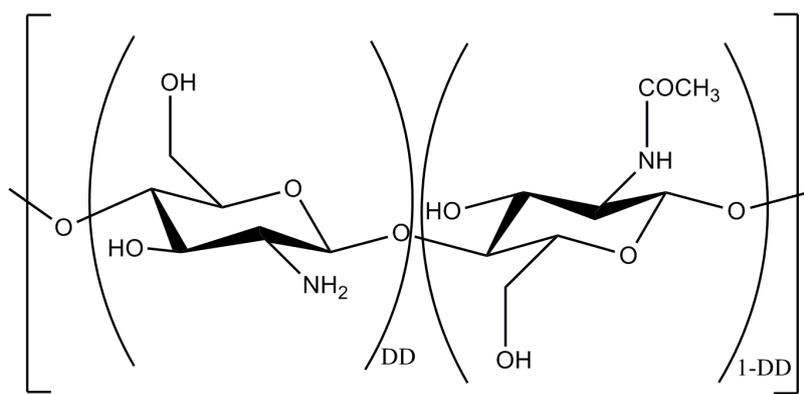


Figura 1.1 - Estrutura molecular do quitosano (DD – Grau de desacetilação; 1-DD – Grau de acetilação).

O quitosano é um biopolímero produzido a partir da quitina, sendo que a quitina é um elemento estrutural do exosqueleto dos crustáceos e encontra-se também na parede celular de certos fungos. Para produzir o quitosano é necessário retirar o exosqueleto a estes animais e transformá-lo em pó, para que posteriormente seja processado e se obtenha quitosano [12]. A produção de quitosano envolve 2 passos, isolamento e desacetilação da quitina. O isolamento da quitina envolve descoloração, desproteinização com hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) diluído e desmineralização com remoção do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) do exosqueleto dos crustáceos usando ácido clorídrico diluído [13]. No segundo passo, a quitina é desacetilada usando  $\text{NaOH}$  a 40-50% à temperatura de 110-115°C por várias horas sem oxigénio. A quitina passa a quitosano quando o grau de desacetilação (DD) excede os 50% [14]. Outra maneira de produzir é através de N-desacetilações usando enzimas em condições relativamente suaves [15].

As propriedades físicas e químicas do quitosano são fortemente dependentes do grau de desacetilação e do seu peso molecular. Um peso molecular elevado limita o uso do quitosano devido à sua elevada viscosidade e baixa solubilidade em soluções aquosas neutras, enquanto para pesos moleculares baixos as suas propriedades são ótimas para preparação de nanopartículas para libertação controlada de fármacos [16]. Segundo Yang *et al.* [17] a eficiência de encapsulamento do quitosano aumenta com a diminuição do peso molecular.

Uma das propriedades mais importantes do quitosano é que é solúvel na maioria das soluções ácidas com pH inferior a 6,5 devido à protonação dos grupos amina livres, podendo facilmente formar nanopartículas através de reticulação com agentes tais como glutaraldeído, tripolifosfato de sódio e sódio de ácido poliaspártico. Portanto o quitosano é o sistema de libertação ideal para fármacos hidrofílicos como 5-fluorouracil e leucovorina [18].

### 1.1.1. Derivado do quitosano: Hidroxipropil quitosano (HPCS)

Apesar do quitosano ser solúvel em soluções aquosas com pH inferior a 6,5, é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Por isso tem-se prestado especial atenção a modificações químicas que possam ser feitas para obter derivados solúveis em água a um pH mais amplo [19].

Existem vários derivados do quitosano obtidos através da substituição/alteração de dois grupos específicos, os grupos amina (-NH<sub>2</sub>) e os grupos hidroxilo (-OH). Alguns exemplos são a acetilação, tosilação, N-ftaloilação, sulfatação, alquilação, formação de sais quaternários, carboxialquilação, entre outros [20].

Neste trabalho o foco está na preparação de hidroxipropil quitosano (HPCS), que é obtido através da alcalinização e eterificação do quitosano. Peng *et al.* [19] produziram hidroxipropil quitosano solúvel em água com diferentes graus de substituição em que a substituição ocorreu nos grupos 6-OH, 3-OH e NH<sub>2</sub>, como indicado na Figura 1.2. O derivado obtido mostrou-se eficiente contra alguns fungos, no entanto não tem qualquer efeito inibitório contra a bactéria *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

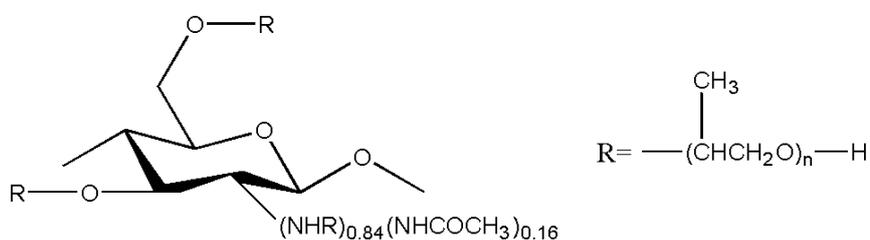


Figura 1.2 - Estrutura química do HPCS (Adaptado de [21]).

### 1.1.2. Aplicações de CS e derivados

O quitosano possui diversas aplicações, nomeadamente na indústria alimentar, em cosmética, agricultura, tratamento de águas e para aplicações biomédicas e farmacêuticas [22].

No caso das aplicações biomédicas este pode ser utilizado em tratamento de feridas, devido às suas propriedades de agente anti-infeccioso, biocompatível e biodegradável, o CS ajuda no tratamento das feridas em todas as etapas do tratamento, desde a formação de barreira

antimicrobiana até à fase final de fechamento da ferida [23]. O quitosano e os seus derivados também podem ser utilizados em engenharia de tecidos, em particular na regeneração óssea [24].

O CS também pode ser utilizado como revestimento de partículas magnéticas, como por exemplo em partículas de óxido de ferro melhorando assim a biocompatibilidade das partículas [25].

A utilização de sistemas de libertação de fármacos baseados em nanopartículas não só melhora a eficiência de muitos fármacos *in vivo*, como também permite a libertação específica a nível nasal, oral, gastrointestinal, vaginal, transdérmico, peridontal e do cólon. Estes sistemas podem ser utilizados na forma de micro e nanopartículas, filmes e géis [26]. Por exemplo, Khdair *et al.* [27] estudaram nanopartículas de quitosano como portadoras de doxorrubicina utilizando um método de síntese de dupla emulsão com evaporação de solvente. Estes autores obtiveram nanopartículas com um tamanho inferior a 100 nm, com capacidade para eficientemente encapsular e libertar o fármaco em estudo. Outro exemplo é de Jain *et al.* [28] que estudaram nanopartículas de quitosano com docetaxel incorporado utilizando o método de gelificação ionotrópica para produzir nanopartículas com um tamanho entre 159 nm a 220 nm. Os resultados mostraram uma eficiência de encapsulamento de 78% a 92%, sendo este um método promissor no tratamento do cancro de mama.

## **1.2. Métodos de preparação de partículas de quitosano**

Existem diversos métodos de preparação de partículas de quitosano, tais como emulsões água em óleo (A/O), coacervação/precipitação, *spray-drying*, gelificação ionotrópica, método micelar inverso e peneiração [29].

### **1.2.1. Gelificação ionotrópica**

Esta técnica baseia-se na interação iónica entre o CS e o tripolifosfato de sódio (TPP), mais concretamente entre os grupos amina do CS, que possuem carga positiva e os grupos fosfato do TPP, que possuem carga negativa. Estes grupos ao interagirem permitem a reticulação, o que leva à formação de partículas esféricas [30]. Calvo *et al* [31] foram os pioneiros na utilização desta técnica: para obter as partículas utilizaram duas fases aquosas, a primeira composta por CS, óxido de etileno e óxido propileno e a segunda fase contendo TPP. Obtiveram partículas nanométricas em condições suaves num curto espaço de tempo. Fan *et al.* [30] analisaram a importância do rácio de TPP e CS no tamanho das partículas adicionando diferentes volumes de TPP a uma solução de 10 mL de CS. Estes autores verificaram que para os rácios de 4:1 até 2,9:1 as partículas diminuem gradualmente de tamanho de 172 nm para 133 nm, fora desse rácio o tamanho de partículas aumenta drasticamente para 237 nm.

Silva *et al.* [32] prepararam nanopartículas de quitosano através de gelificação ionotrópica para encapsular ácido rosmarínico. Os autores utilizaram um rácio de CS e TPP de 7:1 a pH 5,8 o que originou um tamanho de partículas entre 200 e 300 nm, com um potencial zeta entre os +20 mV e +30 mV. As partículas demonstraram uma baixa citotoxicidade contra os pigmentos da retina e as células da córnea. Estes autores concluíram que as nanopartículas de CS são um método promissor para a libertação de fármacos em aplicações oculares.

Este é um método simples de produzir nanopartículas, com as vantagens de não utilizar agentes reticulantes e emulsionantes que são geralmente tóxicos para o organismo como é o caso do glutaraldeído [29]. Para além disto, as partículas preparadas por este método são sensíveis ao pH, o que faz com que sejam muito utilizadas para libertação de fármacos [33].

### **1.2.2. Emulsões água em óleo**

Este método consiste na junção de uma solução aquosa de quitosano a uma fase oleosa, sendo a emulsão estabilizada utilizando um tensoativo. À emulsão estável junta-se um agente reticulante de maneira a formar as partículas. A reticulação dá-se entre o grupo amina do CS e o grupo aldeído do agente reticulante, levando à formação de grupos imina [34].

O tamanho das partículas está dependente da concentração do tensoativo, do peso molecular, da concentração de quitosano, da concentração de agente reticulante e da velocidade de preparação da emulsão [35].

Xu *et al.* [36] prepararam nanopartículas de CS carregadas com paclitaxel através do método água em óleo utilizando como agente reticulante o glutaraldeído. Estes autores concluíram que o tamanho das partículas estava dependente do pH da emulsão, sendo que para um pH de 4,4 obteve-se partículas com 563,8 nm, à medida que se aumentou o pH até 6,5, o tamanho das partículas diminuíu até ao valor de 133,7 nm e a partir desse pH o tamanho de partículas voltou a aumentar. Verificou-se uma eficiência de encapsulamento de 94,01% e uma eficiência de carregamento de 8,55%.

Este método possui a vantagem de se obter partículas esféricas e com uma elevada percentagem de encapsulamento. No entanto possui a desvantagem de se utilizar um agente reticulante como o glutaraldeído, que é tóxico para o corpo humano [36, 37].

### **1.2.3. Método micelar inverso**

Para preparar partículas utilizando este método é necessário seguir um conjunto de passos, começando por dissolver o tensoativo AOT em hexano, depois a esta solução junta-se o CS, hidróxido de amónia e glutaraldeído para reticular as partículas. O sistema é deixado a agitar durante a noite. No dia seguinte procede-se à evaporação do solvente e re-suspensão da massa seca, seguido de longos processos de lavagem e extração das partículas [38].

Esta técnica permite a produção de nanopartículas, usando uma suspensão de micelas inversas e usando glutaraldeído como agente reticulante, originando partículas com uma gama muito estreita de tamanhos, mais concretamente na ordem dos 100 nm. O tamanho das partículas está dependente da densidade das partículas, bem como do grau de reticulação [38].

Mitra *et al.* [39] prepararam nanopartículas de quitosano encapsuladas com um complexo DOX-dextrano utilizando o método micelar inverso, obtendo partículas com um tamanho de  $100 \pm 10$  nm e morfologia esférica. Os resultados na redução do tumor foram superiores quando se encapsulou o fármaco na partícula, o que o levou a concluir que as nanopartículas de quitosano têm potencial para libertação controlada de fármacos.

Esta técnica possui a vantagem de se conseguir obter partículas com tamanhos muito reduzidos. No entanto possui um processo de produção muito extenso, várias etapas de lavagem e utiliza solventes orgânicos prejudiciais ao corpo humano [40].

#### **1.2.4. Precipitação**

Este método baseia-se no facto de o quitosano ser insolúvel em meio básico, ou seja, quando entra em contacto com soluções alcalinas o quitosano precipita [41]. O quitosano é precipitado numa solução alcalina sob agitação a velocidade elevada; em seguida a solução é deixada durante algum tempo a agitar a velocidade mais reduzida para maturar as partículas [41].

Bento *et al.* [41] desenvolveram nanopartículas de CS incorporadas com um ativador de mastócitos (C48/80) de maneira a obter uma vacina nasal, obtendo partículas monodispersas com um diâmetro entre 400 nm e 500 nm e índice de polidispersão inferior a 0,162, com uma eficiência de encapsulamento de  $18,65 \pm 2,99$  %. A incorporação de C48/80 promoveu um aumento da imunidade da mucosa nasal comparativamente com outros métodos testados até à data.

Mooren *et al.* [42] estudaram a influência das micropartículas de CS no transporte de um fármaco hidrofílico, o fosfato de sódio de prednisolona, através da barreira epitelial. As partículas foram preparadas utilizando o método de precipitação, o tamanho médio das partículas obtido foi de  $0,9 \pm 0,2$   $\mu\text{m}$  e obteve uma percentagem de encapsulamento de 53%.

Este método possui a vantagem de ser bastante mais rápido do que os anteriores.

### **1.3. Libertação de fármacos de partículas de CS**

Uma das propriedades do quitosano que mais influência a libertação de fármacos das suas partículas é a sua capacidade de inchamento. Esta está dependente de vários fatores externos, como a temperatura, o pH e a força iónica do meio [43]. As variações de pH alteram o comportamento de inchamento do quitosano. Segundo López *et al.* [43] o diâmetro das partículas é maior para pH 4 e vai diminuído acentuadamente até pH 7. A partir de pH 7 até pH 10 não

ocorrem variações de inchamento. Ou seja, o diâmetro e o inchamento das partículas dependem das alterações de pH do meio, que são provocadas por variações de carga nas redes de CS. O pH das zonas tumorais é ácido e o perfil de libertação da DOX é melhor em pH ácido, devido à sua solubilidade e degradação do CS neste tipo de meio. Desta forma, a incorporação de DOX em partículas de CS é adequada para o tratamento de tumores [44]. Outra das condições que influencia o inchamento é o grau de reticulação, pois aumentar a quantidade de agente reticulante provoca a diminuição da capacidade do CS fazer ligações de hidrogénio com as moléculas de água, o que provoca uma diminuição na capacidade de inchamento. Para além disso, quanto maior for o grau de reticulação, menor é a capacidade de inchamento dos hidrogéis de CS devido ao tempo de relaxamento das cadeias poliméricas ser mais lento, o que resulta numa diminuição da taxa de libertação [33].

A libertação de fármacos a partir de uma partícula de quitosano pode ser feita a partir de 3 mecanismos (figura 1.3): libertação a partir da superfície, difusão a partir da partícula inchada e libertação devido à erosão do polímero [29, 45]. A libertação a partir da superfície consiste na dissolução do fármaco instantaneamente quando contacta com o meio de libertação. Este tipo de libertação provoca a libertação imediata de grande parte do fármaco nos minutos iniciais [29]. A difusão a partir da partícula inchada inicia-se com a entrada de água no sistema (Partícula de CS+DOX), o que leva ao inchamento da matriz de quitosano, depois ocorre conversão do polímero “vítreo” numa matriz de “borracha” e por fim ocorre a libertação do fármaco a partir da matriz inchada. Neste caso a libertação do fármaco é lenta inicialmente e depois torna-se rápida [29]. A libertação por erosão do polímero ocorre quando o polímero se dissolve e ocorre libertação do fármaco sem transporte. Para além disso a erosão também cria poros que aumentam a taxa de difusão [45].

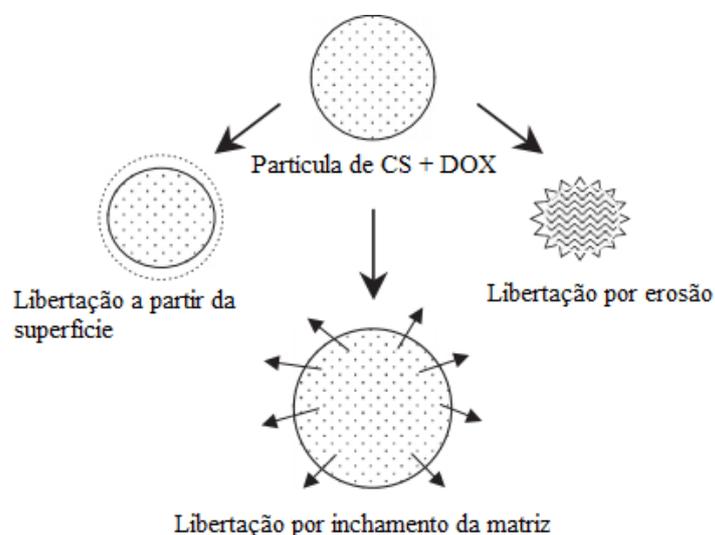


Figura 1.3 - Mecanismos de libertação do fármaco (Adaptado de [29]).

Existem vários estudos sobre a liberação de DOX a partir de partículas de CS e seus derivados. Khdair *et al.* [27] estudaram a liberação de DOX a partir de partículas de diacetato e triacetato de quitosano em PBS a 37°C. Os seus resultados mostraram uma liberação lenta do fármaco ao longo de três semanas. Para o caso das partículas de CS triacetato ocorreu uma liberação imediata de 20% do fármaco na primeira hora, depois durante as primeiras 24 horas ocorreu uma liberação rápida de 60% do fármaco. No entanto a quantidade restante foi libertada lentamente durante 20 dias. Concluíram que este perfil de liberação é favorável em sistemas biológicos, pois a quantidade de DOX libertada inicialmente serve como uma terapêutica de ação rápida e a dose seguinte serve como terapêutica mais sustentada. No caso das partículas de CS diacetato, 40% do fármaco foi libertado entre a primeira hora e as 24 horas e ao fim do segundo dia 70% do fármaco já tinha sido libertado. A quantidade restante foi libertada nos dezanove dias seguintes. Desta forma as partículas de triacetato mostraram um melhor perfil de liberação, pois possuem uma matriz de reticulação mais forte.

Pan *et al.* [46] estudaram a liberação de DOX a partir de nanocompósitos de carboximetil quitosano funcionalizado com óxido de grafeno em PBS a pH 7,4 e numa solução tampão de acetato a pH 5,8. Os seus resultados mostraram que a liberação em PBS ocorreu lentamente, alcançando os 20% após 72 h. Na solução a pH 5,8 após 72 h foi libertado 45% do fármaco. Os autores concluíram que o comportamento da DOX é muito similar nos dois pH's e que a liberação de DOX em pH mais ácido foi mais rápida devido a fraca interação entre a DOX e o grafeno a pH mais ácido.

Unsoy *et al.* [47] estudaram a liberação de DOX a partir de nanopartículas magnéticas revestidas com quitosano em soluções tampão a pH 4,2 e 5,0 a 37°C durante 30 h. O perfil de liberação foi analisado tendo em conta diferentes parâmetros tais como o pH, o tipo de solução tampão, a temperatura e o tamanho das nanopartículas. Para pH 4,2 ao fim de 30 min houve uma liberação rápida do fármaco de 20-30% e para pH 5,0 houve também uma liberação rápida de 15-20%. Após 7 h foi observada uma liberação mais lenta do fármaco. Concluíram que a liberação de DOX foi maior para pH 4,2 do que para pH 5,0. Em termos de tamanho de partículas, observaram que houve apenas uma diferença de 10% nos perfis de liberação, em que as partículas mais pequenas libertaram uma maior quantidade de DOX.

Wang *et al.* [48] estudaram a liberação de DOX a partir de nanopartículas de quitosano enriquecidas com ácido borónico. A liberação foi feita em PBS a diferentes pH's (pH 4,0, 5,0 e 7,4) a 37°C, sem a presença de luz. A pH 7,4 apenas 5,2% do fármaco foi libertado em 240 h, a pH 5,0 foi libertado 42% do fármaco e a pH 4,0 foi libertado 88% do fármaco. Concluíram que a liberação a pH 7,4 foi lenta devido à interação do ácido borónico com os grupos amina da DOX. Quando o pH diminui esta interação é enfraquecida devido à protonação dos grupos amina, aumentando assim a percentagem de liberação.

Em suma, o perfil de liberação está dependente de vários parâmetros tais como a eficiência de encapsulamento, a variação do pH do meio, a temperatura e o tamanho das partículas.

#### **1.4. Modelos matemáticos para sistemas de liberação de fármacos**

Os modelos matemáticos permitem prever os mecanismos de liberação do fármaco de um determinado sistema permitindo uma melhoria na eficiência do sistema, com a vantagem de reduzir tempo e custos na identificação dos mecanismos de liberação [49]. Em 1961, o criador dos modelos matemáticos para sistemas de liberação de fármacos, o professor Takeru Higuchi [50], publicou uma equação que relaciona a velocidade de liberação com a raiz quadrada do tempo. Depois desta publicação surgiram numerosas propostas de modelos empíricos, semi-empíricos e realísticos. Os modelos realísticos são baseados em fenômenos reais tais como difusão, dissolução, inchamento, erosão, precipitação e degradação. Este tipo de modelos permite a determinação de parâmetros específicos, oferecendo um maior conhecimento sobre o mecanismo de liberação. Permitem, por exemplo, estimar a importância relativa dos vários processos envolvidos [51]. Os modelos empíricos e semi-empíricos possuem um tratamento matemático meramente descritivo, que não é baseado em fenômenos físico-químicos. Sendo assim o poder de previsão destes modelos é baixo. Este tipo de modelos pode ser útil quando se pretende comparar diferentes perfis de liberação de fármacos [51]. Estes modelos são baseados em diferentes funções matemáticas que descrevem o perfil de liberação do fármaco, permitindo a comparação de diferentes perfis. Os modelos mais usados são: o modelo de ordem-zero, o modelo de primeira ordem, o modelo de Higuchi, o modelo de Hixson-Crowell, o modelo de Korsmeyer-Peppas, o modelo de Hofenberg, o modelo de Weibull e o modelo de Peppas-Sahlin [52].

O modelo de ordem zero descreve um sistema onde a taxa de liberação do fármaco é independente da sua concentração [53], representando a dissolução do fármaco a partir de formas de dosagem que não desagregam e libertam o fármaco lentamente[52-54]:

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad \text{Equação 1.1}$$

$Q_0$ - Quantidade inicial de fármaco em solução.

$Q_t$ - Quantidade cumulativa do fármaco libertado no tempo t.

$K_0$ - Constante de liberação de ordem zero.

Este modelo pode ser aplicado para descrever a liberação de fármacos a partir de vários sistemas, tais como sistemas transdérmicos, matrizes com fármacos pouco solúveis em formas farmacêuticas revestidas e sistemas osmóticos [53].

O modelo de primeira ordem é utilizado para descrever a absorção e eliminação de vários fármacos. Neste sistema a libertação está dependente da concentração do fármaco [52-54]:

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t \quad \text{Equação 1.2}$$

$K_1$ - Constante de libertação de primeira ordem.

Esta relação pode ser utilizada para descrever a libertação de fármacos solúveis em água através de materiais porosos [53].

O modelo de Higuchi é aplicado a sistemas porosos com diferentes geometrias e baseia-se nas hipóteses de que a concentração inicial de fármaco na matriz é maior do que a solubilidade do fármaco e a difusão do fármaco ocorre apenas numa direção. Além disto, este modelo assume que as partículas do fármaco são mais pequenas que a espessura do sistema e o inchamento da matriz e a dissolução são negligenciáveis, sendo a difusão do fármaco constante, mantendo as condições de emersão perfeitas [52]. Este modelo pode ser utilizado em sistemas transdérmicos e matriz com fármacos solúveis em água [52]. A equação que descreve o modelo é a seguinte [50]:

$$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 1.3}$$

$K_H$ - Constante de libertação de Higuchi.

O modelo de Hixson-Crowell descreve a libertação de fármacos em sistemas em que existe alteração na área de superfície e no diâmetro das partículas. Neste modelo considera-se que a taxa de libertação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco e não pela difusão através da matriz polimérica [53]. A equação que descreve o modelo é a seguinte [52-54]:

$$\sqrt[3]{Q_t} - \sqrt[3]{Q_0} = K_{HC} t \quad \text{Equação 1.4}$$

$K_{HC}$ - Constante de libertação de Hixson-Crowell.

O modelo de Hopfenberg descreve a libertação do fármaco a partir polímeros de superfícies erodidas, em que a área de superfície do polímero se mantém constante. A equação que descreve o modelo é a seguinte [52-54]:

$$Q_t = 1 - \left(1 - \frac{k_0 t}{C_0 a}\right)^n \quad \text{Equação 1.5}$$

$k_0$ - Constante de libertação de ordem zero, descreve a degradação do polímero.

$C_0$ -Concentração uniforme inicial do fármaco no sistema.

$a$ - Raio da esfera.

$n$ - expoente que varia com a geometria.

O modelo de Korsmeyer-Peppas é utilizado para analisar sistemas de libertação poliméricos com várias geometrias, por isso as constantes utilizadas variam com a geometria. Esta equação aplica-se apenas os primeiros 60% de libertação [55]:

$$Q_t = Kt^n \quad \text{Equação 1.6}$$

$K$ - Constante relacionada com a geometria e estrutura do polímero.

$n$ - Expoente de libertação empírico.

De acordo com o valor de  $n$  é possível identificar o perfil de libertação, isto é, para  $n \leq 0,43$  ocorre difusão de Fick, também chamada de caso I, onde a taxa de difusão é menor que a taxa de relaxação. Quando  $n = 0,85$  estamos perante o caso II de transporte, onde a taxa de relaxação é mais lenta que a taxa de difusão. Quando  $0,43 < n < 0,85$  ocorre difusão anómala e neste caso existe uma similaridade entre a taxa de relaxação e a taxa de difusão. Quando  $n > 0,85$  corresponde ao super caso II [55].

O modelo de Weibull adapta-se à grande maioria dos perfis de libertação e é usada para descrever os 60% iniciais de libertação. Baseia-se numa equação empírica descrita por Weibull em 1951, mais tarde adaptada por Langenbucher para processos de libertação [53, 56]:

$$Q_t = 100 \times \left[ 1 - e^{-\frac{tb}{a}} \right] \quad \text{Equação 1.7}$$

$a$ - Fator de escala de tempo.

$b$ - Fator de forma, se  $b = 1$  é uma exponencial, se  $b < 1$  tem a forma de uma parábola, se  $b > 1$  é uma sigmoide.

Em 2006, foi identificada uma relação entre o parâmetro  $b$  da equação de Weibull e o expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas. De acordo com o valor de  $b$  é possível identificar o mecanismo de libertação: se  $b \leq 0,75$ , ocorre difusão de Fick; se  $0,75 < b < 1$  ocorre um mecanismo combinado de difusão e caso II; se  $b > 1$  ocorre um mecanismo complexo [57].

Por último, o modelo descrito por Peppas e Sahlin [58] em 1989, através da seguinte equação [53, 58]:

$$Q_t = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m} \quad \text{Equação 1.8}$$

$k_1$ - Constante relativa à contribuição de Fick.

$k_2$ - Constante relativa à contribuição de Relaxação, ou caso II.

$m$ - Esta relacionado com o expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas e o seu valor deve semelhante.

## 1.5. Objetivos

Esta dissertação surge na sequência de um trabalho anterior [59] no qual foi avaliado o perfil de libertação da doxorubicina de nanopartículas de quitosano e de *O*-HTCC utilizando como método de síntese o método de gelificação ionotrópica. Neste trabalho pretende-se utilizar o mesmo modelo de libertação de doxorubicina fazendo duas alterações principais: a primeira está relacionada com o método de síntese de nanopartículas e a segunda com o derivado do quitosano.

Assim o principal objetivo deste trabalho é avaliar a influência do método de preparação de partículas à base de quitosano na libertação de fármacos, utilizando a doxorubicina como fármaco modelo. Para atingir este objetivo foram definidos os seguintes objetivos parciais:

- Preparação e caracterização de 3 amostras poliméricas à base de quitosano: quitosano de elevado peso molecular (470 kDa), quitosano de baixo peso molecular (33 kDa); hidroxipropil quitosano;
- Síntese e caracterização de micro/nanopartículas de quitosano e de hidroxipropil quitosano através de quatro técnicas de síntese descritas na literatura: gelificação ionotrópica (método controlo), emulsão água em óleo, método micelar inverso e precipitação;
- Avaliação da eficiência de encapsulamento de doxorubicina nas referidas micro/nanopartículas;
- Estudar o seu perfil de libertação da doxorubicina das partículas produzidas em condições fisiológicas;
- Utilizando os modelos matemáticos acima referidos que melhor se adequam ao sistema produzido: Weibull, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin.

No final deste trabalho espera-se poder aferir acerca da influência do tipo de polímero, método de síntese e tamanho de partícula no perfil de libertação da doxorubicina.

# Capítulo 2. Materiais e Métodos

De maneira a estudar a ação de diferentes tipos de síntese de partículas, na libertação do fármaco, foram utilizados dois tipos de quitosano com diferentes pesos moleculares e um derivado do quitosano, o hidroxipropil quitosano. Para além disto foi estudada a influência da utilização de diferentes métodos de síntese de partículas, no sistema de libertação do fármaco.

## 2.1. Despolimerização do quitosano

### 2.1.1. Materiais

Quitosano (*Cognis*, DA 75,5%), ácido acético (*Panreac*), nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ , *Sigma-aldrich*), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ , *Eka*).

### 2.1.2. Procedimento

O método de despolimerização do quitosano foi baseado no método de Huang *et al.*[60]. Foram dissolvidas 5 g de quitosano em 500 mL de ácido acético a 1% (V/V) e deixados a agitar durante a noite. Foram dissolvidos 200 mg de nitrito de sódio em 20 mL de água millipore, que posteriormente foram adicionados à solução inicial de quitosano, sob agitação mecânica e foram deixados a reagir durante 1h. O quitosano de baixo peso molecular foi precipitado com  $\text{NaOH}$  a 1 M até pH 8. O precipitado foi centrifugado (*Heraeus Multifuge X1R centrifuge – Thermo Scientific*) a 10 000 rpm, durante 10 min e lavado várias vezes com água millipore. O pellet obtido foi seco em estufa (*IPP 55-Memmert*) a uma temperatura de 40°C.

## 2.2. Viscosimetria Capilar

### 2.2.1. Materiais

Capilar Übbelohde (*SCHOTT GERÄTE Typ 53201/0a*), ácido acético (*Panreac*), acetato de sódio (*Scharlau*), soluções de quitosano (20 mg/mL, 16 mg/mL, 12 mg/mL, 8mg/mL, 4 mg/mL).

### 2.2.2. Procedimento

O peso molecular do quitosano despolimerizado foi medido utilizando o viscosímetro capilar num banho de água a uma temperatura constante de 30°C, usando um solvente constituído por ácido acético a 0,2 M e acetato de sódio a 0,1 M.

Mediu-se o tempo de passagem do solvente e das soluções de quitosano diluídas no capilar Übbelohde, em grupos de cinco e calculou-se o valor médio.

A viscosidade intrínseca foi calculada graficamente a partir da viscosidade diluída em função da concentração do polímero na solução.

O peso molecular do quitosano despolimerizado foi calculado usando a fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) ( $K=1,39 \times 10^{-5}$  dl/g,  $\alpha= 1$ ) [61].

## **2.3. Síntese de hidroxipropil quitosano**

### **2.3.1. Materiais**

Quitosano (*Cognis*, DA 75,5%), hidróxido de sódio (NaOH, *Eka*), isopropanol (*Pronalab*), óxido de propileno (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, *Aldrich*), ácido clorídrico (HCl, *Panreac*), etanol (*Fisher*), acetona (*Labchem*).

### **2.3.2. Procedimento**

Primeiro adicionou-se 3 g de quitosano a uma solução de NaOH a 50% (m/v) e deixou-se ficar sob agitação durante 2 h. Depois colocou-se a solução no congelador para alcalinização, durante a noite. Depois de descongelado o quitosano alcalino foi misturado com 30 mL de isopropanol, durante 1 h a 60°C. Posteriormente foram adicionados 30 mL de óxido de propileno e deixou-se reagir durante 2 h a 40°C, sob agitação constante com condensador. Após este tempo, ajustou-se o pH para 7,0, adicionando 65 mL de uma solução de HCl a 50% (v/v). Por fim filtrou-se a mistura com o auxílio de uma bomba de vácuo (*KNF Lab- Laboport*) e lavou-se várias vezes com etanol e acetona. Depois de lavado foi colocado em estufa (*IPP 55-Memmert*) a 40°C até peso constante [62].

## **2.4. Preparação de nanopartículas de quitosano por gelificação ionotrópica**

### **2.4.1. Materiais**

Quitosano (*Cognis*, DA 75,5%), quitosano despolimerizado, hidroxipropil quitosano, ácido acético (*Panreac*), Tripolifosfato de sódio (TPP, *Acros Organics*).

### **2.4.2. Procedimento**

Este procedimento baseia-se no de Calvo *et al.* [31] tendo sido foram preparadas 3 reações diferentes: utilizando quitosano de 470 kDa, quitosano despolimerizado e hidroxipropil quitosano. O método de preparação foi semelhante para cada reação.

Primeiro dissolveu-se 10 mg de quitosano numa solução de 5 mL de ácido acético a 1% (v/v). Separadamente preparou-se uma solução 5 mL de TPP a 0,1% (m/v). Depois do quitosano estar totalmente dissolvido, colocou-se sob agitação magnética e adicionou-se rapidamente a solução de TPP. As partículas foram isoladas por centrifugação (*Heraeus Multifuge X1R centrifuge – Thermo Scientific*) a 10 000 rpm, durante 10 min. Por fim foram liofilizadas (*VaCO2 ZIRBUS technology; -45 °C and 0,07 mbar*) e armazenadas em local seco.

## **2.5. Preparação de nanopartículas de quitosano através do método de emulsões de água em óleo (A/O)**

### **2.5.1. Materiais**

Quitosano (*Cognis, DA 75,5%*), quitosano despolimerizado, hidroxipropil quitosano, ácido acético (*Panreac*), óleo de silicone (*Baysilone M350*), Span 80 (*Sigma-Aldrich*) Glutaraldeído (25% em água, *Sigma-Aldrich*), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ , *Sigma*) hexano (*Valente & Ribeiro*).

### **2.5.2. Procedimento**

Este procedimento baseia-se no de J. Xu *et al.* [36] e tal como no caso anterior foram preparadas 3 reações diferentes, cada uma com um tipo de quitosano, isto é, com quitosano de 470 kDa, com quitosano despolimerizado e com hidroxipropil quitosano. O método de preparação é similar para cada síntese.

Primeiro dissolveu-se 0,2 mL de Span 80 em 8 mL de óleo de silicone, utilizando um dispersor (*IKA T10 basic ultra-turrax*), até se obter uma dispersão esbranquiçada. Depois dissolveu-se 10 mg de CS em 0,5 mL de solução de ácido acético a 1% (v/v). Juntou-se a solução de CS à fase oleosa, utilizando o ultra-turrax, obtendo-se a emulsão (A/O). Para reticular as partículas preparou-se uma solução com 0,6 mL de água e 0,1 mL de glutaraldeído e adicionou-se à emulsão. Para se obter o tamanho de partícula pretendido ajustou-se o pH da reação para 5,5, usando 0,3 mL de  $\text{NaHCO}_3$  a 1% (m/v). A mistura obtida foi agitada mecanicamente durante 4 h a 40°C. Posteriormente foi lavada repetidamente com hexano e água, usando a centrífuga (*Heraeus Multifuge X1R centrifuge – Thermo Scientific*) a uma velocidade de 10 000 rpm durante 10 min. Por fim as partículas foram liofilizadas (*VaCO2 ZIRBUS technology; -45 °C and 0,07 mbar*) e armazenadas em local seco.

## **2.6. Preparação de micropartículas de quitosano através de um sistema micelar inverso**

### **2.6.1. Materiais**

Quitosano (*Cognis*, DA 75,5%), ácido acético (*Panreac*), dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT, *Aldrich-Chemistry*), hexano (*Valente & Ribeiro*), tris(hidroximetil)aminometano (*Apollo Scientific*), ácido clorídrico (HCL, *Panreac*), hidróxido de amónia (*Sigma-Aldrich*), Glutaraldeído (50% em água, *Fluka*), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>, *Sigma-Aldrich*).

### **2.6.2. Procedimento**

Este procedimento é adaptado de Banerjee *et al.*[38]. Primeiro dissolveu-se o tensioativo AOT (0,04 M) em 40 mL de hexano. Para 40 mL da solução AOT, foram adicionados sob agitação constante e à temperatura ambiente, 0,4 mL de solução de CS a 0,1% (m/v) em ácido acético a 6%. (v/v), 176 µL de uma solução tampão de Tris-HCL (0,01%, pH 8,0), 40 µL de hidróxido de amónia e 4 µL de solução de glutaraldeído a 0,01% (v/v). O sistema foi deixado a agitar durante a noite à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado, usando o rota-vapor (*Laborota 4000-Heidolph*) e à massa seca foram adicionados 20 mL da solução tampão de Tris-HCL. De seguida colocou-se a solução no sonicador (*UP400S Ultrasonic Processor- Hielscher*), durante breves minutos até se obter uma solução transparente. Para precipitar o tensioativo adicionou-se, gota a gota, 4 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (30% (m/v)). O precipitado foi sujeito a centrifugação (*Heraeus Multifuge X1R centrifuge – Thermo Scientific*) a 6000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante que contém a maioria das partículas foi guardado; para separar as restantes partículas que ficaram no pellet, este foi dissolvido em 10 mL de hexano e esta solução foi lavada duas vezes com 1 mL de solução tampão Tris-HCL. Por fim a solução que contém as partículas foi liofilizada (*VaCO2 ZIRBUS technology*; -45 °C and 0,07 mbar).

## **2.7. Preparação de nanopartículas de quitosano por precipitação**

### **2.7.1. Materiais**

Quitosano (*Cognis*, DA 75,5%), quitosano despolimerizado, hidroxipropil quitosano, ácido acético (*Panreac*), hidróxido de sódio (NaOH, *Eka*), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *Panreac*).

### **2.7.2. Procedimento**

Este procedimento baseia-se no de Bento *et al.* [41] e tal como em casos anteriores foram preparadas 3 sínteses diferentes, cada uma com um tipo de quitosano, isto é, com quitosano de

470 kDa, com quitosano despolimerizado e com hidroxipropil quitosano. O método de preparação é similar para cada síntese.

Primeiro preparou-se 6 mL de uma solução de NaOH (5 mM) e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.03 mg/mL). Depois preparou-se 6 mL de uma solução de CS (1 mg/mL) em ácido acético a 0,1%. Adicionou-se a solução de NaOH + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à solução de CS rapidamente usando o ultra-turrax (*IKA T10 basic*) na velocidade 4 durante 10 min. Para maturar as partículas colocou-se a solução sob agitação magnética durante 1 h. Foram centrifugadas (*Heraeus Multifuge X1R centrifuge – Thermo Scientific*) durante 10 min a 10 000 rpm. Por fim as partículas foram liofilizadas (*VaCO2 ZIRBUS technology; -45 °C and 0.07 mbar*).

## **2.8. Caracterização do quitosano, HPCS e suas partículas**

Foram feitas diversas análises, de maneira a caracterizar o quitosano, o seu derivado e as respectivas partículas.

### **2.8.1. Dispersão Dinâmica de Luz e Potencial zeta**

Realizou-se a Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) (*SZ-100 nanopartica series, Horiba, Lda*) para obter informação sobre o tamanho hidrodinâmico das partículas, consoante o tipo de polímero utilizado e o método de síntese. Fizeram-se medições de potencial zeta para analisar a estabilidade das partículas. As medições foram efetuadas em triplicado. Para as medições de tamanho hidrodinâmico utilizou-se um ângulo de dispersão de 90° e uma célula descartável. No caso do potencial zeta as medições foram feitas com um ângulo de dispersão de 173° e utilizou-se uma célula de grafite.

### **2.8.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento**

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) (*Carl Zeiss Auriga CrossBeam*) realizou-se para obter informação sobre a morfologia e aparência das partículas, bem como informação sobre o tamanho das mesmas. Para analisar a amostra foi colocada uma gota da suspensão aquosa num substrato de silício e deixou-se evaporar completamente o solvente antes da medição.

### **2.8.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier**

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), que permitiu obter informação sobre alterações nas ligações químicas das amostras foi realizada usando um espectrofotómetro ATR-FTIR *Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectrometer (ATR-FTIR)*.

#### 2.8.4. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada usando o equipamento *Thermal Analyzer NETZSCH STA 449 F3 Jupiter*, com o objetivo de obter informação sobre alterações nas características físico-químicas da amostra em função da temperatura. A medida foi efetuada entre 25°C e 550°C a uma velocidade de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de azoto.

## 2.9. Avaliação da eficiência de encapsulamento

### 2.9.1. Materiais

Doxorubicina (*Fluka*) e todos os materiais utilizados nas sínteses de partículas descritas anteriormente.

### 2.9.2. Procedimento

A concentração de DOX em todas as soluções foi determinada através da medição da absorvância e utilizando as curvas de calibração da DOX calculadas previamente [61] para dois solventes, a água e a solução tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4. A absorvância foi medida no pico dos 480 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vísivel (*T90 + PG Instruments*). Este pico corresponde ao pico máximo de absorvância da DOX.

A DOX foi incorporada durante a síntese das partículas (subcapítulo 2.4 a 2.7) juntamente com a solução de quitosano. A quantidade de DOX adicionada foi ajustada para cada método conforme a tabela abaixo:

Tabela 2.1 - Quantidade de DOX adicionada em cada método.

Método de síntese	Concentração de CS (%)	Quantidade de CS (mL)	Quantidade de DOX (mL)
Gelificação ionotrópica	1,2	0,5	0,5
Água em óleo	2	0,5	0,5
Micelar inverso	0,1	0,4	0,2
Precipitação	0,1	5,5	0,5

No caso da gelificação ionotrópica adicionou-se 0,5 mL de solução de CS (1,2% m/v) e logo de seguida 0,5 mL de solução de DOX e por fim adicionou-se rapidamente 4,5 mL de uma solução de TPP (0,25% m/v). A mistura foi agitada por 5 min utilizando o ultra-turrax a velocidade 4. Depois a solução foi centrifugada durante 10 min a 12000 rpm, retirou-se o

sobrenadante e guardou-se. Ao pellet adicionou-se 3 mL de água e centrifugou-se novamente sob as mesmas condições e o sobrenadante obtido foi também guardado. A absorvância dos dois sobrenadantes obtidos foi medida utilizando o espectrofotômetro UV-Visível a um comprimento de onda de 480 nm e assim calculou-se a eficiência de encapsulamento (Equação 2.1).

$$EE(\%) = \frac{(massa\ inicial\ de\ DOX) - (massa\ de\ DOX\ no\ sobrenadante)}{massa\ inicial\ de\ DOX} \times 100 \quad \text{Equação 2.1}$$

O procedimento da água em óleo foi feito como o descrito no subcapítulo 2.5, e o que permitiu avaliar a eficiência de encapsulamento foi medir as absorvâncias dos sobrenadantes após cada centrifugação. Foram feitas cinco centrifugações lavando o pellet foi lavado 7 mL de hexano e 7 mL de água.

Relativamente ao método micelar inverso foi feito tal como descrito no subcapítulo 2.6 e a eficiência de encapsulamento também se avaliou medindo a absorvância do sobrenadante, mas neste caso foi apenas feita uma medida pois apenas foi necessário fazer uma centrifugação.

Por fim a eficiência de encapsulamento das partículas obtidas por precipitação foi também avaliada através da medição da absorvância do sobrenadante após centrifugação.

Todas as experiências com DOX foram feitas na ausência de luz para evitar a degradação e cada tipo de síntese foi feito em triplicado. Para além disso para cada método foram feitas sínteses sem utilizar DOX, que serviram como controlo e estas também foram feitas em triplicado.



Figura 2.1 - *Pellet* resultante de um ensaio de encapsulamento.

## 2.10. Ensaio de libertação de DOX

### 2.10.1. Materiais

PBS a pH 7,4 e nanopartículas obtidas anteriormente pelos seguintes métodos: gelificação ionotrópica, água em óleo e precipitação.

### 2.10.2. Procedimento

Os ensaios de libertação foram feitos utilizando PBS a pH 7,4. As partículas obtidas anteriormente, descritas nos capítulos 2.4, 2.5, 2.7, foram ressuspensas em 1 mL de PBS e sonicadas por alguns segundos, para que as partículas ficassem bem dispersas na solução. Estas soluções foram então dialisadas (*Spectrum Laboratories*,  $M_w = 10-12$  kDa) em 10 mL de solução tampão de PBS a pH 7,4 a 37°C durante 72 h. Em intervalos de tempo regulares foram retirados e armazenados 3 mL de solução do meio de libertação e seguidamente foram repostos com nova solução tampão em igual volume.

As absorvâncias de todas as amostras armazenadas foram medidas a 480 nm e com o auxílio da curva de calibração da DOX em PBS, foi possível obter o valor da concentração de DOX, para assim obter a percentagem de DOX libertada em cada intervalo de tempo.

Todas as partículas utilizadas neste procedimento foram liofilizadas, cada ensaio de libertação foi feito em triplicado e foram utilizadas também partículas de controlo (sem DOX) [61].



Figura 2.2 - Partículas carregadas com DOX no interior da membrana de diálise.

## 2.11. Modelos matemáticos dos perfis de libertação

Para perceber que tipo de libertação ocorreu em cada ensaio de libertação, foi utilizada uma extensão do Excel, denominada DDSolver. Este programa foi desenvolvido por Yong Zhang

*et al.*[63] com o objetivo de facilitar a aplicação de modelos matemáticos a perfis de libertação. De todos os modelos existentes, neste trabalho foram aplicados os seguintes: Korsmeyer-Peppas, Weibull e Peppas-Sahlin, pois são os que melhor representam os perfis de libertação utilizados [59].



# Capítulo 3. Resultados e discussão

## 3.1. Caracterização dos polímeros utilizados

Neste trabalho foram utilizadas três amostras poliméricas à base de quitosano: quitosano com peso molecular de 470 kDa, com 33 kDa (despolimerizado) e hidroxipropil quitosano. Antes da produção das partículas poliméricas e de avaliar o seu potencial como veículos para a libertação controlada de fármaco, os polímeros utilizados foram caracterizados. O peso molecular do quitosano após despolimerização foi medido por viscosimetria capilar, enquanto a hidroxipropilação do quitosano foi avaliada por FTIR. Além disso também foram feitas medidas de termogravimetria para as três amostras poliméricas.

### 3.1.1. Viscosimetria capilar

O quitosano foi despolimerizado através do método de Huang *et al.* [60] que consiste na adição de uma quantidade específica de  $\text{NaNO}_2$ , a uma solução ácida de CS. Variando a quantidade de  $\text{NaNO}_2$  é possível obter quitosano com diferentes pesos moleculares.

O peso molecular do CS foi medido através de uma técnica denominada por viscosidade da solução diluída utilizando um viscosímetro capilar (Ubbelöhde No = 0a). Nesta técnica dissolve-se o quitosano num solvente apropriado por forma a obter cinco concentrações diferentes em  $\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$  e mede-se o tempo de efluxo da solução a temperatura constante. Calcula-se a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) através da divisão do tempo de efluxo ( $t$ ) da solução CS a uma determinada concentração, pelo tempo de efluxo do solvente ( $t_0$ ) (Equação 3.1).

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad \text{Equação 3.1}$$

Depois calcula-se a viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ), que consiste na diferença entre do tempo de efluxo da solução de CS ( $t$ ) e o tempo de efluxo do solvente ( $t_0$ ), relativamente ao tempo de efluxo do solvente (Equação 3.2).

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 3.2}$$

Em seguida calcula-se a viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ), que consiste na divisão da viscosidade específica pela concentração ( $C$ ) da solução (Equação 3.3).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{Equação 3.3}$$

Para calcular a viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) faz-se o limite da viscosidade reduzida à medida que a concentração tende para zero, ou faz-se o limite da viscosidade inerente ( $\eta_{in}$ ),  $\ln(t/t_0)$ , à medida que a concentração tende para zero (Equação 3.4).

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{red}}{C} = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{in}}{C} \quad \text{Equação 3.4}$$

Por forma a obter a viscosidade intrínseca fazem-se os gráficos  $\eta_{red}$  vs. C e  $\eta_{in}$  vs. C, sendo que a viscosidade intrínseca corresponde ao ponto de interceção das retas com o eixo das ordenadas (Figura 3.1).

Para calcular o peso molecular do quitosano despolimerizado utiliza-se a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3.5).

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde K e  $\alpha$  são determinados por:

$$\alpha = 0,6202 + \frac{0,699x}{0,4806 + x} \quad \text{Equação 3.6}$$

$$\log K \cdot 10^{-5} = -5,767\alpha + 5,9232 \quad \text{Equação 3.7}$$

$$x = \frac{DA}{pH \cdot \mu} \quad \text{Equação 3.8}$$

Sendo que DA é o grau de desacetilação do quitosano e  $\mu$  é a força iónica a uma temperatura entre os 20°C e 30°C [61].

Utilizando as equações referidas anteriormente e o gráfico representado na Figura 3.1 obteve-se quitosano com peso molecular de 33 kDa, tendo como ponto de partida quitosano com um peso molecular de 470 kDa.

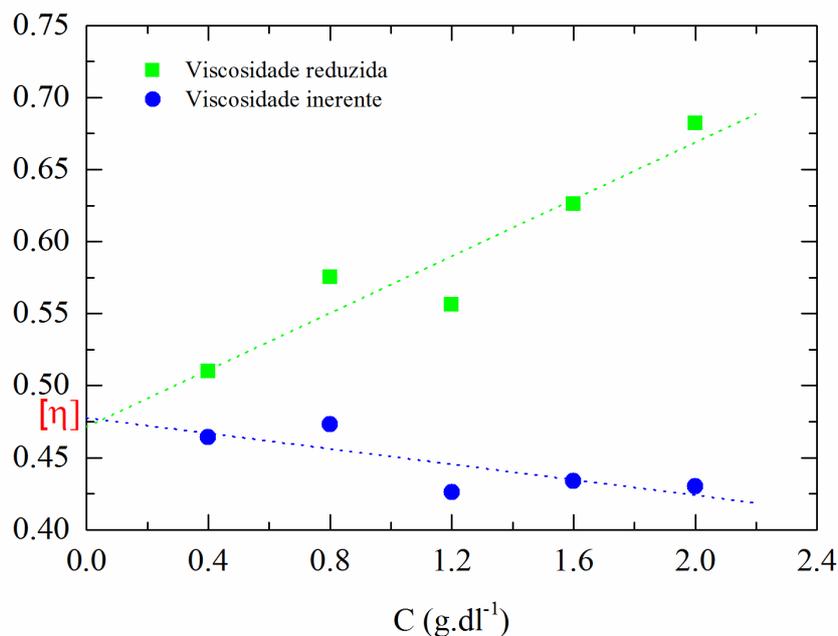


Figura 3.1 - Relação entre a viscosidade reduzida e inerente com a concentração da solução de quitosano cujo limite permite determinar a viscosidade intrínseca  $[\eta]$ .

### 3.1.1. Análise de FTIR

Realizou-se a técnica de FTIR para analisar a composição química dos polímeros utilizados, assim como para confirmar a hidroxipropilação do quitosano. O espectro da Figura 3.2 mostra as bandas típicas de FTIR para o quitosano. A banda entre 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento da ligação O-H enquanto a banda que ocorre aos 2874  $\text{cm}^{-1}$  se deve ao alongamento da ligação C-H. Em torno dos 1655  $\text{cm}^{-1}$  e dos 1325  $\text{cm}^{-1}$  ocorre a típica banda amida I e III, respetivamente. As bandas relacionadas com as pontes C-O-C localizam-se a 1150  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento antissimétrico), 1023  $\text{cm}^{-1}$  e 892  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento da ligação glicosídica). Aos 1064  $\text{cm}^{-1}$  ocorre a banda vibratória atribuída ao alongamento C-N [61, 62, 64].

Comparando o CS 470 kDa com o CS 33 kDa observa-se que possuem espectros muito similares, o que permite concluir que a despolimerização não provocou alterações na estrutura química do polímero.

Relativamente ao HPCS (figura 3.3) foi possível observar algumas variações no espectro: a banda entre 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  aparece diminuída relativamente à banda dos ~2900  $\text{cm}^{-1}$ , devido à diminuição do rácio -OH:-CH durante a hidroxipropilação; o pico de absorção C-O do grupo hidroxilo secundário torna-se mais intenso, mascarando a banda do grupo  $-\text{NH}_2$ . Estas alterações no espectro de FTIR indicam que a hidroxipropilação ocorreu. Contudo, o derivado do quitosano produzido não é completamente solúvel em água. Desta forma o grau de substituição é

provavelmente baixo. De facto, o estudo realizado pela equipa de Dong [21] mostra que com baixa concentração de óxido de propileno a substituição se dá preferencialmente no grupo OH ligado ao C6. Por outro lado, o derivado de quitosano apenas é solúvel se a grau de substituição for superior a 3,2. No caso do presente trabalho experimental o rácio (m/m) CS:óxido de propileno utilizado foi cerca de 1:18, sendo que o grau de substituição esperado seria inferior a 1, de acordo com os resultados obtidos por Dong *et al.* Assim, justifica-se que o derivado produzido seja pouco solúvel em água e que as diferenças no espectro de FTIR comparativamente com o CS 470 kDa sejam poucas.

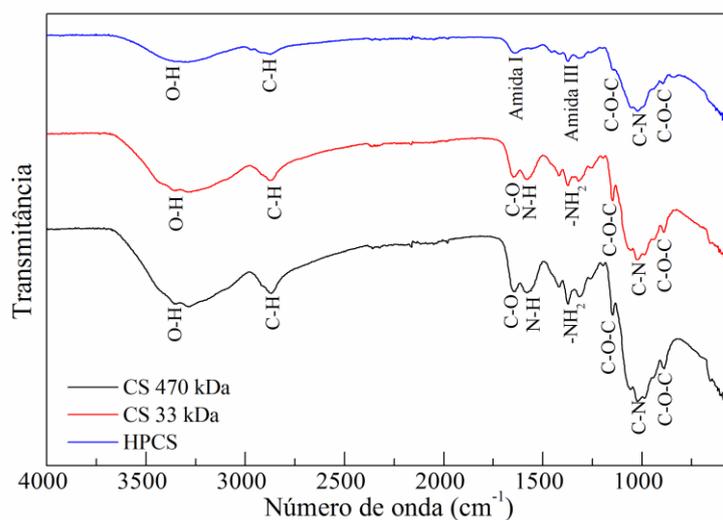


Figura 3.2 - Espectro de FTIR de CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS.

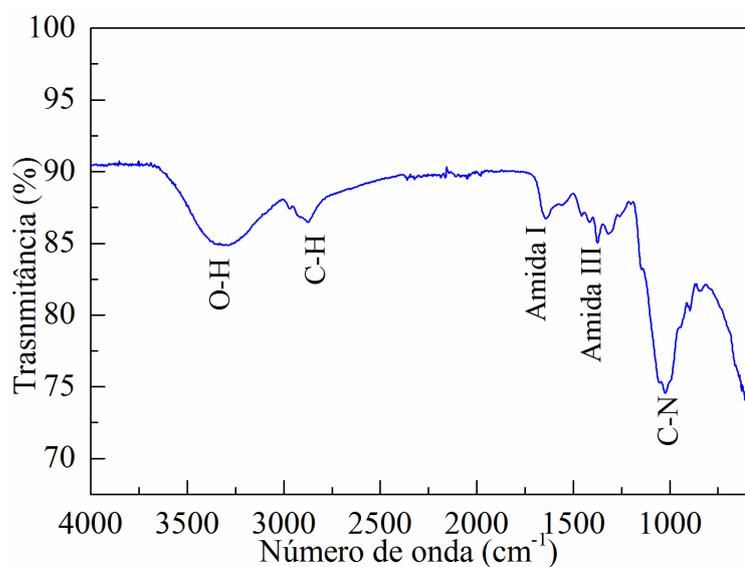


Figura 3.3 – Ampliação do espectro de FTIR do HPCS

### 3.1.2. Análise de TGA

Na Figura 3.4 observa-se os gráficos correspondentes às análises termogravimétricas das 2 amostras de CS e da amostra de HPCS utilizadas neste trabalho. Para os três casos ocorre uma perda inicial de massa a uma temperatura inferior a 150°C, que corresponde à perda de água da amostra. No caso do CS de 470 kDa o pico de temperatura onde ocorre degradação do polímero é em torno dos 300°C. No caso do CS de 33 kDa a degradação dá-se em torno dos 270°C e a perda de massa não é tão intensa. Para o HPCS a degradação dá-se aos 261°C e a perda de massa é semelhante ao CS de 33 kDa. No total o CS de 470 kDa possui uma perda de massa de 62%, enquanto o CS de 33 kDa possui uma perda de 58% e o HPCS possui uma perda de 48%. As percentagens de perda de massa assim como a temperatura a que estas ocorrem estão representadas na Tabela 3.1. Assim verifica-se que a degradação do CS está dependente do peso molecular, ou seja, quanto menor for o peso molecular menor será a temperatura a que ocorre a degradação, por ser necessária menos energia para quebrar as ligações glicosídicas [65, 66]. O mesmo fenómeno ocorre com o HPCS. Uma possível justificação é o facto de ao se adicionar o grupo hidroxipropil à cadeia polimérica de quitosano, existe um maior impedimento estereoquímico para a formação de ligações entre cadeias, facilitando a degradação do polímero [21].

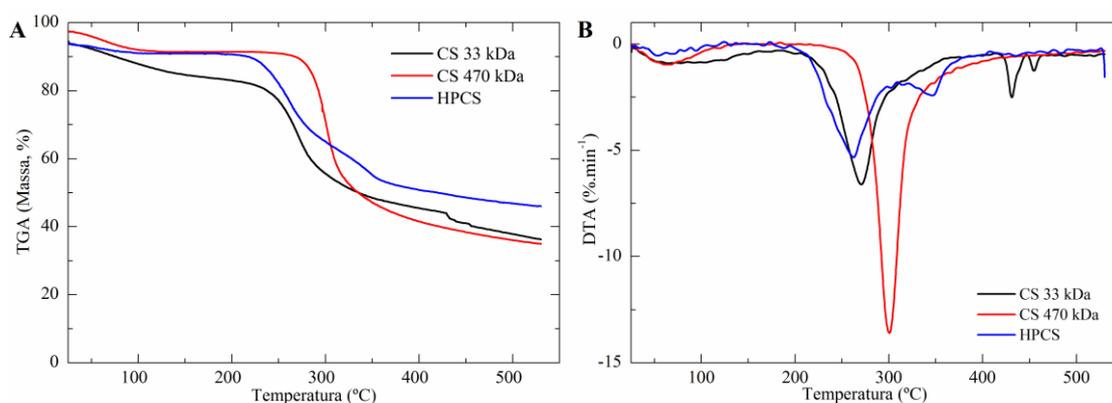


Figura 3.4 - Gráfico TGA e DTA de CS 33kDa, CS 470 kDa e HPCS.

Tabela 3.1 – Temperatura e respetivas perdas de massa obtidas na análise termogravimétrica das amostras poliméricas: CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS.

	T (°C)	% Perda massa	T (°C)	% Perda massa	% Total perda massa
<b>CS 470 kDa</b>	Até 150°C	6,1	300	56	62,1
<b>CS 33 kDa</b>		9,8	270	48	57,8
<b>HPCS</b>		3,1	261	45	48,1

## 3.2. Caracterização das micro/nanopartículas poliméricas

Após caracterização dos polímeros CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS foram produzidas micro/nanopartículas poliméricas utilizando 4 métodos de síntese diferentes: gelificação ionotrópica, método micelar inverso, emulsão A/O e precipitação. Estas partículas foram caracterizadas utilizando diferentes técnicas antes de ser testado o seu potencial como veículos para a libertação controlada de fármaco.

### 3.2.1. Análise de FTIR

A figura 3.5 compara os espectros das nanopartículas preparadas por gelificação ionotrópica com CS 470 kDa e HPCS, observando-se pequenas diferenças entre elas. A banda entre 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  torna-se mais larga nas NPs CS 470 kDa, indicando que a ligação de hidrogénio é melhorada. A banda que corresponde à vibração de flexão da ligação N-H a 1537  $\text{cm}^{-1}$  desaparece e surge uma nova banda a 1398  $\text{cm}^{-1}$  a qual pode ser atribuída ao N-O (modo vibracional de alongamento assimétrico) [61]. No caso das nanopartículas de HPCS também se verifica as mesmas alterações no espectro de FTIR, confirmando a interação com o TPP.

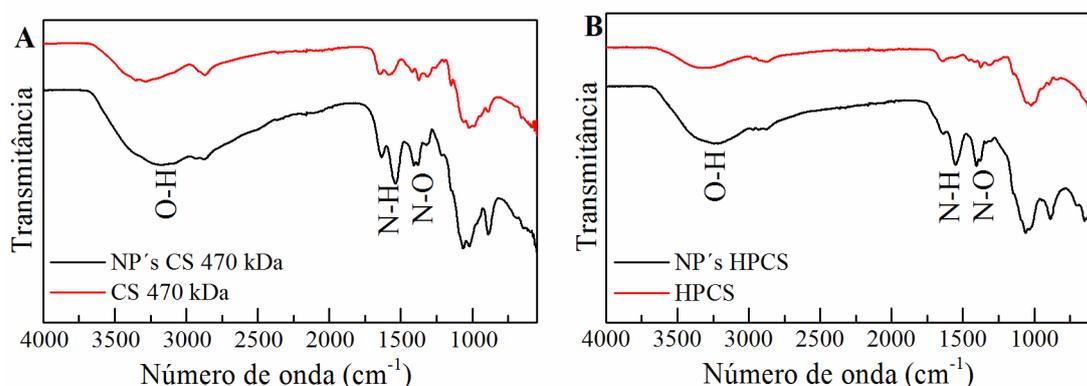


Figura 3.5 - Espectro de FTIR de NP's obtidas por gelificação ionotrópica usando CS 470 kDa (A) e HPCS (B).

Ao comparar o espectro de FTIR das nanopartículas obtidas pelo método de emulsão A/O com o de quitosano (Figura 3.6) observa-se o grupo amina característico e o modo vibracional de flexão da ligação N-H, que é claramente identificado no espectro de CS 470 kDa, a 1645  $\text{cm}^{-1}$  e 1576  $\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. Contudo no espectro de nanopartículas o modo vibracional de flexão N-H desapareceu, sugerindo que o grupo amina do CS reagiu com o grupo aldeído do glutaraldeído [36]. No caso das nanopartículas de HPCS também se verifica as mesmas alterações no espectro de FTIR.

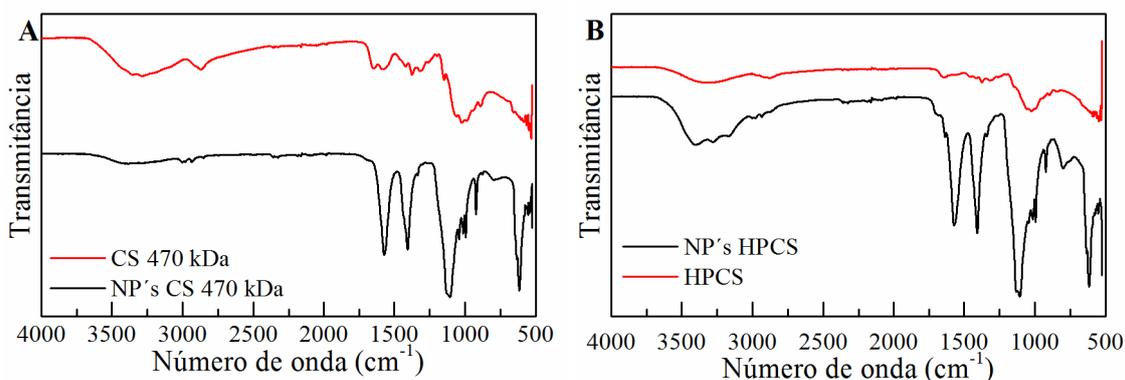


Figura 3.6 - Espectro de FTIR de NP's obtidas pelo método de emulsão A/O usando CS 470 kDa (A) e HPCS (B).

Relativamente ao espectro de FTIR das partículas obtidas pelo método micelar inverso (Figura 3.7), observa-se um aumento da intensidade da banda que ocorre aos 3436  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao alongamento da ligação O-H. Para além disso surge uma nova banda aos 1612  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde alongamento da ligação C=N. Esta banda muito intensa indica que ocorreu formação das bases de Schiff como resultado da reação entre o grupo carbonilo do glutaraldeído e o grupo amina do quitosano [38].

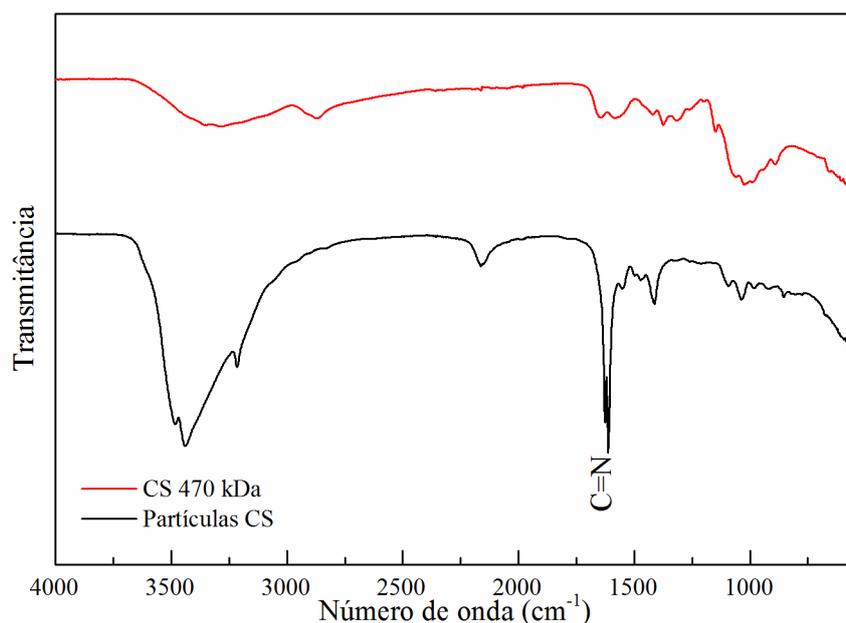


Figura 3.7 - Espectro de FTIR das partículas obtidas pelo método micelar inverso usando CS de 470 kDa.

Em relação ao espectro de FTIR das partículas obtidas por precipitação (Figura 3.8), observa-se uma similaridade com o espectro das nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica, com uma ligeira diferença na banda correspondente à vibração de flexão N-H que ocorre a 1571  $\text{cm}^{-1}$  e a banda correspondente à vibração de alongamento assimétrico N-O que

ocorre a  $1404\text{ cm}^{-1}$ . Para além disso estas bandas apresentam uma maior intensidade, comparativamente às bandas obtidas no espectro de gelificação ionotrópica.

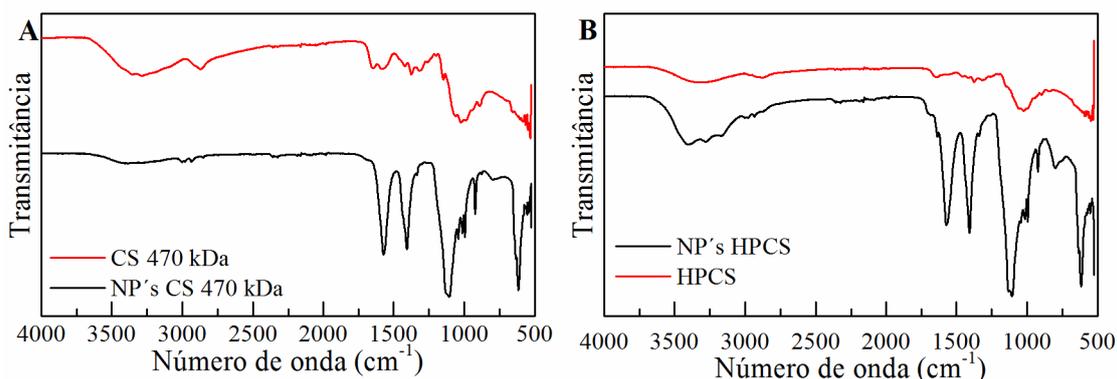


Figura 3.8 - Espectro de FTIR das partículas obtidas pelo método de precipitação, usando CS de 470 kDa (A) e HPCS (B).

### 3.2.2. Análise de TGA

Outro método utilizado para caracterizar as partículas foi a análise termogravimétrica que permite analisar a variação de massa da amostra em função da temperatura. A Figura 3.9 mostra a comparação entre os quatro métodos de produção de partículas de CS 470 kDa, sendo que as percentagens de perda de massa assim como os picos de temperatura a que as mesmas ocorrem estão resumidos na Tabela 3.2. No caso das nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica verificam-se duas perdas de massa: a primeira que ocorre até aproximadamente  $150^{\circ}\text{C}$  e que corresponde à perda de água; e a segunda a  $280^{\circ}\text{C}$  com cerca de 34% de perda de massa e que corresponde à degradação das cadeias poliméricas.

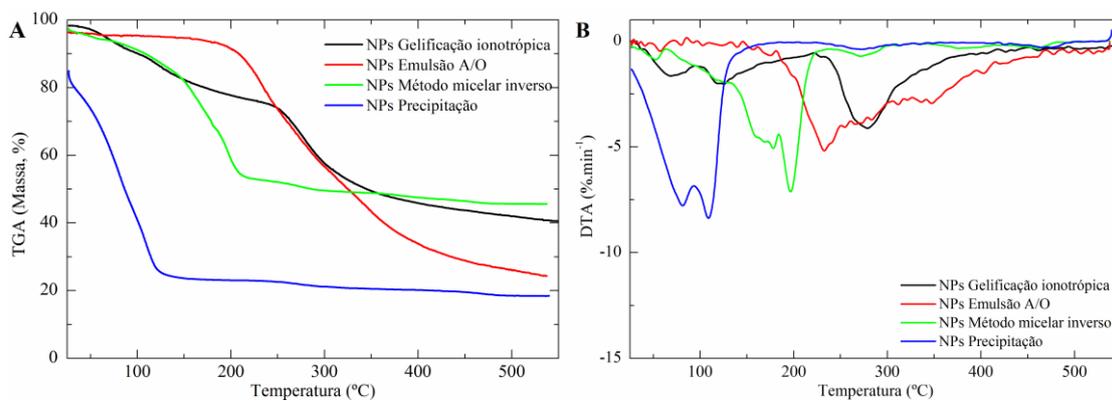


Figura 3.9 - Gráfico TGA e DTA de partículas de CS 470 kDa.

Tabela 3.2 - Temperatura e respetivas perdas de massa obtidas na análise termogravimétrica das NPs de CS 470 kDa obtidas por gelificação ionotrópica, emulsão A/O, método micelar inverso e precipitação.

	T (°C)	% Perda de massa	T (°C)	% Perda de massa	% Total Perda de massa
<b>CS 470 kDa</b>	Até ~ 150°C	6,1	300	56	62,1
<b>NPs Gelificação ionotrópica</b>		16	280	33,9	57,6
<b>NPs emulsão A/O</b>		1,8	196	70,2	72
<b>NPs método micelar inverso</b>		15,4	196	30	52,8
<b>NPs precipitação</b>		61,3	270	5,2	66,5

Relativamente às partículas obtidas pelo método micelar inverso e por água em óleo denota-se a existência de um pico acentuado a 197°C e a 233°C, respetivamente. Estes picos devem-se provavelmente à degradação das cadeias poliméricas. Em ambos os casos as partículas foram reticuladas com glutaraldeído. Comparando estes dois métodos com os restantes e com o polímero inicial, a temperatura a que ocorre a degradação é mais baixa. Uma possível justificação para a diminuição da temperatura de degradação do polímero é o facto de o glutaraldeído interagir com a cadeia polimérica, interferindo com as pontes de hidrogénio entre cadeias, o que vai enfraquecer as ligações glicosídica da cadeia de quitosano [67]. No total, as partículas obtidas pelo método água em óleo perderam 72% de massa enquanto as partículas obtidas pelo método micelar inverso perderam 53% de massa.

No caso das partículas preparadas por precipitação possuem uma perda de massa inicial de 60%, a uma temperatura inferior a 150°C, a qual se deve à perda de água por parte da amostra. No caso desta amostra em particular, o processo de secagem, neste caso a liofilização, não foi completamente eficaz. A 270°C ocorre um pequeno pico derivativo que corresponde à degradação do polímero como se pode ver na ampliação da Figura 3.10.

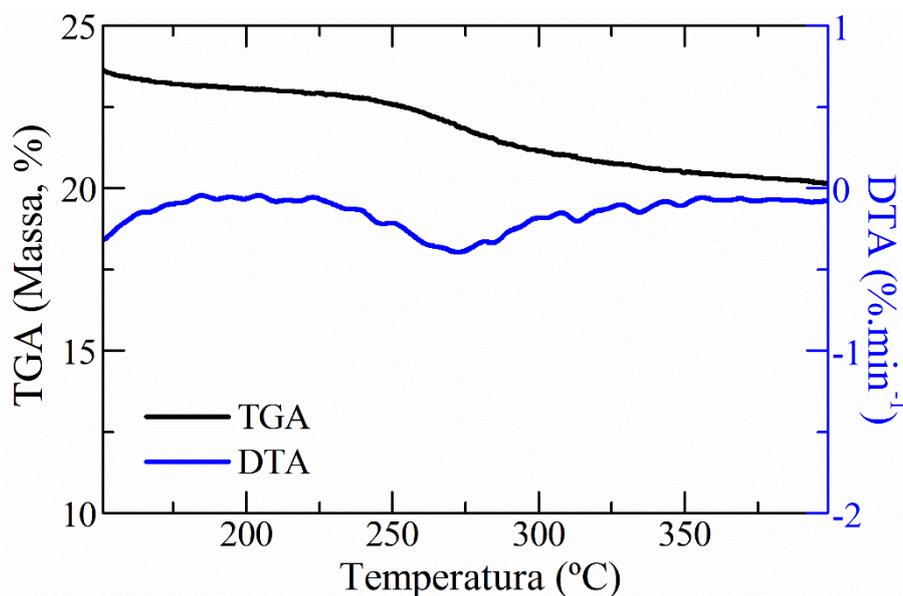


Figura 3.10 - Ampliação do gráfico das medidas termogravimétricas da amostra de partículas de CS 470 kDa obtidas por precipitação.

### 3.2.3. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta

O tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das partículas foram medidos através do método denominado de dispersão dinâmica de luz.

No caso das partículas obtidas por gelificação ionotrópica mediu-se o tamanho hidrodinâmico para os dois CS's utilizados e do HPCS, e também se fizeram medidas de potencial zeta para averiguar sobre a estabilidade das partículas, conforme apresentado na Tabela 3.3 e Figura 3.12. As medições foram realizadas a uma concentração de 0,06 mg/ml.

Tabela 3.3 - Tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta de partículas obtidas por gelificação ionotrópica com diferentes tipos de CS.

NP's CS	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PI)	Potencial zeta (mV)
<b>CS 470 kDa</b>	151 ± 51	0,61 ± 0,13	+32 ± 2
<b>CS 33 kDa</b>	165 ± 5	0,26 ± 0,18	+32 ± 2
<b>HPCS</b>	143 ± 25	0,12 ± 0,12	+31 ± 2

Comparando os tamanhos das partículas da Tabela 3.3, verifica-se que as partículas obtidas utilizando HPCS possuem um tamanho hidrodinâmico menor (143 ± 25 nm), comparado com o tamanho das partículas obtidas usando CS de 470 kDa e 33 kDa. Nestas seria de esperar

que as partículas obtidas com CS de 33 kDa fossem mais pequenas do que as obtidas com CS 470 kDa devido ao facto de a cadeia polimérica ser menor, mas em média isso não aconteceu. No entanto é possível verificar que o desvio padrão para as partículas que têm maior peso molecular é bem maior do que o obtido para as partículas de menor peso molecular, o que significa que existe uma maior dispersão de tamanhos. Para além disso, o índice de polidispersão que dá informação sobre a homogeneidade das partículas, é superior para as partículas de CS 470 kDa, o que significa que podem existir partículas de diferentes tamanhos e neste caso a solução é menos homogénea. Relativamente ao potencial zeta as amostras apresentam carga positiva com valores muito similares. Em todos os casos o potencial zeta apresenta um valor superior a 30 mV, valor a partir do qual se pode considerar que as partículas são estáveis em solução [68, 69]. O potencial zeta das partículas produzidas com HPCS é semelhante ao das partículas produzidas com CS. Isto deve-se ao facto da reação com o óxido de propileno ser preferencial no grupo OH do C6 [21], o que deixa os grupos amina livres para que ocorra protonação em meio ácido e consequente reticulação iónica com o TPP. Desta forma, a formação de nanopartículas através da ligação iónica com o TPP é semelhante entre o HPCS e o CS, originando um potencial zeta semelhante.

Em relação à Figura 3.11 que mostra as curvas de autocorrelação das partículas de CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS obtidas por gelificação ionotrópica é possível observar que as curvas possuem um comportamento similar, no entanto a curva que corresponde ao CS de maior peso molecular, está ligeiramente deslocada para a direita, o que indica a existência de partículas de maior tamanho.

Observando a Figura 3.12 é possível analisar a variação de potencial zeta em função do pH da solução para as partículas produzidas por gelificação ionotrópica, numa gama de pH que varia entre 2 e 12.

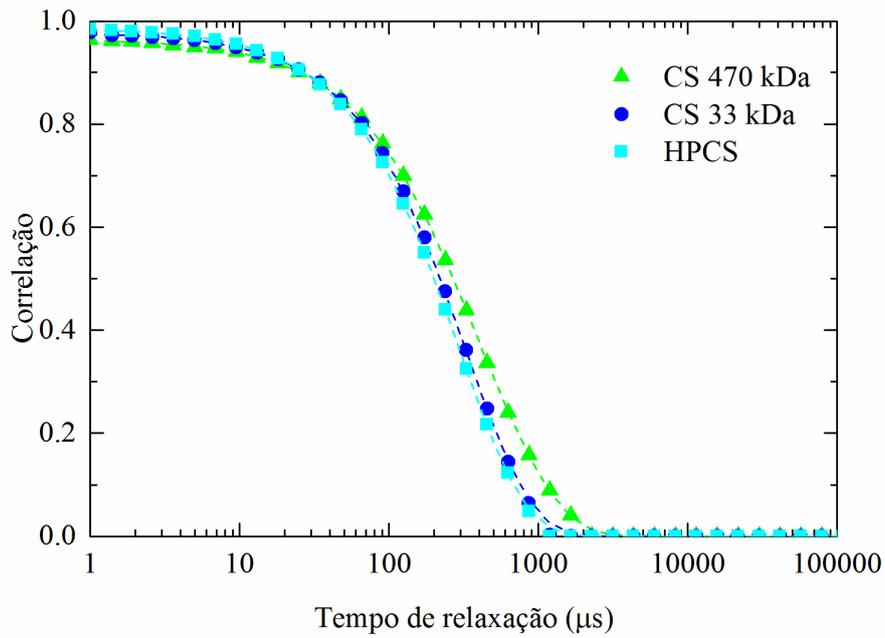


Figura 3.11 - Curvas de autocorrelação para partículas de CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS obtidas por gelificação ionotrópica.

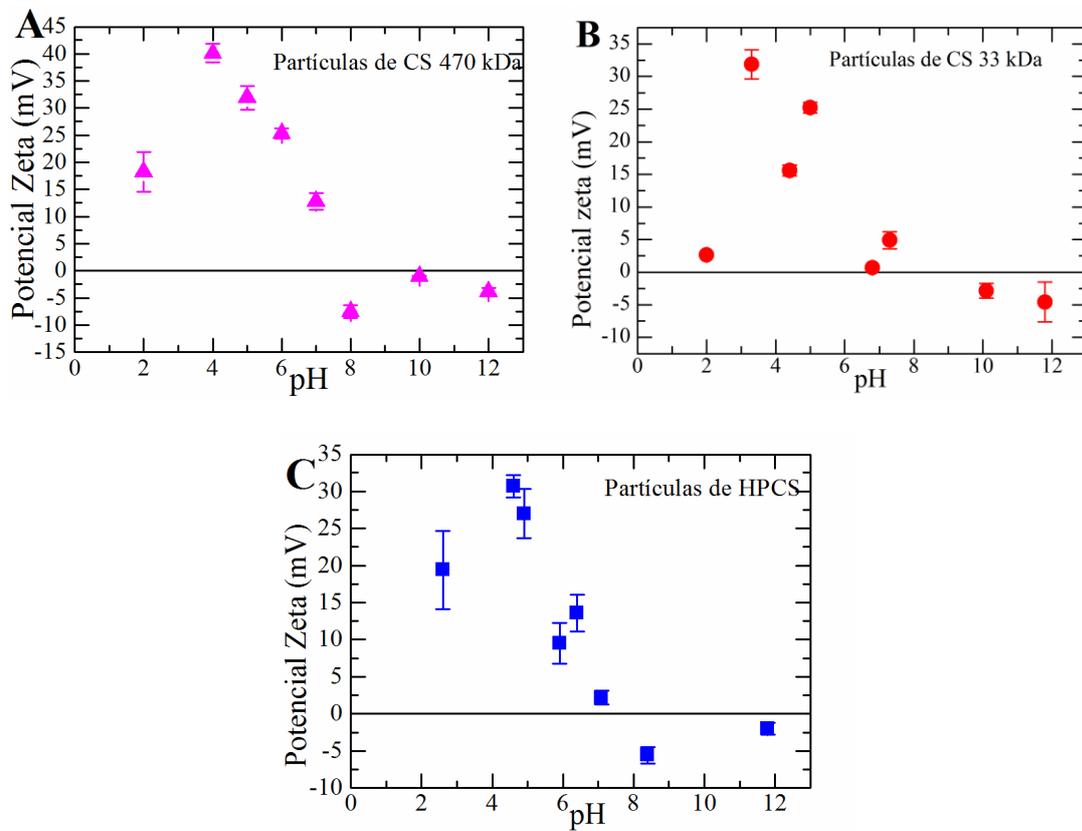


Figura 3.12 - Potencial zeta das partículas obtidas por gelificação ionotrópica A) CS 470 kDa. B) CS 33 kDa. C) HPCS.

A experiência foi realizada em triplicado utilizando soluções diluídas num factor de 1:25, resultando numa concentração de 0,06 mg/ml. Verificou-se que as partículas são estáveis a pH ácido, entre 3 e 5, obtendo-se um potencial zeta acima de +30 mV, o qual não varia significativamente com o peso molecular. No caso do HPCS o comportamento com o pH é semelhante ao CS.

Realizaram-se medições de tamanho hidrodinâmico das partículas obtidas através dos quatro métodos de síntese descritos neste trabalho, de forma a comparar as diferenças de tamanho das partículas em função do método de síntese. Para todos os casos utilizou-se CS de 470 kDa e as medições realizaram-se em triplicado utilizando soluções diluídas (Figura 3.13). Os resultados obtidos estão também resumidos na Tabela 3.4. As medições foram realizadas com concentrações entre 0,04 e 0,1 mg/ml.

Tabela 3.4 - Tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão das partículas obtidas por gelificação ionotrópica, água em óleo, método micelar inverso e precipitação utilizando CS 470 kDa.

NP's CS	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PI)
<b>Gelificação ionotrópica</b>	151 ± 51	0,61 ± 0,13
<b>Água em óleo</b>	283 ± 7	0,40 ± 0,03
<b>Micelar Inverso</b>	890 ± 234	0,81 ± 0,19
<b>Precipitação</b>	509 ± 68	0,41 ± 0,03

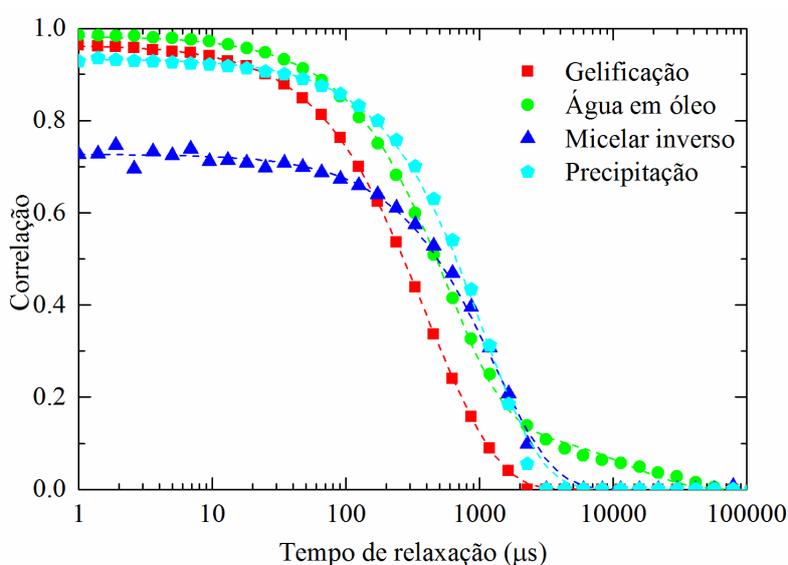


Figura 3.13 - Curvas de autocorrelação para as partículas obtidas por gelificação ionotrópica, água em óleo, método micelar inverso e precipitação.

De acordo com a Tabela 3.4 observa-se que as partículas de menor tamanho são as obtidas por gelificação ionotrópica ( $151 \pm 51$  nm) e as de maior tamanho são as partículas obtidas pelo método micelar inverso ( $890 \pm 234$  nm). Relativamente ao índice de polidispersão, que avalia a homogeneidade da solução, verifica-se que para as partículas obtidas pelo método micelar inverso a solução é pouco homogênea. As partículas obtidas por precipitação e pela emulsão A/O apresentam um tamanho de 509 nm e 283 nm, respetivamente. Os índices de polidispersão destas amostras, apesar de serem menores que as restantes, ainda mostram alguma heterogeneidade da amostra. Observando a Figura 3.13 **Error! Reference source not found.** verifica-se que todos os métodos apresentam curvas bem definidas, de acordo com o tamanho de partículas que se obtém em cada método, quanto maior o tempo que a curva demora a decair, maior o tamanho das partículas [26].

### 3.2.4. Análise por SEM

Analisaram-se as partículas por microscopia eletrónica de varrimento de maneira a obter informação sobre a morfologia, a aparência e o tamanho das partículas. As partículas obtidas por gelificação ionotrópica (Figura 3.14 **Error! Reference source not found.**) apresentam forma esférica e possuem uma distribuição de tamanhos entre os 24-57 nm, sendo que as partículas de menor tamanho são as obtidas com HPCS, tal como ocorreu na análise de DLS.

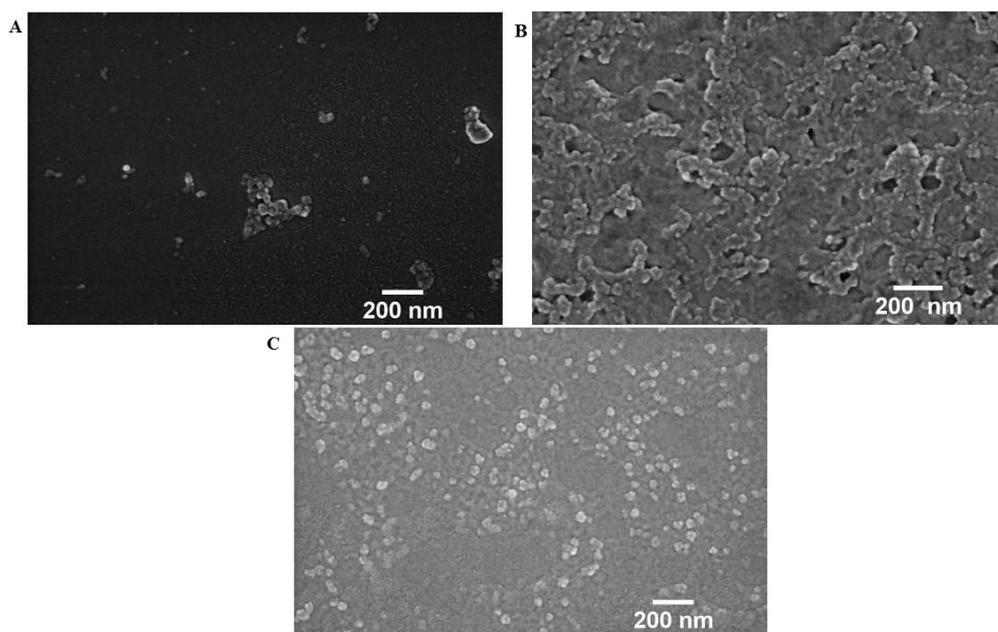


Figura 3.14 - Imagem de SEM de partículas obtidas por gelificação ionotrópica; A) CS 470 kDa B) CS 33 kDa C) HPCS.

Verificou-se que ocorreu alguma agregação entre as nanopartículas durante o processo de secagem, o que também pode estar relacionado com o elevado índice de polidispersão verificado

nas medições de DLS. Para além disso verificou-se que o tamanho das nanopartículas é menor em relação aos tamanhos das nanopartículas obtidas por DLS. Uma possível explicação é que as partículas de CS incham em meio aquoso e para além disso o DLS mede o tamanho hidrodinâmico enquanto o SEM mede o tamanho seco da partícula [30]. Relativamente às partículas obtidas pelo método de emulsão água em óleo (Figura 3.15), verificou-se que possuem forma esférica e o tamanho de partículas situa-se entre os 62 e os 186 nm [36]. Neste caso os resultados também estão de acordo com os resultados obtidos por DLS, apesar de nas imagens de SEM o tamanho médio das partículas ser menor.

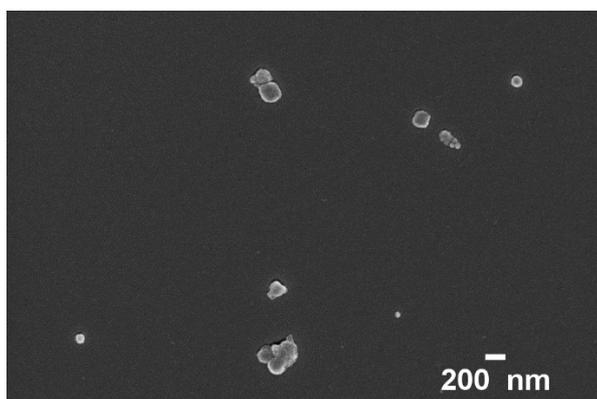


Figura 3.15 - Imagem de SEM de partículas obtidas pelo método de emulsão água em óleo com CS 470 kDa.

Na Figura 3.16 observam-se as partículas obtidas pelo método micelar inverso que possuem um tamanho entre os 80 nm e os 300 nm. No entanto observam-se estruturas de grande dimensão de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 800 nm de largura em forma de bastonete, que provavelmente correspondem a agregados. As medidas de DLS desta amostra também mostraram a presença de partículas micrométricas, com um elevado índice de polidispersão, o que demonstra a heterogeneidade da amostra.

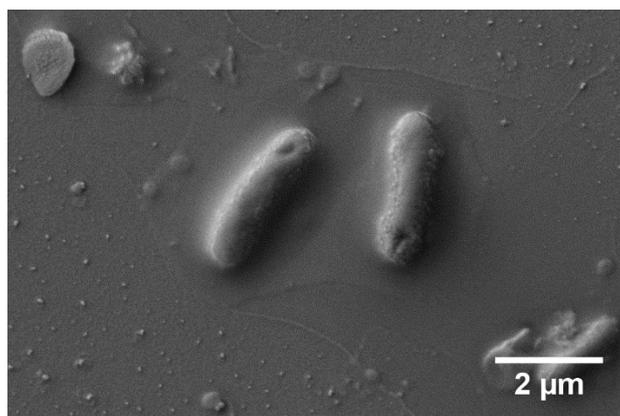


Figura 3.16 - Imagem de SEM de partículas obtidas pelo método micelar inverso com Cs 470 kDa.

As partículas obtidas por precipitação (Figura 3.17) apresentam forma esférica e um tamanho entre 38 e os 120 nm, sendo que as partículas obtidas com CS de 33 kDa são as que apresentam menor tamanho.

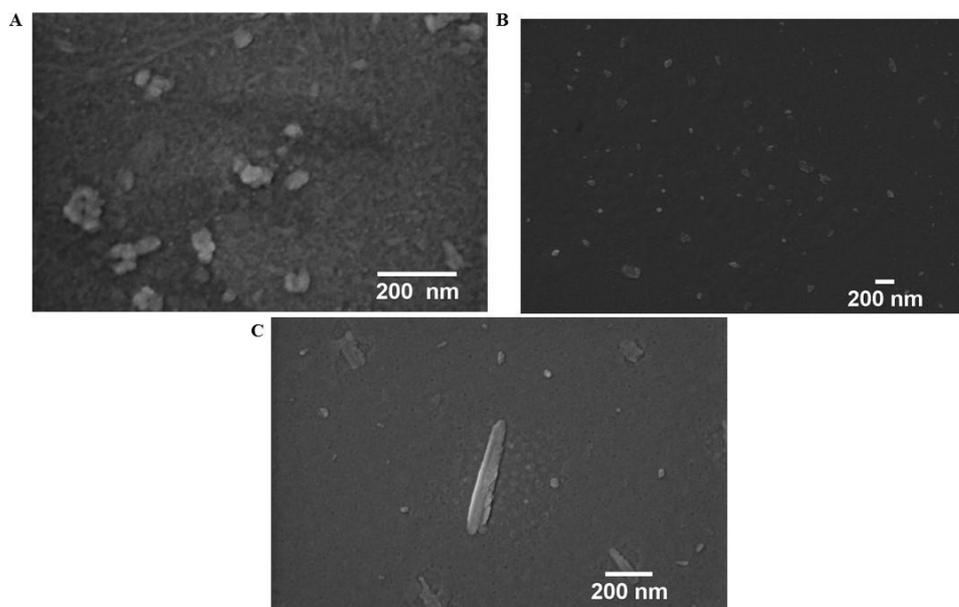


Figura 3.17 - Imagem de SEM de partículas obtidas por precipitação A) CS de 470 kDa B) CS de 33 kDa C) HPCS

### 3.3. Eficiência de Encapsulamento da DOX

Após caracterização morfológica e físico-química das amostras de partículas de quitosano e HPCS obtidas pelos diferentes métodos, foi avaliada a sua eficácia como veículo de liberação de fármacos. Num primeiro passo foi avaliada a eficiência de encapsulamento da DOX foi estudada para todos os métodos de preparação de partículas utilizando CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS, conforme se apresenta na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Eficiência de Encapsulamento (%) de DOX nas micro/nanopartículas de CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS preparadas pelos 4 métodos de síntese.

		CS 470 kDa	CS 33 kDa	HPCS
<b>Eficiência de Encapsulamento (%)</b>	Gelificação ionotrópica	27 ± 0,70	29 ± 0,39	32 ± 1,4
	Emulsão água em óleo	86 ± 2,5	80 ± 4,5	80 ± 4,8
	Precipitação	20 ± 7,7	16 ± 6,2	17 ± 4,3
	Método micelar inverso	0	---	---

As partículas obtidas por gelificação ionotrópica apresentam uma eficiência de encapsulamento próxima dos 30%, sendo que o polímero utilizado não influenciou a eficiência de encapsulamento. Este valor de eficiência é ligeiramente mais baixo do que o encontrado na literatura [61] porque as partículas foram lavadas com água, o que pode ter provocado a liberação de alguma DOX.

As partículas obtidas por emulsão água em óleo são as que apresentam uma maior eficiência de encapsulamento, em torno dos 80%. Neste caso a variação do tipo de polímero não teve grande influência na eficiência de encapsulamento, apenas ocorreu uma variação de 5%.

As partículas obtidas por precipitação apresentam uma eficiência de encapsulamento muito baixa, entre os 16% e os 20%. Neste caso também não se verificou diferença na eficiência de encapsulamento utilizando diferentes tipos de polímero.

Relativamente às partículas obtidas pelo método micelar inverso apenas se fez a medição da eficiência para o CS 470 kDa e verificou-se que não houve qualquer encapsulamento de DOX.

Tendo em conta os resultados obtidos verifica-se que o método de emulsão A/O é aquele que apresenta uma maior eficiência de encapsulamento, seguido da gelificação ionotrópica e precipitação. O método micelar inverso não foi testado para a liberação de fármaco pois não se verificou qualquer encapsulamento de DOX. De forma geral também não se verificaram diferenças significativas na eficiência de encapsulamento com a variação de peso molecular de 470 kDa para 33 kDa, nem com o derivado do quitosano, o HPCS.

### **3.4. Estudos de liberação da DOX**

Os estudos de liberação da DOX foram efetuados para as partículas obtidas por gelificação ionotrópica, pelo método de emulsão água em óleo e por precipitação utilizando o CS 470 kDa, o CS 33 kDa e o HPCS. Os estudos foram realizados a pH 7,4, correspondente ao pH da corrente sanguínea e a temperatura fisiológica de 37°C, tendo por base o modelo de liberação de DOX otimizado noutra dissertação [59].

Na Figura 3.18 é possível observar as curvas de liberação de DOX para nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica usando CS 470 kDa, CS 33 kDa e HPCS. A DOX é libertada maioritariamente nas primeiras 10 h, atingindo depois disso um patamar. No caso das nanopartículas obtidas com CS 470 kDa ocorre 31% de liberação, enquanto as partículas obtidas com CS de 33 kDa libertam 26% de DOX e as partículas obtidas com HPCS libertam apenas 19% de DOX.

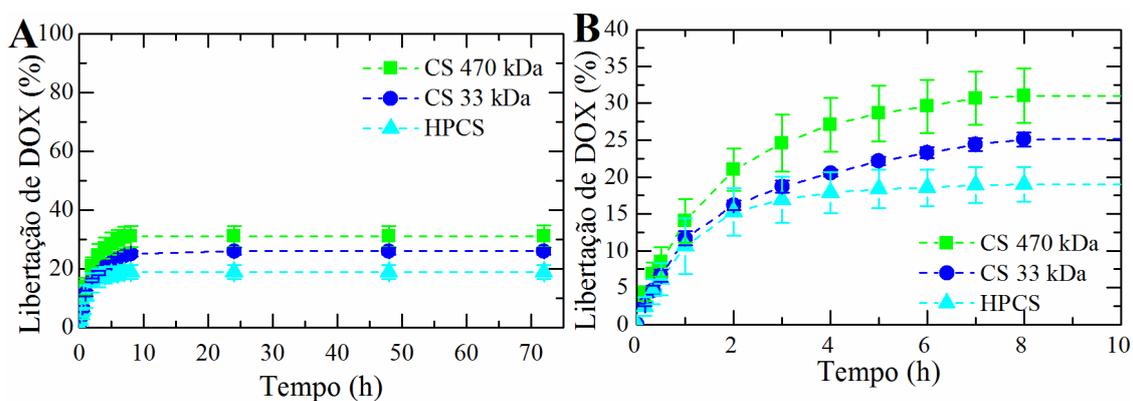


Figura 3.18 - (A) Percentagem de libertação de DOX para nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica. (B) Ampliação da percentagem de libertação de DOX para as primeiras 10 h.

Relativamente às partículas obtidas por precipitação (Figura 3.19), verifica-se que as obtidas com CS 470 kDa libertam 21% da DOX, as obtidas com CS de 33 kDa libertam 25% da DOX e as obtidas com HPCS libertam 20% da DOX. O patamar de libertação é atingido ao fim 10h. Neste caso não se verificam diferenças significativas na percentagem de libertação de DOX com a variação do peso molecular do quitosano ou com o HPCS.

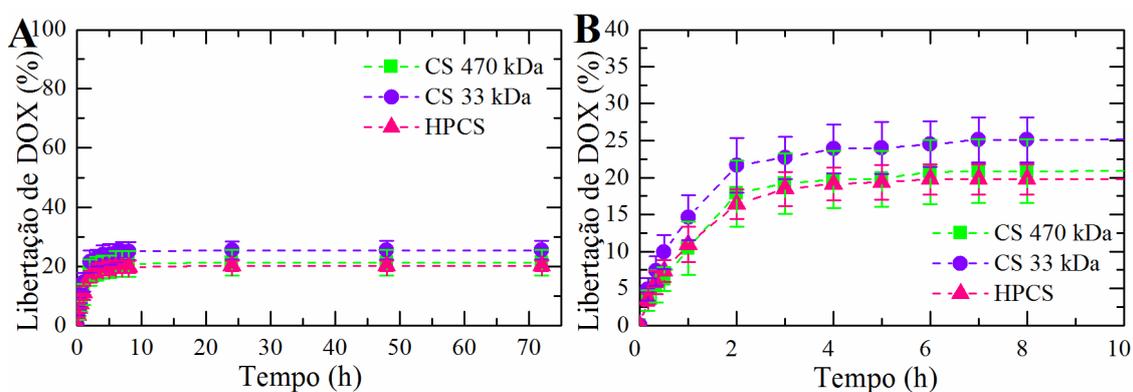


Figura 3.19 - (A) Libertação de DOX para nanopartículas obtidas por precipitação. (B) Ampliação da percentagem de libertação de DOX para as primeiras 10 h.

Ao analisar as variações do polímero utilizado verifica-se que não existe um padrão, isto é, no caso da gelificação ionotrópica as partículas obtidas com CS de 470 kDa apresentam a maior percentagem de libertação, mas no caso da precipitação são as partículas obtidas com CS de 33 kDa que apresentam maior percentagem de libertação, sendo que o HPCS apresenta nos dois ensaios a pior percentagem de libertação. Estes resultados mostram que no caso do CS de 470 kDa e CS de 33 kDa não existe diferença para a quantidade de libertação de DOX, mas no caso do HPCS verifica-se que possui uma baixa percentagem de libertação para os dois métodos analisados, apesar de a diferença ser no máximo de 12%.

Relativamente às partículas obtidas pelo método de emulsão água em óleo, verificou-se que não ocorreu libertação do fármaco ao fim de 72 h. O ensaio de libertação foi estendido até às 168 horas, não se verificando mesmo assim libertação de DOX. Uma possível justificação pode ser a quantidade de glutaraldeído que, por criar uma rede densa de quitosano, não permita o seu inchamento a pH 7,4, não havendo portanto libertação de DOX.

Comparando a eficiência da libertação do fármaco das partículas obtidas por gelificação iónica e por precipitação usando CS de 470 kDa verifica-se que as partículas obtidas por gelificação iónica libertam uma maior percentagem de DOX (31%) enquanto as partículas obtidas por precipitação apenas libertam 21% da DOX, o que corresponde a uma diferença de 10% na eficiência de libertação entre os dois métodos (Figura 3.20).

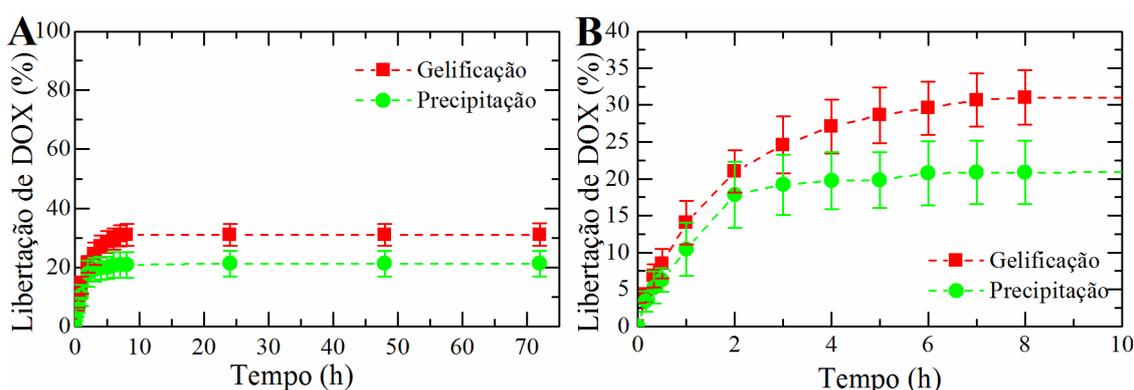


Figura 3.20 - (A) Comparação entre a libertação de DOX por parte de partículas de CS 470 kDa obtidas por gelificação iónica e por precipitação a pH 7,4. (B) Ampliação da percentagem de libertação de DOX para as primeiras 10 h.

### 3.5. Modelos matemáticos para estudos dos perfis de libertação

Para aplicar os modelos matemáticos foi utilizado um suplemento do Excel, o DDSolver, que permite fazer aplicação de diversos modelos matemáticos aos dados experimentais de libertação de fármaco. O programa retorna a informação inserida pelo utilizador e os dados previstos pelo programa, para além das constantes associadas aos modelos e valores estatísticos que avaliam a correlação entre os dados experimentais e os resultados modelados. Um exemplo gráfico, da aplicação deste programa, utilizando o modelo de Weibull, é mostrado na Figura 3.21.

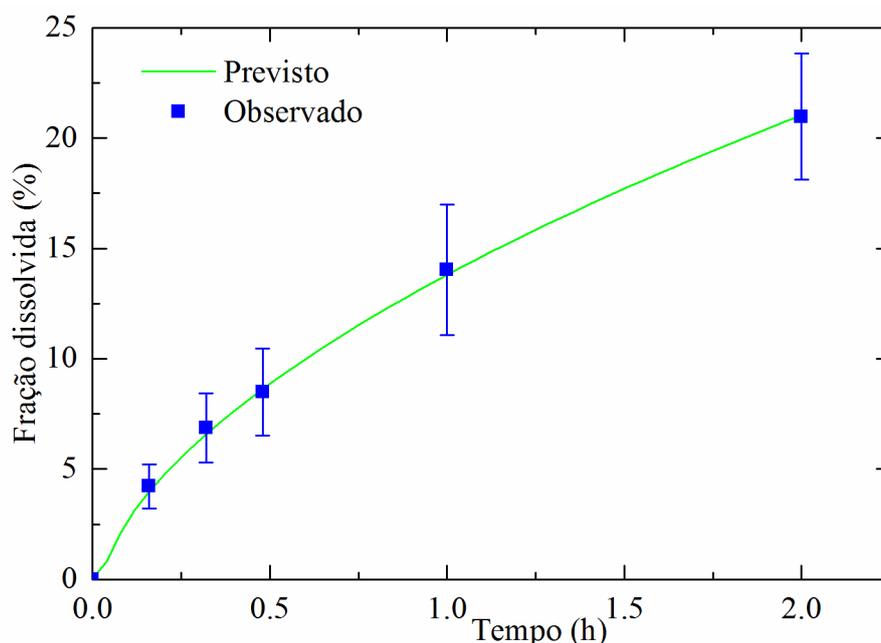


Figura 3.21 - Exemplo do modelo de Weibull, com valores previstos e observados para liberação de DOX a partir de nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica com CS 470 kDa.

Aplicou-se este procedimento às partículas obtidas por gelificação ionotrópica e às partículas obtidas por precipitação, pois foram as únicas que apresentaram liberação de DOX. A seleção do modelo que descreve a liberação foi feita através do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), sendo que o modelo com o maior  $R^2$  é o que melhor descreve a liberação do fármaco [63].

Os modelos aplicados neste trabalho foram o de Korsmeyer-Peppas, Weibull e Peppas-Sahlin, pois são os que melhor se enquadram com o tipo partículas e materiais utilizados neste trabalho, pois os outros modelos apresentam um baixo coeficiente de correlação [59].

O modelo de Korsmeyer-Peppas possui duas constantes  $n$  e  $K$ , sendo que a constante  $n$  está relacionada com o tipo de mecanismo de liberação: se  $n \leq 0,43$  ocorre majoritariamente difusão; se  $n = 0,85$  ocorre o caso II transporte, relacionado com a relaxação da matriz polimérica e inchamento; se  $0,43 < n < 0,85$  ocorre transporte anômalo que resulta da combinação do caso II com difusão; e finalmente se  $n > 0,85$  é um super caso II, em que a relaxação da matriz polimérica é o fenômeno predominante. A constante  $K$  está relacionada com a estrutura e forma do polímero. O modelo de Weibull possui duas constantes  $a$  e  $b$  sendo que  $a$  corresponde ao fator tempo e  $b$  está relacionado com o formato da curva de liberação. De acordo com o valor de  $b$  é possível identificar o mecanismo de liberação: se  $b \leq 0,75$  ocorre difusão; se  $0,75 < b < 1$  ocorre um mecanismo combinado de difusão e caso II; se  $b > 1$  ocorre um mecanismo complexo. Para além disso existe uma correlação entre o parâmetro  $b$  da equação de Weibull e o expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas. Por último, o modelo de Peppas-Sahlin possui três constantes  $k_1$ ,  $k_2$  e  $m$ , sendo que  $k_1$  está relacionado com a difusão, o  $k_2$  está relacionado com o caso II e o  $m$  esta

relacionado com o expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas e o seu valor deve ser semelhante [53, 57-59].

Os resultados dos modelos matemáticos para os dados experimentais das partículas obtidas por gelificação ionotrópica são apresentados na Tabela 3.6. No caso das nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópica com CS de 470 kDa, os modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull são os que melhor descrevem o tipo de libertação pois possuem o coeficiente de correlação mais alto. Segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas ocorre transporte anómalo, que resulta da combinação de um mecanismo de relaxação das cadeias poliméricas com difusão, enquanto o modelo de Weibull indica que ocorre maioritariamente difusão. No entanto, como o coeficiente de correlação do modelo de Weibull é ligeiramente superior, considera-se que no caso destas nanopartículas o mecanismo de libertação é maioritariamente dependente da difusão, apesar de a relaxação das cadeias poliméricas também ter influência na libertação.

No caso das partículas obtidas por gelificação ionotrópica com CS 33 kDa o modelo que apresenta um maior coeficiente de correlação é o de Weibull, com  $b \leq 0,75$  indicando que ocorre maioritariamente difusão. Para as partículas obtidas com HPCS o modelo que melhor define o perfil de libertação também é o de Weibull e conclui-se que a DOX é libertada por um mecanismo combinado de difusão e relaxação das cadeias poliméricas. Assim pode-se concluir que neste método as partículas obtidas com CS de 470 kDa e HPCS possuem um mecanismo de libertação semelhante, o que pode estar relacionado com a proximidade dos seus pesos moleculares, como já foi referido anteriormente. Como as partículas obtidas com CS de 33 kDa possuem um peso molecular mais baixo, o mecanismo de libertação de DOX é ligeiramente diferente ocorrendo maioritariamente por difusão.

Relativamente às partículas obtidas por precipitação (Tabela 3.7) com CS de 470 kDa verifica-se que o modelo que melhor define o perfil de libertação é o de Korsmeyer-Peppas, que indica que ocorre uma combinação de relaxação das cadeias poliméricas com difusão. No caso das partículas obtidas com CS de 33 kDa, apesar dos modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull apresentarem coeficientes de correlação muito próximos, o que melhor define o sistema de libertação é o de Weibull, que indica que ocorre maioritariamente por difusão. Relativamente às partículas obtidas com HPCS, a libertação de DOX dá-se por difusão, segundo o modelo de Weibull que é o que melhor define o perfil de libertação.

Observando os resultados obtidos, verifica-se que os modelos que melhor definem os perfis de libertação são o de Korsmeyer-Peppas e o de Weibull e que a libertação de DOX deu-se maioritariamente por difusão. Comparando os dois métodos de obtenção de partículas verifica-se que a libertação dá-se maioritariamente por difusão. No entanto no caso das partículas obtidas por

gelificação ionotrópica em alguns casos a libertação de DOX também pode ser atribuída à relaxação das cadeias poliméricas.

Tabela 3.6 - Modelos matemáticos para as partículas obtidas por gelificação ionotrópica.

Modelo	Constantes	CS 470 kDa	CS 33 kDa	HPCS
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<i>n</i>	0,64 ± 0,069	0,59 ± 0,024	0,82 ± 0,061
	<i>K</i>	14 ± 2,5	10 ± 0,70	11 ± 3,7
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,998	0,980	0,997
<b>Weibull</b>	<i>a</i>	6,8 ± 1,7	8,2 ± 0,70	9,4 ± 3,2
	<i>b</i>	0,67 ± 0,092	0,52 ± 0,040	0,77 ± 0,078
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,998	0,990	0,999
<b>Peppas Sahlin</b>	<i>k<sub>1</sub></i>	18±2,9	13±0,69	12±3,0
	<i>k<sub>2</sub></i>	-2,2±0,48	-1,5±0,20	-1,7±0,67
	<i>m</i>	0,42±0,016	0,43±0,019	0,39±0,038
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,931	0,945	0,903

Tabela 3.7 - Modelos matemáticos para as partículas obtidas por precipitação.

Modelo	Constantes	CS 470 kDa	CS 33 kDa	HPCS
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<i>n</i>	0,65 ± 0,090	0,61 ± 0,059	0,61 ± 0,031
	<i>K</i>	10 ± 3,4	15 ± 3,0	11 ± 2,4
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,991	0,997	0,996
<b>Weibull</b>	<i>a</i>	9,7 ± 2,8	6,4 ± 1,6	8,7 ± 2,1
	<i>b</i>	0,63 ± 0,15	0,60 ± 0,088	0,55 ± 0,10
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,987	0,998	0,998
<b>Peppas Sahlin</b>	<i>k<sub>1</sub></i>	13 ± 3,5	17 ± 3,2	14 ± 2,2
	<i>k<sub>2</sub></i>	-1,9 ± 0,63	-2,7 ± 0,72	-1,9 ± 0,49
	<i>m</i>	0,39 ± 0,025	0,37 ± 0,028	0,38 ± 0,023
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,902	0,922	0,918

# Capítulo 4. Conclusões e trabalho futuro

Neste trabalho foram produzidas partículas de quitosano a partir quatro métodos diferentes: gelificação ionotrópica, emulsão água em óleo, método micelar inverso e precipitação. Foram utilizados três polímeros à base de quitosano: CS com 470 kDa, CS com 33 kDa e hidroxipropil quitosano. Estas partículas foram caracterizadas quanto à sua morfologia e propriedades físico-químicas. A DOX foi encapsulada nas partículas produzidas e foi feita a libertação *in vitro* do fármaco para fazer uma análise sobre os perfis de libertação. Por fim procedeu-se à utilização de modelos matemáticos para determinar os mecanismos de libertação dominantes.

Relativamente ao processo de produção de quitosano despolimerizado, verificou-se através do método denominado de viscosidade da solução diluída que o quitosano obtido apresentava um peso molecular de 33 kDa, sendo este um valor na gama do esperado [61]. Segundo as análises de FTIR e TGA a amostra de CS de 33 kDa apresentava características semelhantes às do CS de 470 kDa, mostrando que o processo de despolimerização utilizado não alterou as características físico-químicas da amostra, apenas diminuiu o seu peso molecular. Em relação ao processo de produção de HPCS, através da técnica de FTIR verificou-se que ocorreu hidroxipropilação devido à diminuição do rácio -OH:-CH. No entanto, o grau de substituição parece ser baixo, de acordo com os valores de referência da literatura. Para confirmar esta assunção poder-se-ia proceder à análise elementar da amostra. Segundo a análise de TGA a degradação do HPCS dá-se aos 261°C, sendo que a temperatura a que ocorre degradação de CS de 470 kDa é aos 300°C.

As partículas poliméricas produzidas pelos diversos métodos apresentam tamanhos medidos em DLS entre os  $151 \pm 51$  nm e os  $890 \pm 234$  nm. As partículas obtidas por gelificação e emulsão água em óleo são as que apresentam o tamanho mais reduzido, de  $151 \pm 51$  nm e  $283 \pm 7$  nm, respetivamente. Tendo em conta o tipo de polímero utilizado fez-se uma análise do tamanho hidrodinâmico e do potencial zeta para averiguar sobre a estabilidade das partículas e concluiu-se que, independentemente do tipo de polímero utilizado, o valor de potencial zeta é de aproximadamente +30 mV a pH entre os 3 e 5, comprovando a estabilidade das partículas em suspensão aquosa. Em relação ao tamanho hidrodinâmico, não se verificou uma variação significativa entre as partículas. No entanto observou-se que as partículas obtidas com CS de 470 kDa apresentavam uma maior heterogeneidade de tamanhos. Fazendo uma análise morfológica das partículas, verificou-se que possuem morfologia esférica para todos os métodos de síntese.

No que diz respeito aos ensaios de encapsulamento, verificou-se que as partículas obtidas por água em óleo apresentam uma eficiência de encapsulamento de  $86\% \pm 2,5\%$ . No entanto este valor pode não corresponder à realidade pois utilizou-se uma curva de calibração de DOX em água e para este caso utilizou-se hexano como solvente. Excluindo esta amostra, as partículas que apresentam maior eficiência de encapsulamento são as obtidas por gelificação ionotrópica. Para além disso verificou-se as partículas obtidas pelo método micelar inverso não encapsularam o fármaco para as condições testadas e que o tipo de polímero utilizado não teve grande influência na eficiência de encapsulamento.

Como as partículas obtidas pelo método micelar inverso não encapsularam DOX, apenas se fizeram ensaios de libertação das partículas obtidas por gelificação ionotrópica, emulsão água em óleo e precipitação. Destes três métodos, verificou-se que nas 72 h do ensaio de libertação apenas as partículas obtidas por gelificação ionotrópica e precipitação libertaram DOX. O patamar de libertação para as partículas obtidas por gelificação ionotrópica e precipitação é atingido ao fim de 10 h. Para além disso as partículas obtidas por gelificação ionotrópica libertam 10% mais DOX que as obtidas por precipitação. Comparando as partículas obtidas por diferentes tipos de polímero, verifica-se que não ocorreu uma grande variação nos ensaios de libertação, para as condições experimentais testadas.

Observando os resultados obtidos nos modelos matemáticos, os que melhor definem os perfis de libertação são o de Kormeyer-Peppas e o de Weibull. A libertação de DOX deu-se maioritariamente por difusão apesar de a relaxação das cadeias poliméricas também ter alguma influência. Também aqui não se verificaram diferenças significativas entre os métodos utilizados ou o tipo de polímero utilizado.

Desta forma foi possível preparar três amostras poliméricas à base de quitosano: Cs de 470 kDa, Cs de 33 kDa e HPCS. Utilizaram-se estes polímeros para a produção de partículas através de quatro métodos: gelificação ionotrópica, emulsão água em óleo, método micelar inverso e precipitação. Foi feita a avaliação da eficiência de encapsulamento e estudo dos perfis de libertação da DOX das partículas produzidas em condições fisiológicas e foram utilizados modelos matemáticos para perceber os mecanismos de libertação.

Por forma a otimizar o trabalho realizado nesta dissertação, poderá fazer-se uma análise da influência da utilização de quitosano despolimerizado com peso molecular inferior ao utilizado neste trabalho, o qual poderia ser solúvel a pH fisiológico. Por outro lado também se poderia estudar a influência da utilização de outros derivados do quitosano no tamanho das partículas, na eficiência de encapsulamento e na eficiência de libertação de DOX.

Por outro lado, poderia ser interessante fazer novas sínteses de HPCS com diferentes graus de substituição para que o derivado que se dissolva eficientemente em água (pH neutro).

Também seria interessante fazer uma otimização dos métodos de síntese de partículas utilizados e alargar-se o estudo a outros métodos, fazendo uma comparação para perceber qual o mais eficiente na libertação controlada de DOX. Estes estudos de libertação também deveriam ser feitos em soluções de PBS com diferentes pH's de maneira a simular o pH das diversas zonas do tumor (pH mais ácido). Também se poderia fazer uma otimização do encapsulamento e da libertação de DOX para os métodos estudados de maneira a obter um maior encapsulamento e uma libertação do fármaco mais controlada.

Por último, as partículas produzidas deveriam ser analisadas quanto à sua citotoxicidade. Após este passo, seria importante analisar a sua capacidade de libertação controlada na presença de células e a sua capacidade anti-tumoral.



# Referências

1. N. Miranda, C.P., *Doenças oncológicas em números-2014*. Direção Geral da Saúde, 2014.
2. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013. **65**(2): p. 157-170.
3. Dragojevic, S., et al., *Abstract 2168: Optimizing doxorubicin derivatives delivery using temperature sensitive biopolymers in multidrug resistant breast cancer cells*. Cancer Research, 2016. **76**(14 Supplement): p. 2168-2168.
4. Sun, K., et al., *Dextran-g-PEI nanoparticles as a carrier for co-delivery of adriamycin and plasmid into osteosarcoma cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **49**(2): p. 173-180.
5. Ninomiya, K., et al., *Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer*. Ultrasonics Sonochemistry, 2014. **21**(1): p. 310-316.
6. Mastria, E.M., et al., *Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma*. Journal of Controlled Release, 2015. **208**: p. 52-58.
7. Shi, X., et al., *Effect of degree of substitution and molecular weight of carboxymethyl chitosan nanoparticles on doxorubicin delivery*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **100**(6): p. 4689-4696.
8. Mincea, M., A. Negulescu, and V. Ostafe, *Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review*. Rev Adv Mater Sci, 2012. **30**(3): p. 225-242.
9. Kraisit, P., et al., *Nanoparticle formation by using shellac and chitosan for a protein delivery system*. Pharmaceutical development and technology, 2013. **18**(3): p. 686-693.
10. Kittur, F.S., A.B.V. Kumar, and R.N. Tharanathan, *Low molecular weight chitosans—preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization*. Carbohydrate research, 2003. **338**(12): p. 1283-1290.
11. Krajewska, B., *Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials*. Separation and purification technology, 2005. **41**(3): p. 305-312.
12. Illum, L., et al., *Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **51**(1): p. 81-96.
13. No, H.K. and S.P. Meyers, *Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1995. **4**(2): p. 27-52.
14. Steenkamp, G., et al., *Copper (II) removal from polluted water with alumina/chitosan composite membranes*. Journal of membrane science, 2002. **197**(1): p. 147-156.
15. Prashanth, K.H., F. Kittur, and R. Tharanathan, *Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions*. Carbohydrate Polymers, 2002. **50**(1): p. 27-33.
16. Jayakumar, R., et al., *Preparation, characterization, bioactive and metal uptake studies of alginate/phosphorylated chitin blend films*. Int J Biol Macromol, 2009. **44**(1): p. 107-111.
17. Yang, H.-C. and M.-H. Hon, *The Effect of the Degree of Deacetylation of Chitosan Nanoparticles and its Characterization and Encapsulation Efficiency on Drug Delivery*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2010. **49**(12): p. 1292-1296.
18. Li, P., et al., *Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(3): p. 698-704.
19. Peng, Y., et al., *Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan*. Carbohydr Res, 2005. **340**(11): p. 1846-51.
20. Pinto, L., *Síntese e estudo de derivados do quitosano com potencial interesse biológico e ambiental*, in *Departamento de Química- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto* 2005.

21. Dong, Y., et al., *Influence of degree of molar etherification on critical liquid crystal behavior of hydroxypropyl chitosan*. European Polymer Journal, 2001. **37**(8): p. 1713-1720.
22. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: properties and applications*. Progress in polymer science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
23. Archana, D., P.K. Dutta, and J. Dutta, *Chitosan: A Potential Therapeutic Dressing Material for Wound Healing*, in *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*, K.P. Dutta, Editor 2016, Springer India: New Delhi. p. 193-227.
24. Ravi Kumar, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
25. Soares, P.I.P., et al., *Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, 2016. **149**: p. 382-390.
26. McNeil, S.E., *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, ed. H. Press 2011.
27. Khadair, A., et al., *Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. **93**: p. 38-44.
28. Jain, A., et al., *Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: formulation, characterization and cytotoxicity studies*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014. **69**: p. 546-553.
29. Agnihotri, S.A., N.N. Mallikarjuna, and T.M. Aminabhavi, *Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2004. **100**(1): p. 5-28.
30. Fan, W., et al., *Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **90**: p. 21-27.
31. Calvo, P., et al., *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers*. Journal of Applied Polymer Science, 1997. **63**(1): p. 125-132.
32. da Silva, S.B., et al., *Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery*. Pharmaceutical Biology, 2015. **53**(5): p. 642-652.
33. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(1): p. 19-34.
34. Kumbhar, S., A. Kulkarni, and T. Aminabhavi, *Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent*. Journal of Microencapsulation, 2002. **19**(2): p. 173-180.
35. Al-Helw, A.A., et al., *Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone*. Journal of Microencapsulation, 1998. **15**(3): p. 373-382.
36. Xu, J., et al., *Design and characterization of antitumor drug paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles by W/O emulsions*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(2): p. 438-443.
37. Liu, C., et al., *Preparations, characterizations and applications of chitosan-based nanoparticles*. Journal of Ocean University of China, 2007. **6**(3): p. 237-243.
38. Banerjee, T., et al., *Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles*. Int J Pharm, 2002. **243**(1-2): p. 93-105.
39. Mitra, S., et al., *Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier*. Journal of Controlled Release, 2001. **74**(1): p. 317-323.
40. Nagpal, K., S.K. Singh, and D.N. Mishra, *Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2010. **58**(11): p. 1423-1430.
41. Bento, D., et al., *Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **93**: p. 149-164.

42. Mooren, F.C., et al., *Influence of Chitosan Microspheres on the Transport of Prednisolone Sodium Phosphate Across HT-29 Cell Monolayers*. *Pharmaceutical Research*, 1998. **15**(1): p. 58-65.
43. López-León, T., et al., *Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005. **283**(2): p. 344-351.
44. Zhao, Y., et al., *Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity*. *Journal of Controlled Release*, 2016. **222**: p. 56-66.
45. Fredenberg, S., et al., *The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review*. *Int J Pharm*, 2011. **415**(1–2): p. 34-52.
46. Pan, Q., et al., *Lactobionic acid and carboxymethyl chitosan functionalized graphene oxide nanocomposites as targeted anticancer drug delivery systems*. *Carbohydrate Polymers*, 2016. **151**: p. 812-820.
47. Unsoy, G., et al., *Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014. **62**: p. 243-250.
48. Wang, X., et al., *Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles*. *Biomaterials*, 2013. **34**(19): p. 4667-4679.
49. Siepmann, J. and A. Göpferich, *Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **48**(2–3): p. 229-247.
50. Higuchi, T., *Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1961. **50**(10): p. 874-875.
51. Siepmann, J. and F. Siepmann, *Mathematical modeling of drug delivery*. *Int J Pharm*, 2008. **364**(2): p. 328-343.
52. Dash, S., et al., *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*. *Acta Pol Pharm*, 2010. **67**(3): p. 217-23.
53. Shaikh, H.K., R. Kshirsagar, and S. Patil, *Mathematical models for drug release characterization: a review*. *WJPPS*, 2015. **4**: p. 324-338.
54. Singhvi, G. and M. Singh, *Review: in-vitro drug release characterization models*. *Int J Pharm Stud Res*, 2011. **2**(1): p. 77-84.
55. Korsmeyer, R.W., et al., *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. *Int J Pharm*, 1983. **15**(1): p. 25-35.
56. Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001. **13**(2): p. 123-133.
57. Papadopoulou, V., et al., *On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms*. *Int J Pharm*, 2006. **309**(1–2): p. 44-50.
58. Peppas, N.A. and J.J. Sahlin, *A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation*. *Int J Pharm*, 1989. **57**(2): p. 169-172.
59. Sousa, A.I., *Chitosan-based drug delivery systems-optimization and modelling*, in *Faculdade de Ciência e Tecnologias 2015*, Universidade Nova de Lisboa.
60. Huang, M., E. Khor, and L.-Y. Lim, *Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation*. *Pharmaceutical Research*, 2004. **21**(2): p. 344-353.
61. Soares, P.I.P., et al., *Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling*. *Carbohydrate Polymers*, 2016. **147**: p. 304-312.
62. Xie, W., et al., *Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative*. *Carbohydrate Polymers*, 2002. **50**(1): p. 35-40.
63. Zhang, Y., et al., *DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles*. *The AAPS Journal*, 2010. **12**(3): p. 263-271.

64. Dong, Y., et al., *Liquid crystalline behaviour of chitooligosaccharides*. Carbohydrate Polymers, 2004. **57**(3): p. 235-240.
65. Tsao, C.T., et al., *Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation*. Carbohydrate research, 2011. **346**(1): p. 94-102.
66. Mao, S., et al., *The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties*. Int J Pharm, 2004. **281**(1): p. 45-54.
67. Klein, M.P., et al., *Effect of the Support Size on the Properties of  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles*. Biomacromolecules, 2012. **13**(8): p. 2456-2464.
68. Tandon, V., et al., *Zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(5): p. 1092-101.
69. Qiao, R., C. Yang, and M. Gao, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(35): p. 6274.