



Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais e Humanas - CCNH

Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana
e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH

MONIQUE KAWANAKA DOS SANTOS

Santo André

2014



Universidade Federal do ABC

Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH

MONIQUE KAWANAKA DOS SANTOS

RA: 11093708

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, Centro de Ciências Naturais Humanas, pela Universidade Federal do ABC.

Santo André

2014

Resumo

Os sistemas de liberação controlada de fármacos vêm sendo cada vez mais estudados, devido à sua notável aplicação biomédica e farmacêutica, e que para serem mais eficazes, devem apresentar melhor desempenho, eficácia prolongada (potencialidade) e menores efeitos colaterais. Hidrogéis de alginato de cálcio são sistemas muito estudados para a liberação controlada de fármacos de origem proteica. O grande desafio deste trabalho é investigar o potencial do sistema alginato-quitosana, para encapsulação de proteínas de interesse farmacológico, permitindo assim a administração oral e liberação entérica sem que ocorra a proteólise na região gástrica. Primeiramente foram produzidas esferas de alginato de cálcio através do gotejamento de soluções de alginato de sódio contendo proteína em uma solução de cloreto de cálcio (para a reticulação do polímero). Posteriormente, foram produzidas esferas com camada externa de quitosana (Alg-Quit) e esferas com uma segunda camada de alginato sobreposta (Alg-Quit-Alg). O objetivo principal foi verificar se a camada externa de quitosana proporciona algum benefício para o encapsulamento de proteínas. Por fim, a análise da proteção e da liberação controlada de proteína foi realizada através da observação da integridade física das esferas e por determinação espectrofotométrica da proteína liberada, onde as esferas foram expostas a três diferentes soluções tampão que simularam os sucos gástrico e entérico. Para as esferas Alg-Quit-Alg, não foi possível realizar os testes, devido à inviabilidade de continuidade do teste. Para as esferas produzidas com camada externa de quitosana, através dos testes de estabilidade realizados, não foram percebidas melhoras em relação às esferas de CaAlg. A concentração não interferiu na resistência mecânica das esferas formadas. Porém, com o aumento do número de camadas (recobrimento), menores foram o diâmetro e a resistência mecânica.

Palavras-chave: proteína, alginato, quitosana, cápsulas, hidrogéis.

SUMÁRIO

Resumo	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Hidrogéis como carregadores de fármacos para liberação controlada.....	3
1.2. Alginato	4
1.3. Quitosana	5
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGIA	6
3.1. Materiais e reagentes	6
3.2. Estruturação da parte metodológica.....	7
3.3. Encapsulação de proteína com Alginato de cálcio	8
3.1.1. Preparação de Solução de Alginato 1,5% (m/v)	8
3.1.2. Encapsulação de proteína	8
3.4. Revestimento com camada de quitosana e com quitosana-alginato	9
3.5. Testes de estabilidade em função do pH.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1. Influência da concentração da proteína encapsulada	10
4.2. Análise comparativa de diferentes proteínas encapsuladas	14
4.3. Influência do número de camadas para veiculação de proteínas	17
5. CONCLUSÕES	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
7. ASSINATURAS	23

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidrogéis como carregadores de fármacos para liberação controlada

Os filmes de géis e hidrogéis pertencem a uma classe de materiais com estruturas poliméricas hidrofílicas reticuladas por ligações químicas covalentes ou por interações iônicas e apresentam propriedades hidrodinâmicas de géis naturais biológicos, ou de células e tecidos, que podem reter significativas quantidades de água ou fluidos biológicos, podendo intumescer e apresentar volumes bem superiores ao seu inicial sem se dissolver, devido as suas ligações cruzadas. São também biocompatíveis, possuem resistência à tração e apresentam alta permeabilidade à água [1].

Um bom sistema de liberação controlada é aquele que não apresenta reminiscência do hidrogel após a liberação do princípio ativo, sendo este um dos grandes desafios nesta área de pesquisa [2]. A utilização de fármacos proteicos injetáveis ao invés da administração oral se dá principalmente devido à instabilidade física e química da proteína, já que no estômago, são degradados devido baixo pH do suco gástrico e presença de enzimas proteolíticas, inviabilizando a absorção na mucosa gastrointestinal. A insulina é talvez a proteína mais utilizada terapêuticamente, com administração subcutânea diária em uma ou múltiplas doses. Por ser digerida no estômago, a insulina não pode ser administrada oralmente [3]. Uma das alternativas para a administração oral de proteínas sem perda de atividade é através de seu encapsulamento em polímeros que protejam a proteína da digestão, mas que posteriormente permitam sua liberação para absorção. No entanto, a maioria dos polímeros sintéticos é imunogênica e a incorporação de proteínas por estes polímeros exige ambiente quimicamente hostil que pode desnaturar e inativar a proteína [4]. Muitos estudos vêm sendo realizados para se obter melhores resultados em mecanismos de liberação de medicamentos utilizando

polímeros naturais em função da biodegradabilidade e biocompatibilidade desses materiais [5,6].

1.2. Alginato

O ácido algínico é um polissacarídeo linear de ligação β -D-(1 \rightarrow 4) entre resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico (vide figura 1), originalmente extraído de algas marrons, principalmente a partir de algas pertencentes à família *Phaeophyceae*.

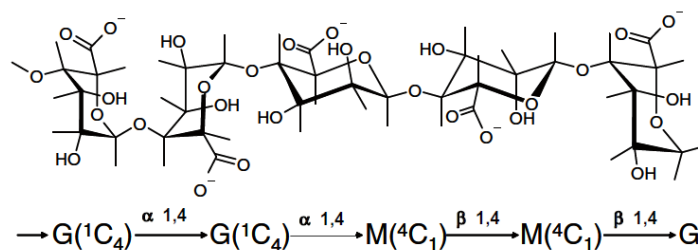


Figura 1: estrutura ácido algínico [7]

O alginato gelifica espontaneamente na presença de cátions divalentes, como é o caso do Ca^{2+} . Ocorre uma forte interação estequiométrica 2:1 dos resíduos de ácido gulurônico com íons Ca^{+2} , que leva a dimerizações de cadeias, formando uma malha de cadeias conhecida como modelo “caixa de ovos” [2], conforme apresentado na figura 2.

O alginato de cálcio (CaAlg) tem sido considerado um dos biopolímeros mais adequados para a produção de cápsulas, devido à sua composição, estrutura sequencial (que tem uma grande importância para a sua função como material de encapsulação, já que depende geralmente de espessamento, de formação de gel e de estabilização) [8,9] e estabilidade em pH gástrico. Porém, o CaAlg tem a desvantagem de ser rapidamente dissolvido no pH mais alto que prevalece no intestino. Algumas possibilidades de reticulação vêm sendo estudadas, como a formação de ligações cruzadas com o glutaraldeído, que impede a fácil dissolução do CaAlg em pHs mais elevados como o do intestino, ajudando assim na liberação controlada do fármaco por expansão controlada do hidrogel [4].

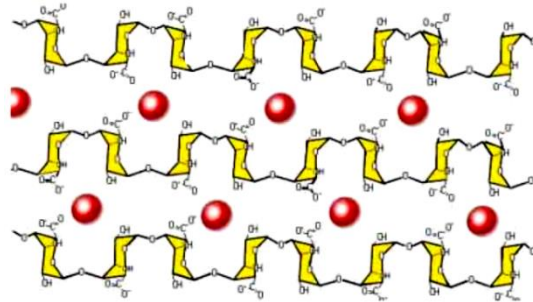


Figura 2: Representação esquemática da formação de hidrogéis através de interações entre íons Ca^{2+} com os grupos carboxílicos do alginato [2]

1.3. Quitosana

A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino, conforme mostrado na figura 3. O grau de desacetilação depende das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação:

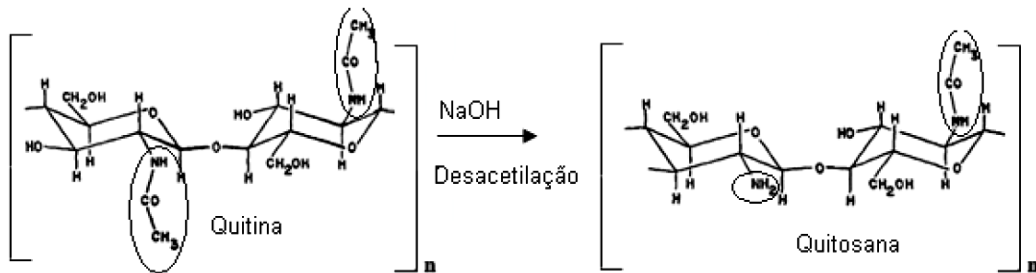


Figura 3: Esquema representativo da formação da estrutura química da quitosana, através da reação de desacetilação da quitina (n =número de unidades de açúcar por polímero) [2]

O termo quitina vem do grego e significa “envelope”. É um polímero natural (segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose) extraído de exoesqueleto de crustáceos e insetos, e composto pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4) 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Tanto a quitina como a quitosana apresentam estruturas moleculares similares à da celulose (figura 4), diferenciando-se somente nos grupos funcionais.

O elevado número de grupos hidroxila e amino presentes na quitosana aumentam a sua hidrofilicidade [10], fazendo com que tenha utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana, sendo aplicada como veículo de liberação de fármacos,

bandagens e géis injetáveis [4,11], muito devido a sua não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de bioabsorção no organismo [2,12]. Para seu uso na liberação controlada de fármacos e na bioengenharia (engenharia de tecidos e culturas celulares), vem sendo estudada a reticulação química da quitosana com agentes de entrecruzamento menos citotóxicos e mais biocompatíveis, como por exemplo, a genipina, que é um produto natural isolado de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides Ellis* [14,15, 16].

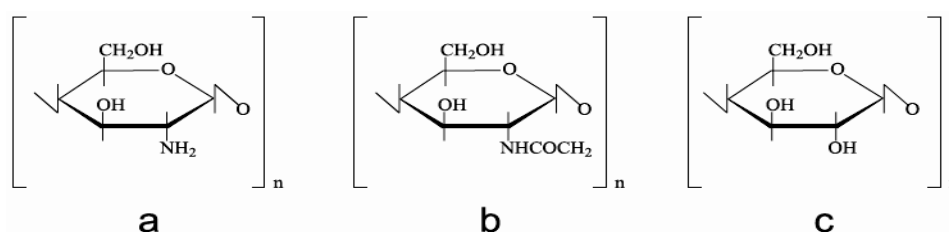


Figura 4: Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c) [11]

2. OBJETIVOS

Obter de forma viável, esferas de Alginato de cálcio, Alginato de cálcio recoberto com quitosana e Alginato de cálcio recoberto com quitosana-alginato, verificar a estabilidade destes complexos em função do pH e através de métodos espectrofotométricos, avaliar o potencial para a administração de proteínas de interesse farmacológico por via oral.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais e reagentes

Para a encapsulação de proteínas foi utilizado alginato de sódio (NaAlg), quitosana (massa molar 600.000-800.000 g mol⁻¹), e CaCl₂·2H₂O (ACROS Organics, Geel, Bélgica).

Preparou-se 1 litro das soluções tampão usadas nas análises de estabilidade, onde se utilizou HCl 12 mol L⁻¹ (37%) (Synth, São Paulo, Brasil), KCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), NaOH e KH₂PO₄ (Fisher Scientific, Loughborough, Inglaterra).

Todas as soluções foram preparadas com água de osmose reversa (RO) (Quimis, Diadema, Brasil).

O suco gástrico, pH 1,2 foi preparado com solução de HCl 0,2 Mol L⁻¹ e solução de KCl 0,05 Mol L⁻¹. Para pH 6,8, foi utilizada solução de KH₂PO₄ 0,17 Mol L⁻¹ e solução de NaOH 0,045 Mol L⁻¹. A solução de pH 7,4 foi preparada com solução de KH₂PO₄ 0,2 Mol L⁻¹ e solução de NaOH 0,2 Mol L⁻¹. Para todos os casos, foram misturadas as soluções em balão de 1000 mL. O pH das soluções foi ajustado com soluções de NaOH e HCl 1 mol L⁻¹.

O tampão acetato pH 4.5 foi obtido conforme literatura [18], onde foram utilizados acetato de sódio (Synth) e ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França). As proteínas usadas para teste foram a Ovoalbumina, albumina sérica bovina (BSA), Papaína (todas Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes usados são de grau analítico ou superior. As medidas de pH foram realizadas com o auxílio de um pHmetro digital de bancada DLA-PH (Del Lab, Araraquara, Brasil).

As leituras de absorvância foram efetuadas sem um espectrofotômetro SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

3.2. Estruturação da parte metodológica

Basicamente, três tipos de encapsulação foram propostos: a) simples, em CaAlg, b) em CaAlg recoberto com quitosana e c) em CaAlg recoberto com quitosana e posteriormente recoberto com alginato. Em todos os casos o CaAlg foi obtido pelo gotejamento de uma solução aquosa de NaAlg 1,5% (m/v) em solução de CaCl₂ 0,5 mol L⁻¹. Além de avaliar o tipo de encapsulação, foi testada a veiculação de três proteínas distintas Ovoalbumina, BSA e Papaína, sendo que o procedimento foi testado para concentrações diferentes de Ovoalbumina (0,2%, 0,8% e 1,5% (m/v)). Em todas as etapas, realizaram-se testes em duplicatas. Em todos os testes, uma parte das esferas formadas foi corada com solução de azul de metileno

(Certistainn, Darmstadt, Alemanha), enquanto a parte majoritária foi utilizada para os testes de liberação.

3.3. Encapsulação de proteína com Alginato de cálcio

3.1.1. Preparação de Solução de Alginato 1,5% (m/v)

Dissolveu-se 3,0 g de NaAlg em 200 mL de água OR, obtendo-se uma concentração de 1,5% (m/v). Essa concentração foi utilizada seguindo a literatura [18], onde se adotou como a concentração ótima para utilização de solução de alginato, já que através de testes preliminares para formação de esferas com solução de CaCl_2 , percebeu-se que quanto menor a concentração da solução de alginato, menor a estabilidade das esferas formadas. Para dissolver totalmente o NaAlg, a solução foi mantida em agitação por 24 horas, em agitador magnético e posteriormente armazenada em geladeira a 6°C .

3.1.2. Encapsulação de proteína

Alíquotas de 10 mL da solução de NaAlg foram utilizadas para dissolver Ovoalbumina em concentrações de 0,2%, 0,8% e 1,5% (m/v). Foram realizados testes com outras 2 proteínas: BSA e Papaína, porém restringindo o teste para concentrações de 0,5% (m/v), encapsuladas somente com CaAlg.



Figura 5: Esquema utilizado para formação das cápsulas de CaAlg, contendo proteína.

Gotejou-se a solução de proteína-NaAlg com uma seringa com agulha de injeção em aço inox tamanho 23G (23 Gauge equivale a um diâmetro externo de 0,6 mm) em 30 mL da

solução de CaCl_2 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, a uma distância de, aproximadamente, $2,0 \text{ cm}$, conforme ilustrado na Figura 5. Esta distância foi adotada para que não houvesse um grande desvio no diâmetro das esferas formadas.

As cápsulas formadas foram mantidas na solução de CaCl_2 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ por 1 hora. Em seguida, foram filtradas e lavadas com água OR.

3.4.Revestimento com camada de quitosana e com quitosana-alginato

A camada de quitosana foi obtida através da simples imersão por 30 min das esferas de CaAlg em solução de quitosana 0,5% (m/v). As esferas revestidas foram recuperadas por filtração, através de tela de nylon, lavando-se em seguida com água OR. Para o revestimento quitosana-alginato, as esferas obtidas foram imersas em solução de NaAlg 0,5% (m/v). Utilizou-se esta concentração, pois como a solução de NaAlg se torna mais viscosa conforme se aumenta a concentração, seria inviável trabalhar com concentrações mais elevadas. Percebeu-se que as cápsulas aglutinam com a solução, inviabilizando a filtração, sendo necessário pinçar individualmente as cápsulas para prosseguir com os testes, o que é um fator negativo.

3.5.Testes de estabilidade em função do pH

Foram colocados em um balão volumétrico de 25 mL 22,5 mL de água OR, sendo o balão avolumado com as esferas. A estabilidade e a liberação de proteína foi verificada em três condições experimentais diferentes, com pHs 1,2 que simulou o suco gástrico, 6,8 e 7,4 que simularam o suco entérico (intestinal e intestinal colônico, respectivamente), todos os testes efetuados à 37°C . Foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm para quantificação direta de proteína já que absorvem neste comprimento de onda devido à presença de cadeias laterais aromáticas do triptofano, da tirosina e da cistina. As medidas foram realizadas em intervalos de tempo de 10 min, num total de 50 min em cada meio. Para cada teste, foram montadas as respectivas curvas padrão, com as seguintes concentrações de proteína: 0,09%,

0,18%, 0,37%, 0,75%, 1,25% e 2,50% (m/v). Para cada leitura foi retirada uma alíquota para realização de teste qualitativo com reagente de biureto, para analisar de forma visual a liberação da proteína.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da concentração da proteína encapsulada

Para as cápsulas de Ovoalbumina 0,2, 0,8 e 1,5% (m/v), a análise morfológica foi auxiliada pela coloração das esferas com solução de azul de metileno, conforme Figura 6.

Estas esferas apresentaram certa resistência quando aplicada uma pressão mecânica.

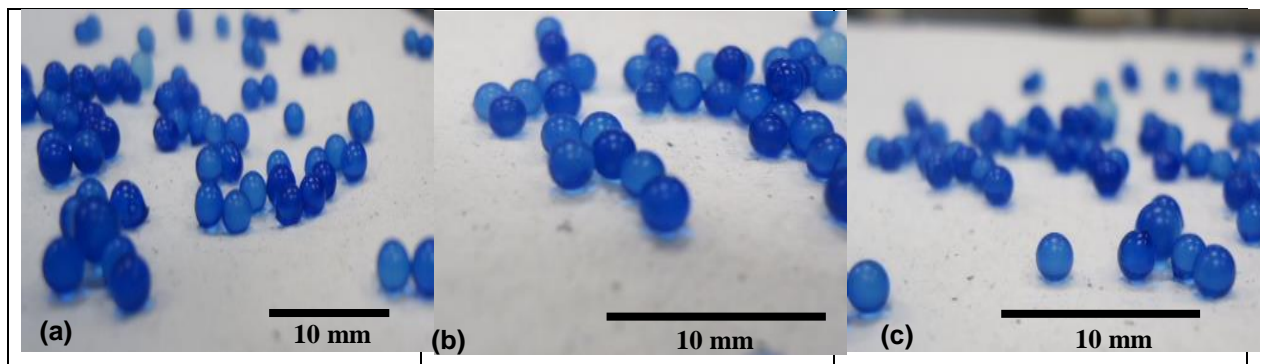


Figura 6: cápsulas de CaAlg com diferentes concentrações de Ovoalbumina: (a) 0,2%; (b) 0,8%; (c) 1,5%.

Após os testes de liberação e estabilidade com concentração de 0,2% de Ovoalbumina foram encontrados os resultados apresentados na tabela 1.

Considerando a curva de calibração para a Ovoalbumina em meio pH 1,2, pH 6,8 e pH 7,4, temos respectivamente Equação 1, $y = 0,1763x + 0,0182$, $R^2 = 0,9978$, Equação 2, $y = 0,2547x + 0,0191$, $R^2 = 0,9973$ e Equação 3, $y = 0,2661x + 0,0218$, $R^2 = 0,9975$, onde o y representa o valor de absorbância e o x a concentração de proteína em % (m/v). Para o meio 1, através da eq. 1 e considerando o fator de diluição de 10, não foi possível verificar a liberação de proteína para nenhum dos 2 testes. Para a eq. 2 e 3, no teste 1 temos que após exposição das cápsulas em meio pH 6,8 e 7,4, para os maiores valores de absorbância, tem-se

uma concentração de proteína de 0,85% (valor em 50 min) e 0,72% (valor em 50 min). Como iniciamos com 0,2%, o que pode ter ocorrido foi que havia material pertencente às cápsulas que se desfizeram durante as análises.

Tabela 1: Avaliação de estabilidade para Ovoalbumina 0,2 % (m/v). Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.

DUPLICATA 1				DUPLICATA 2			
Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm			Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4		Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,003	0,003	0,012	0	0,002	0,003	0,003
10	0,004	0,005	0,015	10	0,005	0,007	0,004
20	0,007	0,008	0,015	20	0,005	0,009	0,018
30	0,005	0,026	0,018	30	0,008	0,034	0,021
40	0,010	0,036	0,023	40	0,006	0,028	0,017
50	0,007	0,041	0,041	50	0,006	0,036	0,021

Os valores de absorbância encontrados foram muito baixos, o que pode levar a desvios experimentais grandes. Infelizmente, não foi realizado um branco com esferas de CaAlg sem proteína para comprovar se a liberação da matriz poderia justificar o resultado observado. Uma alternativa anteriormente testada, envolvendo o teste com biureto, também apresentou um erro sistemático. O teste com biureto permitiria a determinação de proteínas pela formação de um complexo violeta, com absorvidade máxima por volta de 550 nm. O teste com a concentração de Ovoalbumina 0,2%, encontra-se ilustrado na Figura 7.

No teste de biureto, as soluções aquosas de compostos contendo duas ou mais ligações peptídicas formam, através dos átomos de nitrogênio destas ligações e os íons Cu^{2+} , complexos de coloração violeta, onde a intensidade varia com a concentração de proteína.

Como é possível observar, as soluções não obtiveram coloração violeta. O problema desse teste é que, caso haja a liberação de alginato, este pode reticular com Cu^{2+} , com uma ligação com maior estabilidade inclusive que a ligação CaAlg. Nesse caso o resultado é um falso negativo para a presença de proteínas. Foi feito um teste rápido para confirmação, através do gotejamento de NaAlg em solução de CuSO_4 , o que ocasionou na formação de esferas transparentes. Isto demonstra a reticulação do alginato com Cu^{2+} .

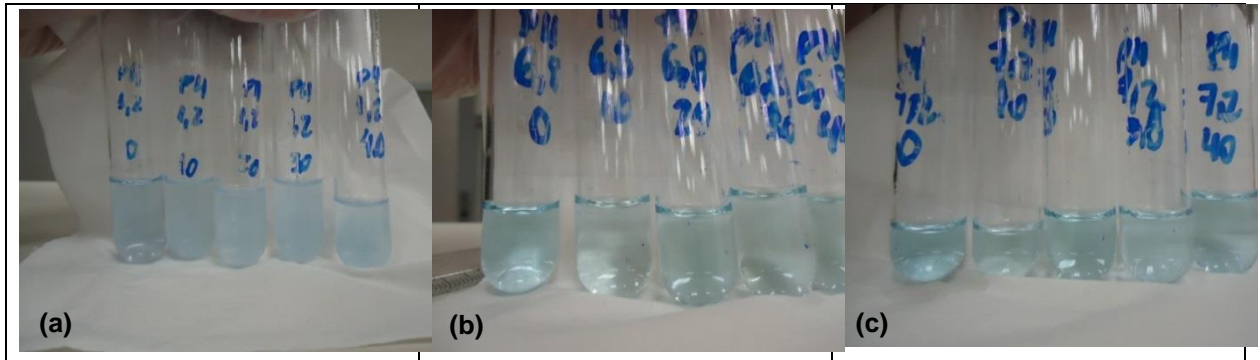


Figura 7: Teste visual com biureto para alíquotas de cápsulas de Ovoalbumina 0,2%, somente com alginato. (a) pH 1,2; (b) pH 6,8; (c) pH 7,4.

As cápsulas contendo 0,8% de Ovoalbumina também apresentaram boa resistência mecânica quando aplicada pressão, já as esferas contendo 1,5% da proteína demonstraram ser mais frágeis em comparação às anteriormente formadas. Os resultados dos testes de liberação para essas duas condições experimentais seguem demonstrados nas Tabela 2 e 3.

Percebe-se que para o teste 1 em meio 1, temos valores bem maiores quando comparados com os do mesmo meio no teste 2. Como esta diferença se deu bem pronunciada somente no meio 1, tem-se que ocorreu algum desvio devido os baixos valores de absorvância, já que foram utilizados os mesmos procedimentos para todas as leituras. Através das curvas de calibração para a Ovoalbumina, para o meio 1, temos que em 50 min no teste 1, o valor de absorvância lido equivale a liberação de um pouco mais de 26% da proteína veiculada.

Já no segundo meio, se analisarmos também em 50 min do mesmo teste, o valor de absorvância lido equivale à liberação de mais de 52% de proteína. No meio 3, ao fim dos testes, pelas curvas de calibração e pelo fato dos valores de absorvância lidos terem sido mais uma vez muito baixos, não foi possível quantificar a liberação de proteína.

Temos novamente uma grande diferença de valores entre os testes 1 e 2, quando se compara os meios 1 e os últimos valores do meio 2. No caso do meio 1, como todos os valores, desde o início, apresentaram uma discrepância grande, temos que os cálculos de

liberação de proteína se mostram prejudicados, uma vez que não é possível dizer ao certo a quantidade de proteína liberada no meio. Se por exemplo, tomarmos os valores do teste 1 para o meio 1, através das curvas de calibração, temos que o valor lido em 40 min representa uma liberação de mais de 60% da proteína total veiculada.

Tabela 2: Avaliação de estabilidade para Ovoalbumina 0,8 % (m/v). Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.

DUPLICATA 1				DUPLICATA 2			
Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm			Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4		Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,017	0,017	0,015	0	0,003	0,001	0,008
10	0,019	0,018	0,012	10	0,003	0,003	0,005
20	0,021	0,021	0,017	20	0,003	0,004	0,012
30	0,023	0,020	0,015	30	0,009	0,007	0,015
40	0,022	0,021	0,015	40	0,003	0,034	0,018
50	0,022	0,030	0,018	50	0,007	0,042	0,011

Tabela 3: Avaliação de estabilidade para Ovoalbumina 1,5 % (m/v). Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.

DUPLICATA 1				DUPLICATA 2			
Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm			Tempo (min)	Leituras de Absorbâncias a 280 nm		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4		Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,021	0,002	0,011	0	0,003	0,001	0,008
10	0,029	0,007	0,013	10	0,003	0,003	0,011
20	0,033	0,009	0,011	20	0,003	0,004	0,012
30	0,038	0,001	0,018	30	0,009	0,007	0,013
40	0,061	0,015	0,012	40	0,003	0,034	0,012
50	0,044	0,015	0,019	50	0,007	0,042	0,011

Fazendo-se um gráfico do percentual de proteína liberada para a concentração de 0,8% (m/v) no teste 1 para os meios onde foi possível quantificar a concentração de proteína (meios 1 e 2), pode-se verificar a evolução da liberação de proteína no meio, conforme Figura 8. Fazendo-se uma análise sobre o gráfico, percebe-se que há uma tendência crescente da liberação de proteína, conforme o tempo de exposição aos meios vai aumentando. Estes testes com concentrações diferentes mostraram que quando temos concentrações baixas (0,2%) e

concentrações mais elevadas (1,5%), os valores de absorbância encontrados são muito baixos e, portanto, não são conclusivos.

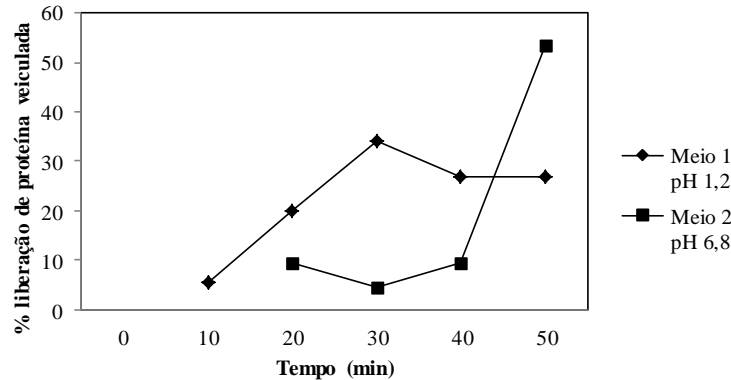


Figura 8: Evolução em percentual da liberação de proteína veiculada em pHs 1,2 e 6,8 para teste 1.

4.2. Análise comparativa de diferentes proteínas encapsuladas

Foram preparadas cápsulas para 3 proteínas diferentes (Ovoalbumina, BSA e Papaína), todas com concentrações de 0,5% (m/v), para as quais foram testadas a encapsulação somente com CaAlg. Para cada tipo de proteína, as cápsulas formadas foram coradas, para melhor análise morfológica das mesmas (figura 9).

Através de leituras dos diâmetros das esferas, com paquímetro digital (Dutra Máquinas, São Paulo, Brasil), foi possível perceber que houve diferenciação de valores entre as 3 diferentes proteínas, onde tivemos uma amostragem de 10 esferas para cada teste, e o diâmetro médio encontrado foi $2,01 \pm 0,01$, $2,07 \pm 0,01$ e $2,11 \pm 0,01$ (mm) para BSA, Ovoalbumina e Papaína, respectivamente. Isto mostra que o tipo de proteína encapsulada interfere na estrutura morfológica das cápsulas formadas. Em termos de resistência mecânica, todas se apresentaram de forma bem similar.

A análise de estabilidade foi realizada para as 3 diferentes proteínas e apresentou os resultados demonstrados nas Tabela 4 e tabela 5. Para BSA, através das curvas de calibração, em meio pH 1,2, pH 6,8 e pH 7,4, temos respectivamente Equação 4, $y = 0,0827x + 0,0496$,

$R^2 = 0,9707$, Equação 5, $y = 0,1171x + 0,0395$, $R^2 = 0,9871$ e Equação 6, $y = 0,1274x + 0,0422$. Analisando-se os resultados obtidos nos 2 testes, em pHs 1,2 e 6,8, não tivemos valores de absorbância onde fosse possível calcular a liberação de proteína. Já no meio 3, em 50 min do teste 1, o valor lido representa uma concentração de 0,06%, o que representaria um percentual de mais de 87% de proteína veiculada ainda não liberada. Isto pode representar que neste caso para esta proteína, o tempo de análise devesse ser ampliado, ou que os valores de absorbância lidos foram muito baixos, em relação aos valores da curva de calibração, o que acarretou em um erro considerável.

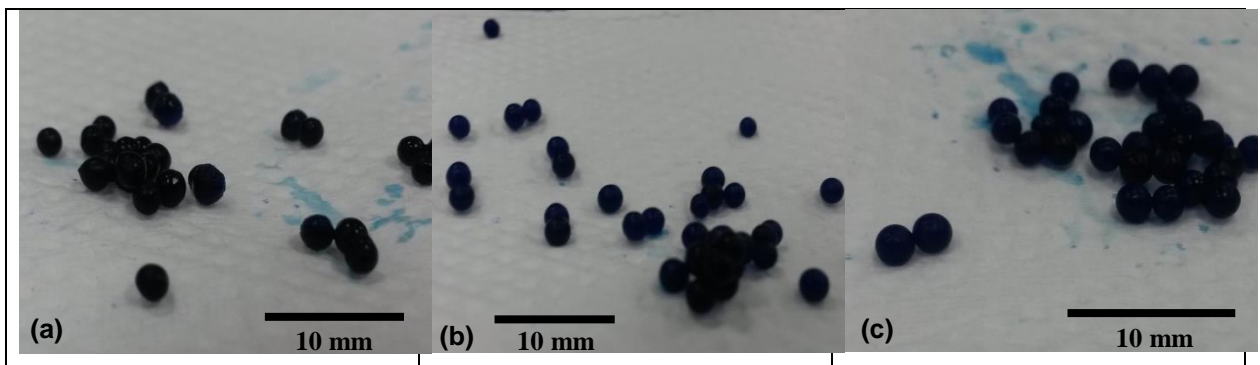


Figura 9: Fotos dos resultados obtidos para as cápsulas coradas com solução de azul de metileno, obtidas com 0,5% proteína e camada de alginato. (a) BSA; (b) Ovoalbumina; (c) Papaína.

Para a Ovoalbumina, as curva de calibração resultaram na Equação 7, $y = 0,1857x + 0,0188$, $R^2 = 0,9971$, Equação 8, $y = 0,2545x + 0,0213$, $R^2 = 0,9989$ e Equação 9, $y = 0,2591x + 0,0328$, $R^2 = 0,9986$. Novamente, para esta proteína, em meio 1, comparando-se os 2 testes, tivemos valores bem divergentes, o que impossibilita avaliar de forma clara, o percentual de proteína liberada. Já no meio 2 no teste 2, avaliando-se o valor em 50 min, o resultado neste ponto mostra uma liberação de 64% a mais da proteína veiculada inicialmente. Se considerarmos somente este teste, parece que temos a liberação de toda a proteína, mas como as esferas não haviam se desfeito, considera-se que houve apenas processos de difusão, liberando a proteína sem desfazer as esferas. Provavelmente, em um tempo maior de teste, o CaAlg, por estar exposto em meio levemente básico, começaria a solubilizar, inviabilizando a

continuidade do teste. Para a Papaína, as equações encontradas foram Equação 10, $y = 0,1654x + 0,0619$, $R^2 = 0,9722$, Equação 11, $y = 0,2757x + 0,0715$, $R^2 = 0,9774$ e Equação 12, $y = 0,2824x + 0,0667$, $R^2 = 0,9803$. Considerando os 2 testes, foi possível calcular a liberação de proteína somente a partir do meio 2, pois os valores de absorvância lidos foram muito baixos em relação aos valores da curva de calibração. Para o meio 2 e utilizando-se o teste 1, tivemos em 50 min 54% de proteína veiculada ainda não liberada. Mesmo assim não foi possível realizar teste no meio 3, pois ocorreu a desestruturação das esferas de CaAlg. Isso demonstra que o tipo de proteína é importante para as características mecânicas e físicas das esferas. Como as esferas foram dissolvidas, não foi possível o teste em pH 7,4.

Tabela 4: Duplicata 1, avaliação de estabilidade para BSA, Ovoalbumina e Papaína 0,5 % (m/v). Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C. Leituras de absorvâncias em 280 nm.

Tempo (min)	BSA 0,5%			OvA 0,5%			Pap 0,5%		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,005	0,010	0,019	0,017	0,017	0,015	0,017	0,061	
10	0,007	0,008	0,021	0,019	0,018	0,012	0,023	0,063	não foi possível
20	0,012	0,006	0,026	0,021	0,021	0,017	0,029	0,059	realizar a
30	0,013	0,011	0,031	0,023	0,020	0,015	0,031	0,077	leitura
40	0,008	0,018	0,033	0,022	0,021	0,015	0,037	0,071	(esferas
50	0,007	0,021	0,043	0,022	0,030	0,018	0,031	0,078	solubiliza- ram)

Algumas proteínas interferem de forma ainda mais ativa na estrutura das esferas, como por exemplo a Lisozima. Esta quando utilizada em testes que empregam camadas de quitosana, pode inviabilizar a leitura, devido o fato de que a Lisozima é uma enzima capaz de degradar cadeias de quitosana. Essa atividade enzimática depende de vários fatores, como o grau de desacetilação da quitosana, já que a Lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo e que apresentam um papel fundamental no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima [11].

Tabela 5: Duplicata 2, avaliação de estabilidade para BSA, Ovoalbumina e Papaína 0,5 % (m/v). Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C. Leituras de absorvâncias em 280 nm.

Tempo (min)	BSA 0,5%			OvA 0,5%			Pap 0,5%		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,005	0,003	0,007	0,003	0,001	0,008	0,009	0,031	
10	0,008	0,007	0,014	0,003	0,003	0,005	0,013	0,043	não foi possível
20	0,011	0,009	0,021	0,003	0,004	0,012	0,018	0,039	realizar a
30	0,009	0,034	0,021	0,009	0,007	0,015	0,023	0,051	leitura
40	0,011	0,028	0,019	0,003	0,034	0,018	0,027	0,053	(esferas
50	0,007	0,036	0,029	0,007	0,042	0,011	0,037	0,042	solubiliza- ram)

4.3. Influência do número de camadas para veiculação de proteínas

Realizou-se a análise morfológica das cápsulas formadas com BSA 0,5%, encapsuladas somente com CaAlg e com recobrimento de quitosana, conforme Figura 10. Para os testes do recobrimento com do CaAlg com quitosana-alginato, a análise não foi possível, uma vez que para formar a última camada com alginato, após imergi-las na solução, ocorreu uma aglutinação, inviabilizando o prosseguimento dos testes.

Analisando as esferas formadas, a cápsulas formadas somente com cobertura de alginato, se mostraram mais frágeis, quando aplicada certa pressão mecânica.

A quitosana é um biopolímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos e solúvel em meio ácido diluído, por este motivo foi dissolvida em tampão acetato contendo o ácido acético, que é o solvente mais empregado para sua dissolução. [11]

Após a interação com os meios, os resultados obtidos seguem nas tabelas 6 e 7.

O revestimento com uma camada de quitosana ocorre devido ao fato da quitosana ser uma poliamina catiônica com baixo valor de pKa. Efetivamente, em pH baixo (< 6,5), a quitosana apresenta alta densidade de cargas positivas devido à protonação dos grupos amino gerando o íon $R-NH^{3+}$. Ocorre a formação de pares iônicos entre a quitosana e as carboxilas do ácido algínico. 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. 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.

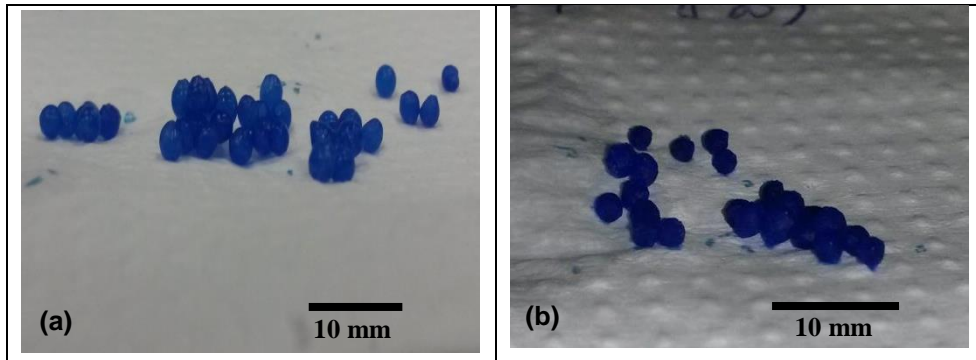


Figura 10: cápsulas formadas com BSA 0,5%: (a) somente com alginato; (b) Alg-Quit

Tabela 6: Avaliação de estabilidade para BSA 0,5% (m/v) encapsulada com alginato de calcio. Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.

Tempo (min)	DUPLICATA 1			DUPLICATA 2		
	Leituras de Absorbâncias a 280 nm			Leituras de Absorbâncias a 280 nm		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,001	0,001		0,000	0,008	
10	0,001	0,002		0,000	0,009	
20	0,007	0,002	não foi possível realizar a leitura	0,007	0,010	não foi possível realizar a leitura
30	0,004	0,004	(esferas solubilizaram)	0,009	0,011	(esferas solubilizaram)
40	0,001	0,015		0,007	0,012	
50	0,011	0,014		0,009	0,021	

As curvas de calibração do BSA nestes testes são representadas pela Equação 13, $y = 0,0784x + 0,0315$, $R^2 = 0,9826$, Equação 14, $y = 0,1119x + 0,0295$, $R^2 = 0,9749$ e Equação 15, $y = 0,1138x + 0,045$. Através das curvas e com os valores de absorbância lidos, só foi possível quantificar a liberação de proteína para a camada Alg-Quit a partir do meio 2, onde no teste 2, em 50 minutos de análise, o valor de absorbância lido de 0,042 representa mais de 120% de proteína a mais do que a real quantidade de proteína utilizada. Este valor maior representa em parte, uma fração das camadas das cápsulas que se desfizeram durante a análise. As esferas não resistiram mais à exposição ao meio. Isto pode ser explicado porque a estrutura da quitosana é mantida por interações iônicas, que são fortemente influenciadas pelo

pH do meio reacional, onde a desprotonação ocorrida devido o aumento de pH reduziu a interação iônica entre os biopolímeros, acarretando na perda da camada de quitosana influenciando também na capacidade de retenção de água no hidrogel (figura 11).

Tabela 7: Avaliação de estabilidade para BSA 0,5% (m/v) revestida camada Alg-Quit. Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.

Tempo (min)	DUPLICATA 1			Tempo (min)	DUPLICATA 2		
	Leituras de Absorbâncias a 280 nm				Leituras de Absorbâncias a 280 nm		
	Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4		Meio 1 pH 1,2	Meio 2 pH 6,8	Meio 3 pH 7,4
0	0,001	0,007		0	0,003	0,001	
10	0,001	0,009		10	0,003	0,003	
20	0,004	0,009	não foi possível realizar a leitura	20	0,003	0,004	não foi possível realizar a leitura
30	0,001	0,008	(esferas solubilizaram)	30	0,009	0,007	(esferas solubilizaram)
40	0,000	0,016		40	0,003	0,034	
50	0,005	0,030		50	0,007	0,042	

Quando ocorre a perda da camada de quitosana, as cápsulas ficam expostas ao meio levemente básico, somente envolvidas pelo alginato, que nestas condições, se torna solúvel, o que influencia a estabilidade da estrutura das cápsulas. No caso em que foi utilizada a encapsulação somente com alginato, pelos valores de absorbância, não tivemos como quantificar a liberação de proteína até o meio 2. Muito parecido com o ocorrido no teste de com diferentes proteínas.

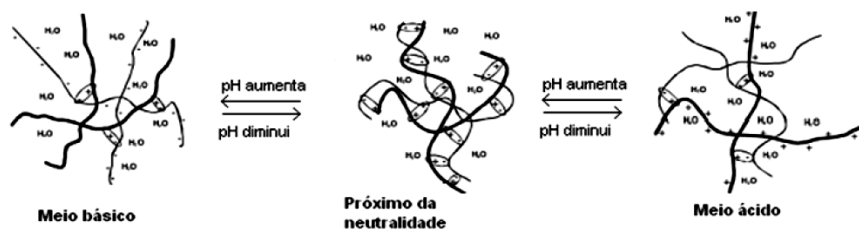


Figura 11: estrutura e variação do inchamento de um complexo polieletrólítico com o pH do meio [13]

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, foi possível observar que a concentração e a quantidade de camadas interferem no diâmetro das esferas formadas, porém não com um padrão linear, para as condições testadas. Quanto maior o recobrimento (número de camadas) tem-se uma redução do diâmetro e da resistência mecânica. As cápsulas obtidas com CaAlg se mostraram

equivalentes às esferas obtidas com camada externa de quitosana, porém era esperado que com esta camada externa, tivéssemos uma estabilidade maior das esferas formadas, já que teríamos uma camada a mais de revestimento, retardando talvez a liberação da proteína e também porque não foi observado através dos resultados, que o alginato se torna rapidamente solúvel em pH neutro-alcálico.

Infelizmente, devido ser inviável prosseguir com o material formado, não foi possível realizar os testes com a camada externa de alginato (Alg-Quit-Alg), o que seria de grande valia, visto que era o diferencial proposto inicialmente. Isto mostra que há a necessidade de realizar adaptações e correções no método utilizado, para que seja possível analisar as esferas formadas, já que esperávamos obter uma maior estabilidade, uma vez que no meio ácido (suco gástrico) não teríamos alteração nas esferas, que deveria ocorrer apenas no meio neutro-alcálico com a solubilização da camada de alginato, ficando assim com a camada mais externa de quitosana, e que pelo fato desta ser solúvel somente em meio ácido, teríamos uma maior resistência das esferas, aumentando a eficácia da liberação controlada do fármaco no colon intestinal.

Os desvios encontrados nos resultados mostraram que é necessário que o método de análise seja revisado, uma vez que foram encontradas muitas dificuldades na parte experimental, principalmente os valores muito baixos de absorbância, aumentando o erro, comprometendo qualquer possibilidade de conclusão mais fundamentada. Para poder avaliar melhor as interferências nos resultados, deve-se pensar posteriormente, em análises paralelas ou até mesmo prévias, como realizar a leitura de um branco com esferas de CaAlg sem proteína para confirmar se a liberação da matriz é efetivamente responsável por variações nas leituras. Um método de separação tal qual eletroforese ou cromatografia seria o ideal para o acompanhamento da liberação de proteínas e mesmo para verificar a integridade dessas proteínas frente ao meio ácido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COELHO, S.L. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação de nitrofurazona**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba. p. 16-28.
- [2] ABREU, F.O.M.S. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carregadores de fármacos**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p.1-51.
- [3] FINOTELLI, P.V et al. **Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1): 206–211, 2010.
- [4] GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. **pH sensitive alginate–guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs**. *International Journal of Pharmaceutics*, 335: 123–129, 2007.
- [5] HOLANDA, A.L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. 2011. Tese (Doutorado engenharia de processos) -Pós-graduação em engenharia de processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. p. 28-52.
- [6] VALENTA, C. **The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11): 1692-1712, 2005.
- [7] LERTSUTTHIWONG, Pet al. **Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil**. *Carbohydrate Polymers*, 74: 209–214, 2008.
- [8] TØNNESEN, H.H.; KARLSEN, J. **Alginate in drug delivery systems**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6): 621-30, 2002.
- [9] Roy, I et al. **Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalina**. *Biochemical Engineering J.* 23: 193-198, 2005.
- [10] GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANA-FILHO, S.P. *Biotecnologia ciência & desenvolvimento. Produção de Esferas de Quitosana*. ed. 33, p. 30-34, 2004.
- [11] LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**. *Quim. Nova*, 32(3): 672-678, 2009.
- [12] MENDES, A.Aet al.. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. *Quim. Nova*, 34(5): 831-840, 2011.
- [13] SENEL, S et al. **Chitosan films and hydrogels of chlohexidinegluconate for oral mucosal delivery**. *International Journal of Pharmaceutics*, 193(2): 197-203, 2000.

- [14] GONÇALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. **Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana**. *Quim. Nova*, 34(7): 1215-1223, 2011
- [15] Chiono, V.; Pulieri, E.; Vozzi, G.; Ciardelli, G.; Ahluwalia, A.; Giusti, P. **Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2): 889-898, 2008.
- [16] RAMACHANDRAND, S.; THIRUMURUGN, G.; DHANARAJU, M.D. **Development and evaluation of biodegradable chitosan microspheres loaded with ranitidine and cross linked with glutaraldehyde**. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(2): 105-120, 2011.
- [17] MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: padronização, preparação e purificação**. 2 ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, SP, 1968. p. 302-303
- [18] Yu, W et al. **Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by GPC**. *Journal of Membrane Science*, 346: 296-301, 2010.

7. ASSINATURAS

Monique Kawanaka dos Santos

Prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho - Orientador