



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MARIANA INÊS DO NASCIMENTO SILVA

**PREPARO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E MORFOLÓGICO DE HIDROGEL DE
ALGINATO RECOBERTO COM QUITOSANA CONTENDO BERBERINA**

**CEILÂNDIA, DF
2015**

MARIANA INÊS DO NASCIMENTO SILVA

**PREPARO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E MORFOLÓGICO DE HIDROGEL DE
ALGINATO RECOBERTO COM QUITOSANA CONTENDO BERBERINA**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico, na
Universidade de Brasília, Faculdade de
Ceilândia.

Orientador: Profª Drª Claire Nain Lunardi Gomes

CEILÂNDIA, DF

2015

MARIANA INÊS DO NASCIMENTO SILVA

**PREPARO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E MORFOLÓGICO DE HIDROGEL DE
ALGINATO RECOBERTO COM QUITOSANA CONTENDO BERBERINA**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dr^a Claire Nain Lunardi Gomes
(FCE/ Universidade de Brasília)

Co - Orientador: Prof^o Dr^o Anderson de Jesus Gomes
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof^a Dr^a Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof^o Dr^o Marcelo Henrique Sousa
(FCE/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2015

RESUMO

O estudo de micro e nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação controlada de fármacos tem se estendido cada vez mais, revelando as vantagens e desvantagens dos diversos polímeros, naturais ou não, mostrando as particularidades das diversas técnicas de produção. A quitosana e alginato utilizados no presente estudo são dois importantes polímeros naturais bastante utilizados na produção de micro e nanopartículas poliméricas. Algumas de suas vantagens são sua biocompatibilidade, capacidade de ser biodegradável, ou capacidade de formar hidrogéis, que são mais resistentes, quando comparadas ao polímero sozinho. As técnicas de produção utilizadas aqui, complexação polieletrólítica e *spray drying*, permitiram a produção de micro e nanopartículas com esses polímeros em separado ou formando um complexo alginato-quitosana. Foi feita a caracterização físico-química das micropartículas de alginato recobertas com quitosana, realizando teste de intumescimento com o qual foi possível analisar o comportamento do hidrogel em diferentes solventes. Foi feita também a incorporação de um fármaco, a berberina, e estudado o perfil de liberação desse fármaco em pH 5,5; 7,4 e 10, o que mostrou que em meio ácido a liberação ocorreu de forma abrupta, em meio neutro a liberação se deu de forma sustentada, pelo equilíbrio de cargas e estabilidade do hidrogel, e em meio básico a liberação não ocorreu possivelmente porque nesse pH os grupos amino da quitosana encontram-se desprotonados, e assim, o grau de inchamento do hidrogel é inferior. Além disso, foram feitas imagens por microscopia eletrônica de varredura, que permitiram observar que as micropartículas apresentam superfície mais rugosa e irregular, comparando-se com as nanopartículas.

Palavras-chave: Hidrogel; quitosana; alginato de Sódio; berberina; complexação polieletrólítica; *spray drying*.

ABSTRACT

The study involving micro and nanoparticles as controlled drug delivery systems has been increasingly extended, revealing the advantages and disadvantages of the various polymers, natural or not, showing the particularities of the various techniques of production. Chitosan and alginate used in this study are two important natural polymers widely used in the production of polymeric micro and nanoparticles. Some of its advantages is its biocompatibility, ability to be biodegradable, or ability to form hydrogels, which are more resistant. The manufacturing techniques used here polyelectrolytic complexation and spray drying, allowed the production of micro and nanoparticles with these polymers alone or a complex forming alginate-chitosan. The physicochemical characterization of alginate coated with chitosan microparticles, performing swelling test with which it was possible to analyze the hydrogel behavior in different solvents was made. It was also made incorporating a drug, and thus the release profile at pH 5.5, 7.4 and 10, which showed that in the release in acid pH was abrupt, whereas in neutral pH the release was sustained, by ionic balancing, and in basic pH the release did not occur possibly because the chitosan amino groups are deprotonated, thus, the degree of hydrogel swelling is lower. In addition, images were made by scanning electron microscopy, which allowed the observation that the microparticles have more rough and uneven surface, compared with the nanoparticles.

Keywords: Hydrogel; chitosan; Sodium Alginate; berberine; polyelectrolyte complexes; spray drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Quitosana(a) e Alginato de Sódio(b), onde M e G se referem às unidades de ác. manurônico e gulurônico.....	11
Figura 2 - Diagrama esquemático do Mini Spray Dryer Büchi B-290.....	13
Figura 3 - Fórmula estrutural da berberina. Massa molar 336,36122 g/mol e fórmula molecular $C_{20}H_{18}NO_4^+$	14
Figura 4 - Espectro UV-Vis de absorção da Berberina.....	24
Figura 5 - a) Foto do Mini Spray Dryer Büchi B-290; b) Parâmetros do aparelho utilizados.....	25
Figura 6 - Foto mostrando as partes do Mini Spray Dryer Büchi B-.....	25
Figura 7 - Partículas de quitosana produzidas pela técnica <i>spray drying</i> com e sem o fármaco.....	26
Figura 8 - Partículas de alginato produzidas pela técnica <i>spray drying</i> com e sem o fármaco.....	26
Figura 9 - Processo de produção das micropartículas de alginato e quitosana.....	28
Figura 10 – Nanopartículas QUI_vaz produzidas por <i>spray drying</i> . Sendo que em a) com aumento de 100x, b) 500x e c) 5000x.....	30
Figura 11 - Nanopartículas ALG_vaz produzidas por <i>spray drying</i> . Em a) aumento de 500x e b) 2505x.....	31
Figura 12 – Micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia). Em a) aumento de 100x e b) 500x.....	32
Figura 13 - Amostras com seus respectivos solventes no tempo inicial (t0), após um dia (t1) e após oito dias (t8).....	34
Figura 14 – Beads intumescidas com NaCl (a) comparadas às beads secas (b).....	36
Figura 15 – Perfil de liberação da Berberina em pH 5,5; 7,4 e 10,0 medido em absorbância 230nm em função do tempo em minutos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Listagem dos tipos de nanopartículas e micropartículas produzidas.....	19
Tabela 2 - Aparência e grau de intumescimento das amostras em diferentes solventes.....	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Revisão da Literatura.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivos gerais.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. MATERIAIS.....	17
4.1.1. Equipamentos.....	17
4.1.2. Reagentes.....	17
4.2. MÉTODOS.....	18
4.2.1. Preparo das soluções estoque e de preparo das nanopartículas e micropartículas poliméricas com e sem fármaco.....	19
4.2.1.1. Solução estoque do fármaco berberina.....	19
4.2.1.2. Preparo das soluções estoques para o preparo das nanopartículas (QUI_vaz e QUI_BS).....	19
4.2.1.3. Preparo das soluções estoques para o preparo das nanopartículas (ALG_vaz e ALG_BS).....	20
4.2.1.4. Preparo das soluções estoques para o preparo das micropartículas (bead vazia e bead_BS).....	20
4.2.2. Técnica <i>spray drying</i>	20
4.2.3. Preparo das micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia e bead_BS).....	21
4.2.4. Estabilidade das micropartículas.....	21
4.2.5. Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-Vis.....	22
4.2.6. Perfil de liberação.....	23
4.2.7. Análise morfológica dos sistemas.....	23
4.2.8. Análises estatísticas e gráficas.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Espectro de UV-Vis da berberina (BS).....	24

5.2. Modo de prepare das micropartículas por <i>spray drying</i>	24
5.3. Preparo das beads.....	27
5.4. Morfologia (MEV).....	29
5.5. Estabilidade das beads e intumescimento.....	32
5.6. Perfil de liberação nos diferentes valores de pH.....	36
6. CONCLUSÃO.....	39
7. AGRADECIMENTOS.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Revisão da literatura

Sistemas de liberação controlada podem ser definidos como métodos pelo qual um ou mais agentes ativos ou ingredientes podem ser disponibilizados em um determinado meio ou sistema, com tempo e velocidade específicos. Podendo ter diversas aplicações como em indústria alimentícia e farmacêutica. Quando esses sistemas estão relacionados à fármacos podem permitir liberação de forma sustentada no organismo, em sítios específicos, sob estímulos específicos como variação de pH, temperatura, pressão osmótica, entre outros (HORST, 2009).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam diversas vantagens comparando-se aos sistemas convencionais de administração de princípios ativos, como: especificidade, melhor controle da administração, liberação com uma velocidade controlada durante períodos de tempo prolongados e redução de efeitos adversos. Desta forma, garante melhor eficiência terapêutica devido à liberação em condições específicas, e assim direcionamento a órgãos alvos, degradação controlada do fármaco e diminuição da toxicidade (HORST, 2009; MEDEIROS, 2011; TAVARES, 2011).

Algumas das possíveis estruturas de liberação controlada de fármacos são as micro e nanopartículas, que podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais, como proteínas, polissacarídeos e polímeros naturais e sintéticos. Sendo que estruturas feitas com polímeros ganham um olhar diferenciado pelas vantagens que esse material tem em sistemas biológicos pois a maioria é biodegradável e biocompatível (FERREIRA, 2013; SILVA, 2012). Os mecanismos de produção, caracterização físico-química das partículas formadas, estudos de liberação de fármacos, otimização de técnicas, entre outros são de grande importância para a solidificação e domínio desta crescente área.

A quitosana e o alginato de sódio são uns dos polímeros naturais mais comumente utilizados. A quitosana tem sido um produto de escolha no

desenvolvimento de fármaco de liberação controlada. Esse é um aminopolissacarídeo derivado da desacetilação parcial da quitina (que provém da carapaça de crustáceos e insetos), em meio ácido apresenta carga positiva devido à protonação dos grupos amino presentes na macromolécula. Além de ser biodegradável e biocompatível, sua capacidade de ficar carregada positivamente faz com que tenha característica mucoadesiva, permitindo um aumento no tempo residual do fármaco no local de absorção. As suas duas mais importantes propriedades são: a natureza catiônica e a alta densidade de cargas positivas em soluções ácidas. Assim, consegue formar complexos iônicos insolúveis, hidrogéis, com espécies polianiônicas solúveis em água, como o alginato de sódio, em condições neutras ou alcalinas (ABREU, CAVALCANTE & JUNIOR, 2012; MEDEIROS, 2011; SILVA, 2012; TAGLIARI, 2012; TAVARES, 2011).

Já o alginato de sódio é um copolímero formado por unidades de ácido gulurônico e manurônico. Em meio aquoso seus grupamentos de ácido carboxílico apresentam carga negativa. Combinado a essas propriedades, o alginato ainda apresenta habilidade de formar hidrogéis espontaneamente e alta viscosidade, tendo recebido destaque dentre os vários polímeros possíveis para complexar com a quitosana. Enquanto essa é facilmente degradada pelas lisozimas, o complexo quitosana-alginato demonstrou maior resistência devido a forte interação entre as cadeias poliméricas alcalinas (ABREU, CAVALCANTE & JUNIOR, 2012; TAGLIARI, 2012).

A Figura 1 mostra a fórmula estrutural da quitosana e alginato, respectivamente:

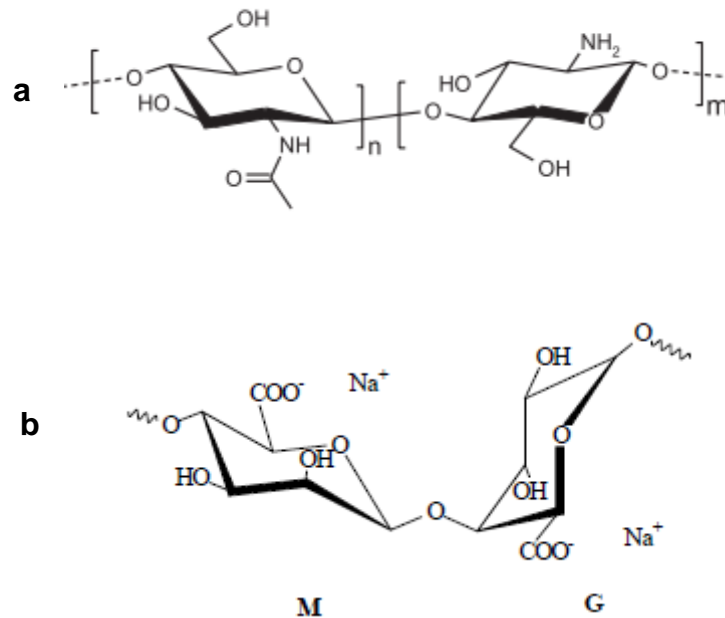


Figura 1 - Estrutura da Quitosana(a) (SILVA, 2006) e Alginato de Sódio(b), onde M e G se referem às unidades de ác. manurônico e gulurônico (IWAKI, 2010).

Esses polímeros são bastante utilizados na forma de hidrogel, que são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação química ou física. Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímeros como grupos amino e carboxílicos que possuem afinidade com a molécula de água. Os hidrogéis tem uma vasta aplicação no campo biomédico e farmacêutico como sistemas de liberação controlada de fármacos. Podendo ser constituídos de um ou mais biopolímeros. A quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, como também alginato, carragenina, gelatina e outros (MENDES, 2009).

O método de obtenção de nano e micropartículas representa um fator crucial para as suas características físico-químicas como distribuição de tamanho e morfologia, o que, em contrapartida, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação de ativos (TAGLIARI, 2012). Dois métodos possíveis de serem testados são: complexação polieletrólítica e secagem por Spray Dryer.

Na complexação polieletrólítica, método também conhecido por coacervação, utiliza-se dois ou mais polímeros hidrofílicos e com cargas opostas. As partículas são formadas pela interação iônica entre esses polímeros. Dessa forma, as frações aquosas e seus respectivos polímeros são homogeneizados sob gotejamento ou sob forte agitação que pode ser ultrassônica ou mecânica, para que haja interação eletrostática. Nesse método a atração eletrostática entre os grupos catiônicos de um polícatión, como a quitosana, e os grupos aniônicos de um poliânion, como o alginato, é a principal interação que leva à formação do complexo (ABREU, CAVALCANTE & JUNIOR, 2012; FERREIRA, 2013).

O método utilizando a secagem por Spray Dryer, também chamada aspensão em torre de secagem ou nebulização é um processo de pulverização e secagem de partículas líquidas e sólidas. É a técnica de encapsulamento mais econômica, sendo o seu procedimento baseado na pulverização de uma solução ou suspensão polimérica contendo o princípio ativo em uma câmara de secagem. O princípio ativo é dissolvido ou disperso na solução polimérica e a mistura líquida é dividida sob a forma de finíssimas gotículas para dentro da câmara de secagem em cujo interior circula ar aquecido. A rápida evaporação do solvente permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto. Os parâmetros fundamentais de controle de secagem para as características do produto obtido são: temperatura de entrada e saída do ar, fluxo do ar de secagem, distribuição de temperatura e umidade, tempo de resistência da amostra, parâmetros de injeção da amostra e geometria da câmara (FAYAD, 2010).

A Figura 2 é um diagrama esquemático do equipamento:

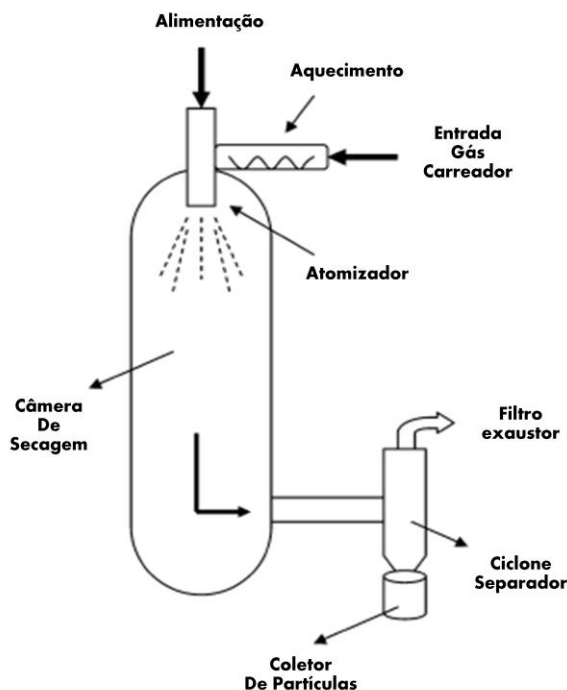


Figura 2 - Diagrama esquemático do Mini Spray Dryer Büchi B-290, mostrando as partes do equipamento respectivas responsáveis por: entrada do gás carreador, aquecimento, alimentação, atomizador, câmara de secagem, filtro exaustor, ciclone separador e coletor de partículas (HADINOTO *et al*, 2006)

O processo ocorre pelas seguintes etapas: atomização, conversão gota-partícula e coleta de partículas. Atomização: é um parâmetro chave na determinação do tamanho da partícula, onde a solução ou suspensão é inserida na câmara de secagem pelo atomizador, através do fluxo de um gás carreador. Conversão gota-partícula: as gotículas que são geradas a partir do atomizador entram na câmara de secagem, as gotículas de aerossol são submetidas à evaporação, sob alta temperatura, e ocorre condensação do soluto no interior da gotícula, formando a partícula. Coleta de partículas: após a etapa de gota-partícula ser concluída, as partículas livres de solventes são recolhidos em um tubo coletor. O gás de transporte utilizado para carrear as gotas de aerossol para a câmara pode ser ar, gases inertes, gás quente, ou vapor, dependendo dos tipos de componentes químicos (NANDIYANTO & OKUYAMA, 2011).

Uma das maneiras de caracterização físico-química de micropartículas é medindo-se o grau de intumescimento, que pode estar relacionado ao perfil de liberação da droga. Em sistemas onde o mecanismo de liberação é influenciado pelo intumescimento, o polímero inicialmente intumesce através da absorção de líquido do meio, sofrendo uma transição do estado vítreo, seco, para o estado gelatinoso, intumescido, através da interação com o solvente. As cadeias do polímero no estado gelatinoso são mais móveis do que no estado vítreo, permitindo que o ingrediente encapsulado se difunda rapidamente pela matriz polimérica (HORST, 2009).

O fármaco utilizado neste estudo para ser incorporado às nano e micropartículas foi a berberina (BS). Este é um composto alcaloide encontrado em diversas plantas presentes em lugares como Ásia e Europa. É conhecida por seu amplo uso na medicina tradicional oriental chinesa. Desde o século passado, a BS tem sido amplamente investigada e foi estudada por apresentar grande variedade de atividades farmacológicas em aplicações biomédicas tais como: ação antibacteriana, antidiarreico, protetor gástrico, antioxidante, ação cardioprotetora. A berberina pode também aumentar a liberação de mucina, agindo diretamente em células secretoras de mucina das vias respiratórias, sugerindo este agente para um estudo mais aprofundado para a possível utilização como um expectorante suave durante o tratamento de doenças das vias respiratórias crônicas. Os efeitos cardiovasculares são decorrentes de seus derivados tetrahydroberberina e 8-oxoberberina com efeito inotrópico positivo, cronotrópico negativo e antiarrítmico, além de propriedades vasodilatadoras (FUKUDA, 1999; JUNG *et al.*, 2008; KIM, 2009; LEE, 2003).

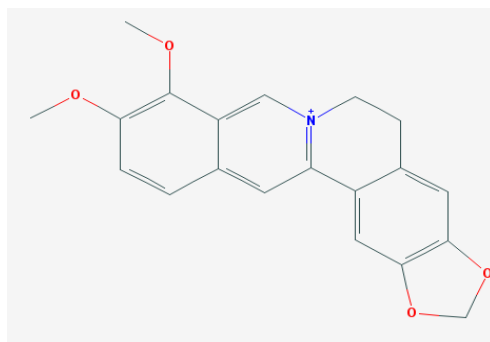


Figura 3 - Fórmula estrutural da berberina. Massa molar 336.36122 g/mol e fórmula molecular $C_{20}H_{18}NO_4^+$ (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION).

2. JUSTIFICATIVA

A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido amplamente estudada nos últimos anos. O interesse nesse campo tem aumentado consideravelmente devido às vantagens que essa tecnologia agrega principalmente à área farmacêutica. Modelos micro e nanoestruturados são exemplos de sistemas que permitem essa liberação controlada de fármacos. O trabalho proposto aqui foi fazer um estudo físico-químico de micropartículas de alginato recobertas com quitosana, com incorporação do fármaco berberina e avaliar a liberação de acordo com pH. Além de produzir nanopartículas utilizando esses componentes isolados, com e sem a incorporação de um fármaco, utilizando a técnica de *spray drying*. Há diversos estudos com os polímeros e as técnicas aqui utilizadas, no entanto, estudos como este são importantes por conferirem domínio de técnicas, conhecimento das particularidades em cada uma, caracterização físico-química e assim produzir conhecimento mais consolidado nessa crescente área tecnológica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Produzir micro e nanopartículas com polímeros naturais a fim de se conhecer técnicas de preparo e metodologias de caracterização físico-química das mesmas, como grau de intumescimento, perfil de liberação de fármacos e análise da morfologia externa.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas de polímeros naturais (quitosana e alginato) com a técnica de *spray drying* na presença e ausência do fármaco berberina;
- Avaliar a morfologia externa das nanopartículas de alginato e quitosana através de microscopia eletrônica de varredura;
- Preparar micropartículas de alginato recoberta de quitosana contendo o fármaco berberina;
- Avaliar a estabilidade das micropartículas em diferentes solventes utilizando parâmetros de intumescimento;
- Estudar o perfil de liberação do fármaco das micropartículas em diferentes valores de pH;
- Avaliar a morfologia externa das micropartículas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Equipamentos

Abaixo segue listagem de equipamentos utilizados na execução do estudo:

- Agitador de tubos vortex, marca Logen Scientific[®], modelo LSM56-III e marca IKA[®] modelo labdance;
- Balança analítica marca Marte[®] modelo AY 220;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco[®] modelos CFLV 09 e CFLV 12;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific[®] modelo LS61-220;
- Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi Hight-Technologies Coporation[®], modelo U-3900H;
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µl e 100-1000 µL, marca Kasvi[®], modelo Ecopipette;
- Microscópio Eletrônica de Varredura FEI QUANTA 250 A[®];
- Mini Spray dryer marca Büchi modelo B-290.

4.1.2. Reagentes

Utilizou-se dos reagentes abaixo listados para a produção, montagem, caracterização das partículas. Os materiais inicialmente propostos e utilizados para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando indicados:

- Berberina (BS MM 320,54 g/mol de Sigma Chem.Co.);
- Alginato de sódio (MM: 584,44 g/mol Merck);
- Quitosana (Sigma Chem. Aldrich);
- Cloreto de cálcio (MM: 116,44 g/mol, Vetec Química Fina[®]);

- Ácido acético ($C_2H_4O_2$, M.M 60,04 g mol⁻¹ Dinâmica, P.A.);
- Álcool etílico P.A ACS, C_2H_6O , MM 46,06 g/mol, dosagem mínima 95,0%; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina[®];
- Álcool metílico P.A ACS, CH_4O , MM 32,04 g/mol, dosagem mínima 99,8%; densidade 0,79 g/mL, marca Vetec Química Fina[®];
- Hexano C_6H_{14} , MM 86,18 g/mol, densidade 0,6548g/mL, marca Chemco[®];
- Solução salina 0,9% - Solução Fisiológica. Solução de Cloreto de Sódio 0,9%, marca Arboreto[®];
- Solução tampão fosfato pH 5,5: Preparada dissolvendo-se 13,61g de Fosfato de Potássio dibásico em 1L de água destilada para a solução I e 35,81g de Fosfato dissódico em 1L de água destilada para a solução II; depois misturado 96,4mL da solução I e 3,6mL da solução II para produzir a solução tampão;
- Solução tampão fosfato salina pH 7,4: 2,38g de Fosfato dissódico, 0,19g de Fosfato de Potássio dibásico e 8,0g de Cloreto de Sódio diluídos em 1L de água destilada;
- Solução tampão Cloreto de Amônio pH 10: 33,5g de Cloreto de amônio dissolvidos em 150mL de água, adicionado 42mL de amônia concentrada e completado o volume para 250mL de água destilada.

4.2. MÉTODOS

A seguir, em ordem crescente de complexidade, nomeou-se as micro e nanopartículas produzidas em sistemas 1 a 6, conforme a tabela, para melhor acompanhamento e análise. Ao longo do texto será utilizado as abreviaturas de cada sistema, sendo que para as micropartículas também será utilizado a nomenclatura “beads” referindo-se às mesmas, por ser um termo usado na nomenclatura internacional.

Tabela 1 - Listagem dos tipos de nanopartículas e micropartículas produzidas.

Sistema 1	Nanopartículas de quitosana (QUI_vaz): via <i>spray drying</i>
Sistema 2	Nanopartículas de quitosana contendo berberina (QUI_BS): via <i>spray drying</i>
Sistema 3	Nanopartículas de alginato (ALG_vaz): via <i>spray drying</i>
Sistema 4	Nanopartículas de alginato e berberina (ALG_BS): via <i>spray drying</i>
Sistema 5	Micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia)
Sistema 6	Micropartículas de alginato e quitosana e berberina (bead- BS)

4.2.1. Preparo das soluções estoque e de preparo das micro e nanopartículas poliméricas com e sem fármaco

4.2.1.1. Solução estoque do fármaco berberina

Inicialmente foi preparado uma solução estoque de berberina com 50 mL de água ultrapura e 0,038g de BS pesado em balança analítica sendo a concentração obtida de 1,2 mM por meio da relação $A = \varepsilon \times b \times C$ (Lambert-Beer); onde A é absorvância da amostra (344 nm); ε é o coeficiente de extinção molar (4.209 M cm^{-1}); b caminho ótico e C a concentração.

4.2.1.2. Preparo das soluções estoques para o preparo das nanopartículas de quitosana (QUI_vaz e QUI_BS)

Foi preparada uma solução aquosa de quitosana, em que foi pesada a massa de 0,1269g de quitosana em uma balança analítica e esta foi colocada sob agitação com 40 mL de água, adicionando-se 300 μ L de ácido acético para dissolução. À metade desta solução foi adicionado 400 μ L de Berberina [1mM]. Ambas as soluções foram utilizadas no spray-dryer.

4.2.1.3. Preparo das soluções estoques para o preparo das nanopartículas de alginato de sódio (ALG_vaz e ALG_BS)

Foi preparada uma solução aquosa de alginato de sódio, em que foi pesada a massa de 0,3628g de alginato de sódio em uma balança analítica e dissolvida em 40 mL de água. À metade desta solução foi adicionado 400 μ L de Berberina [1mM]. Ambas as soluções foram utilizadas no spray-dryer.

4.2.1.4. Preparo das soluções estoques para o preparo de micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia e bead_BS)

Para o preparo destas micropartículas foram utilizadas soluções de alginato de sódio e quitosana

A solução de alginato de sódio foi preparada adicionando 0,36g de alginato de sódio a 19mL de água ultrapura e deixando sob agitação para completa dissolução. Para as micropartículas de bead_BS foi adicionado 20 μ M de berberina.

Para a solução de quitosana pesou-se 0,12g de quitosana que foram adicionados a 27mL de água ultrapura, sob agitação, e então 0,9g de Cloreto de Cálcio. Depois de melhor dissolvida a solução de quitosana, foi adicionado 300 μ L de ácido acético concentrado e deixado sob agitação por 50 minutos.

4.2.2. Técnica de *spray drying*

O princípio desta técnica consiste em: preparação de uma solução inicial contendo material componente do produto desejado em um solvente; atomização desta solução formando gotículas que são introduzidas no evaporador de solvente; evaporação do solvente, difusão do soluto, secagem e precipitação em um coletor final.

As nanopartículas foram preparadas utilizando as soluções estoques dos sistemas 1 e 2 (QUI_vaz e QUI_BS) e dos sistemas 3 e 4 (ALG_vaz e ALG_BS). As

condições utilizadas foram temperatura de entrada 150°C; taxa aspiração 90%; velocidade de atomização 15%.

4.2.3. Preparo das micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia e bead_BS)

No preparo das micropartículas de alginato e quitosana realizou-se o procedimento de gotejamento de uma solução sobre a outra. Em um béquer foi adicionado 27mL da solução de quitosana, recém preparada , que ficou sob agitação prévia por 50minutos , foi mantida sob leve agitação. Com o auxílio de uma seringa foi adicionado por gotejamento lentamente a solução de alginato (sem e com BS), de forma que as gotículas formadas não se aglomerassem e formassem grumos. Depois de gotejada toda a solução de alginato na solução de quitosana a mistura contendo a suspensão de micropartículas foi mantida sob agitação lenta *over night*. Após 24 horas as beads formadas foram lavadas 3 vezes com água ultrapura. Foi retirado o excesso de água com a ajuda de um conta-gotas e então deixada em uma superfície plana e protegida de possíveis contaminações para secagem adequada, à temperatura ambiente, pelo tempo necessário até massa constante, o que foi obtida após 3 dias. Depois de totalmente secas foram recolhidas e armazenadas.

4.2.4. Estabilidade das micropartículas

O teste de estabilidade das micropartículas foi realizado com as beads vazias. Neste teste foi utilizado como referência o trabalho de Guessier (2009), onde utiliza-se solventes diferentes e é avaliado as massas das beads ao longo do tempo. É utilizado também uma análise visual da aparência das beads em cada um dos solventes testados sendo as mesmas classificadas como (intacta, pouco gelificada, parcialmente gelificada e gelificada).

Foi analisado o intumescimento das amostras. As análises foram executadas baseando-se na variação de massa ocorrida durante o intumescimento das beads e aferidas em balança analítica.

As beads foram pesadas e separadas em alíquotas de aproximadamente 0,02g. Foi adicionado 3mL de cada um dos solventes em cada alíquota. Após um e oito dias as beads foram avaliadas quanto ao seu aspecto referente ao inicial, retiradas do solvente e pesadas.

Após as medidas dos valores em todos os solventes, o perfil de intumescimento foi feito aplicando os valores na equação de intumescimento usada por Guesser (2009): $GI = [(M_f - M_i) / M_i] \times 100$. Onde, “ M_i ” é a massa das micropartículas inicial e “ M_f ” é a massa das beads pesada após oito dias.

4.2.5. Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-Vis

Espectros de absorção eletrônica dos sistemas em estudo foram obtidos valendo-se de um espectrofotômetro UV-Vis (ultra-visível) de duplo feixe, duplo monocromador, com fotomultiplicador da marca Hitachi®, modelo 3900H. Para efeito de leitura das medidas ajustou-se a fenda para passagem de luz 2,0nm, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e temperatura constante de 37,0 °C. Em princípio, a linha de base era obtida para posteriormente realizar as medidas de absorbância por meio do modo de varredura dentro da faixa espectral de 200,0 a 800,0nm, com velocidade de escaneamento de 300nm/min, durante períodos predeterminados com intervalo de 15 minutos entre as medições. Os dados obtidos eram tratados com o software UV Solutions 3,0[®] e transferidos para o programa GraPhPad 6.0[®].

4.2.6. Perfil de liberação

O perfil de liberação das micropartículas do hidrogel de alginato e quitosana contendo BS (bead BS) foi determinado por meio de medidas da concentração de BS pela técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis em função do tempo. Uma massa de 30,0mg de bead BS foi resuspensa em 2,0 mL de solução tampão fosfato pH 5,5; 7,4 e 10,0 respectivamente e transferido para uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) e mantida sob temperatura ambiente. Cada ciclo, composto por 99 leituras, foi realizadas no aparelho da marca Hitachi, modelo 3.900H, entre os comprimentos de onda 200-800 nm, com fenda de 2,0 nm e velocidade de escaneamento de 300,0 nm/min, durante períodos predeterminados que variavam de 15 minutos de intervalo entre as medições.

4.2.7. Análise morfológica dos sistemas

Para realização das imagens e medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizou-se as nanopartículas e beads dos sistemas 1, 2, 3, 4 e 5 anteriormente secas. Após 30 minutos as amostras, cerca de 1 mg de cada sistema, foram inseridas na superfície de um suporte de alumínio (stub) em cima de uma fita adesiva dupla-face, onde foram metalizadas em atmosfera de argônio. Para tal procedimento utilizou-se um equipamento da marca Balzers®, modelo SCD-050. As amostras foram estudadas e fotografadas em aumentos iniciados em 250 a 35.000 vezes, com tensão de aceleração de elétrons de 20,0 kV no modo detecção de elétrons secundários. Durante a aquisição das imagens no equipamento do MEV, também foram realizados registros nos espectros de energia dispersiva (EDS, Energy Dispersive Spectroscopic).

4.2.8. Análises estatísticas e gráficas

Os dados foram analisados através do programa Prisma 6.0 para Windows. Para auxílio na construção de gráficos foi utilizado o Excel®, versão 2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Espectro UV-Vis da Berberina (BS)

A Figura 4 ilustra o espectro de UV-Visível que foi obtido da solução aquosa de berberina com concentração 1,2 mM. O espectro apresenta três picos de absorbância sendo que o comprimento de onda de um deles, em 230nm, foi escolhido para se fazer o perfil de liberação da berberina nos diferentes valores de pH.

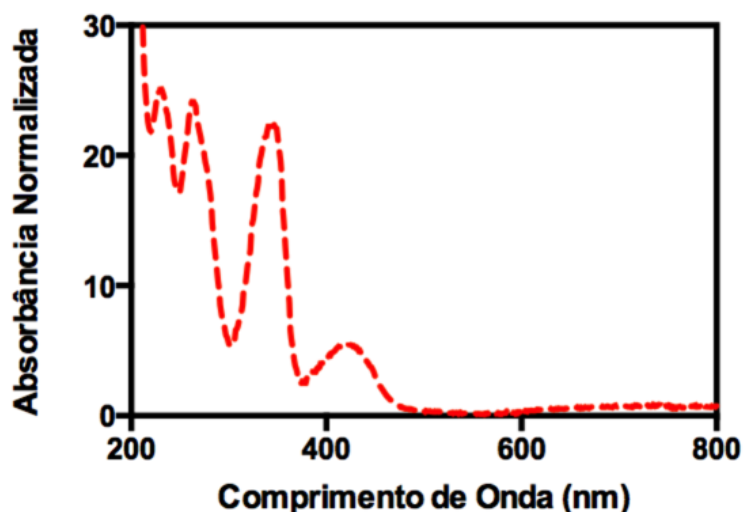


Figura 4 - Espectro UV-Vis de absorção da Berberina.

5.2. Modo de preparo das nanopartículas por *spray drying*

As nanopartículas foram preparadas com os polímeros com e sem fármaco (QUI_vaz, QUI_BS, ALG_vaz e ALG_BS). Inicialmente as partículas produzidas foram feitas com os polímeros em separado e então seguiu-se para a produção pela técnica de complexação polieletrólítica com o alginato e a quitosana pois esta é uma outra técnica de importância e permitiu a produção de partículas revestidas e estudos de estabilidade e liberação de fármaco.

As Figuras 5 e 6 mostram o aparelho durante a produção das partículas.

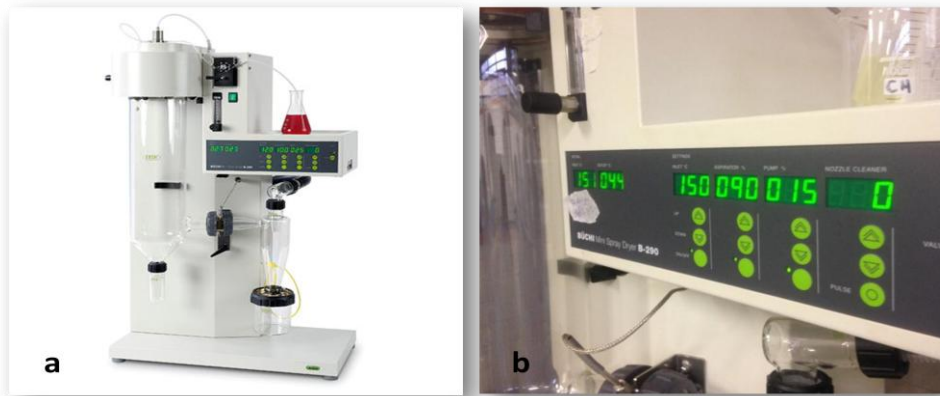


Figura 5 - a) Foto do Mini Spray Dryer Büchi B-290; b) Parâmetros do aparelho utilizados: temperatura de entrada de 150 °C; taxa de aspiração de 90%; velocidade de atomização de 15%.

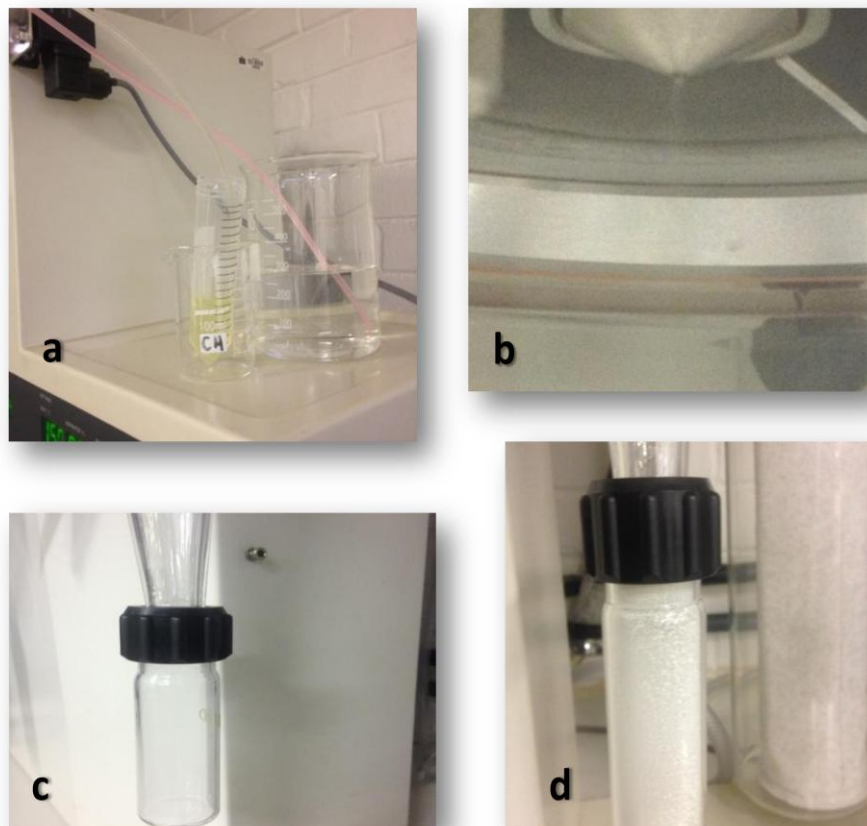


Figura 6 – Foto mostrando as partes do Mini Spray Dryer Büchi B-290: a) coletor da solução; b) atomizador; c) e d) coletor de partículas.

As Figuras 7 e 8 mostram as nanopartículas produzidas recolhidas do aparelho.

É possível observar que as partículas formadas tem aspecto muito fino, quase como um pó, o que reflete o tamanho das partículas obtidas nesta técnica observado na microscopia eletrônica de varredura, tópico 5.4, que chega a ser nanométrico.

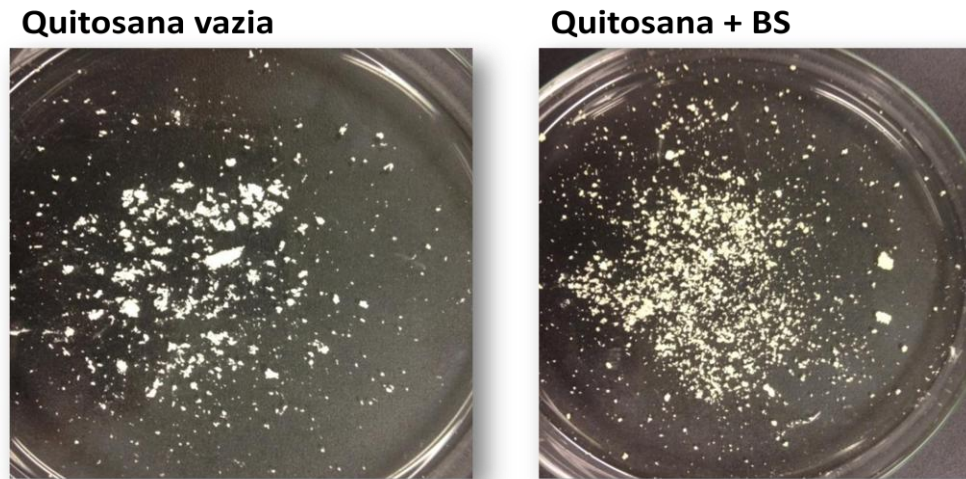


Figura 7 - Partículas de quitosana produzidas pela técnica *spray drying* com e sem o fármaco.

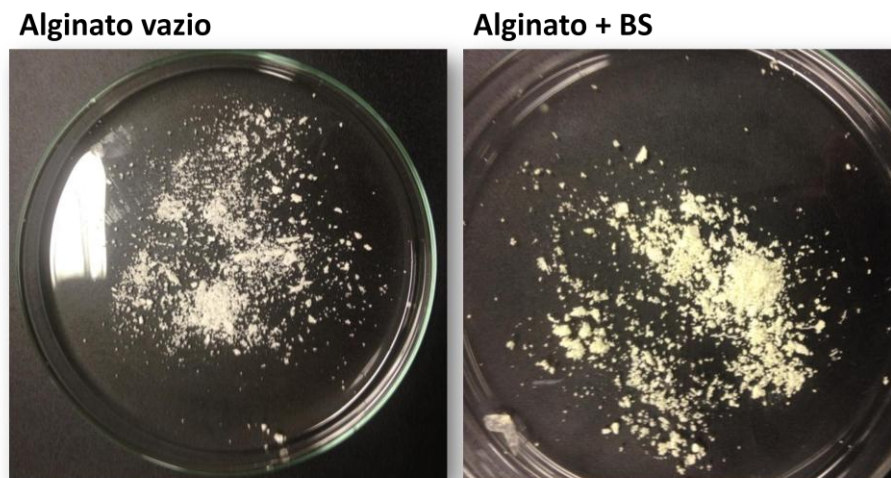


Figura 8 - Partículas de alginato produzidas pela técnica *spray drying* com e sem o fármaco.

O trabalho de Horst (2009) mostra a influência da temperatura de secagem, durante a atomização, na morfologia e na incorporação do corante antocianina em micropartículas de quitosana e quitosana-alginato. Ele usou as temperaturas de 120°C, 140°C, 160°C e 180°C. Neste estudo, estruturas só de quitosana, como foi o caso do experimento realizado aqui, mostraram sofrer pouca influência da temperatura quanto à morfologia, e na incorporação de fármaco quanto maior a temperatura maior a quantidade de corante incorporado. Quanto às estruturas de quitosana e alginato Horst verificou que a temperatura mais alta altera a morfologia mas não influencia na incorporação do corante.

No presente trabalho não houve estudo da variação da temperatura de entrada e avaliação da incorporação do fármaco na produção das nanopartículas de quitosana e alginato com e sem berberina produzidas no spray dryer. No entanto, é possível ver nas Figuras 7 e 8, de maneira observacional, que os sistemas contendo berberina formados adquiriram cor amarela característica desse composto. Foram feitas imagens por microscopia eletrônica de varredura que serão analisadas nos tópicos seguintes.

5.3. Preparo das beads

Os hidrogéis formados por alginato e quitosana foram produzidos por complexação polieletrólítica pelo gotejamento da solução de alginato dissolvido em meio aquoso na solução de quitosana em meio ácido contendo íons cálcio, sob agitação moderada, possibilitando a formação do complexo (Figura 9-a). No sistema com berberina esta foi adicionada à solução de alginato antes do gotejamento.

A Figura 9 ilustra o processo de produção das beads, onde a) mostra o momento do gotejamento da solução de alginato na solução de quitosana dissolvida em ácido; b) o início do processo de secagem, onde o meio líquido em que se encontram foi retirado ao máximo com um conta-gotas e então foram secas à temperatura ambiente e c) mostrando as beads prontas secas.

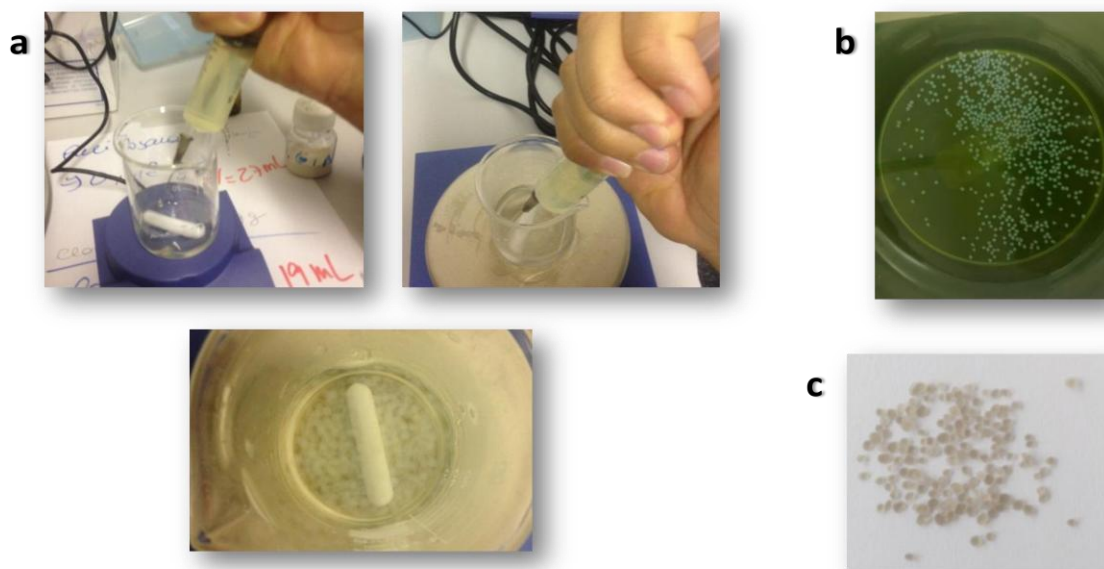


Figura 9 – Processo de produção das micropartículas de alginato e quitosana: a) Preparo das micropartículas; b) Secagem; c) Beads secas

Esse é o método direto, mas há variações desta técnica em que primeiramente é gotejada a solução de alginato em uma solução com íons cálcio e depois o revestimento de quitosana pode ser feito por imersão das partículas alginato-Ca em solução de quitosana (ABREU, 2008).

As partículas formadas por essa técnica podem apresentar grandes variações nas propriedades finais, conforme o método de preparação das mesmas. São inúmeros os fatores que envolvem a formação do complexo, como: grau de desacetilação da quitosana, pH, concentração das soluções (ABREU, 2008). Sendo que o grau de desacetilação da quitosana usada é $\geq 75\%$, o pH foi controlado pela adição de ácido acético e as concentrações usadas foram adequadas para produzir as micropartículas desejadas.

A maior desacetilação da quitosana proporciona o maior número de grupamentos amino ionizáveis que podem se ligar aos grupos iônicos do alginato,

melhorando a interação e ligação entre eles, formando um hidrogel mais reticulado (ABREU, 2008).

O pH é importante pois a solução de quitosana deve estar em meio ácido para que haja protonação dos grupos amino e haja a interação com os grupos aniônicos do do alginato (ABREU, 2008).

Há diversos estudos que mostram que a concentração das soluções influencia no tamanho das partículas, sendo que soluções mais concentradas geram partículas maiores e soluções menos concentradas geram partículas menores (ABREU, 2008; HORST, 2009).

5.4. Morfologia dos sistemas nano e microestruturados por MEV

As Figuras 10 e 11 mostram as imagens obtidas através do MEV para nanopartículas de quitosana e alginato. As nanopartículas de ambos os polímeros mostraram-se com formato esférico, sem fissura ou porosidade aparente. Apesar de uma população mista contendo partículas no tamanho micrométrico, é possível observar um grande número de partículas em tamanho nanométrico.

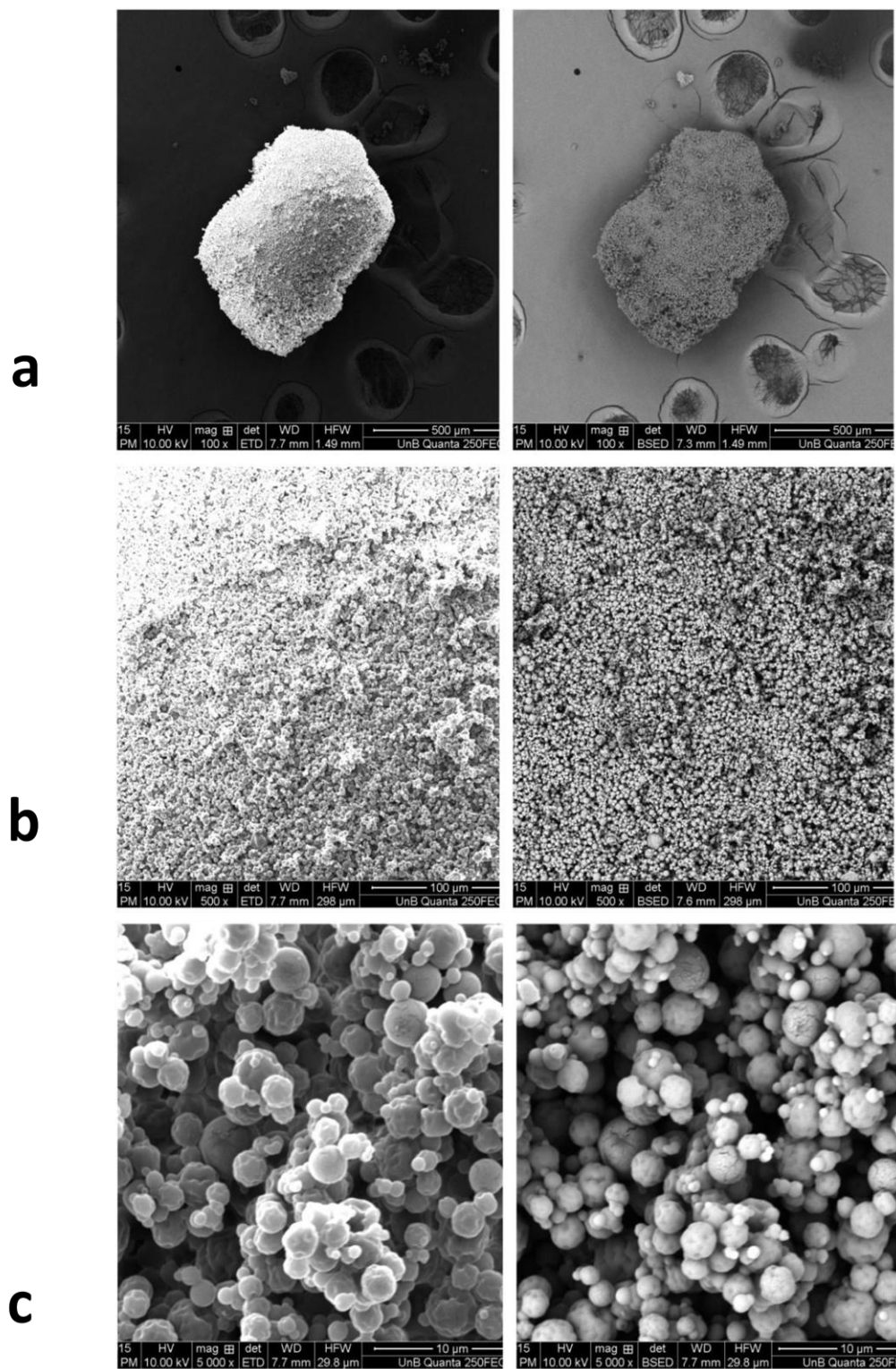


Figura 10 – Nanopartículas QUI_vaz produzidas por *spray drying*. Sendo que em a) com aumento de 100x, b) 500x e c) 5000x.

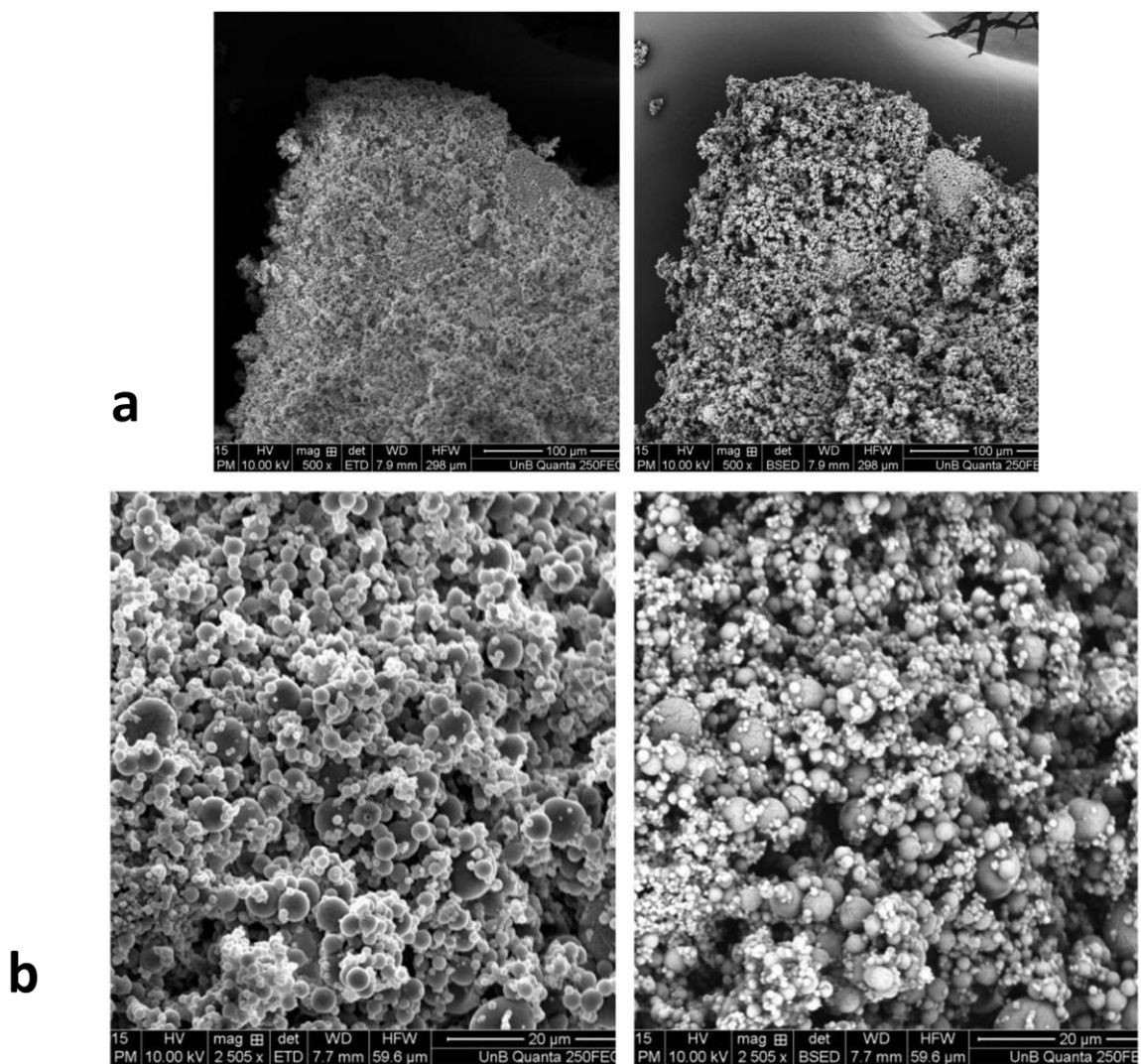


Figura 11 – Nanopartículas ALG_vaz produzidas por *spray drying*. Em a) aumento de 500x e b) 2505x.

Já na Figura 12 as imagens mostram as micropartículas de alginato e quitosana. Apresentam superfície rugosa, formato irregular, com muitas reentrâncias, o que é um favorecimento ao intumescimento. Esse formato irregular se deve à interação entre os polímeros, como constatou Horst (2009), que preparou micropartículas por diferentes métodos com polímeros isolados e associados e observou o aumento de rugosidade e mudança na superfície em micropartículas de alginato recobertas com quitosana.

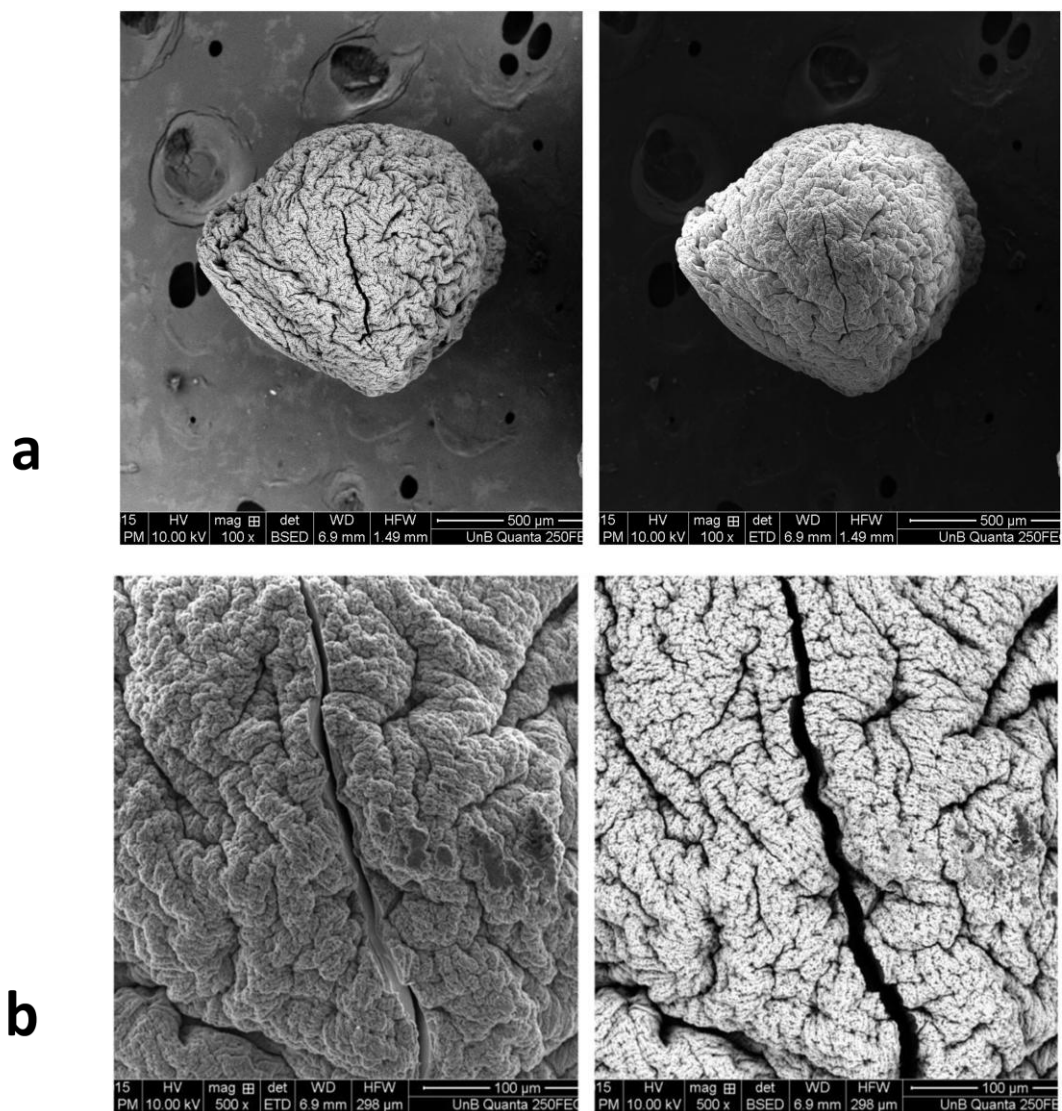


Figura 12 – Micropartículas de alginato e quitosana (bead vazia). Em a) aumento de 100x e b) 500x.

5.5. Estabilidade das beads e intumescimento

O hidrogel é uma cadeia polimérica reticulada que permite, na presença de solventes, o intumescimento enquanto as cadeias puderem ser distendidas. O intumescimento é a capacidade que o hidrogel tem de incorporar solventes na sua rede, sem se dissolver (GUESSER, 2009).

O grau de intumescimento (GI) foi medido pela imersão de massas iniciais conhecidas (M_i) das beads vazias em diferentes solventes por um e oito dias e então,

pesadas as massas finais (M_f) no oitavo dia, calculou-se segundo a equação: $GI = [(M_f - M_i) / M_i] \times 100$ (GUESSER, 2009).

Tabela 2 – Aparência e grau de intumescimento das amostras em diferentes solventes.

Amostras	Solvente (0,5mL)	M_i (g)	Aparência t1	Aparência t8	M_f (g)	GI (%)
A	H ₂ O	0,0202	Pouco gelificado	Parcialmente gelificado	0,0469	132
B	Metanol	0,0205	Intacto	Intacto	0,0345	68
C	Etanol	0,0207	Intacto	Intacto	0,0280	35
D	Hexano	0,0206	Pouco gelificado	Pouco gelificado	0,0370	79
E	Ácido acético 1%	0,0208	Pouco gelificado	Parcialmente gelificado	0,0425	104
F	Sol. Salina 0,9%	0,0204	Parcialmente gelificado	Gelificado	0,6215	2946

Mi: massa inicial; Mf: massa final; t1: 1 dia; t8: 8 dias.

O teste de intumescimento foi realizado com o intuito de mostrar estabilidade das beads de acordo com seu grau de inchamento em diferentes solventes.

Com o intumescimento o hidrogel apresenta modificações de suas propriedades físicas, de acordo com o solvente utilizado, como coloração, consistência e transparência. A classificação visual que abrangeu esses aspectos foi feita entre intacto, pouco gelificado, parcialmente gelificado e gelificado. Esta classificação foi feita comparando-se as beads intumescidas com as beads secas, sendo que as intactas apresentaram grande ou total semelhança de tamanho e cor com as beads iniciais,

pouco gelificada apresentaram pouco aumento no tamanho, pequena transparência e mudança de cor, parcialmente gelificado tem aspecto intermediário entre pouco e gelificado e gelificadas refere-se às beads que tiveram aumento de tamanho significativo e transparência evidente.

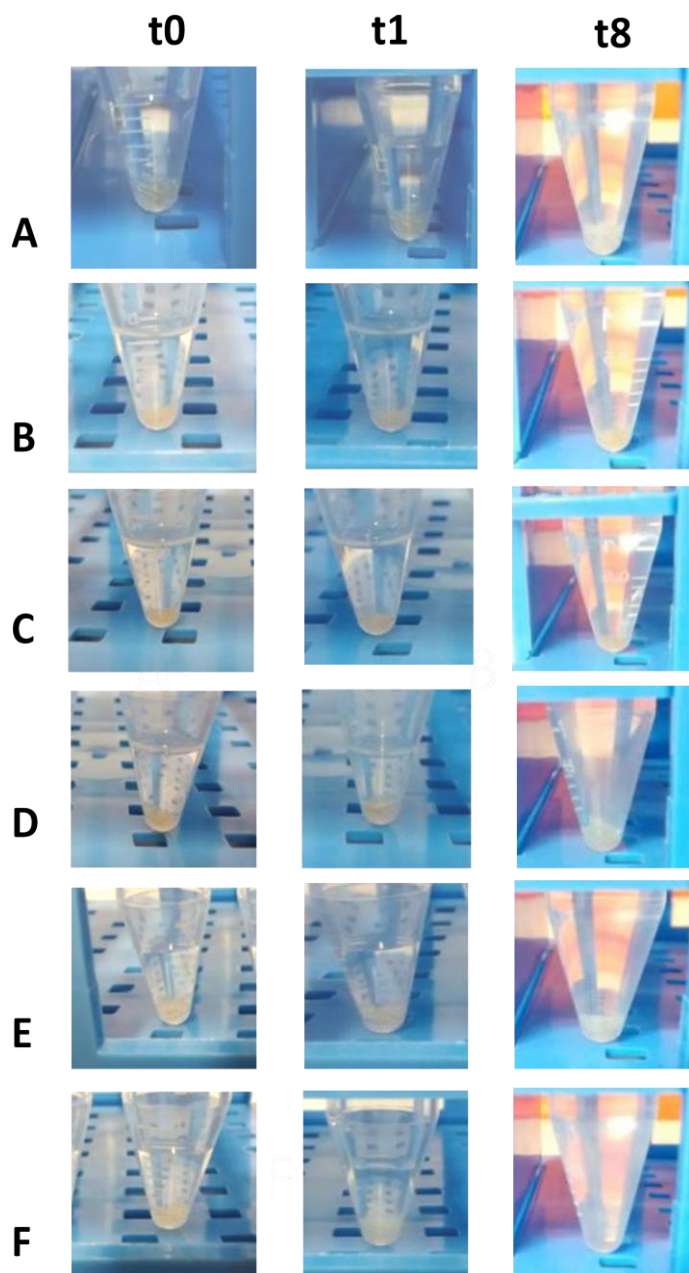


Figura 13 - Amostras com seus respectivos solventes no tempo inicial (t0), após um dia (t1) e após oito dias (t8).

As beads intumescidas em água mostraram pouca mudança na aparência, de pouco a parcialmente gelificada, mas aumentou em 132% comparado à massa inicial das beads.

As amostras com os solventes orgânicos metanol, etanol e hexano (B, C e D) mostraram grau de intumescimento baixos, comparados ao intumescimento da água, 68%, 35% e 79%, sendo que apresentaram muito pouca mudança na aparência. Em metanol e etanol apresentaram aparência intacta e em hexano pouco gelificado nas análises em um e oito dias. Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura do hidrogel como grupos amino, carboxílicos e hidroxilas que possuem afinidade com a molécula de água e repulsão a grupos apolares presentes nos solventes orgânicos.

Em ácido acético 1% o grau de intumescimento foi 104%, maior que os solventes orgânicos, mas ainda assim apresentou pouca variação na aparência: pouco gelificada no primeiro dia e parcialmente gelificada no oitavo dia. Em contato com ácido os grupos amino da quitosana são protonados e a concentração de água no hidrogel é aumentada porque o grau de inchamento é favorecido, no entanto, a concentração usada de ácido acético foi baixa, o que pode ter sido a causa do inchamento leve.

Em solução salina, no entanto, o volume das micropartículas aumentou 2946%, no oitavo dia a transparência é tanta que elas se perdem no meio. Isso ocorre porque a hidrofiliabilidade desses hidrogéis responde à mudança da força iônica do meio de intumescimento. Isto demonstra que esses hidrogéis são sal-responsivos. A solução salina aumenta a osmolaridade do meio, provendo, assim, aumento da força iônica (AQUADA *et al*, 2009).

A Figura 14 mostra melhor elas intumescidas, totalmente gelificadas, comparadas às beads secas.

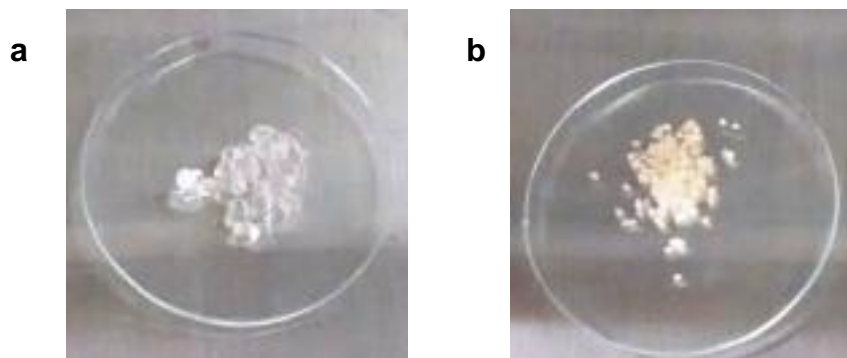


Figura 14 - Beads intumescidas com NaCl (a) comparadas às beads secas (b).

5.6. Perfil de liberação nos diferentes valores de pH

O estudo da liberação controlada de um ingrediente ativo, sob condições específicas, é interessante e necessário para entender o comportamento de liberação e o mecanismo através do qual essa liberação ocorre (HORST, 2009).

Abaixo é apresentado o gráfico com este perfil de liberação:

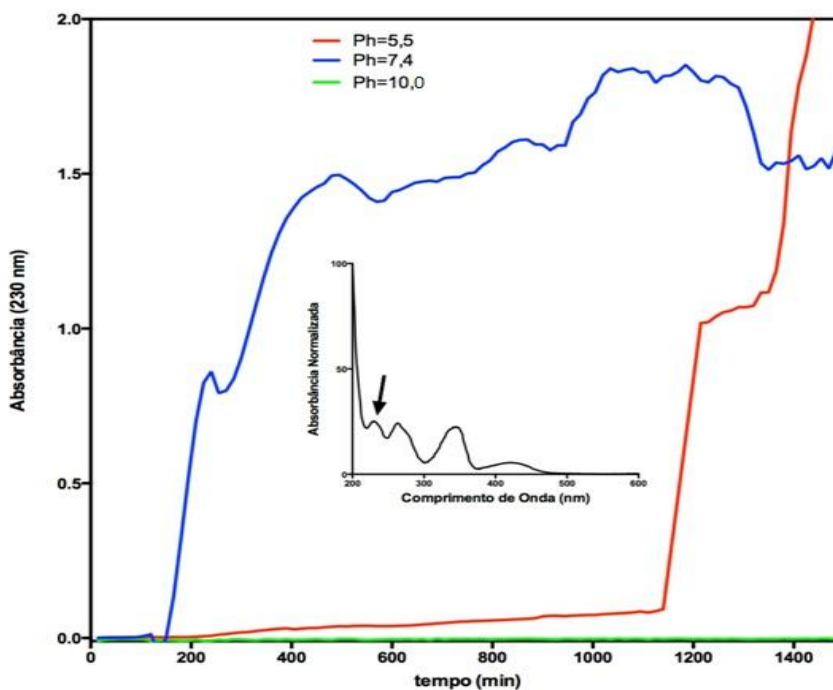


Figura 15 - Perfil de liberação da Berberina em pH 5,5; 7,4 e 10,0 medido em absorbância 230nm em função do tempo em minutos.

Foi feita a coleta de varredura de tempo em 24 horas de cada solução de pH diverso (5,5;7,4 e 10,0) utilizando o comprimento de onda de 230 nm. Os valores de absorvância foram coletados de cada amostra e construído uma curva de perfil de liberação ao longo do tempo. As medidas foram realizadas a cada 15 minutos.

A estrutura formada em complexos polieletrólíticos, por interações iônicas, como é o caso do hidrogel em estudo, são fortemente influenciadas pelo pH do meio, que influencia a capacidade de retenção de água no hidrogel (MENDES, 2009).

Em pH baixo (< 6,5), a quitosana apresenta alta densidade de cargas positivas devido à protonação dos grupos amino. Ocorre a formação de pares iônicos entre a quitosana e as carboxilas do alginato. Quanto menor o pH, tem-se o aumento na protonação dos grupos amino, acarretando em uma repulsão das cargas positivas presentes no meio ácido reduzindo a resistência mecânica e química do hidrogel, favorecendo consideravelmente o grau de inchamento. Assim, a liberação é facilitada devido à maior difusão dos fármacos nos poros do hidrogel. No caso da liberação em pH 5,5 mostrada na Figura 15, a acidez pode ter provocado uma ruptura repentina ou uma desestabilização da matriz polimérica subitamente e assim abrupta liberação da BS. (HORST, 2009; MENDES, 2009; SANTOS, 2014).

Com o aumento do pH, tem-se uma redução de protonação, e o alginato expande suas cadeias e, conseqüentemente, diminui-se o grau de inchamento dos hidrogéis. Neste meio, os grupos carregados negativamente como, por exemplo, grupos carboxílicos, se encontram na forma iônica e os grupos amino da quitosana se encontram desprotonados (MENDES, 2009; SANTOS, 2014). Assim, é possível observar na Figura 15, a liberação da BS em pH 10,0 não ocorreu possivelmente porque o grau de inchamento do hidrogel é inferior, reduzindo a possibilidade de liberação da droga.

A molécula de água interage mais facilmente com os grupos amino protonados para a formação de íons hidroxônio. Em pH 7,4 é possível notar que o perfil de liberação da berberina se deu de maneira mais gradual e contínua. Isso ocorre pois em pH próximo da neutralidade há equilíbrio entre as cargas do hidrogel que promove

interação máxima entre o grupos ionizáveis, proporcionando maior estabilidade do gel (MENDES,2009).

Recentemente, muitos têm sido os esforços para elucidar o mecanismo e cinética de liberação de ingredientes ativos a partir de matrizes hidrofílicas. Não foi feita uma análise mais aprofundada aqui sobre o mecanismo da liberação da berberina, além da influência do pH. No entanto, há estudos que utilizam diversas equações matemáticas para se conhecer o mecanismo de liberação, que pode ser por difusão, intumescimento, erosão da matriz ou a combinação de todos (HORST, 2009; ZHOU *et al*, 2014).

6. CONCLUSÃO

No decorrer deste trabalho foi possível produzir micro e nanopartículas poliméricas utilizando técnicas diversas: *spray drying* e método de gotejamento. As técnicas utilizadas mostraram-se eficientes e reprodutivas na obtenção das micro e nanopartículas propostas inicialmente, sendo capaz de carrear a berberina no seu interior de maneira adequada. Foi possível utilizar recursos e técnicas de caracterização tais como espectroscopia no UV-vis e microscopia de varredura. No desenvolvimento dos sistemas micro e nanoestruturados foi assimilado conteúdos específicos desta área dos sistemas de liberação de fármacos, como estabilidade, grau de intumescimento e perfil de liberação, sendo que foi possível observar que o hidrogel é sal-responsivo devido o alto intumescimento em solução salina, além de permitir uma liberação sustentada da berberina em pH neutro.

7. AGRADECIMENTOS

À professora Claire e professor Anderson, pelo apoio, incentivo, paciência e todo conhecimento transmitido.

À toda equipe do laboratório de Fotoquímica da FCE - UnB, em especial ao Wagner e Diego que auxiliaram e colaboraram com o trabalho.

Ao apoio do CNPq, FAPDF, DPP-UnB pelo auxílio financeiro científico ao grupo de pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos.** Tese (Doutorado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul . Porto Alegre, 2008.

ABREU, F. O. M. S; CAVALCANTE, L. G; JUNIOR, O. A. C. M. **Síntese e caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana e alginato com potencial utilização para adsorção de metais pesados.** XII Encontro de pós-graduação e pesquisa. Universidade de Fortaleza. Fortaleza, 2012.

AOUADA, F. A; MUNIZ, E. C; VAZ, C. M. P; MATTOSO, L. H. C. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1482-1490, 2009

FAYAD, S. J. **Obtenção e Caracterização de Micro e Nanopartículas à base de Proteína Isolada de Soja.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina . Florianópolis, 2010.

FERREIRA, C. G. T. **Nanopartículas poliméricas para inclusão de compostos de origem natural.** 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo. Rio de Janeiro, 2013.

GUESSER, F. **Preparação, caracterização e aplicação de hidrogel de quitosana/glutaraldeído.** Trabalho de Conclusão de Curso (Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina , 2009.

HADINOTO, K; PHANAPAVUDHIKUL, P; KEWU, Z; TAN, R. B. H. Novel Formulation of Large Hollow Nanoparticles Aggregates as Potential Carriers in Inhaled Delivery of Nanoparticulate Drugs. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3697-3706, 2006.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e *spray drying***. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

IWAKI, Y. O. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

MEDEIROS, K. A. **Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais**. Dissertação (Mestrado em Biologia animal). Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas. Brasília, 2011.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e protocolos de imobilização de lipase para a síntese enzimática de biodiesel**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. São Carlos, 2009.

NANDIYANTO, A. B. D; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. **Advanced Powder Technology**, v. 22, p.1–19, 2011.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Database**. Disponível em: <CID=2353, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2353>>. Acesso em: 3 de junho de 2015.

SANTOS, M. K. **Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH**. Trabalho de Conclusão de Curso (Química). Centro de Ciências Naturais e Humanas. Universidade Federal do ABC. São Paulo, 2014.

SILVA, H. S. R. C; SANTOS, K. S. C. R; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 776-785, 2006.

SILVA, L. C. R. P. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas polissacarídicas com atividade anticoagulante.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

TAGLIARI, M. P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica.** Tese (Doutorado em Farmácia). Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2012.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2011.

ZHOU, H. Y; CAO, P.P; ZHAO, J; WANG, Z. Y; LI, J. B; ZHANG, F. L. Release behavior and kinetic evaluation of berberine hydrochloride from ethyl cellulose/chitosan microspheres. **Frontiers of Materials Science**, v.8, n.4, p. 373 -382, 2014.