



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Josefa Virgínia da Silva Souza

**Preparação de biocompósitos magnéticos à base de gelatina para
liberação controlada de doxorrubicina**

Rio de Janeiro

2017

Josefa Virgínia da Silva Souza

Preparação de biocompósitos magnéticos à base de gelatina para liberação controlada de doxorrubicina

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Polímeros.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva Costa

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

S729 Souza, Josefa Virgínia da Silva
Preparação de biocompósitos magnéticos à base de gelatina
para liberação controlada de doxorubicina. / Josefa Virgínia da
Silva Souza- 2017.
125 f.

Orientador: Marcos Antonio da Silva Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Química.

1. Microesferas de gelatina - Tese - Teses. 2. Propriedades
magnéticas – Teses. 3. Biocompósitos poliméricos - Teses I.
Costa, Marcos Antonio da Silva II. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 665.931.7

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese.

Assinatura

Data

Josefa Virgínia da Silva Souza

Preparação de biocompósitos magnéticos à base de gelatina para liberação controlada de doxorrubicina

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Polímeros.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva Costa (Orientador)
Instituto de Química - UERJ

Prof(a). Dr(a). Luciana da Cunha Costa
Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof. Dr. Emerson Oliveira da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof(a). Dr(a). Marcia Cerqueira Delpech
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Luiz Claudio de Santa Maria
Instituto de Química - UERJ

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Deus pois sem Ele não poderia ter chegado até aqui, e também aos meus pais pois foram quem primeiro acreditaram em mim e pelo apoio e incentivo fundamentais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Severo e meus filhos Gabriel e Sophia pela motivação, compreensão e amor incondicional.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva Costa por seus conselhos, dedicação e grande contribuição na minha vida acadêmica e profissional.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química da UERJ pela grande contribuição na minha formação acadêmica.

Aos amigos Washington Formiga, Cristiane Nunes, Fabiana Rodrigues, Joyce Salazar e Antônio Florêncio por suas contribuições na forma de apoio sempre solícito, pelos bons momentos vividos e pelo estímulo mútuo.

Aos alunos de iniciação científica Evandro Ribeiro e João Pedro Tinoco pelo auxílio na parte experimental desta Tese.

Ao professor Manoel Ribeiro da Silva do Instituto de Ciências da Universidade Federal de Itajubá pelas análises de propriedades magnéticas.

À Química Mônica Machado da Silva do Laboratório de Caracterização Instrumental (IQ/UERJ) pelas análises termogravimétricas (TGA).

À FAPERJ pelo auxílio financeiro.

As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam.

1 Coríntios 2:9

RESUMO

SOUZA, J. V. S. *Preparação de biocompósitos magnéticos à base de gelatina para liberação controlada de doxorrubicina*. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Química, área de concentração: Polímeros) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Dispositivos para liberação controlada de fármacos são sistemas à base de polímeros que contém, em seu interior, uma carga farmacêutica que é liberada gradativamente quando em contato com o meio fisiológico. Esta liberação gradual do fármaco oferece grandes vantagens quando se compara ao método convencional de administração como, por exemplo, maior concentração do medicamento no tecido doente e menos efeitos adversos. Quando este tipo de sistema contém material magnético, ele pode ser facilmente direcionado e, conseqüentemente, o tempo para o dispositivo chegar ao local desejado, assim como o percurso percorrido diminuem. Com a finalidade de se obter um dispositivo magneticamente controlado para liberação de doxorrubicina (DOX), foram estudadas a preparação e a caracterização de biocompósitos à base de gelatina e magnetita. Microesferas foram preparadas por meio de emulsão água-em-óleo e diferentes agentes de reticulação com baixa citotoxicidade (frutose, glicose, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, glutaldeído, genipina) foram avaliados em substituição ao reticulante convencional (glutaraldeído), com o intuito de minimizar efeitos adversos ocasionados pela liberação de moléculas de agente de reticulação após a degradação do biocompósito nas células alvo. Magnetita obtida com cloreto ferroso ou sulfato ferroso, além de um fluido magnético, foram avaliados a fim de maximizar a magnetização dos biocompósitos. A influência de campo magnético constante, campo magnético oscilante e ausência de campo magnético sobre a liberação de doxorrubicina também foi estudada. Os biocompósitos foram caracterizados por percentual de gelatina dissolvido em água (técnica de determinação de proteína com reagente de biureto), microscopia eletrônica de varredura, análises termogravimétricas, magnetômetro de amostra vibrante e testes de liberação *in vitro* do fármaco. A ferramenta planejamento de experimentos variando-se o tipo de reticulante (frutose ou glicose), a concentração de reticulante, o tempo de aquecimento e pH do meio reacional foi realizado a fim de encontrar quais parâmetros influenciam o grau de reticulação das microesferas. Os resultados mostraram que tanto a frutose como a glicose têm sua reação de reticulação fortemente influenciada pelo pH reacional e pelo tempo de reação. Comparando-se todos os reticulantes estudados, verificou-se que, a genipina é o melhor agente de reticulação para as cadeias proteicas de gelatina, porém seu alto custo (cerca de R\$ 880,00/g de microesferas) inviabiliza processos em larga escala. A utilização de frutose como reticulante levou à obtenção de microesferas de gelatina com propriedades físicas melhores que as reticuladas com glutaraldeído e de baixo custo (cerca de R\$ 2,25/g de microesferas). Os biocompósitos sintetizados apresentaram elevada magnetização de saturação e comportamento superparamagnético. Além disso, variando-se o campo magnético externo foi possível modificar o perfil de liberação de doxorrubicina.

Palavras-chave: Microesferas de gelatina. Grau de reticulação. Biocompósito.

Propriedades magnéticas.

ABSTRACT

SOUZA, J. V. S. *Preparation of biocomposites based on gelatin for doxorubicin controlled release*. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Química, área de concentração: Polímeros) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Devices for drug controlled release are polymer-based systems which contain a pharmaceutical filler that is released gradually when in contact with physiological medium. This gradual release offers great advantages when compared to the conventional administration method, for example, medicament higher concentration in diseased tissue and fewer adverse effects. When this type of system contains magnetic material, it can be easily directed and, consequently, the time for the device to reach the desired location as well as the path traveled decrease. In order to obtain a magnetically controlled device for the release of doxorubicin (DOX), the preparation and characterization of biocomposites based on gelatin and magnetite were studied. Microspheres were prepared by water-in-oil emulsion and different crosslinking agents with low cytotoxicity (fructose, glucose, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, glutaraldehyde, genipine) were evaluated instead of the conventional crosslinker glutaraldehyde in order to minimize the adverse effects caused by the release of crosslinking molecules after biocomposite degradation in the target cells. Magnetite obtained with ferrous chloride, ferrous sulfate or in a magnetic fluid, were evaluated in order to maximize the magnetization of the biocomposites. The influence of constant magnetic field, oscillating magnetic field and absence of magnetic field on the release of doxorubicin was also studied. The biocomposites were characterized by the percentage of gelatin dissolved in water (protein determination technique with biuret reagent), scanning electron microscopy, thermogravimetric analyzes, vibrating sample magnetometer and in vitro drug release tests. The design of experiments tool, varying the type of crosslinker (fructose or glucose), the crosslinker concentration, the heating time and the pH of the reaction medium was performed in order to find which parameters influence the degree of cross-linking of the microspheres. The results showed that both fructose and glucose have their crosslinking reaction strongly influenced by the reaction pH and the reaction time. Comparing all of the crosslinkers studied, genipine was found to be the best cross-linking agent for gelatin protein chains, but its high cost (about R\$ 880.00 / g of microspheres) made it impossible to process large-scale processes. The use of fructose as a crosslinker led to the production of gelatin microspheres with better physical properties than glutaraldehyde and low cost (about R\$ 2.25 / g microspheres) crosslinked. The synthesized biocomposites presented high saturation magnetization and superparamagnetic behavior. In addition, by varying the external magnetic field it was possible to modify the doxorubicin release profile.

Keywords: Gelatin microspheres. Extent of crosslinking. Biocomposite. Magnetic properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Unidade básica das cadeias de gelatina.....	23
Figura 2 -	Formas cíclica (a) e aberta (b) da glicose.....	27
Figura 3 -	Formas cíclica (a) e aberta (b) da frutose.....	27
Figura 4 -	Representação esquemática do mecanismo de reticulação de gelatina por açúcar redutor.....	28
Figura 5 -	Estrutura química do geniposídeo (a) e da genipina (b).....	30
Figura 6 -	Processo de reticulação de gelatina utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente reticulante...	33
Figura 7 -	Esquema comparativo dos perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x liberação controlada.....	34
Figura 8 -	Mecanismos de liberação controlada de fármacos.....	36
Figura 9 -	Esquema hipotético de um sistema de entrega de fármacos magneticamente controlado.....	38
Figura 10 -	Nanopartícula magnética comercializada por Chemicell.....	39
Figura 11 -	Aparelhagem para o preparo das microesferas de gelatina: etapa de aquecimento (a) e etapa de resfriamento (b).....	48
Figura 12 -	Aspecto visual de gelatina reticulada com glutaraldeído (GBG03) e sem reticulação (GB 01).....	54
Figura 13 -	Aspecto visual das microesferas de gelatina reticuladas com frutose em diferentes tempos.....	57
Figura 14 -	Curva de calibração de BCA para determinação de proteínas.....	59
Figura 15 -	Gráfico de Pareto para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	62

Figura 16 - Superfície de resposta para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	63
Figura 17 - Curvas de nível da superfície de resposta para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	63
Figura 18 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 100 μ L.....	67
Figura 19 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 200 μ L.....	67
Figura 20 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 500 μ L.....	68
Figura 21 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 1.....	68
Figura 22 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 2.....	69
Figura 23 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 5.....	69
Figura 24 - Gráfico de Pareto para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	72
Figura 25 - Gráficos de contorno para influência do pH e do tempo de aquecimento sobre o percentual de gelatina dissolvida quando se utilizou 40% (m/m) de frutose.....	73
Figura 26 - Gráficos de contorno para influência do pH e do tempo de aquecimento sobre o percentual de gelatina dissolvida quando se utilizou 100% (m/m) de frutose.....	74
Figura 27 - Gráficos de contorno para influência do pH e da concentração de frutose sobre o percentual de gelatina dissolvida quando a reação foi realizada em 10 minutos.....	75

Figura 28 - Gráficos de contorno para influência do pH e da concentração de frutose sobre o percentual de gelatina dissolvida quando a reação foi realizada em 60 minutos.....	75
Figura 29 - Curvas de degradação térmica das microesferas reticuladas com glutaraldeído (amostra GBG03).....	79
Figura 30 - Curvas de degradação térmica das microesferas reticuladas com frutose (amostra AF).....	79
Figura 31 - Aspecto visual das amostras GBG03 e AF.....	81
Figura 32 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra AF com aumento de 50X.....	81
Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra AF com aumento de 500X e detalhe da superfície com aumento de 5000X.....	82
Figura 34 - Gráfico de Pareto para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	87
Figura 35 - Superfície de resposta para tempo em função do tipo de reticulante para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	88
Figura 36 - Superfície de resposta para tipo de reticulante em função de sua concentração para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	89
Figura 37 - Superfície de resposta para pH em função do tipo de reticulante para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	89
Figura 38 - Gráficos de contorno do planejamento de experimentos utilizando glicose como reticulante para pH em função da concentração de reticulante com tempo de aquecimento de 10 minutos (a), tempo de aquecimento de 20 minutos (b) e tempo de aquecimento de 30 minutos.....	91

Figura 39 - Testes de solubilidade em água para amostras reticuladas com genipina, EDC, frutose e glutaraldeído.....	93
Figura 40 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com genipina ou frutose.....	95
Figura 41 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com EDC ou frutose.....	96
Figura 42 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com glutaraldeído ou frutose.....	97
Figura 43 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com genipina, EDC, glutaraldeído ou frutose.....	97
Figura 44 - Aspecto visual de microesferas à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM).....	101
Figura 45 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina e frutose (AF) com aumento de 1500X.....	102
Figura 46 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina e frutose (AF) com aumento de 20000X.....	102
Figura 47 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM) com aumento de 100X.....	104
Figura 48 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM) com aumento de 500X.....	104
Figura 49 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso (AFM2) com aumento de 1500X.....	105
Figura 50 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso (AFM2) com aumento de 20000X.....	106

Figura 51 - Curva de magnetização da magnetita sólida obtida a partir de sulfato ferroso.....	109
Figura 52 - Curva de magnetização da magnetita sólida obtida a partir de cloreto ferroso.....	109
Figura 53 - Curva de magnetização do fluido magnético à base de magnetita sólida obtida a partir de sulfato ferroso.....	110
Figura 54 - Curva de magnetização do biocompósito AFM (à base de gelatina, frutose e magnetita de sulfato).....	111
Figura 55 - Curva de magnetização do biocompósito AFM2 (à base de gelatina, frutose e magnetita de cloreto).....	111
Figura 56 - Influência do tempo na incorporação de doxorubicina pelas microesferas de gelatina magnéticas e não magnéticas.....	113
Figura 57 - Esquema da ligação da doxorubicina aos terminais glicilglicínicos das cadeias poliméricas de gelatina.....	115
Figura 58 - Influência do campo magnético externo e da presença de magnetita sobre a liberação de doxorubicina (DOX) em função do tempo.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem dos aminoácidos na gelatina (adaptado de GENNADIOS et al., 1994).....	23
Tabela 2 -	Diversidade de parâmetros de preparo das microesferas de gelatina encontrada na literatura.....	24
Tabela 3 -	Efeito da temperatura e do tempo de reticulação da gelatina com frutose em pH 11.....	55
Tabela 4 -	Efeito de alguns parâmetros reacionais na reticulação de gelatina com frutose.....	56
Tabela 5 -	Efeito do pH, tempo de reação e concentração de frutose sobre a propriedade de dissolução em meio aquoso das microesferas de gelatinas obtidas.....	60
Tabela 6 -	Tabela ANOVA para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	61
Tabela 7 -	Réplica dos testes de percentual de dissolução de proteína pelo método do ácido bicincônico.....	65
Tabela 8 -	Variações realizadas no método do ácido bicincônico e resultados de percentual de gelatina dissolvida.....	66
Tabela 9 -	Variações realizadas no método do biureto para determinação de proteínas e resultados de percentual de gelatina dissolvida.....	70
Tabela 10 -	Resultados para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	71
Tabela 11 -	Análise de variância (ANOVA) para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.....	71
Tabela 12 -	Análises termogravimétricas.....	77

Tabela 13 - Determinação de perda de grupos NH ₂	77
Tabela 14 - Fatores e níveis experimentais para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	84
Tabela 15 - Resultados do percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas pelo planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	84
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas pelo planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	85
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) sem efeitos de segunda ordem para percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	86
Tabela 18 - Melhores resultados obtidos com o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.....	92
Tabela 19 - Descrição dos materiais magnéticos sintetizados.....	100
Tabela 20 - Material magnético utilizado no preparo dos biocompósitos.....	100
Tabela 21 - Propriedades magnéticas dos materiais magnéticos sintetizados....	107
Tabela 22 - Propriedades magnéticas dos biocompósitos AFM (à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso) e AFM2 (à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso).....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
DOE	Planejamento de experimentos
DOX	Doxorrubicina
DTG	Derivada da curva de degradação
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
Hc	Campo coersivo
IEP	Ponto isoelétrico
Mr	Magnetização remanescente
Ms	Magnetização de saturação
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
TGA	Análise termogravimétrica
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
T_{maxdeg}	Temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima
T_{onset}	Temperatura de início da degradação
UV	Ultravioleta
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	20
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1	Gelatina.....	22
1.2	Modificação da gelatina.....	25
1.2.1	<u>Carboidratos.....</u>	26
1.2.2	<u>Genipina.....</u>	30
1.2.3	<u>Carbodiimidas.....</u>	32
1.3	Liberção controlada de fármacos.....	33
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo principal.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	Produtos químicos.....	42
3.2	Equipamentos.....	43
3.3	Preparo das microesferas.....	44
3.3.1	<u>Preparo das microesferas de gelatina.....</u>	44
3.3.2	<u>Preparo das microesferas reticuladas com frutose ou glicose.....</u>	44
3.3.3	<u>Preparo das microesferas de gelatin reticuladas com genipina, EDC ou glutaraldeído.....</u>	45
3.4	Síntese do material magnético.....	45
3.4.1	<u>Síntese do cloreto ferroso.....</u>	45
3.4.2	<u>Síntese de magnetita a partir de cloreto ferroso.....</u>	46
3.4.3	<u>Síntese de magnetita a partir de sulfato ferroso.....</u>	46

3.4.4	<u>Fluido magnético.....</u>	46
3.5	Preparo dos biocompósitos magnéticos.....	47
3.6	Preparo das microesferas carregadas com fármaco.....	48
3.7	Liberção in vitro de doxorrubicina.....	49
3.8	Morfologia das microesferas.....	49
3.9	Propriedades magnéticas.....	50
3.10	Análises termogravimétricas.....	50
3.11	Testes de dissolução.....	50
3.11.1	<u>Testes qualitativos de dissolução.....</u>	50
3.11.2	<u>Testes quantitativos de dissolução.....</u>	50
3.11.3	<u>Determinação de concentração proteínas.....</u>	51
3.12	Titulação dos grupos NH2 livres.....	52
3.13	Degradação enzimática.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Testes preliminares.....	53
4.2	Utilização de frutose como agente de reticulação.....	58
4.2.1	<u>Técnica do ácido bicincônico (BCA).....</u>	59
4.2.2	<u>Técnica do reagente de biureto.....</u>	66
4.2.3	<u>Análises complementares.....</u>	76
4.2.4	<u>Comparação das propriedades das amostras reticuladas com frutose (AF) com as amostras reticuladas com glutaraldeído (GBG03).....</u>	78
4.2.5	<u>Morfologia da amostra AF.....</u>	80
4.3	Utilização de glicose como agente de reticulação	83
4.4	Estudo comparativo da utilização de genipina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), glutaraldeído e frutose como agentes de reticulação.....	92

4.4.1	<u>Solubilidade em água</u>	92
4.4.2	<u>Testes de degradação enzimática</u>	94
4.5	Preparo dos biocompósitos	99
4.5.1	<u>Morfologia dos biocompósitos</u>	100
4.5.2	<u>Propriedades magnéticas</u>	106
4.6	Incorporação e liberação in vitro de doxorrubicina (DOX)	113
	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS	119

INTRODUÇÃO

Sistemas para liberação e transporte controlados de fármacos são temas de pesquisas nas áreas de medicina, farmácia e química. É muito importante e necessário que estas pesquisas avancem porque são excelentes alternativas ao tratamento que utiliza fármacos quimioterápicos, especialmente fármacos anticancer.

Quando partículas (nano e microesferas, fibras ou implantes) carregadas com fármacos são direcionadas para as células ou tecidos alvo, há a diminuição dos efeitos adversos e da toxidez do fármaco enquanto sua eficácia aumenta (CUKIERMAN e KHAN, 2010; MUNIYANDY et al., 2004; ROULLIN et al., 2002). Partículas poliméricas têm sido utilizadas frequentemente para produzir esses materiais, especialmente microesferas, por possuírem pequenos tamanhos e alta eficiência no transporte de moléculas (JASPREET et al., 2003). Um dos polímeros mais populares para este fim é a gelatina, por causa da sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade, baixo custo, inúmeros grupos funcionais ativos para fazer ligações com moléculas de fármaco, além de fácil utilização em formulações parenterais (KHAN et al., 2014; LEE et al., 2013; LEO et al., 1997; RATHNA, 2008; SANTORO et al., 2014).

Entretanto, por apresentar solubilidade em água, a gelatina precisa ser modificada para ser utilizada em dispositivos biomédicos. Esta modificação envolve uma reação de reticulação para conectar as cadeias proteicas de gelatina e, assim, diminuir sua solubilidade. Para este propósito, muitos estudos utilizam glutaraldeído como agente de reticulação (DINARVAND et al., 2005; GAIHRE et al., 2009; RAO et al., 2015) porque este reagente é de fácil obtenção, é de baixo custo e reticula a gelatina rapidamente e com grande eficácia (KHOR, 1997). No entanto, a biodegradação da gelatina reticulada com glutaraldeído pode causar citotoxicidade e efeitos adversos (LIEN et al., 2008).

Diferentes métodos de reticulação química da gelatina têm sido reportados na literatura a fim de minimizar a toxidez associada aos agentes de reticulação (ADHIRAJAN et al., 2007; CORTESI et al., 1998; LIEN et al., 2008; SCHULER, 2004; SIIMON et al., 2015). Com este objetivo, nesta Tese foram avaliados frutose,

glicose, genipina e 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) como agentes de reticulação.

Outra propriedade que deve ser observada nos sistemas de liberação controlada de fármacos é como os mesmos são transportados até as células alvo. É importante que as partículas que contêm o fármaco entrem em contato com o tecido doente tão rápido quanto possível e que atravessem o menor caminho com o objetivo de evitar que a carga farmacêutica seja liberada em local indesejado. Uma das formas de se obterem estas propriedades é incorporar material magnético à partícula carreadora de fármaco. Por essa razão, magnetita foi utilizada no preparo dos biocompósitos produzidos nesta Tese.

O fármaco escolhido para a aplicação dos biocompósitos foi a doxorrubicina. Este fármaco é utilizado contra uma variedade de doenças malignas (COUKELL e SPENCER, 1997) e, como outros quimioterápicos, é muito tóxico (FAN e DASH, 2001) e precisa ser direcionado com exatidão e rapidez ao tecido que precisa ser tratado a fim de evitar toxidez em tecidos saudáveis.

A presença de grupos funcionais como amina ($-NH_2$) e carboxila ($-COOH$) faz da gelatina um candidato adequado para se ligar com fármacos como doxorrubicina e formar um conjugado fármaco-polímero (LEO et al., 1997).

Apesar de a aplicação de magnetita em microesferas de gelatina para liberação controlada de doxorrubicina já ter sido reportada na literatura, a avaliação dos reticulantes frutose, glicose, genipina e EDC como alternativa menos citotóxica ainda não foi estudado. Também não foi reportado até a presente data, a influência de diferentes campos magnéticos externos sobre a liberação da molécula de doxorrubicina. Dessa forma, o objetivo desta Tese é desenvolver um sistema carreador de doxorrubicina à base de gelatina que seja magneticamente controlado e que seja reticulado com uma molécula menos citotóxica que o convencional glutaraldeído.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Gelatina

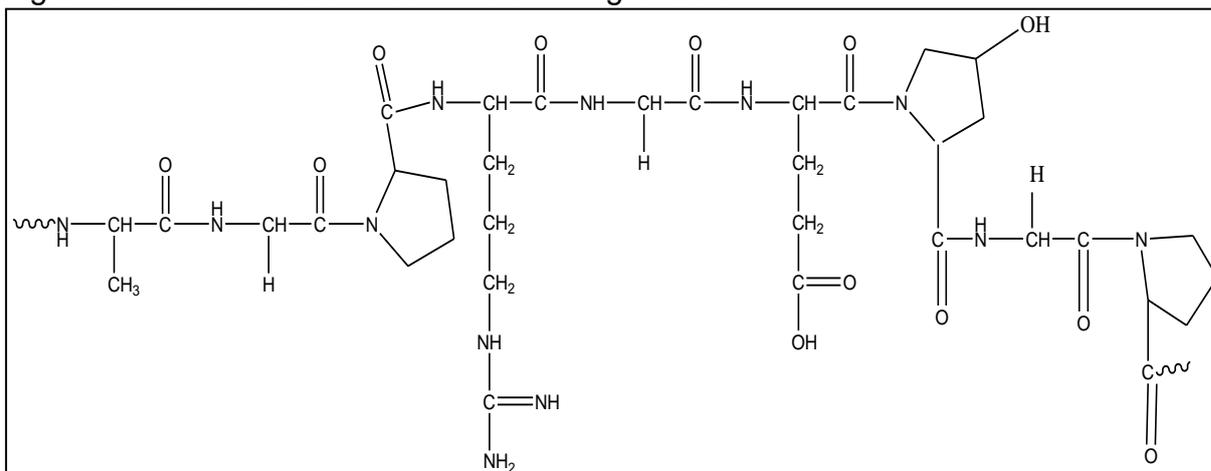
Gelatina é um polímero vítreo parcialmente cristalino e altamente hidrofílico (MAMANI, 2004) obtido da hidrólise parcial das cadeias proteicas de colágeno proveniente da pele, ossos, dentes e tecidos conjuntivos de animais.

Os processos de fabricação da gelatina envolvem a destruição total das estruturas terciária e secundária e alguma extensão da estrutura primária do colágeno (FERNANDEZ-DIAZ et al., 2001). Comercialmente, a gelatina é fabricada por dois diferentes processos: hidrólise ácida e hidrólise básica. A gelatina obtida via hidrólise ácida (gelatina tipo A) utiliza matéria-prima suína e necessita de um pré-tratamento com ácido diluído por um período de três dias. A gelatina obtida via hidrólise básica (gelatina tipo B) é fabricada utilizando-se matérias-primas de origem bovina que são lentamente hidrolisadas. Após a etapa principal de extração da gelatina, há etapas posteriores de purificação, controle de qualidade, esterilização e secagem.

Modificando-se os parâmetros experimentais destes dois processos de fabricação (pH, temperatura, tempo de extração, e tipo de colágeno) há a possibilidade de obtenção de gelatinas com inúmeras diferenças em termos de qualidade, geleificação, massa molar e ponto isoelétrico. Por conta disso, os fabricantes oferecem grande variedade de gelatinas com diversas possibilidades de aplicação.

A proporção e a sequência dos aminoácidos encontrados em uma cadeia polimérica de gelatina geralmente variam em função da fonte de matéria-prima e do tipo de pré-tratamento aplicado ao colágeno. Contudo, a gelatina é formada por uma sequência de 18 diferentes aminoácidos e sua estrutura básica é apresentada na Figura 1. Apesar do elevado número de aminoácidos presentes em sua estrutura, sempre há uma predominância dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina (MAMANI, 2004). A Tabela 1 mostra como a composição de aminoácidos varia nos dois tipos de gelatina.

Figura 1 - Unidade básica das cadeias de gelatina.



Fonte: HATHOUT; OMRAN, 2016.

Tabela 1 - Porcentagem dos aminoácidos na gelatina (adaptado de GENNADIOS et al., 1994).

Aminoácido	Tipo A*	Tipo B*
Lisina	2,7	2,8
Histidina	0,4	0,4
Arginina	4,9	4,8
Ácido aspártico	4,5	4,6
Treonina	1,8	1,8
Serina	3,5	3,3
Ácido glutâmico	7,3	7,2
Prolina	13,2	12,4
Glicina	33,0	33,5
Alanina	11,2	11,7
Valina	2,6	2,2
Metionina	0,4	0,4
Isoleucina	1,0	1,1
Leucina	2,4	2,4
Tirosina	0,3	0,1
Fenilalanina	1,4	1,4
Hidroxiprolina	9,1	9,3
Hidroxilisina	0,6	0,4

*Número de resíduos de aminoácidos em base a 100 resíduos totais.

Fonte: O autor, 2017.

Fisicamente, as cadeias de gelatina são positivamente carregadas em 13% do seu total por causa da presença dos aminoácidos lisina e arginina. Por outro lado, cerca de 12% das mesmas cadeias proteicas são negativamente carregadas por

causa da presença dos terminais de ácidos glutâmico e aspártico (HATHOUT; OMRAN, 2016). Estas natureza e estrutura únicas tornam a gelatina um biopolímero adequado para realizar ligações químicas com uma ampla variedade de moléculas, inclusive fármacos. Estas características aliadas a propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade faz da gelatina candidata promissora para a aplicação em materiais biomédicos.

Dispositivos biomédicos à base de gelatina podem ser fabricados das mais variadas formas: fibras (RUJITANAROJA; PIMPHAB; SUPAPHOL, 2008), microesferas (CORTESE et al., 1999; GOHEL et al., 2005), filmes (BIGI et al., 2002), membranas (LAI; LI, 2011), esponjas (ULUBAYRAM et al., 2002), etc) e para diferentes aplicações na liberação controlada de fármacos (ADHIRAJAN et al., 2007; CHOUBEY; BAJPAI, 2010; CORTESE et al., 1999, SAMAD et al., 2009; WU et al., 1995), engenharia de tecidos (LI et al., 2006), veículo para entrega genética (TRUONG-LE et al., 1999), etc.

Entre as diversas possibilidades da aplicação de gelatina em biotecnologia, destaca-se a utilização de microesferas para transporte e liberação controlada de substâncias farmacologicamente ativas. De acordo com Souza (2012), as microesferas normalmente são fabricadas pela técnica de reticulação de uma solução aquosa de gelatina em emulsão água-em-óleo, mas os parâmetros de preparo variam muito na literatura encontrada como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 - Diversidade de parâmetros de preparo das microesferas de gelatina encontrada na literatura.

Autor	Ano de publicação	Conc. gelatina (m/v)	FA/FO	Velocidade (rpm)	Temperatura (°C)
Habraken	2009	10	1/5	500	60
Samad	2009	20	1/4	2000	40
Cortesi	1998	15	1/20	-	80
Lu	2007	25	4/75	420	70
Liang	2003	25	1/5	-	50
Plichta	1994	20	-	-	60
Vandelli	2001	30	1/2	800	60
Saravanan	2008	21,5	4/57	10000	60

Fonte: SOUZA, 2012.

Legenda: FA/FO = razão fase aquosa/fase oleosa.

1.2 Modificação da gelatina

Por causa da alta solubilidade da gelatina em meio aquoso na temperatura corpórea, suas cadeias poliméricas precisam ser reticuladas por meio da formação de ligações cruzadas entre elas para que sua aplicabilidade seja viável em sistemas biológicos.

Agentes de reticulação química são utilizados muito frequentemente para esta finalidade. Estas substâncias são compostos bifuncionais ou polifuncionais que atuam ligando-se a grupamentos carboxílicos ou amino de moléculas adjacentes da gelatina. Exemplos deste tipo de reticulador incluem: formaldeído, glutaraldeído, gliceraldeído, iminas, cetonas, sacarídeos, corantes, carbonato de cálcio, carbodiimidaz, genipina e outros compostos bifuncionais (ADHIRAJAN et al., 2007; CHOUBEY; BAJPAI, 2010; GAIHRE et al., 2009; LIEN; TE LI; HUANG, 2008; MADHUSUDANA RAO et al., 2015; MO et al., 2000; SIIMON, K.; SIIMON, H; JARVEKULG, 2015; ULUBAYRAM et al., 2002; URANGA et al., 2016).

Apesar da grande variedade de substâncias com alto potencial de utilização como agente reticulador de gelatina, glutaraldeído é um dos reticulantes mais utilizados para este fim. Glutaraldeído é atrativo por ser um reagente barato, amplamente disponível e reticula tecidos e cadeias proteicas com rapidez e eficácia (KHOR, 1997). Entretanto, a biodegradação de partículas de gelatina reticuladas com glutaraldeído podem ocasionar a liberação de moléculas de reticulante no interior do corpo humano e ocasionar efeitos adversos, pois glutaraldeído possui propriedades citotóxicas (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014; LIEN; TE LI; HUANG, 2008).

Com o objetivo de evitar a citotoxicidade causada pelo glutaraldeído, inúmeros trabalhos de pesquisa de dispositivos biomédicos são encontrados na literatura utilizando agentes de reticulação alternativos (ADHIRAJAN; SHANMUGASUNDARAM; BABU, 2007; CORTESI; NASTRUZZI; DAVIS, 1998; LIEN; TE LI; HUANG, 2008; SCHULER, 2004; SIIMON, K.; SIIMON, H; JARVEKULG, 2015; URANGA et al., 2016). Os mais comuns são:

1.2.1 Carboidratos

Alguns autores utilizaram sacarídeos como alternativa de agentes de reticulação de proteína.

Galactose, sendo o açúcar com estrutura análoga a do glutaraldeído, tem grande potencial para as reações de reticulação da gelatina. Este sacarídeo foi estudado em 2001 e 2002 por Schoevaart e Kieboom para a reticulação de proteínas. Os autores utilizaram galactose oxidada por oxigênio molecular catalisada pela enzima D-galactose oxidase. Eles concluíram que a galactose, nestas condições, apresenta propriedades semelhantes às do glutaraldeído e que a reticulação de proteínas pode ser bem-sucedida a partir de produtos bicíclicos oriundos da oxidação da galactose.

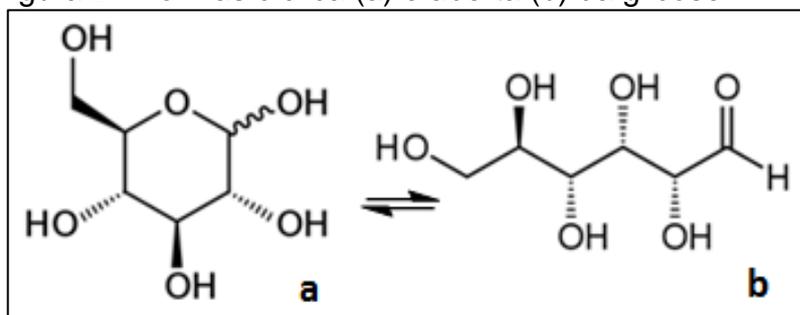
Lactose, um açúcar de fácil obtenção, também foi utilizado por alguns pesquisadores na tentativa de reticulação de gelatina. O primeiro relato com este objetivo foi reportado em 1993 por Venkatachalam et al., que conseguiram induzir a reticulação em determinada extensão em proteínas do leite (VENKATACHALAM et al. 1993). Já Wijk et al (2006) estudaram os derivados da oxidação enzimática da lactose como potenciais agentes de reticulação. Chegaram à conclusão de que os compostos aldeídicos obtidos a partir da lactose resultam em produtos estáveis em condições alcalinas e neutras após sua reação com proteínas via reação de Maillard. Bhat e Karim (2014) prepararam e caracterizaram filmes de gelatina reticulados com lactose ou ribose combinados com irradiação de luz ultravioleta.

A utilização de sacarose foi descrita por Cortesi et al. (1998), Schuler (2004), Gohel et al. (2005) e Samad et al. (2009). Esses autores afirmam ter obtido sucesso na reticulação das cadeias proteicas de gelatina com a utilização desse dissacarídeo. No entanto, Souza (2012) afirma que os grupos carbonílicos provenientes das metades glicose e frutose, que compõem a sacarose, não estão disponíveis para realização de reticulação por causa da ligação peptídica existente na molécula. Além disso, Souza (2012) relata que a diminuição da solubilidade como resultado da reticulação das cadeias de gelatina utilizando sacarose na preparação deve ser atribuída à formação de reticulações intramoleculares.

Quando se trata de sacarídeos, glicose e frutose são utilizados com maior frequência. A molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$) contém seis átomos de carbono e um

grupo aldeído e é, conseqüentemente, referida como uma aldo-hexose. Pode existir em uma forma de cadeia fechada (cíclica - Figura 2a) e aberta (acíclica - Figura 2b).

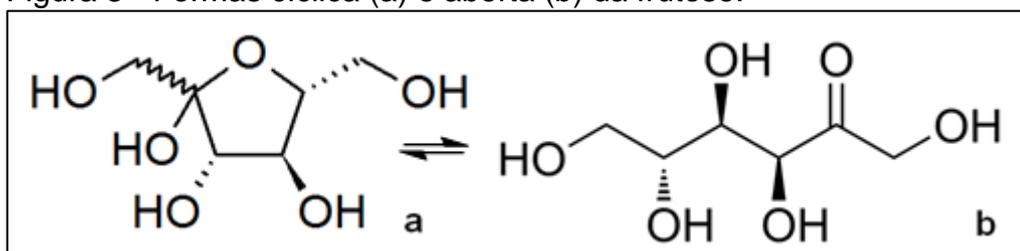
Figura 2 - Formas cíclica (a) e aberta (b) da glicose.



Fonte: O autor, 2017.

A frutose (Figura 3) possui um grupo funcional cetona como grupo característico e, por apresentar 6 carbonos, é considerada uma ceto-hexose.

Figura 3 - Formas cíclica (a) e aberta (b) da frutose.



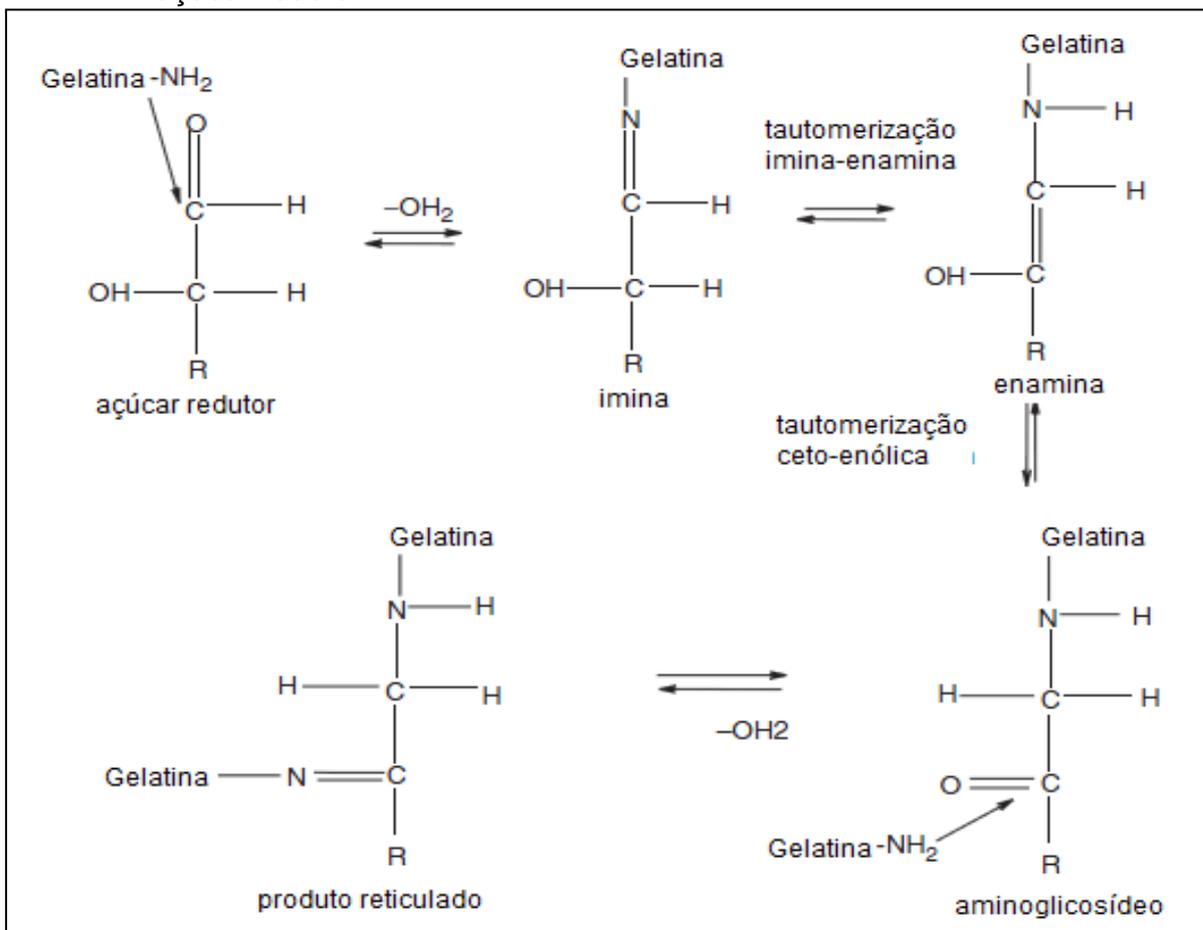
Fonte: O autor, 2017.

Em solução aquosa, tanto para glicose quanto para frutose, a forma cíclica está em equilíbrio com a forma aberta e, em pH ácido ou neutro, a forma cíclica é predominante.

Os grupos funcionais cetona e aldeído provenientes de açúcares redutores, como frutose e glicose, reagem formando ligações covalentes com grupamentos amina das cadeias de gelatina e posteriores ligações cruzadas gerando uma rede polimérica insolúvel (CORTESI et al., 1998; GOHEL et al., 2005; SCHULER, 2004).

O mecanismo envolvido nos processos de reticulação de gelatina por açúcares redutores é descrito por Samad et al. (2009) e pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de reticulação de gelatina por açúcar redutor.



Fonte: adaptado de SAMAD et al. (2009).

Apesar de estes dois açúcares serem moléculas promissoras para a formação de reticulações nas cadeias gelatinosas, são poucos os trabalhos na literatura que os utilizam com este objetivo. Os trabalhos mais recentes utilizando-se glicose como reticulante foram publicados por Siimon, Siimon e Jarvekulg (2015), Lama et al. (2014) e Masutani et al. (2014).

Nanofibras de gelatina termicamente reticuladas com glicose foram preparados por Siimon, Siimon e Jarvekulg (2015). Eles estudaram o efeito da concentração de glicose sobre as propriedades mecânicas das fibras. Concluíram que a reticulação com glicose aumentou consideravelmente o módulo elástico da fibras, o que tornou o material produzido por eles adequado para aplicações biomédicas.

Já Lama et al. (2014) relataram que as nanopartículas de gelatina e colágeno foram satisfatoriamente estabilizadas pelas reticulações formadas pelas moléculas de glicose.

Enquanto Masutani et al. (2014), que também utilizaram glicose como agente reticulador, estudaram os efeitos da radiação ultravioleta sobre a reticulação de matrizes de gelatina com glicose. Os autores concluíram que a utilização da radiação aumenta a estabilidade térmica das partículas e que a adição de glicose aumenta significativamente o grau de reticulação das amostras.

Outras pesquisas mais antigas também utilizaram glicose com a mesma finalidade (reticular a gelatina) para diferentes dispositivos, porém todos com interesse na aplicação na área biomédica (CORTESI; NASTRUZZI; DAVIS, 1998; GHOEL et al., 2005; HIWALE et al., 2011).

Assim como para a glicose, também são poucos os artigos científicos encontrados na literatura que relatam a utilização de frutose como agente de reticulação. As três principais referências estão listadas a seguir.

Cortesi, Nastruzzi e Davis (1998) produziram e examinaram a cinética de dissolução de microesferas e discos de gelatina reticulados com glicose, frutose e sacarose tanto em sua forma nativa quanto na forma oxidada. Os resultados obtidos indicaram que a reticulação acontece de maneira mais efetiva quando o sacarídeo se encontra na forma oxidada. Eles também chegaram à conclusão de que todos os açúcares estudados, quando na forma oxidada, são candidatos adequados para serem utilizados em substituição dos agentes reticulantes sintéticos a fim de reduzir seus efeitos citotóxicos.

Ulubayram et al. (2002) avaliaram glutaraldeído, EDC e frutose como agentes de reticulação para a gelatina. Eles estudaram os efeitos do tipo e da concentração de reticulador sobre as propriedades mecânicas, estabilidade e citotoxicidade de esponjas de gelatina. Ao término de seus experimentos, concluíram que as propriedades mecânicas das esponjas reticuladas não dependem do agente de reticulação, visto que apresentaram propriedades muito semelhantes. No entanto, as amostras reticuladas com frutose apresentaram degradação mais rápida que as amostras reticuladas com os demais reticulantes nas condições estudadas.

Schuler (2004) formulou matrizes à base de gelatina utilizando frutose e sacarose como reticulantes com o objetivo de aplicá-las em sistemas para liberação controlada de fármacos. As matrizes preparadas demonstraram performance aceitável de inchamento e erosão quando se utilizaram 15,8% de frutose.

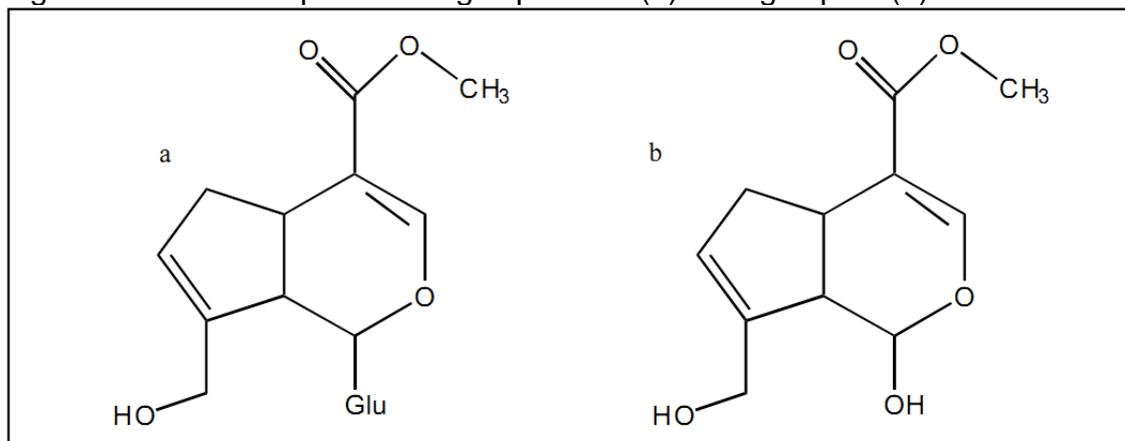
Comparando-se com matrizes não reticuladas, as formulações que continham frutose apresentaram melhores comportamentos de inchamento e erosão.

Por causa do seu alto potencial como reticulante, baixo custo, ampla disponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e, além disso, ter sido pouco explorado na literatura, nesta Tese glicose e frutose serão estudadas como possíveis reticulantes para microesferas de gelatina para liberação controlada de doxorubicina.

1.2.2 Genipina

A genipina (Figura 5b) é um iridóide derivado do geniposídeo (Figura 5a), que pode ser extraída do fruto do jenipapo (*Genipa americana*) ou do fruto da Gardênia (*Gardenia Jasminoide Ellis*). Os iridóides são monoterpenos caracterizados por possuírem em sua estrutura básica o esqueleto ciclopentano-pirano.

Figura 5 - Estrutura química do geniposídeo (a) e da genipina (b).



Fonte: O autor, 2017.

É um excelente agente de reticulação para proteínas, colágeno, gelatina e quitosana, mas suas principais aplicações são na medicina popular oriental, por causa de sua acentuada propriedade antiinflamatória e para a fabricação de corantes, pois sua reação espontânea com aminoácidos produz um pigmento azul muito utilizado na indústria alimentícia. Baseado em seu uso tanto na medicina tradicional chinesa quanto no ramo alimentício, que data de muitos séculos, pode-se

afirmar que sua utilização é segura para o sistema biológico humano e que possui baixa citotoxicidade.

O mecanismo de reação de reticulação da gelatina pela genipina se dá quando a molécula de genipina se liga a um grupo amino terminal da gelatina formando uma amida secundária e uma ligação amino heterocíclica (CUI et al., 2013). Este mecanismo não havia sido totalmente elucidado até 2013. Mesmo assim, vários autores obtiveram sucesso na reação de reticulação de partículas à base de gelatina utilizando genipina como reticulante. Diferentemente do que ocorre com os sacarídeos, há um elevado número de publicações relatando resultados experimentais da utilização da genipina como reticulante. Grande parte destes trabalhos teve como objetivo substituir o glutaraldeído (por conta da já fortemente evidenciada baixa citotoxicidade da genipina).

Pode-se encontrar na literatura a aplicação de genipina para a fabricação de dispositivos à base de gelatina tanto na forma de filmes (AMADORI et al., 2015; BIGI et al., 2002; Ma et al., 2013), quanto na forma de microesferas (LIANG et al., 2002; DE CLERCQ et al., 2016), como na forma de hidrogéis (NICKERSON et al., 2006; CUI et al., 2014), microcápsulas (CHEN et al., 2010), discos (YAO, 2004), estruturas para engenharia de tecidos (DEL GAUDIO et al., 2013; LIEN, LI; HUANG, 2008; TETI et al., 2013; ULUBAYRAM et al., 2002), entre outras.

Independente da formulação ou dos parâmetros experimentais, as conclusões de várias pesquisas convergem para a afirmação de que a genipina é um ótimo reticulante para a gelatina e o dispositivo final apresenta excelente biocompatibilidade.

Dentre os trabalhos que já utilizaram dispositivos à base de gelatina e genipina para liberação controlada de fármacos, segundo Liang et al. (2003), as microesferas de gelatina reticuladas com genipina podem ser utilizadas como sistemas portadores de fármacos para a administração intramuscular.

Almeida et al. (2007), utilizaram dispositivos à base de gelatina, quitosana e genipina para liberar timolol para tratamento de glaucoma. Estes dispositivos forneceram uma entrega segura e muito bem controlada do fármaco utilizado. Sendo assim, genipina foi utilizada com sucesso na reticulação da gelatina.

Choubey e Bajpai (2010) observaram que a liberação de doxorubicina aumenta até um limite, quando se utiliza 0,1326 mM de genipina. Valores de

concentração acima deste limite ocasionam diminuição da taxa de liberação do fármaco, pois o maior número de reticulações diminui o grau de inchamento das partículas e dificulta a difusão da molécula bioativa.

Os exemplos supra-citados dão uma mostra de que as pesquisas com genipina já podem ser encontradas na literatura com diversas formas de entrega do fármaco.

1.2.3 Carbodiimidias

Carbodiimidias solúveis em água quando utilizadas em baixas concentrações também podem ser alternativas viáveis para a reticulação de gelatina com a ausência de subprodutos que apresentem toxidez (TOMIHATA; IKADA, 1996). A grande vantagem da utilização deste agente de reticulação é a produção de ligações cruzadas do mesmo tipo das ligações encontradas nas cadeias proteicas da gelatina (ligações amida).

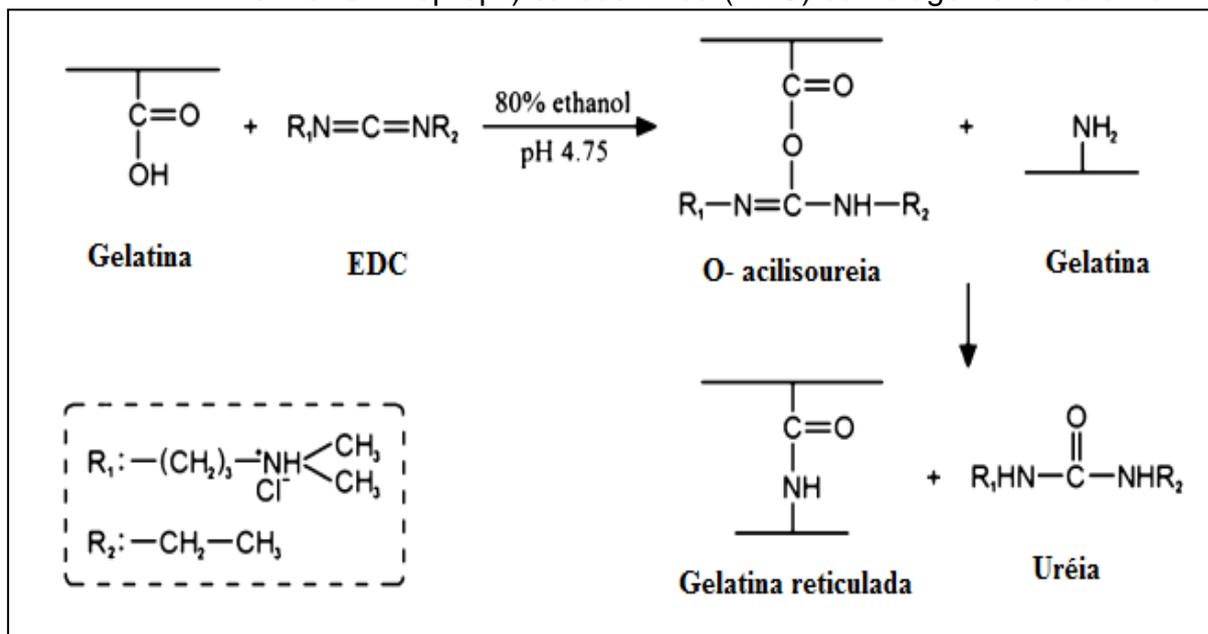
Adhirajan et al. (2007) concluíram que a reticulação da gelatina com a utilização de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) é uma função da concentração e do tempo de reticulação. Além disso, foi observado que o grau de inchamento influencia fortemente o comportamento de liberação das microesferas.

Cristiano et al. (2010) estudaram propriedades térmicas, morfológicas e absorção de água e quanto ao perfil de permeação de p-hidroxiacetanilida (p-HAA) como fármaco modelo de filmes reticulados de gelatina (Gel), caseína (Cas) e a mistura Gel/Cas (1:1, m/m). Os resultados obtidos de grau de reticulação por EDC (de 90,6% para filmes de gelatina e cerca de 70% para filmes de caseína e misturas Gel/Cas (1:1, m/m)) e de permeação de p-HAA através dos filmes indicaram que os dispositivos têm liberação controlada do fármaco principalmente pelo mecanismo de difusão.

Lai e Li (2011) utilizaram com sucesso EDC como agente reticulante para gelatina e concluíram que esta substância é adequada para a fabricação de bioadesivos e carreadores de fármacos até uma concentração de 0,1 mmol EDC/mg de microesferas de gelatina.

O processo de reticulação da gelatina com a utilização de EDC pode ser visto na Figura 6.

Figura 6 - Processo de reticulação de gelatina utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente reticulante.



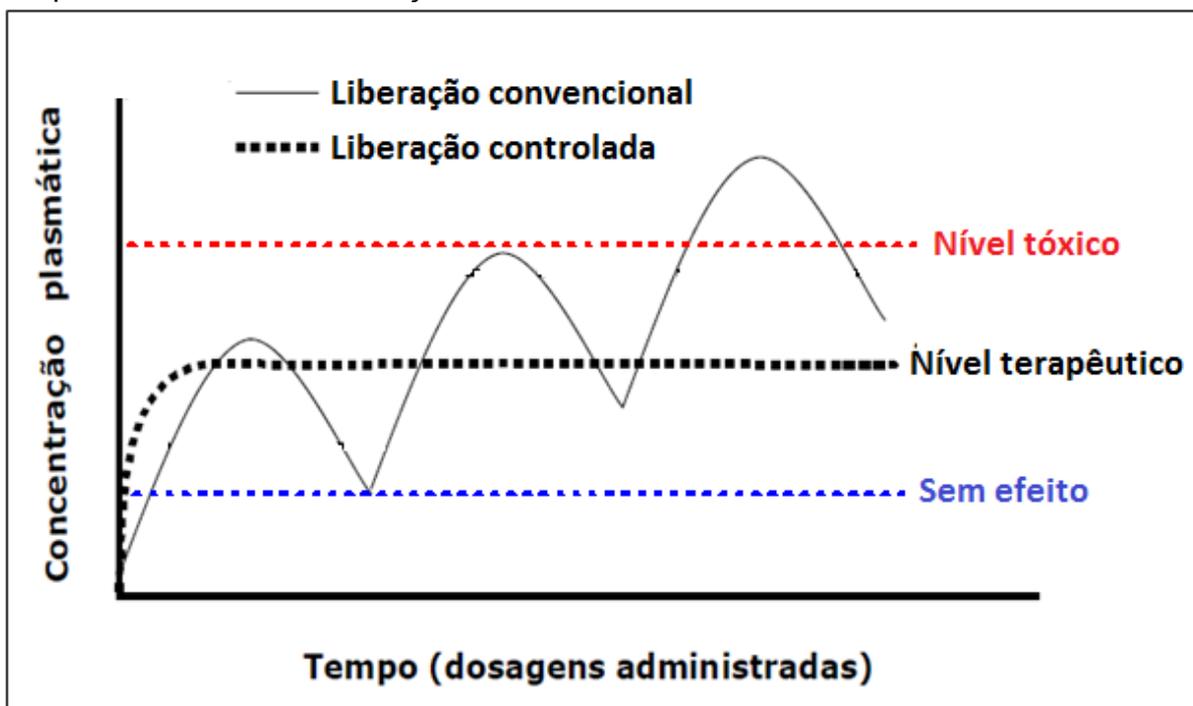
Fonte: Adaptado de Lai e Li (2011).

1.3 Liberação controlada de fármacos

Quando há a necessidade de administração de um fármaco, independente de sua origem ou finalidade, o objetivo principal dessa administração é que a concentração do fármaco seja maximizada no tecido alvo para que o tratamento da doença seja efetivo e, também, para que os efeitos adversos sejam mínimos.

Na realidade, a maior parte do fármaco que entra em contato com o sistema biológico é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação. Por estes motivos, para que haja êxito, o tratamento deverá ser feito de forma a seguir dosagens precisas e frequentes, em horários específicos pré-determinados. Mesmo com todos estes cuidados que devem ser seguidos pelos pacientes, a concentração do fármaco no plasma sanguíneo oscila entre níveis tóxicos e ineficazes. Sendo assim, o objetivo de um sistema de liberação controlada de fármacos é manter uma concentração constante da molécula bioativa no sangue ou tecido-alvo. A Figura 7 mostra um esquema comparativo entre o sistema convencional e o de liberação controlada.

Figura 7 - Esquema comparativo dos perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x liberação controlada.



Fonte: AZEVEDO, 2005.

Como se observa na Figura 7, há uma grande oscilação nos níveis do fármaco quando se utilizam os métodos mais conhecidos. Nesse caso, o medicamento percorre um grande caminho até chegar ao tecido-alvo e, ao chegar, grandes picos no nível do fármaco são observados a cada dose administrada. Quando o fármaco é administrado com dispositivos de liberação controlada, há uma constante liberação do medicamento, permanecendo constante entre o máximo e mínimo desejado por um longo período de tempo e, conseqüentemente, impossibilitando, dessa forma, inefetividade ou toxicidade.

Além de manter o fármaco dentro da concentração desejada, outro importante objetivo dos sistemas de administração controlada de fármacos a fim de minimizar os efeitos adversos. Outras vantagens dos sistemas de liberação controlada sobre os métodos convencionais incluem:

- Diminuição da frequência da administração do medicamento e maior tempo de permanência na circulação;
- A liberação sustentada pode conduzir a uma baixa dosagem do fármaco, que é importante quando se lida com medicamentos que têm efeitos colaterais significativos ou toxicidade;

- A colaboração do paciente pode ser melhorada com administração segura e conveniente;
- Fármacos com alto metabolismo de primeira passagem pelo fígado ou desativação pelo trato gastrointestinal podem ser efetivamente utilizados;
- Direcionamento a alvos específicos com possibilidade de se incorporarem substâncias hidrofílicas e lipofílicas, em determinados sistemas.

Materiais de naturezas diversas têm sido utilizados como suportes de sistemas de liberação controlada. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados.

Com o advento dos materiais poliméricos, surgiram os primeiros sistemas de liberação modificada. Em 1952, surgiu uma das primeiras formas farmacêuticas de ação prolongada, o Spansule^R, da empresa Smithkline Beecham. O medicamento consistia de uma cápsula gelatinosa dura, contendo vários revestimentos, que permitia a liberação do fármaco por um tempo prolongado (MOLINA, 2010).

Com o grande número de vantagens que os sistemas de liberação controlada apresentam, surgiu um grande número de pesquisas e, como consequência, a partir da década de 80, vários dispositivos comerciais para a liberação controlada de fármacos foram desenvolvidos por pesquisadores na Europa, Japão e Estados Unidos (HOLLAND; TGHE, 1986, LANGER; PEPPAS, 1981, PITT, 1990).

A primeira geração de sistemas para liberação controlada de fármacos (1950-1980) teve seu foco na liberação sustentada por via oral e transdérmica e no estabelecimento de mecanismos controlados de liberação de fármaco. A 2ª geração (1980-2010) foi dedicada ao desenvolvimento de sistemas de liberação auto-regulados a longo prazo e sistemas de distribuição baseados em nanotecnologia (PARK, 2014).

Hoje em dia são dezenas de produtos que já se encontram disponíveis para comercialização. Os principais são para liberação de moléculas contraceptivas, por exemplo:

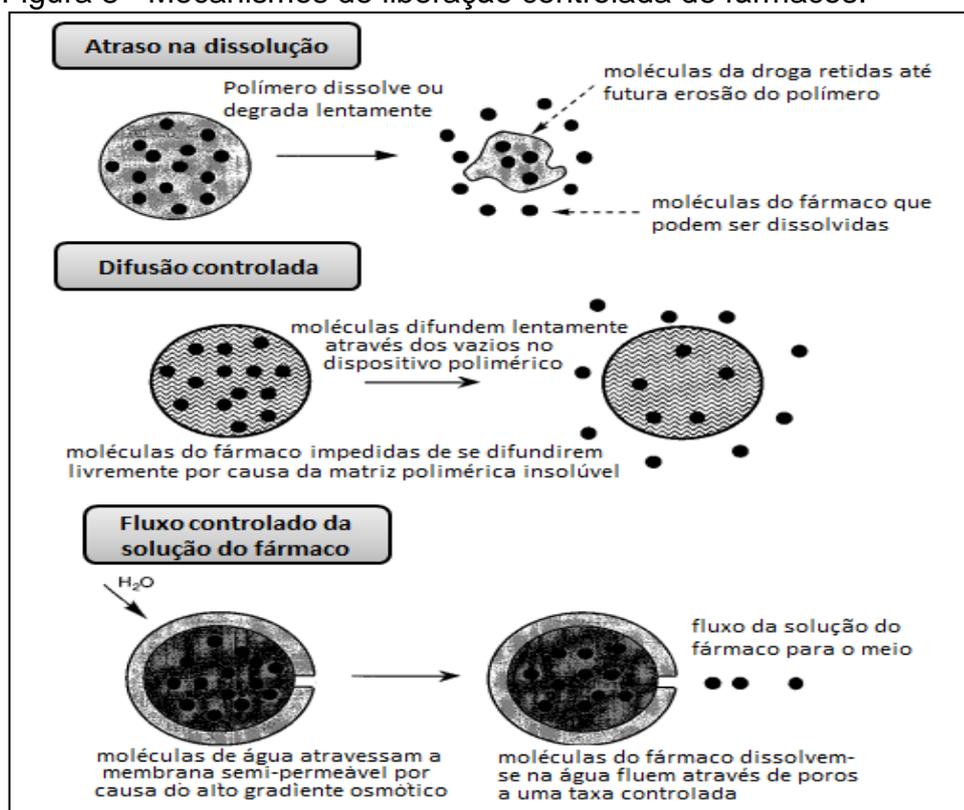
- implantes de reservatórios subdérmicos compostos de polímeros não degradáveis que liberam o fármaco por 5 anos;
- implantes subdérmicos ou microesferas injetáveis compostas de materiais biodegradáveis, tais como copolímeros à base de ácidos lático e glicólico, policaprolactonas ou colesterol;

- anéis vaginais, que são sistemas de reservatório de silicone usados por períodos de tempo que variam de um mês a seis meses.

O desenvolvimento destes dispositivos teve início com o uso de polímeros não biodegradáveis (em sua maioria sintéticos), nos quais a liberação depende do processo de difusão, e subseqüentes progressos levaram ao uso de polímeros biodegradáveis, onde predomina o mecanismo de liberação controlada pelo intumescimento ou erosão (MOLINA, 2010).

A liberação do fármaco pode ser feita por três principais mecanismos: atraso na taxa de dissolução das moléculas do fármaco, inibição da difusão do fármaco do interior para o exterior do dispositivo ou controle do fluxo da solução do fármaco (UHRICH et al., 1999) (Figura 8).

Figura 8 - Mecanismos de liberação controlada de fármacos.



Fonte: Adaptado de UHRICH et al.(1999).

De acordo com Yadav e Varshney (2013), frequentemente verifica-se a utilização de microesferas como suporte para os dispositivos de liberação controlada. Segundo os mesmos autores, as microesferas podem ser:

- Bioadesivas: adesão do dispositivo diretamente na membrana de mucosas, tais como retal, nasal, bucal e ocular. Estes tipos de microesferas têm longo tempo

de permanência no local de aplicação e produz ação terapêutica em parte específica do corpo.

- Magnéticas: microesferas portadoras de partículas magnéticas que liberam o fármaco à medida que são estimuladas por campo magnético externo.
- Flutuantes: são microesferas de menor densidade que o fluido estomacal e permanecem flutuando no interior do estômago. Dessa forma, a liberação do medicamento se dá de forma gradativa e com taxas controladas.
- Radioativas: são injetadas nas artérias que conduzem aos tumores. Nestas condições, as microesferas radioativas podem entregar alta dose de radiação para as áreas específicas e que não danificam os tecidos saudáveis.

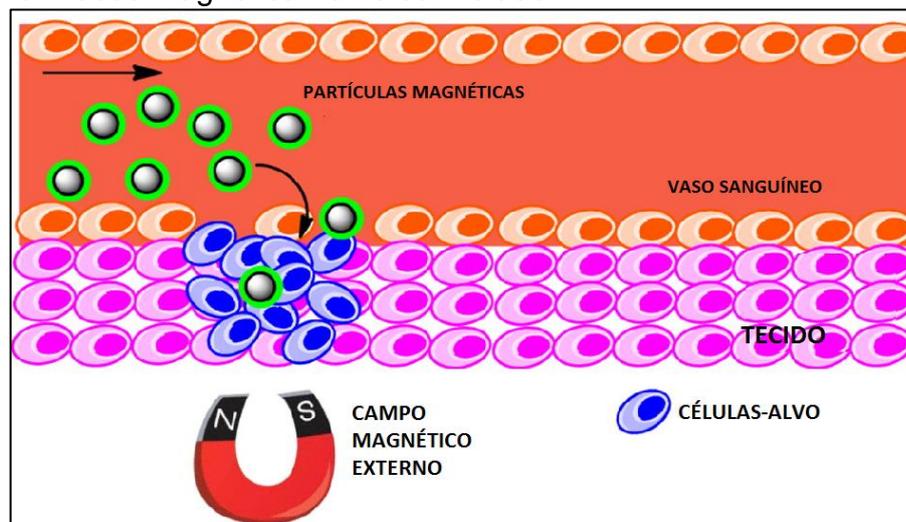
O fármaco pode ser incorporado nas microesferas durante a sua síntese ou depois da formação das microesferas. A incorporação *in situ* só pode ser utilizada para fármacos que não são afetados pelos parâmetros de preparo das microesferas (temperatura, solventes, agentes de reticulação etc), caso contrário, o medicamento somente poderá ser adicionado ao suporte a partir das microesferas pré-formadas.

A utilização de material magnético em matrizes poliméricas para liberação controlada aumenta a eficiência do método porque permite uma maior facilidade no direcionamento das partículas até alvos específicos, o que proporciona maior eficiência terapêutica e menor frequência de efeitos adversos (LOKWANI, 2011).

A liberação controlada de fármacos utilizando microesferas magnéticas foi descrita pela primeira vez por Widder et al. (1979), que utilizaram um transportador de fármacos biodegradável capaz de ser direcionado *in vivo* ao local desejado por meio de campo magnético externo.

Na terapia de câncer onde o transporte de fármacos é magneticamente controlado, um agente citotóxico é ancorado a nanopartículas magnéticas biocompatíveis (biocompósitos). O conjunto fármaco-biocompósito é injetado no paciente via sistema circulatório. Conhecendo bem o sistema circulatório é possível, com auxílio de um campo magnético externo, concentrar o complexo em alvos específicos no organismo quando as partículas entram em contato com o fluxo sanguíneo (Figura 9). Uma vez que o biocompósito se encontra no local desejado, o fármaco é liberado por atividade enzimática, mudanças no pH, na temperatura ou no campo magnético e ataca as células tumorais.

Figura 9 - Esquema hipotético de um sistema de entrega de fármacos magneticamente controlado.



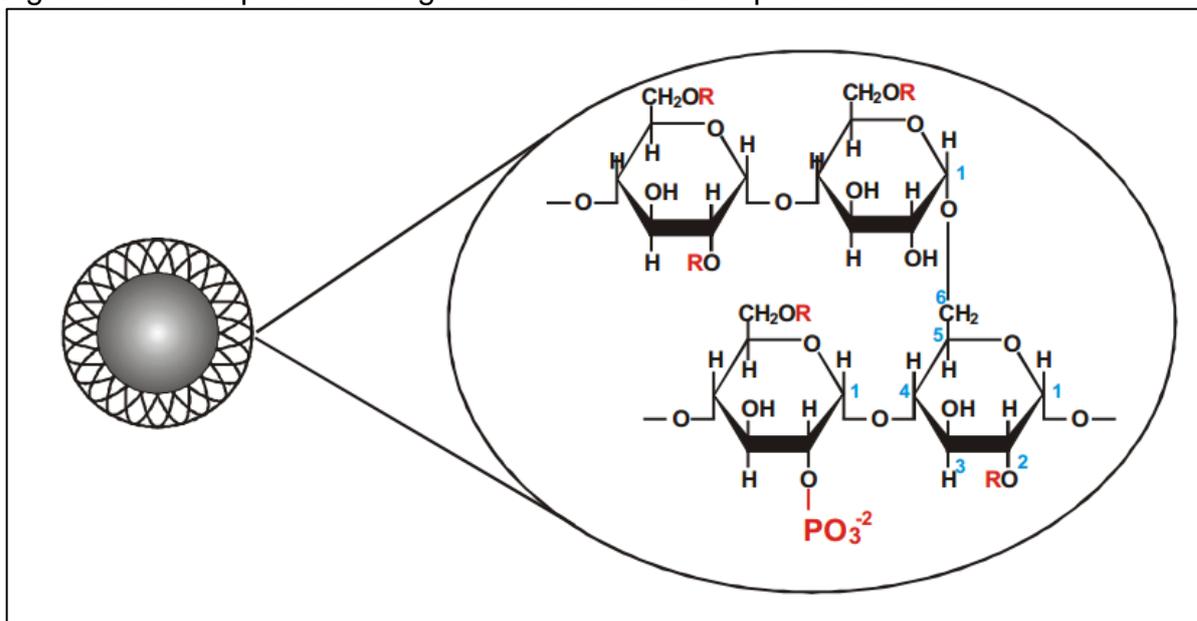
Fonte: WU et al., 2015.

Até 2003, poucos eram os estudos de entrega magnética de fármacos em humanos (PANKHURST et al., 2003). Um destes estudos foi realizado por Lübbe et al. (1996) que obtiveram resultados que demonstraram boa tolerância na aplicação de ferrofluidos em 14 pacientes. Eles verificaram que o ferrofluido foi direcionado aos tecidos alvo sem que houvesse toxicidade.

Posteriormente, pesquisas clínicas foram realizadas pela FeRx Inc. onde sistemas carreadores de fármacos à base de ferro metálico e carvão ativado foram testados no tratamento de tumores de fígado (ARRUEBO et al., 2007).

Atualmente, já há disponíveis dispositivos magnéticos para liberação controlada que são comercializados. Como exemplo, Chemicell comercializa nanopartículas magnéticas do tipo casca-núcleo que contêm um núcleo de magnetita e uma casca de amido com terminais catiônicos que podem ser facilmente trocados por fármacos positivamente carregados (Figura 10).

Figura 10 - Nanopartícula magnética comercializada por Chemicell.



Fonte: CHEMICELL, 2014.

Um dos fármacos mais estudados na atualidade para liberação controlada é a doxorrubicina (DOX). A doxorrubicina é um medicamento quimioterapêutico amplamente utilizado para tratamento do câncer e considerado um dos poucos fármacos a ser encontrado no mercado para comercialização na forma vetorizada (Doxil® / Caelyx®) (OCTAVIA et al., 2012). Conseqüentemente, seus resultados de sucesso e usos superiores fazem dele um dos medicamentos modelo para um alto número de estudos publicados no campo da nanomedicina para modificar sua biodistribuição e liberação e reduzir sua cardiotoxicidade.

Por todos os pontos positivos apresentados, nesta Tese desenvolveu-se metodologia para a preparação e caracterização de microesferas magnéticas à base de gelatina para liberação controlada de doxorrubicina. Além disso, avaliou-se a eficácia dos reticulantes frutose, glicose, genipina e EDC como alternativa menos citotóxica em substituição ao glutaraldeído.

1.4 Doxorrubicina

Segundo a agência reguladora americana de fármacos e alimentos (FDA), a doxorrubicina é um antibiótico da classe das antraciclina.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (NCI), a doxorubicina intercala entre os pares de bases na hélice do ADN, impedindo assim a replicação do ADN e, finalmente, inibindo a síntese de proteínas. Adicionalmente, a doxorubicina inibe a topoisomerase II, o que resulta num complexo enzima-ADN clivável aumentado e estabilizado durante a replicação do ADN e subsequentemente impede a ligação da cadeia nucleotídica após a quebra da cadeia dupla. Estas características conferem à molécula uma potente ação antineoplásica, pois combate rapidamente as células em divisão. A doxorubicina também forma radicais livres de oxigênio, resultando em citotoxicidade secundária à peroxidação lipídica dos lípidos da membrana celular. A formação de radicais livres de oxigênio contribui para a toxicidade deste fármaco aumentando os efeitos adversos, principalmente vasculares cardíacos e cutâneos.

Doxorubicina não é uma molécula que age especificamente nas células tumorais e, por isso, pode afetar o crescimento de muitos outros tipos de células no corpo. A principal consequência é a diminuição do sistema imune do paciente, ocasionando frequentes infecções, fadiga e aumento do tempo de cicatrização.

O maior risco de toxicidade induzida pela doxorubicina é a cardiotoxicidade. Por este motivo, a administração de doxorubicina deve ter dosagem limitada. Embora a cardiotoxicidade seja o maior dos males causados pela presença de doxorubicina nos tecidos saudáveis, também é verificado com frequência citotoxicidade no cérebro, fígado e rins que são associados a este fármaco (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). Por este motivo, é de extrema importância a incorporação de doxorubicina por um dispositivo de liberação controlada de fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Preparar e caracterizar biocompósitos (microesferas) à base de gelatina e magnetita com potencial para utilização em dispositivos biomédicos para liberação magneticamente controlada de doxorubicina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de alguns parâmetros reacionais (tipo de reação, concentração de agente reticulador, concentração de gelatina, pH, temperatura e tempo de reação) sobre a reação de reticulação de gelatina com frutose e glicose;
- Avaliar a eficiência de reticulação de microesferas de gelatina utilizando-se frutose, glicose, genipina e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agentes reticuladores;
- Desenvolver métodos para a determinação da quantidade de gelatina dissolvida em meio aquoso;
- Avaliar a influência de magnetitas preparadas com FeCl_2 , FeSO_4 ou sob a forma de fluido sobre as propriedades das microesferas magnéticas de gelatina;
- Avaliar a influência do tipo de campo magnético sobre a liberação controlada de doxorubicina a partir de microesferas à base de gelatina contendo partículas magnéticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produtos químicos

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e foram utilizados como recebidos. Foram eles:

- Acetona - Vetec Química Fina Ltda;
- Ácido clorídrico - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Cloreto de cálcio - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado, grau analítico - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Cloreto de potássio - Vetec Química Fina Ltda;
- Cloreto de sódio - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Cloridrato de doxorrubicina - Sigma-Aldrich Co;
- Colagenase - Worthington Biochemical Corporation;
- Dihidrogenofosfato de potássio - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) - Sigma-Aldrich Co;
- Frutose P.A. - B. Herzog Varejo de Produtos Químicos Ltda;
- Gelatina tipo B bloom 225 - Sigma-Aldrich Co;
- Genipina - Cayman Chemical Co;
- Glicose P.A. - Vetec Química Fina Ltda;
- Glutaraldeído - Vetec Química Fina Ltda;
- Hidrogenofosfato de sódio - Vetec Química Fina Ltda;
- Hidróxido de amônio - Vetec Química Fina Ltda;
- Hidróxido de sódio P.A. - Vetec Química Fina Ltda;
- Iodeto de potássio - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Kit de determinação de proteínas (ácido bicincônico) - Sigma-Aldrich Co;
- Óleo de milho comercial - Sigma-Aldrich Co;
- Sulfato de cobre - Proquimios Comércio e Indústria Ltda;
- Sulfato de ferro (II) heptahidratado, grau analítico - Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda.

- Tartarato duplo de cobre e potássio - Proquimios Comércio e Indústria Ltda.

3.2 Equipamentos

Com exceção do magnetômetro de amostra vibrante (Universidade Federal de Itajubá - MG) e do microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - RJ), todos os equipamentos utilizados pertencem ao Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os equipamentos utilizados nesta Tese foram:

- Agitador Mecânico IKA, modelo RW 20 digital;
- Analisador Termogravimétrico TA Instruments, modelo Q50 V6 4 Build 193;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AY-220, sensibilidade de 0,1 mg;
- Banho termostatizado Huber, modelo Polystat CC1;
- Centrífuga Fanem, modelo EXCELSA II 2068;
- Espectrofotômetro Fentom, modelo 600S.
- Estufa de esterilização e secagem Icamo, modelo 3;
- Magnetômetro de amostra vibrante Lake Shore série 7400;
- Microscópio eletrônico de varredura analítico de baixo vácuo Carl Zeiss Leo 1450 VPO;
- Microscópio eletrônico de varredura analítico de baixo vácuo Jeol JSM-6490 LV;
- Microscópio ótico Olympus, modelo SZX;
- Placa de aquecimento e agitação IKA, modelo C-MAG HS 7.
- Titulador potenciométrico SCOTT Instruments, modelo TitroLine easy.

3.3 Preparo das microesferas

3.3.1 Preparo das microesferas de gelatina

Para a obtenção das microesferas de gelatina, foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Souza (2012). Sob agitação mecânica de 500 rpm, 10 mL de solução aquosa de gelatina 10% (m/v), pré-aquecida a 80 °C, foram adicionados gota-a-gota a um balão de três bocas de 250 mL contendo 40 mL de óleo de milho também pré-aquecido a 80 °C. Após a adição da gelatina, a emulsão obtida foi mantida sob aquecimento pelo tempo previsto no planejamento de experimentos e, em seguida, foi resfriada em banho de gelo. Após 30 minutos de resfriamento, foram adicionados 50 mL de acetona gelada para completa desidratação e solidificação das microesferas. A agitação e o resfriamento foram mantidos por mais 1 hora, e as pérolas formadas foram purificadas por meio de filtração e lavagem com acetona gelada. A secagem foi realizada em dessecador à temperatura ambiente. Neste trabalho optou-se pela não utilização de reagentes, que mesmo em pequenas quantidades, pudessem aumentar a citotoxicidade do dispositivo como um todo. Por este motivo, nenhuma molécula surfactante (que em geral são citotóxicos) foi utilizada.

3.3.2 Preparo das microesferas reticuladas com frutose ou glicose

Sob agitação mecânica de 500 rpm, 10 mL de solução de gelatina 10% (m/v), contendo a quantidade de frutose ou glicose previsto no planejamento de experimentos (40%, 50% ou 100%), foi pré-aquecida a 80 °C. Em seguida, a solução foi adicionada gota-a-gota a um balão de três bocas de 250 mL contendo 40 mL de óleo de milho, também pré-aquecido a 80 °C. Após a adição da gelatina, a emulsão obtida foi mantida sob aquecimento pelo tempo previsto no planejamento de experimentos (10 min, 30min ou 60 min) e, em seguida, foi resfriada em banho de gelo. Após 30 minutos de resfriamento, foram adicionados 50 mL de acetona gelada para completa desidratação e solidificação das microesferas. A agitação e o resfriamento foram mantidos por mais 1 hora, e as pérolas formadas foram

purificadas por meio de filtração e lavagem com acetona gelada. A secagem foi realizada em dessecador à temperatura ambiente.

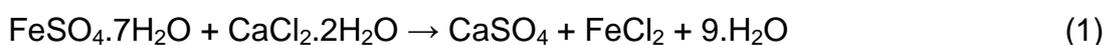
3.3.3 Preparo das microesferas de gelatina reticuladas com genipina, EDC ou glutaraldeído

Para a obtenção de amostras reticuladas com genipina, EDC ou glutaraldeído, foi utilizado um procedimento adaptado de Adhirajan et al. (2007). Cerca de 500 mg de microesferas de gelatina, preparadas seguindo a metodologia descrita no item 3.3, foram colocadas em respectivos tubos de ensaio contendo 25 mL de solução aquosa 3,6 mM de reticulante (genipina, EDC ou glutaraldeído). As amostras foram mantidas à temperatura de 37 °C, a fim de mimetizar a temperatura do corpo humano por diferentes períodos de tempo (3h, 6h, 12h, 24h e 48h).

3.4 Síntese do material magnético

3.4.1 Síntese do cloreto ferroso

O cloreto ferroso utilizado para a síntese de magnetita foi preparado segundo metodologia descrita por Bedê (2010). Misturou-se uma solução 1,9 M de cloreto de cálcio a uma solução 1,42 M de sulfato de cálcio. A reação de obtenção do FeCl₂ se processa segundo a equação (1):



Logo após a mistura destas soluções, foi observada a formação de um precipitado branco de sulfato de cálcio. A mistura foi centrifugada por 30 minutos a 3000 rpm e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi reservado para posterior utilização na síntese de magnetita.

3.4.2 Síntese de magnetita a partir de cloreto ferroso

Sob agitação mecânica de 400 rpm, adicionaram-se 37 mL de solução 0,71 M de cloreto ferroso a 50 mL de solução 1,04 M de cloreto férrico. Esta mistura deu origem a uma solução aquosa de sais de ferro tal que a razão molar $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,5$. A solução resultante foi mantida sob agitação e aquecimento a 60°C por, 15 minutos. Em seguida, foram adicionados, gota-a-gota, 30 mL de solução de hidróxido de amônio 25% (m/m). As condições de agitação e aquecimento foram mantidas por mais 1 h. Após este tempo, o sistema foi resfriado e as partículas de magnetita foram lavadas várias vezes com água destilada (até que o sobrenadante obtivesse pH neutro) e separadas por decantação/separação magnética. Após a lavagem, a magnetita foi colocada em freezer a -5°C , por 24 h, e depois liofilizada por 24 h.

A precipitação das nanopartículas de Fe_3O_4 acontece segundo a equação abaixo:



3.4.3 Síntese de magnetita a partir de sulfato ferroso

Foi utilizada metodologia idêntica à metodologia descrita no item 3.4.2, porém sulfato ferroso foi utilizado como reagente doador de íons Fe^{2+} para a síntese da magnetita.

3.4.4 Fluido magnético

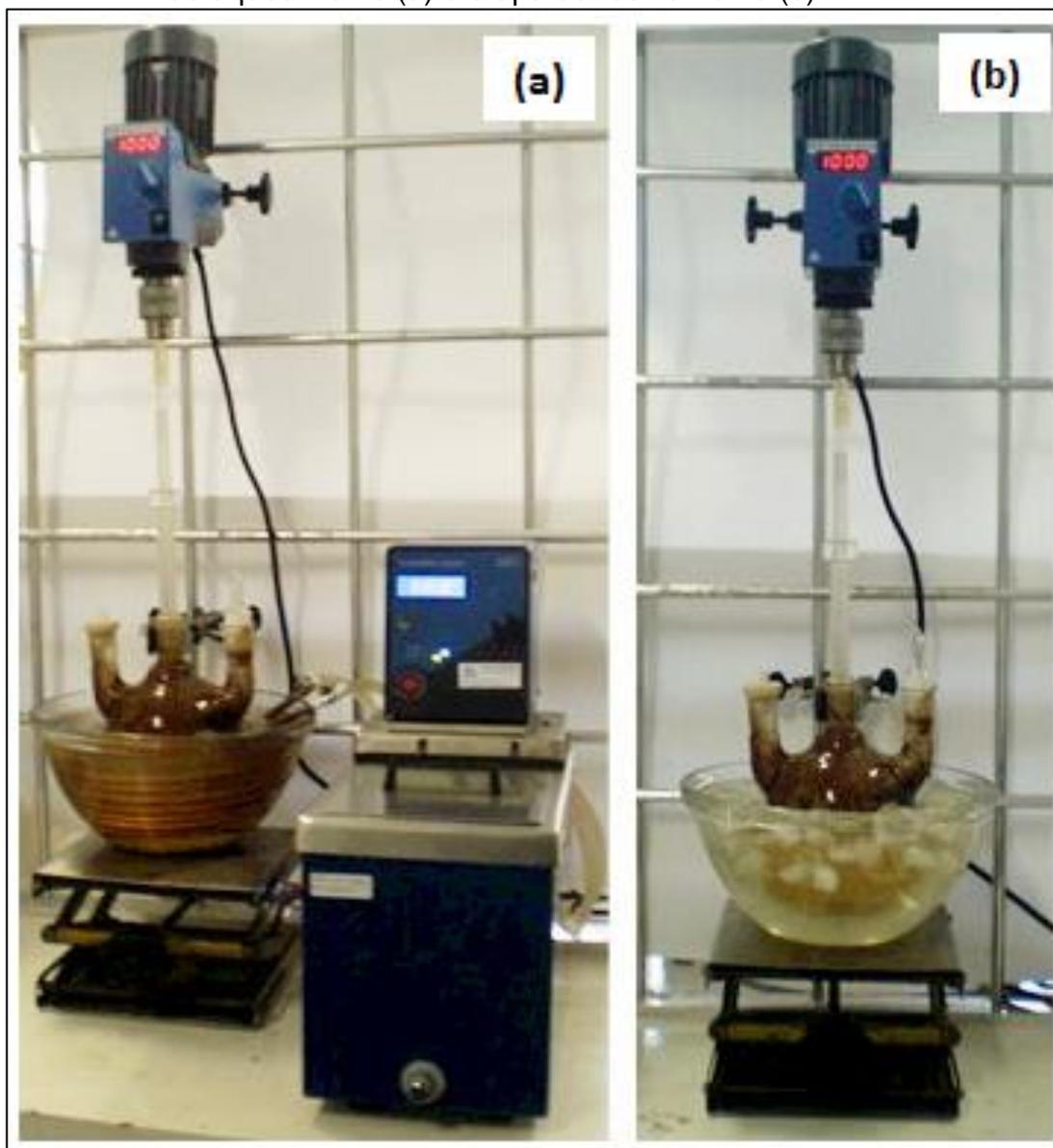
Em um balão de três bocas, foram adicionados 150 mL de solução aquosa de sais de ferro com razão molar $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,5$. O sistema foi aquecido a 60°C e submetido à agitação mecânica de 400 rpm. Em seguida, foram adicionados 7,5 g de gelatina. Após a total dissolução da gelatina, 30 mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio 25% (m/m) foram adicionados gota-a-gota ao balão. A mistura resultante foi mantida sob mesmas condições de agitação e aquecimento por 1 h.

Após este período de tempo, o fluido foi resfriado até temperatura ambiente e reservado para posterior utilização.

3.5 Preparo dos biocompósitos magnéticos

Os biocompósitos foram preparados utilizando-se 50% (m/m) de material magnético (magnetita ou fluido magnético). O material magnético foi adicionado a 10 mL de solução aquosa de gelatina com concentração 10% (m/v) e, em seguida, submetido a aquecimento de 60 °C. A mistura obtida foi colocada no ultrassom por 30 minutos com o objetivo de se obter uma dispersão homogênea. As etapas seguintes foram iguais às da metodologia utilizada para o preparo das microesferas de gelatina descrita no item 3.3.1. A Figura 11 mostra as etapas de aquecimento e resfriamento necessárias para a obtenção dos biocompósitos de gelatina.

Figura 11 - Aparelhagem para o preparo das microesferas de gelatina: etapa de aquecimento (a) e etapa de resfriamento (b).



Fonte: O autor, 2017.

3.6 Preparo das microesferas carregadas com fármaco

Foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Vandelli et al. (2001). Cerca de 300 mg de microesferas foram colocadas em contato com uma solução de doxorrubicina com concentração 0,5 mg/mL, por diferentes períodos de tempo. Em seguida, a absorbância da solução de doxorrubicina foi medida em espectrofotômetro Fentom 600S utilizando o comprimento de onda de 496 nm. O montante de fármaco adsorvido pelas microesferas foi calculado segundo a equação a seguir:

$$C = C_0 - C_f \quad (3)$$

Onde C_0 é a concentração inicial de doxorrubicina e C_f é a concentração final.

3.7 Liberação *in vitro* de doxorrubicina

A liberação controlada foi realizada segundo metodologia previamente descrita por Choubey and Bajpai (2010). Para determinar a quantidade de fármaco liberado, 8 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,15 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 1,38 mM NaCl) foram adicionados a 100 mg de microesferas de gelatina incorporadas com doxorrubicina. Este tampão foi escolhido para mimetizar o pH do sangue. A suspensão obtida foi mantida a temperatura de 37 °C por diferentes intervalos de tempo. O sobrenadante obtido foi analisado espectrofotometricamente. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para analisar amostras não-magnéticas, magnéticas, magnéticas sob ação de campo magnético externo constante e magnéticas sob ação de campo magnético externo oscilante.

3.8 Morfologia das microesferas

A avaliação morfológica das microesferas de gelatina e das nanopartículas de magnetita foi feita por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Foram utilizados os microscópios Carl Zeiss Leo 1450 VPO e Jeol JSM-6490 LV.

As amostras foram acondicionadas em *stubs* de alumínio com auxílio de fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro para aumentar sua condutividade e proteger contra o aquecimento localizado. Para a captura de imagens, foram utilizados detectores de elétrons secundários com distância de trabalho de 9 mm, tamanho do *spot* de 20 nm e voltagens de aceleração dos elétrons de 5 kV e 10 kV.

3.9 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas (magnetização de saturação (M_S), campo coercivo (H_C), magnetização remanescente (M_R) e curvas de histerese foram realizadas à temperatura ambiente sob campo magnético de 15.000 G utilizando magnetômetro de amostra vibrante (VSM) Lake Shore série 7400.

3.10 Análises termogravimétricas

A estabilidade térmica das microesferas preparadas foi verificada utilizando-se um analisador termogravimétrico TA Instruments, modelo Q50 V6.4 Build 193. As amostras foram colocadas em cápsulas de alumínio e submetidas ao aquecimento em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min na faixa de temperatura de 10 °C a 500 °C a uma velocidade de 20 °C/min.

3.11 Testes de dissolução

3.11.1 Testes qualitativos de dissolução

Cerca de 50 mg de amostra foram colocados em um tubo de ensaio e 5 mL de água deionizada foram adicionados. As amostras permanecerem em contato com a água por um período de 24 horas. Após este tempo, a amostra foi filtrada e seca à temperatura ambiente.

3.11.2 Testes quantitativos de dissolução

Cerca de 50 mg de amostra foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 5 mL de água de mili-Q. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 37 °C por uma hora. Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos com rotação de 3600 rpm. Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante da amostra foi retirada para posterior análise de concentração de proteínas.

3.11.3 Determinação de concentração de proteínas

3.11.3.1 Determinação de proteínas pelo método do ácido bicínico

A determinação de proteínas foi realizada utilizando-se um kit de determinação de proteínas conforme metodologia descrita por Cortesi et al. (1999). A solução de trabalho foi preparada misturando-se uma solução 4% de sulfato de cobre pentahidratado a um excesso de ácido bicínico (razão final de 1:50 v/v). A um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução de trabalho e 0,1 mL da solução contendo a gelatina. A mistura foi aquecida a 60 °C, por 15 minutos, e depois resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, a medida de absorvância de cada solução foi obtida mediante leitura em espectrofotômetro a 562 nm.

A concentração de gelatina liberada na solução foi calculada utilizando a equação da reta obtida pela curva analítica construída a partir de padrões de concentração conhecida. O percentual de gelatina dissolvido foi calculado segundo a equação:

$$\text{gelatina dissolvida (\%)} = \frac{C_f \times 100}{C_i} \quad (4)$$

Onde C_f é a concentração de gelatina liberada na solução e C_i é a concentração inicial de gelatina.

3.11.3.2 Determinação de proteínas pelo método do reagente de biureto

Para o preparo do reagente de biureto, dissolveram-se 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado e 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 mL de água destilada. Em seguida, 300 mL de solução 10% de hidróxido de sódio e 1 g de iodeto de potássio foram adicionados sob agitação magnética. A mistura obtida foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1L e, em seguida, o balão foi avolumado.

Para a análise de proteínas em si, uma alíquota de 200 μ L foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 5 mL do reagente de biureto e 300 μ L de água mili-Q. O

tubo de ensaio foi deixado em repouso no escuro por 30 minutos e a análise espectrofotométrica foi realizada em seguida utilizando comprimento de onda de 552 nm. O percentual de gelatina dissolvido foi calculado segundo a equação:

$$\text{gelatina dissolvida (\%)} = \frac{C_f \times 100}{C_i} \quad (5)$$

Onde C_f é a concentração de gelatina liberada na solução e C_i é a concentração inicial de gelatina.

3.12 Titulação dos grupos NH_2 livres

Esta análise foi realizada utilizando-se metodologia adaptada de Kuijpers et al. (2000). Cerca de 50 mg de microesferas foram imersas em 20 mL de água mili-Q e deixou-se descansar por 30 minutos. Os grupos NH_2 foram protonados com HCl 0,2 M até pH igual a 1,5 com adição de incrementos de 0,1mL e intervalo de 30 segundos após cada adição.

Para cada amostra, o número de prótons combinados foi calculado de acordo com a equação:

$$H^+ \text{ combinados} = \frac{C_1}{g (1 - 10^{(pH_w - pH_g)})} \quad (6)$$

Onde C_1 é a concentração do HCl, g é a massa da amostra, pH_w é o pH da água mili-Q e pH_g é o pH da amostra em suspensão.

3.13 Degradação enzimática

Cerca de 100 mg de microesferas foram colocadas em um tubo de ensaio. Foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) contendo 30 mg/mL de colagenase. A ação enzimática transcorreu a 37 °C, por 24 h. Após este tempo, as amostras foram secas em estufa até massa constante e o percentual de massa perdida foi calculada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos desta Tese é avaliar a eficiência da reticulação das cadeias proteicas da gelatina com glicose ou frutose. No entanto, muitas dificuldades surgiram quando os sacarídeos propostos foram utilizados como agentes de reticulação. Microesferas de gelatina reticuladas com frutose e glicose foram preparadas com a utilização das metodologias experimentais encontradas na literatura (CORTESI et al., 1998; GOHEL et al., 2005; SAMAD et al., 2009), porém resultaram em microesferas com baixo grau de reticulação visto que solubilizaram rapidamente em meio aquoso. Esta propriedade inviabiliza a utilização das microesferas obtidas para liberação controlada de fármacos.

Na tentativa de solucionar este problema crítico, foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de identificar quais parâmetros experimentais são responsáveis pelo aumento do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas da gelatina.

4.1 Testes preliminares

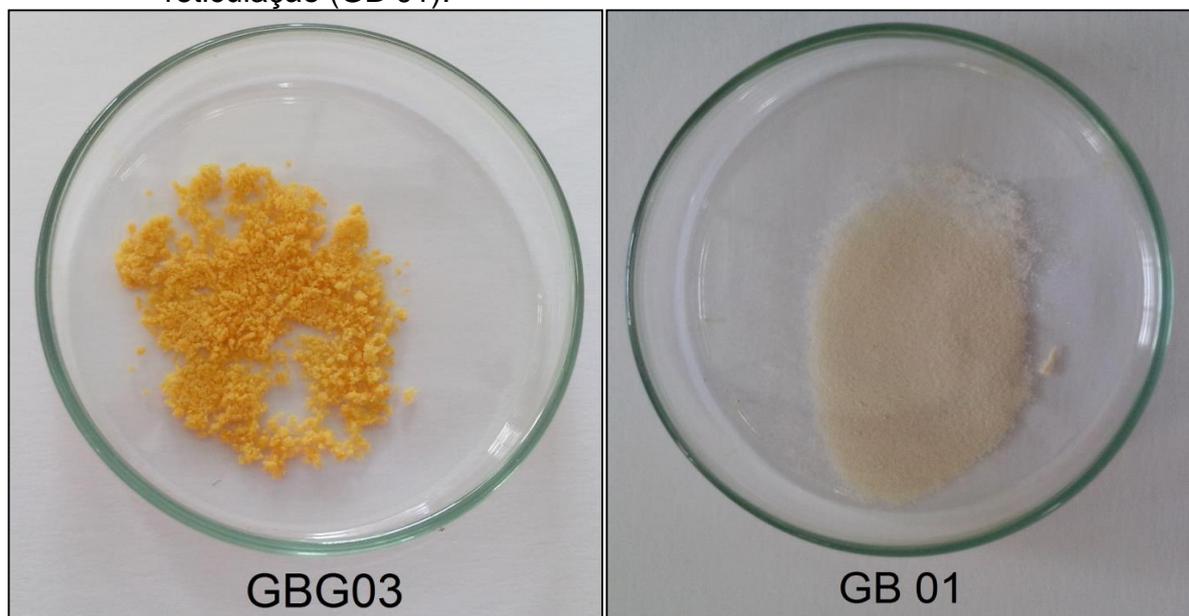
A reticulação da gelatina com glutaraldeído é bem descrita na literatura (CHOY et al., 2008; GAIHRE et al., 2008; GAIHRE et al., 2009), e o perfil de reticulação obtido com este reticulador é amplamente aceito como sendo adequado para a utilização das microesferas em dispositivos biomédicos. Por este motivo, uma amostra de microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído foi preparada para servir como parâmetro de comparação com as microesferas preparadas com os demais reticulantes propostos nesta Tese.

A amostra reticulada com glutaraldeído recebeu a nomenclatura GBG03. Como pode ser visto na Figura 12, há uma grande diferença de coloração quando se compara a amostra GBG03 com as microesferas sem reticulante (nomeadas GB 01). Enquanto as microesferas de gelatina sem agente de reticulação (GB 01) são brancas, as de gelatina e glutaraldeído (GBG03) apresentam coloração amarelo alaranjado. A diferença de coloração entre as duas amostras indica que amostras com baixo teor de reticulação apresentam coloração muito mais clara que as de alto

teor de reticulação. Dessa forma, o aspecto visual das microesferas permite que se faça distinção qualitativa entre as microesferas reticuladas e as sem reticulação.

Um teste qualitativo simples de solubilidade foi realizado adicionando-se as amostras, de forma individual, em um tubo de ensaio contendo água deionizada. Como era de se esperar, a amostra GBG03 permaneceu insolúvel por mais de 72 h, enquanto a amostra GB 01 solubilizou-se completamente em apenas poucos minutos, o que comprova a reticulação eficaz da gelatina pelas moléculas de glutaraldeído.

Figura 12 - Aspecto visual de gelatina reticulada com glutaraldeído (GBG03) e sem reticulação (GB 01).



Fonte: O autor, 2017.

Os testes preliminares utilizando-se frutose como reticulante iniciaram-se com a investigação da influência do pH reacional. Segundo Abete et al. (2008), a cinética da formação de ligação de reticulação é fortemente influenciada pelo pH da solução. Com base nessa referência, foram realizados os testes experimentais mostrados na Tabela 3. Estes testes foram feitos dissolvendo-se a gelatina e a frutose em solução de pH igual a 11 e, na sequência, aquecendo-se o sistema.

Tabela 3 - Efeito da temperatura e do tempo de reticulação da gelatina com frutose em pH 11.

Amostra	T (°C)	Tempo (min)	Resultado
GBRF03A	80	50	gelatina sólida com coloração marrom escuro
GBRF03B	60	165	gelatina sólida com coloração marrom claro

Fonte: O autor, 2017.

Visualmente foi observado que à medida que o tempo avançava, a coloração da gelatina foi intensificando até chegar em uma tonalidade marrom, assim como a viscosidade do meio foi aumentando até a total solidificação da amostra. A reação foi interrompida neste ponto. A solidificação da gelatina nestes experimentos indica, teoricamente, que houve formação de reticulações visto que gelatina não reticulada é solúvel no meio. Quando as duas temperaturas testadas foram comparadas, 60 e 80 °C, verificou-se que a gelatina solidificou cerca de três vezes mais rápido quando a temperatura do sistema foi 80 °C. Dessa forma, já é possível afirmar que a temperatura reacional também influencia a cinética da reação de reticulação.

As amostras GBRF03A e GBRF03B foram colocadas em respectivos tubos de ensaio e submetidas a teste qualitativo de solubilidade em meio aquoso. Ambas permaneceram insolúveis em meio aquoso por mais de 72 horas. Este resultado é um bom indicativo de reticulação, o que torna a gelatina apta para a fabricação de microesferas para liberação controlada de fármacos. Apesar de boas propriedades terem sido encontradas utilizando estes parâmetros experimentais, as amostras dissolveram-se espontaneamente após 15 dias do preparo. De acordo com Giofrè et al. (2012), quando o meio reacional apresenta valores de pH mais altos que 9 e mais baixos que 5, há redução significativa do conteúdo da tripla hélice das cadeias proteicas de gelatina ocasionando reduções consideráveis na estabilidade térmica e nas propriedades mecânicas da gelatina, ou seja, ocorre degradação da mesma. Essa degradação leva à instabilidade da gelatina a longo prazo. É possível que o mesmo tenha acontecido nos experimentos desta Tese.

Com o objetivo de obter microesferas insolúveis em água e estáveis por um longo tempo, novos experimentos foram realizados variando-se a concentração de frutose, o pH do meio reacional, a temperatura de aquecimento do sistema e o tempo de reação (sob aquecimento). A composição das amostras, assim como o seu aspecto visual encontram-se descritos na Tabela 4.

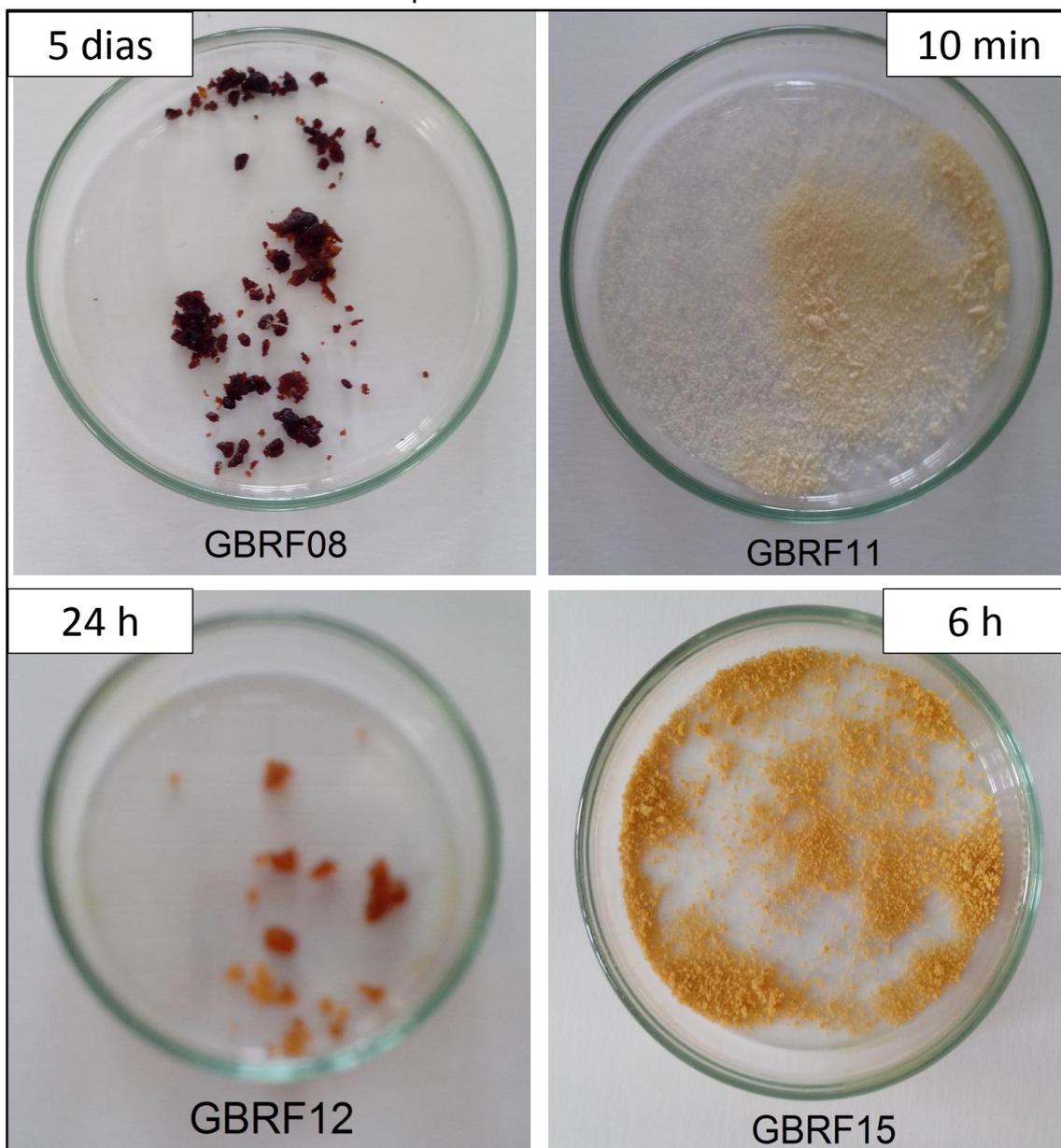
Tabela 4 - Efeito de alguns parâmetros reacionais na reticulação de gelatina com frutose.

Amostra	Tipo de reação	Conc. reticulante (% m/m)	pH	T (°C)	Tempo	Aspecto visual
GBRF04A	solução	40	9	60	7h30 min	solução viscosa marrom escuro
GBRF04B	solução	40	9	80	5h 45 min	sólido gelatinoso marrom escuro
GBRF05	emulsão	40	9	60	24h	microesferas amarelo médio
GBRF06	emulsão	40	9	80	24h	microesferas amarelo escuro
GBRF07	emulsão	40	5	80	24h	microesferas amarelo médio
GBRF08	emulsão	100	5	80	5 dias	partículas irregulares marrom escuro
GBRF09	emulsão	100	9	80	3 dias	sólido gelatinoso marrom escuro
GBRF10	emulsão	100	9	80	24h	partículas irregulares marrom escuro
GBRF11	emulsão	67	5	80	10min	microesferas brancas
GBRF12	emulsão	100	5	80	24h	partículas irregulares amarelo escuro
GBRF13	emulsão	100	5	80	3h	partículas irregulares amarelo escuro
GBRF14	emulsão	100	5	80	1h	microesferas amarelo claro
GBRF15	emulsão	100	5	80	6h	microesferas amarelo médio

Fonte: O autor, 2017.

A Figura 13 mostra o aspecto visual das amostras GBRF 08, GBRF11, GBRF12 E GBRF15. Estas quatro amostras foram preparadas com diferentes tempos de reação mantendo-se as mesmas condições experimentais de pH e temperatura ($\text{pH} = 5$ e $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Figura 13 - Aspecto visual das microesferas de gelatina reticuladas com frutose em diferentes tempos.



Fonte: O autor, 2017.

Foi observado que o aumento do tempo de reação também é um fator que influencia fortemente as propriedades físicas das microesferas obtidas. A partir de 24 horas de reação o polímero perdeu sua propriedade de formação de esferas e

aglutinou formando partículas grandes e totalmente irregulares. Isto indica que mesmo em pH que, segundo Gioffrè et al. (2012), não há perda de conteúdo da tripla hélice, já se pode observar degradação da gelatina quando o tempo no qual as cadeias proteicas se encontram em pH limítrofe é elevado.

Após a realização de todos os testes descritos na Tabela 4, observou-se que a reticulação é mais rápida e efetiva à temperatura de 80°C (como anteriormente já se havia verificado). Além disso, percebeu-se que o pH do meio, o tempo de reação (aquecimento) e percentual de reticulante são fatores cruciais para a avaliação da reação de reticulação das cadeias de gelatina. Por este motivo e também para a minimização da quantidade de experimentos e otimização deste estudo, foi proposta a utilização da metodologia de planejamento de experimentos.

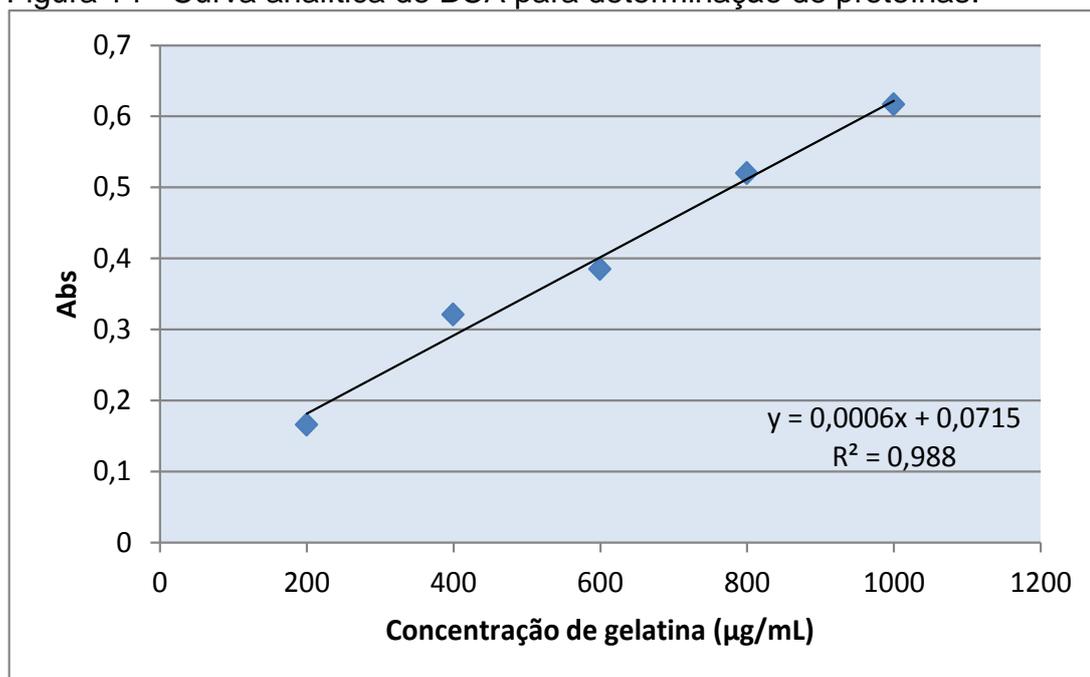
4.2 Utilização de frutose como agente de reticulação

Foi realizado um planejamento de experimentos fatorial do tipo 2³, com triplicata em cada ponto. A resposta que deveria ser escolhida para a variável dependente deveria refletir o grau de reticulação da amostra. Em grande parte da literatura acerca de microesferas de gelatina, pode-se observar que os autores utilizam a análise de grupos amino terminais para determinar o grau de reticulação do material. Normalmente, para a realização desta análise é utilizado o ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) que é de difícil acesso, pois não é produzido no Brasil e sua importação é muito dispendiosa. Este reagente é muito explosivo e muitas das empresas cobram valores altíssimos para a importação ou até mesmo evitam comercializá-lo. Diante desta situação, foi necessária a utilização de técnicas menos usuais para a determinação da eficiência de reticulação das microesferas produzidas. Sendo assim, optou-se por utilizar o percentual de gelatina proveniente da amostra que dissolvesse em meio aquoso a 37°C (temperatura do corpo humano). Esta análise pode ser utilizada como método indireto de determinação do grau de reticulação visto que quanto maior o percentual de gelatina que se dissolve no meio, menor será o grau de reticulação da amostra. A análise quantitativa da gelatina dissolvida foi feita pelas técnicas do ácido bicinônico (BCA) e do reagente de biureto e seus resultados foram comparados.

4.2.1 Técnica do ácido bicincônico (BCA)

A curva analítica (Figura 14) foi obtida variando-se a concentração das soluções padrão de proteína de 200 µg/mL a 1000 µg/mL, como recomenda o manual do fabricante do kit de soluções de BCA.

Figura 14 - Curva analítica de BCA para determinação de proteínas.



Fonte: O autor, 2017.

A Tabela 5 apresenta a composição das amostras preparadas na etapa do planejamento de experimentos assim como os resultados dos testes de dissolução. Pode-se observar que os valores do percentual de gelatina dissolvida em água variou muito entre as réplicas de um mesmo ponto do planejamento. A princípio, estes resultados não seguiram uma tendência muito clara. Este é um dos motivos pelos quais o tratamento estatístico precisou ser aplicado ao final da realização de experimentos. Outro importante motivo para a inclusão de testes estatísticos foi o de analisar todas as variáveis de uma única vez.

A utilização da ferramenta matemática adequada permite fazer conclusões diretas e acertadas, além de possibilitar realizar previsões sobre o comportamento experimental de novas amostras sob condições de síntese previamente definidas.

Tabela 5 - Efeito do pH, tempo de reação e concentração de frutose sobre a propriedade de dissolução em meio aquoso das microesferas de gelatinas obtidas.

Amostra	pH	Tempo (min)*	Frutose (% m/m)**	Réplica	Gelatina dissolvida (%)
1	5	10	40	1	33,09
				2	32,41
				3	50,84
2	9	10	40	1	26,5
				2	29,02
				3	38,28
3	5	60	40	1	45,29
				2	34,67
				3	30,36
4	9	60	40	1	17,28
				2	31,31
				3	35,17
5	5	10	100	1	57,45
				2	99,26
				3	96,04
6	9	10	100	1	80,04
				2	57,12
				3	36,46
7	5	60	100	1	70,21
				2	53,74
				3	58,91
8	9	60	100	1	55,54
				2	60,43
				3	33,67

* tempo de aquecimento; ** percentual de frutose em relação à massa da gelatina; Parâmetros reacionais: concentração de gelatina = 10% em relação ao volume de água; T = 80°C; velocidade de agitação = 500 rpm; óleo de milho como fase oleosa; razão fase aquosa/fase oleosa de 1/4; tempo de agitação sob resfriamento de 30 minutos e tempo de agitação após adição de acetona de 1 hora.
Fonte: O autor, 2017.

A análise da variância (ANOVA) foi utilizada para testar a significância das variáveis experimentadas no planejamento de experimentos (DOE). Os resultados estatísticos desta análise podem ser vistos na Tabela 6. O Teste F e valor p indicam quais variáveis independentes (parâmetros de síntese) apresentam algum nível de significância para a variável dependente (resposta experimental). Somente quando a variável em questão apresenta valor p abaixo de 5%, pode-se dizer que o efeito desta variável sobre a resposta experimental apresenta relevância. Sendo assim, de acordo com os dados obtidos, somente o pH do meio reacional e a concentração de frutose influenciaram a solubilidade das microesferas de gelatina.

Tabela 6 - Tabela ANOVA para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.

Fator	SS	df	MS	F	p
pH (1)	1085,8	1	1085,751	5,47674	0,032558
tempo (2)	503,23	1	503,527	2,53989	0,130563
Conc. Frutose (3)	5240,7	1	5240,712	26,43519	0,000098
1*2	73,11	1	73,109	0,36878	0,552193
1*3	166,64	1	166,640	0,84057	0,372848
2*3	252,17	1	252,175	1,27202	0,276018
1*2*3	103,88	1	103,884	0,52401	0,479586
Erro	3172	16	198,248		
Total SS	10598	23			

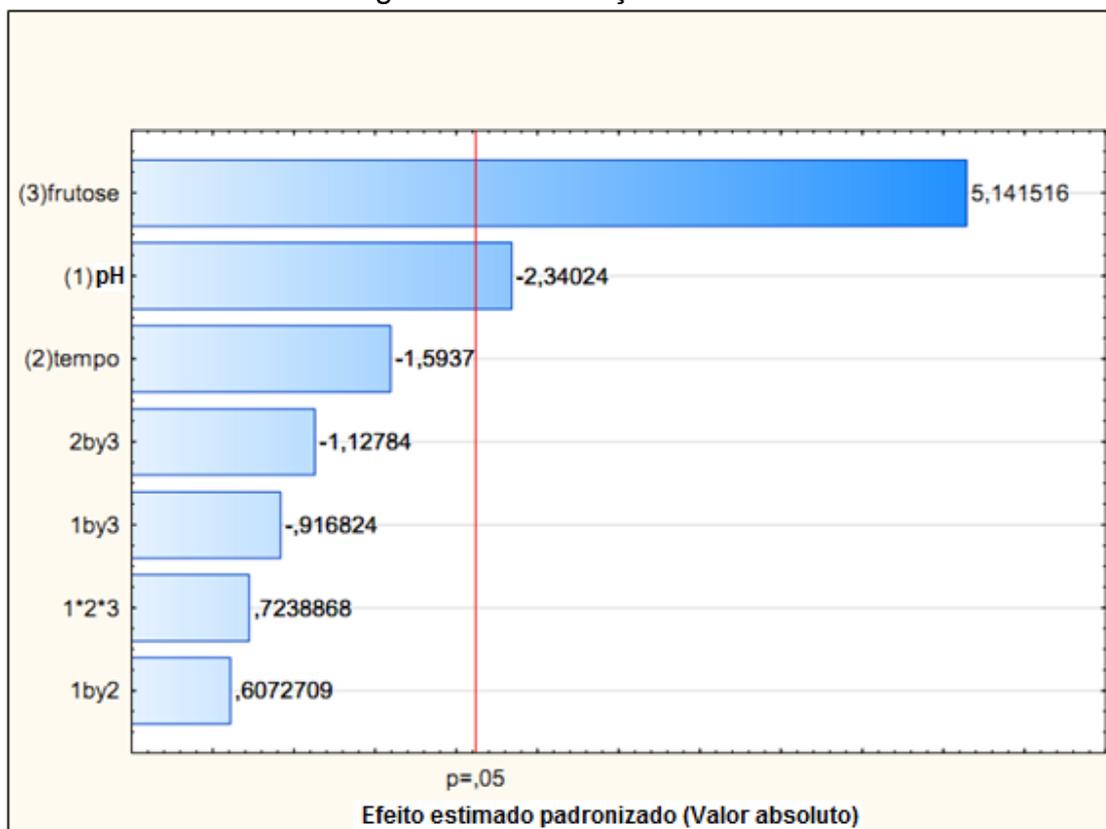
SS = soma quadrática; MS = média quadrática; F = teste F; p = nível de significância; 1*2 = interação entre pH e tempo; 1*3 = interação entre pH e concentração de frutose; 1*2*3 = interação entre pH, tempo e concentração de frutose.

Fonte: O autor, 2017.

Outra forma de representação da ANOVA é através do diagrama de Pareto. O diagrama de Pareto para os dados obtidos neste planejamento de experimentos se encontra na Figura 15. Este diagrama apresenta de forma clara os efeitos que são estatisticamente importantes. Somente os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória ($p = 0,05$) devem ser considerados no modelo matemático que será utilizado para previsões futuras.

Os valores ao lado de cada retângulo representam os valores da estatística dos efeitos analisados. Observando este diagrama, conclui-se que a concentração de frutose influencia a solubilidade das microesferas de gelatina de maneira positiva (quanto maior a concentração de frutose, maior a solubilidade) e que o pH influencia de maneira negativa (quanto maior o pH, menor a solubilidade).

Figura 15 - Gráfico de Pareto para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.



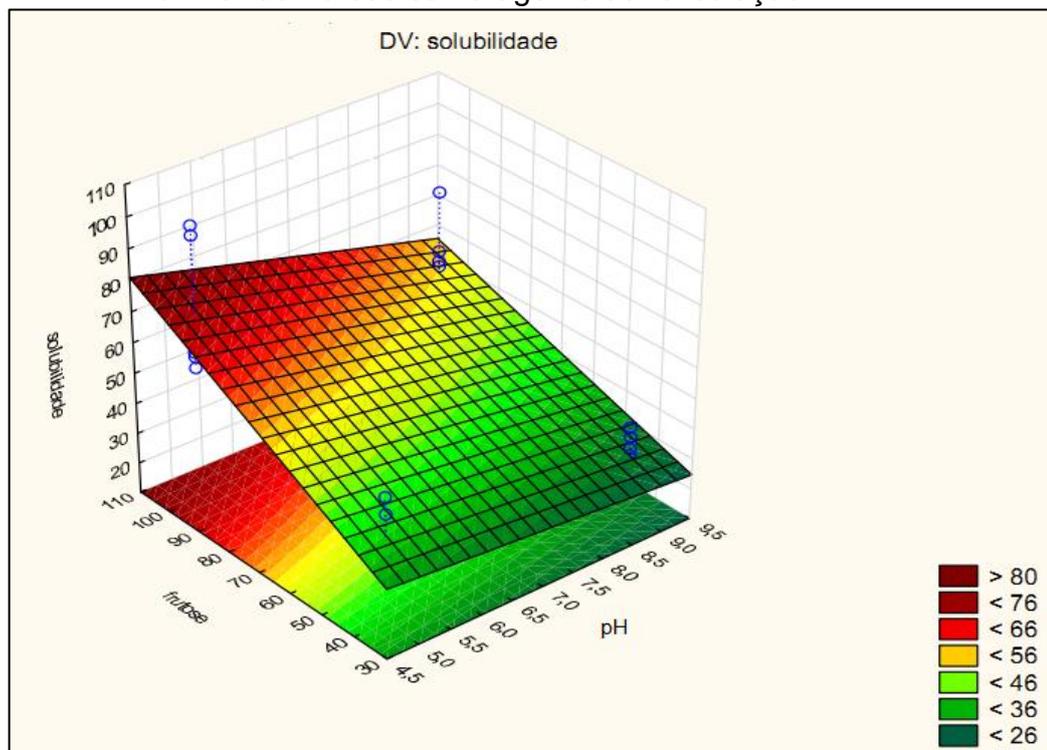
Fonte: O autor, 2017.

Pela análise da Tabela ANOVA (Tabela 6) e do gráfico de Pareto (Figura 15), o modelo matemático proposto é:

$$\text{Solubilidade} = 20,38 - 1,51*(\text{pH}) + 0,95*(\text{Concentração de frutose}) \quad (7)$$

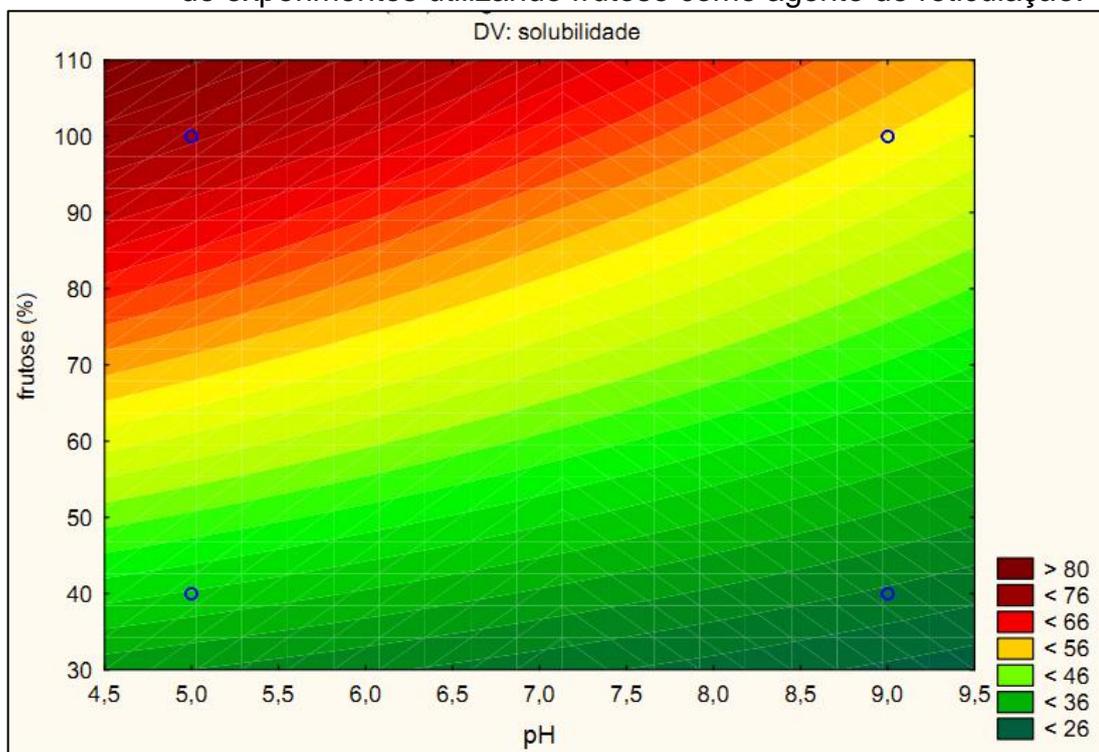
Para facilitar a visualização, os resultados obtidos pelo planejamento de experimentos também podem ser apresentados por uma superfície de resposta (Figuras 16 e 17). Nesta Tese, a ferramenta utilizada foi o planejamento fatorial comum. Para este tipo de planejamento, o modelo proposto é sempre linear. Por este motivo, a superfície de resposta tem a forma de um plano.

Figura 16 - Superfície de resposta para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 17 - Curvas de nível da superfície de resposta para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.



Fonte: O autor, 2017.

A análise da superfície (Figura 16) indica que a região onde se encontram os parâmetros ideais para a síntese das microesferas reticuladas com frutose está na área com pH próximo de 9 e concentração de frutose próxima dos 40%. No entanto, o meio reacional não deve apresentar pH maior que 9 visto que as cadeias poliméricas de gelatina degradam nestas condições, como já foi anteriormente discutido.

As curvas de nível observadas na Figura 17 fornecem uma análise da tendência de resposta da variável dependente (neste caso a solubilidade). As curvaturas que se pode visualizar significam que nestes eixos as variáveis independentes apresentam efeitos de interação mesmo que não sejam estatisticamente significantes, contradizendo a informação básica da ANOVA.

4.1.1.1 Reprodutibilidade do método

Todos os testes de dissolução de proteína foram replicados utilizando as mesmas amostras e reagentes e sob as mesmas condições. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados anteriores. A Tabela 7 mostra os valores obtidos para as réplicas dos testes de percentual de dissolução de proteína pelo método do ácido bicincônico.

Como pode ser visto, os valores de dissolução não foram reprodutíveis. Além disso, verificou-se que a técnica resultou em dados incoerentes para algumas amostras, com valores de dissolução acima de 100%. Dessa forma, a técnica da maneira como descrita na literatura, não é adequada, pois não fornece resultados confiáveis. Por este motivo, decidiu-se variar alguns parâmetros para verificar como influenciam nos resultados obtidos e no grau de confiabilidade da técnica.

Tabela 7 - Réplica dos testes de percentual de dissolução de proteína pelo método do ácido bicinônico.

Amostra	Réplica	Gelatina dissolvida (%)
1	1	47,37
	2	55,77
	3	58,11
2	1	10,96
	2	39,32
	3	49,78
3	1	66,19
	2	53,85
	3	69,13
4	1	30,54
	2	38,16
	3	71,71
5	1	163,54
	2	134,97
	3	91,62
6	1	62,59
	2	125,42
	3	7,44
7	1	141,61
	2	43,56
	3	141,20
8	1	97,56
	2	147,44
	3	87,91

Fonte: O autor, 2017.

Em um primeiro momento, decidiu-se variar a massa e o volume da alíquota a ser reservada para análise para que o erro experimental oriundo da heterogeneidade amostral pudesse ser negligenciado. Duas amostras escolhidas aleatoriamente foram analisadas. A amostra 2 foi analisada variando-se o volume da alíquota reservada para análise enquanto a amostra 4 foi analisada utilizando-se uma maior

variação na massa da amostra. As variações feitas, assim como os resultados obtidos, podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 - Variações realizadas no método do ácido bicincônico e resultados de percentual de gelatina dissolvida.

Amostra	massa (g)	volume da alíquota (mL)	Gelatina dissolvida (%)
2	0,0200	20	114,44
	0,0159	25	167,46
5	0,0158	25	342,18
	0,0257	25	173,25

Fonte: O autor, 2017.

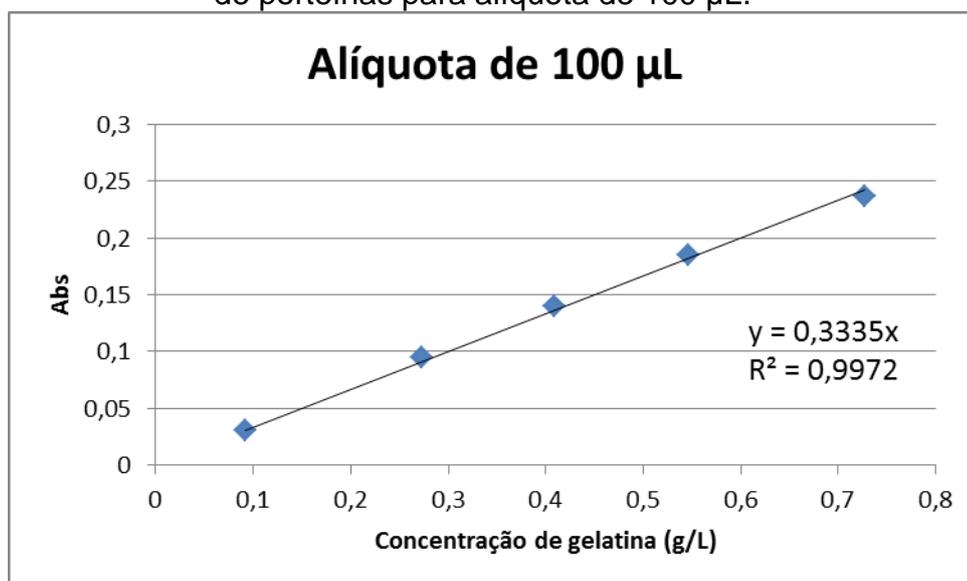
Os resultados mostram claramente que, apesar das variações aplicadas, a técnica continua produzindo resultados incoerentes e, dessa forma, inviável de ser utilizada. Por este motivo, decidiu-se analisar as amostras por outra metodologia. Por ser um método já consagrado na literatura e que usa reagentes de fácil aquisição, a técnica do reagente de biureto foi utilizada para análise do percentual de proteína dissolvido.

4.2.2 Técnica do reagente de biureto

Pelo fato de não ter sido encontrado na literatura o emprego desta técnica para a determinação do teor de gelatina dissolvida, foi necessário a realização de testes preliminares a fim de julgar se a técnica seria adequada e reprodutível. Assim como foi feito com a técnica de BCA, foram variadas as massas das amostras, assim como as alíquotas retiradas para análise.

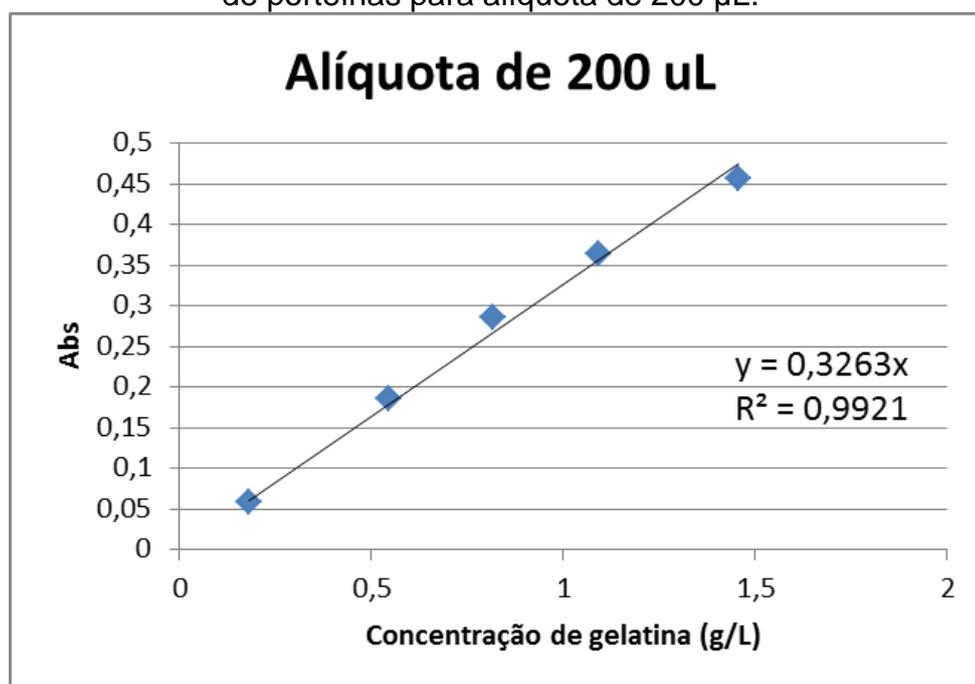
As Figuras 18, 19 e 20 mostram as curvas analítica obtidas quando se analisaram alíquotas de 100 μ L, 200 μ L e 500 μ L, respectivamente. Pode-se perceber que o coeficiente de linearidade e, conseqüentemente, a confiabilidade e reprodutibilidade das análises diminuíram quando se aumentou o volume da alíquota.

Figura 18 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 100 μ L.



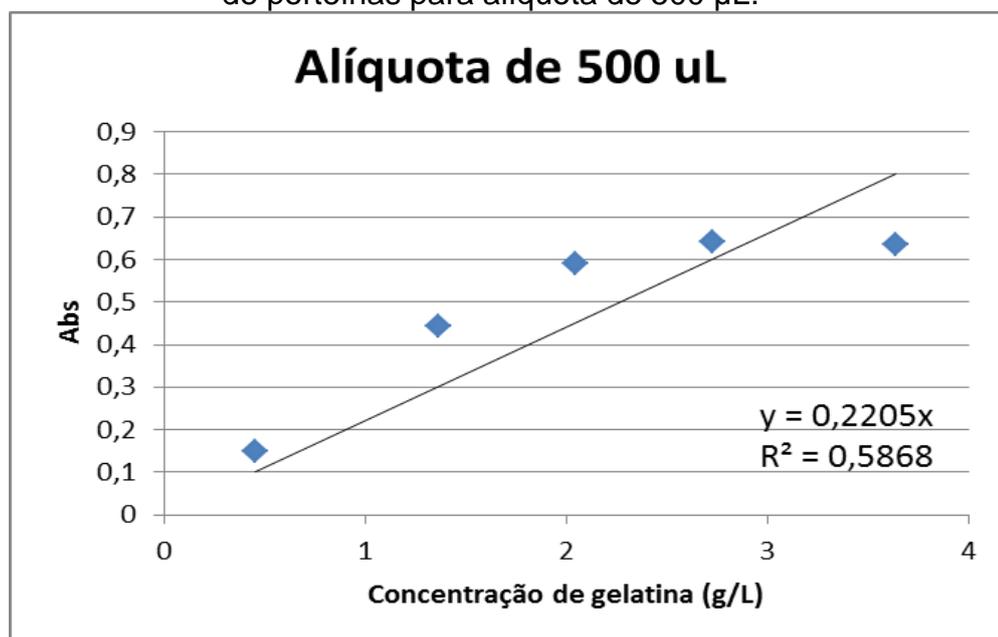
Fonte: O autor, 2017.

Figura 19 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 200 μ L.



Fonte: O autor, 2017.

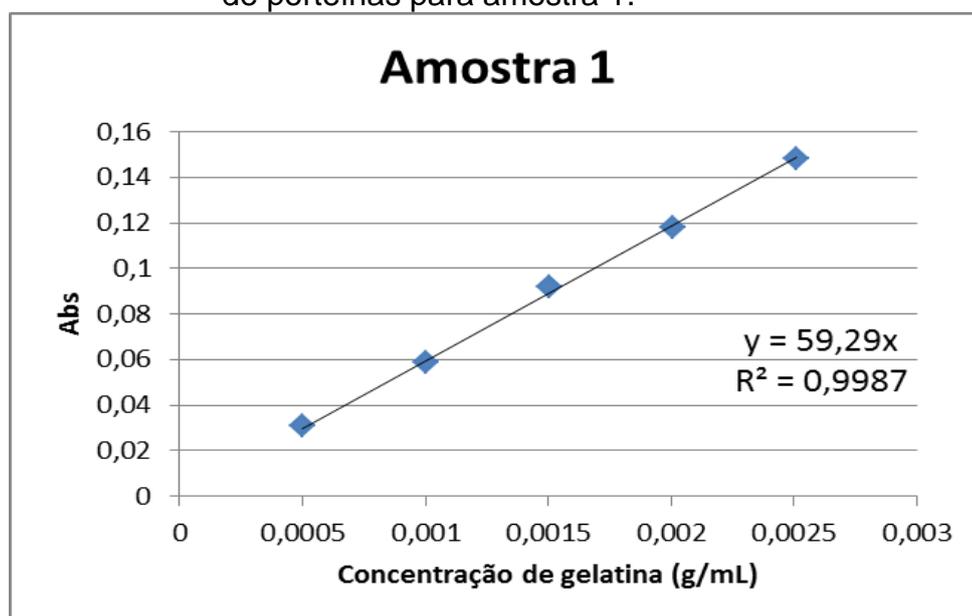
Figura 20 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para alíquota de 500 μ L.



Fonte: O autor, 2017.

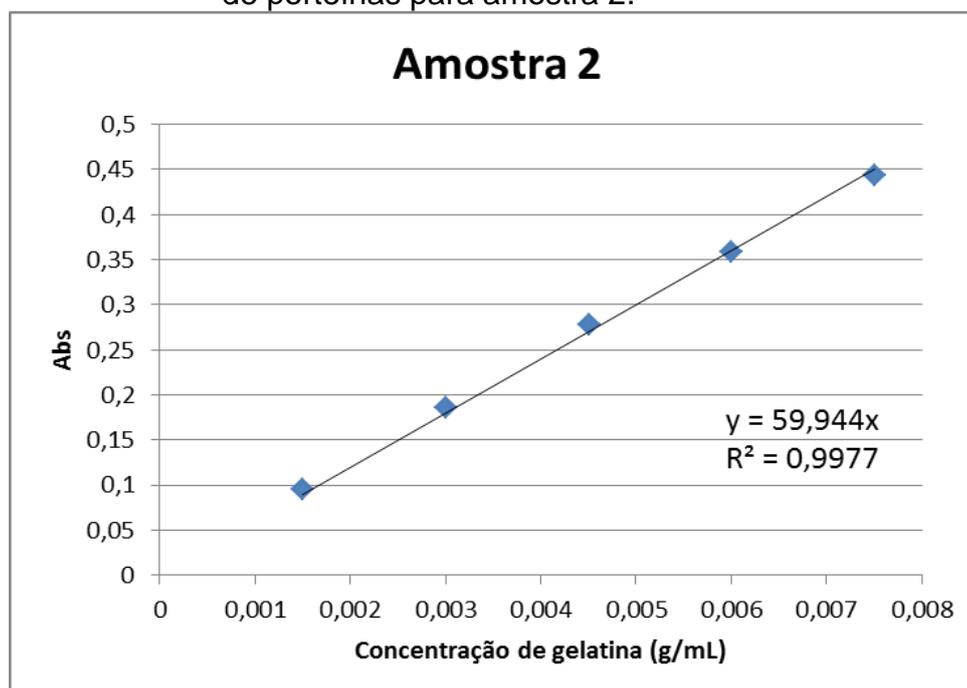
As Figuras 21, 22 e 23 mostram as curvas analíticas obtidas quando se variou a massa das amostras. Percebe-se a mesma tendência anterior: o coeficiente de linearidade é inversamente proporcional à concentração de proteínas no meio, ou seja, a confiabilidade e reprodutibilidade das análises diminuem quando se aumenta concentração de proteína.

Figura 21 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 1.



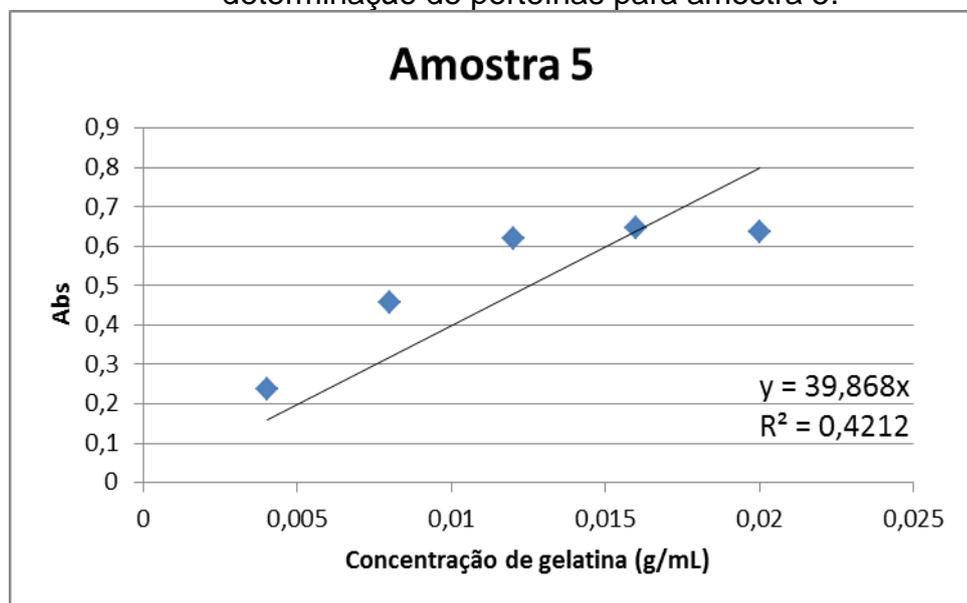
Fonte: O autor, 2017.

Figura 22 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 2.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 23 - Curva analítica do método de biureto para determinação de proteínas para amostra 5.



Fonte: O autor, 2017.

Baseando-se somente no coeficiente de linearidade, a melhor curva analítica foi aquela obtida para a amostra 1, cujas soluções-padrão tinham concentração variando de 500 µg/L a 3000 µg/L. Contudo, ao se avaliar o erro percentual obtido quando se comparou a concentração real da amostra em função da concentração

obtida pela equação da reta, verificou-se que o erro obtido com a curva analítica de 200 µg/L foi o menor, apresentando valor de erro menor que 5%.

Quanto à reprodutibilidade do método, todo o procedimento adotado para a técnica de BCA, foi seguido para a técnica do reagente de biureto, resultando em percentuais de gelatina dissolvida com variação menor que 5% entre as amostras analisadas como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9 - Variações realizadas no método do biureto para determinação de proteínas e resultados de percentual de gelatina dissolvida.

Amostra	massa (g)	volume da alíquota (mL)	Gelatina dissolvida (%)
2	0,0203	20	81,7
	0,0177	25	82,7
5	0,0151	25	67,1
	0,0306	25	68,9

Fonte: O autor, 2017.

Para melhorar a análise estatística, utilizou-se o valor médio do percentual de gelatina dissolvida para cada réplica das amostras. Além disso, foram produzidas amostras com parâmetros experimentais intermediários entre os níveis máximo e mínimo a fim de se obterem pontos centrais. A Tabela 10 mostra os resultados dos testes de dissolução por esta técnica. Estes dados foram tratados estatisticamente e, a partir deles, foi realizada a análise de variância (ANOVA) cujos resultados podem ser vistos na Tabela 11.

Tabela 10 - Resultados para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.

Amostra	pH	Tempo (min)	Frutose (%)	Gelatina dissolvida (%)
1	5	10	40	75,5
2	9	10	40	83,7
3	5	60	40	51,8
4	9	60	40	32,1
5	5	10	100	67,6
6	9	10	100	47,4
7	5	60	100	65,9
8	9	60	100	35,1
Ponto central	7	35	70	54,9
Ponto central	7	35	70	52,3
Ponto central	7	35	70	48,0

Fonte: O autor, 2017.

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.

Fator	SS	MS	F	P-valor
pH (1)	487,9	487,9	14,9	0,018
Tempo de aquecimento (2)	993,9	993,9	30,3	0,005
Concentração de frutose (%) (3)	91,8	91,8	2,8	0,169
1*2	185,68	185,68	5,7	0,076
1*3	194,3	194,3	5,9	0,071
2*3	469,7	469,7	14,3	0,019
Falta de ajuste	107,5	53,8	4,5	0,181
Erro puro	23,73	11,9		
Erro total	2554,7			

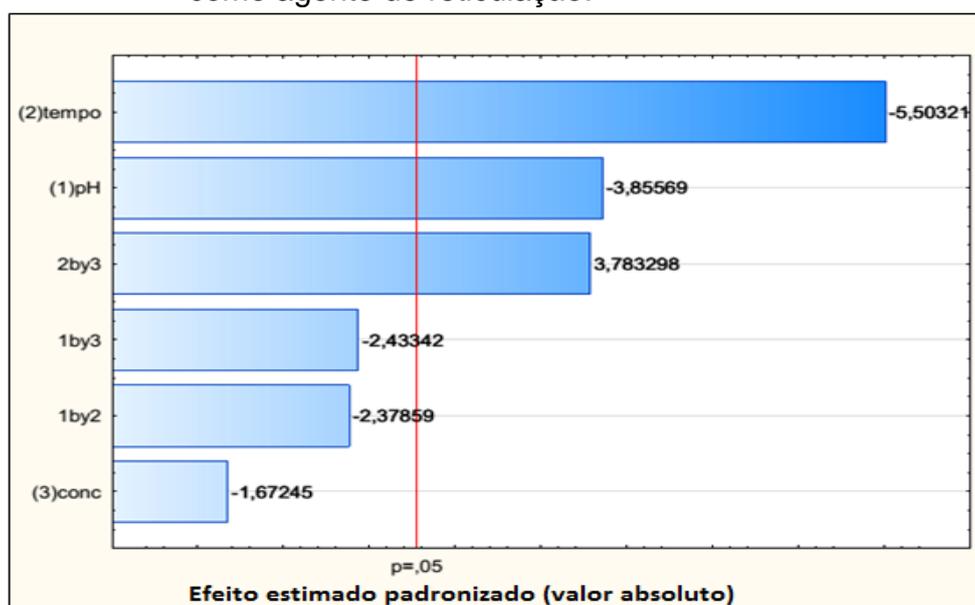
$R^2 = 0,94861$; SS = soma quadrática; MS = média quadrática; F = teste F; p = nível de significância; 1*2 = interação entre pH e tempo; 1*3 = interação entre pH e concentração de frutose; 2*3 = interação entre tempo de aquecimento e concentração de frutose.

Fonte: O autor, 2017.

A análise da variância mostra valor p para a falta de ajuste maior que 0,05 o que se traduz em um modelo adequado a 95% de confiança. Além disso, apresenta um coeficiente de correlação igual a 0,94, ou seja, o modelo encontrado com a utilização desta técnica explica aproximadamente 94% da variabilidade de solubilidade das amostras. Dessa forma, o modelo apresenta significância estatística e pode ser utilizado para fins preditivos.

Com relação aos fatores estudados, o efeito gerado por cada um deles pode ser visualizado pelo gráfico de Pareto (Figura 24). Neste gráfico, o tamanho das barras é proporcional ao valor estimado dos efeitos principais. A linha vertical corresponde ao intervalo de confiança de 95% e um efeito que excede esta linha pode ser considerado significativo. Percebe-se que as variáveis pH e tempo de aquecimento, além da interação de segunda ordem entre tempo de aquecimento e concentração de frutose, apresentaram efeitos significativos sobre o percentual de gelatina que se solubilizou em meio aquoso. Também pode ser observado que tanto o tempo quanto o pH apresentaram efeitos negativos sobre a solubilidade, ou seja, quanto maiores fossem o pH e o tempo, menor seria a solubilidade das amostras produzidas.

Figura 24 - Gráfico de Pareto para percentual de gelatina dissolvida pelo método do biureto de determinação de proteínas para o planejamento de experimentos utilizando frutose como agente de reticulação.

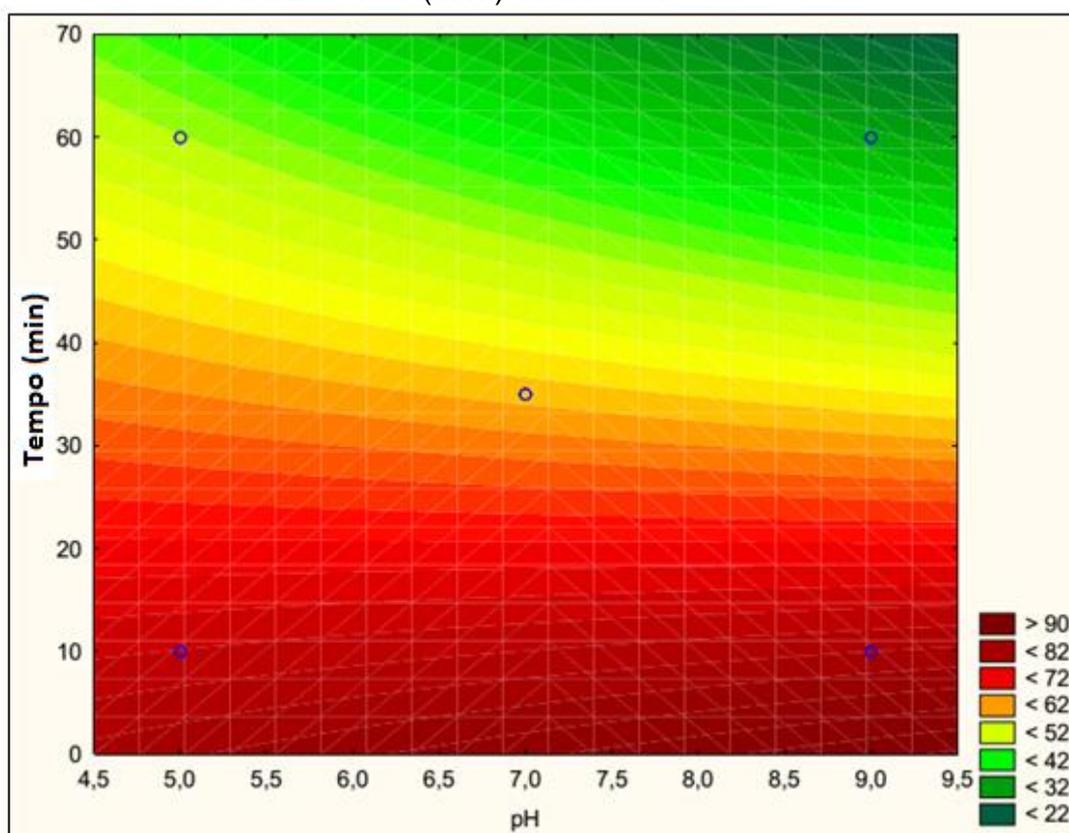


Fonte: O autor, 2017.

No que se refere ao efeito originado pela interação de segunda ordem entre a concentração e reticulante, observa-se pelo gráfico de Pareto que produz efeito positivo. No entanto, para avaliar melhor esta interação, é necessária a análise dos gráficos de contorno que podem ser observados nas Figuras 25, 26, 27 e 28.

A Figura 25 mostra a influência do pH e do tempo de reação sobre o perfil de dissolução da gelatina quando a concentração de frutose é de 40% (m/m). Neste gráfico, observa-se que, solubilidades abaixo de 42% são obtidas quando o tempo de aquecimento é próximo de 60 minutos e o pH varia desde 7,5 até 9,0. No entanto, somente em uma pequena região do gráfico pode-se obter condições experimentais que levam à fabricação de amostras com solubilidade menor que 32%.

Figura 25 - Gráficos de contorno para influência do pH e do tempo de aquecimento sobre o percentual de gelatina dissolvida quando se utilizou 40% (m/m) de frutose.

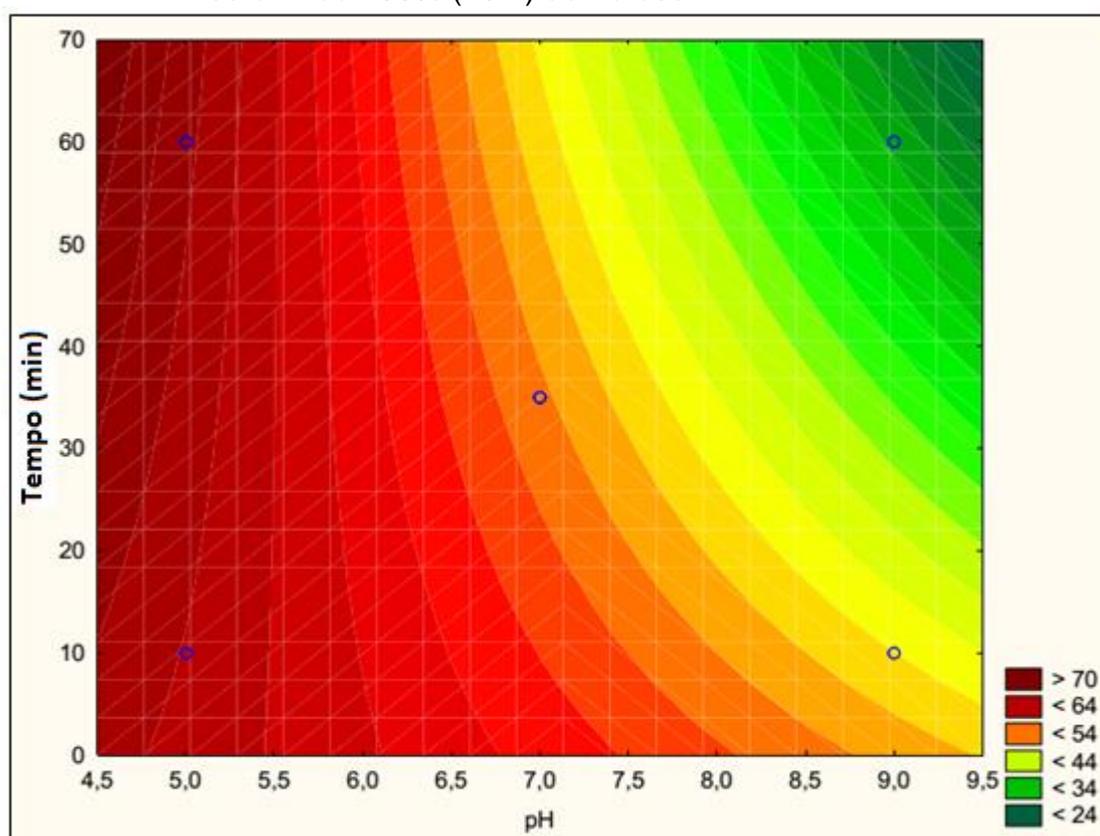


. Fonte: O autor, 2017.

A Figura 26 também mostra a influência do pH e do tempo de reação sobre o perfil de dissolução da gelatina, mas agora a concentração de frutose é de 100% (m/m). Comparando-se o gráfico da Figura 25 com o da Figura 26, observa-se que a

faixa de trabalho de pH diminui. Com a utilização de maior concentração de reticulante, as menores solubilidades podem ser obtidas somente no intervalo de pH de 8,5 a 9,0. No entanto, observa-se também que há a possibilidade de obtenção de amostras com baixa solubilidade utilizando-se menores tempos de aquecimento (de 45 a 60 minutos).

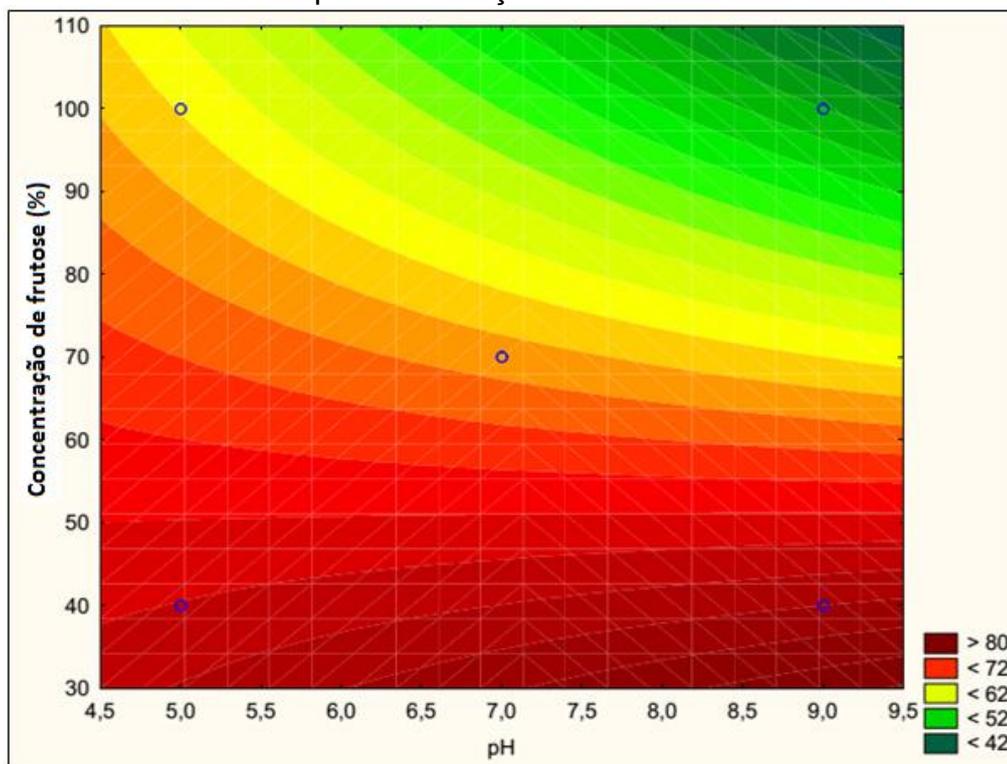
Figura 26 - Gráficos de contorno para influência do pH e do tempo de aquecimento sobre o percentual de gelatina dissolvida quando se utilizou 100% (m/m) de frutose.



. Fonte: O autor, 2017.

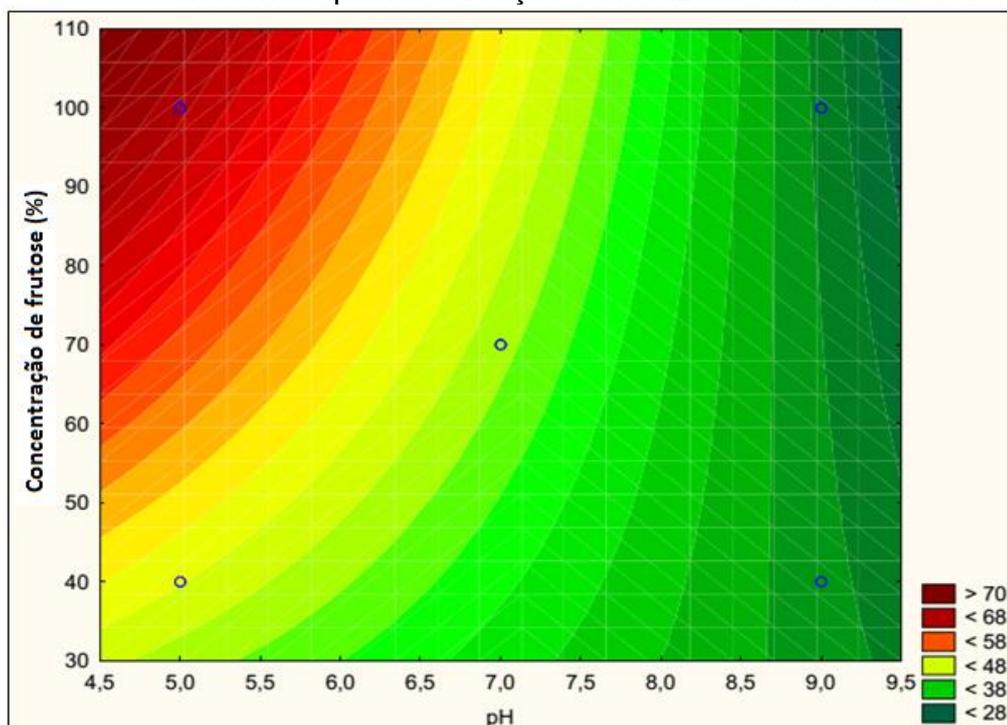
O gráfico de contorno obtido, quando fixou-se o tempo de reação em 10 minutos, é mostrado na Figura 27. Percebe-se que menores solubilidades são alcançadas somente quando a concentração do reticulante é maior que 90% e quando o pH é elevado (maior que 8). Por outro lado, analisando-se a Figura 28, que mostra o gráfico de contorno quando o tempo de aquecimento é de 60 minutos, percebe-se baixa solubilidade para a gelatina pode ser obtida em uma ampla faixa de pH, independente da concentração do reticulante.

Figura 27 - Gráficos de contorno para influência do pH e da concentração de frutose sobre o percentual de gelatina dissolvida quando a reação foi realizada em 10 minutos.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 28 - Gráficos de contorno para influência do pH e da concentração de frutose sobre o percentual de gelatina dissolvida quando a reação foi realizada em 60 minutos.



Fonte: O autor, 2017.

Diante dos perfis apresentados pelas superfícies de contorno verifica-se que, como o objetivo é minimizar a solubilização da gelatina em meio aquoso, o ideal é que se trabalhe com pH próximo de 9 e com tempo de aquecimento de 60 minutos. No que se refere à concentração do reticulante, nestas condições experimentais, sua concentração não é um fator significativo.

4.2.3 Análises complementares

Como não foi possível isolar apenas uma das amostras como sendo a que tivesse maior potencial para aplicação em meio aquoso (menor solubilidade), a partir desse ponto, análises termogravimétricas e de determinação de grupos NH_2 perdidos foram efetuadas com as amostras 4 e 8, preparadas com pH 9 e tempo de aquecimento de 60 minutos. As amostras diferiram apenas quanto à concentração de reticulante, onde a amostra 4 foi preparada com 40% de reticulante e a amostra 8 com 100% de reticulante.

4.2.3.1 Análises termogravimétricas

Através de análises termogravimétricas podem-se observar duas importantes propriedades da amostra: temperatura do início da degradação (T_{onset}) e o percentual de resíduos após a análise. Quando se avalia a reticulação de um material pelos resultados de degradação termogravimétrica, o que se deve observar é que o material mais reticulado possui maior número de ligações cruzadas, ocasionando maior entrelaçamento das moléculas e, conseqüentemente, maior resistência térmica. Pelo fato de possuir um maior entrelaçamento, maior quantidade de energia na forma de calor será necessária para degradar o material mais reticulado, o que aumenta sua temperatura de início de degradação. Pela mesma razão, maior quantidade de resíduo deve ser observada após o término da análise para o material mais reticulado.

Os resultados das análises termogravimétricas podem ser vistos na Tabela 12. Compararam-se as amostras 4 e 8 com a gelatina pura a fim de se verificar como a resistência à degradação se altera com a presença das reticulações. Considerando que o equipamento apresenta um erro de $\pm 3^\circ\text{C}$, observa-se que

ambas as amostras apresentaram um pequeno aumento na temperatura do início de degradação em relação ao polímero de origem. No entanto, as amostras 4 e 8 não apresentam diferença significativa dessa propriedade entre si.

Com relação ao percentual de resíduo, percebe-se que as amostras 4 e 8 apresentaram valores próximos e que não se consegue fazer distinção estatística entre eles. No entanto, quando se compara os valores individuais de cada amostra com o percentual de resíduo da matéria prima (gelatina pura), observa-se que a amostra 4 tem quantidade de resíduo estatisticamente igual à gelatina enquanto que a amostra 8 apresenta maior percentual de matéria residual que a matéria-prima. Estes dados dão leve indício de que a amostra 8 está mais reticulada que a amostra 4.

Tabela 12 - Análises termogravimétricas.

Amostra	T _{onset} (°C)	Resíduo (%)
Gelatina B	289	25,58
4	293	28,55
8	294	29,87

Fonte: O autor, 2017.

4.2.3.2 Determinação de grupos NH₂ perdidos

Analisando o mecanismo sugerido por Hodge (1955) (Figura 1), vê-se que a formação das ligações cruzadas entre as cadeias de gelatina se dá através dos grupos NH₂ presentes na estrutura proteica do polímero. Dessa forma, a quantidade desse grupo funcional que ainda permanece na amostra é inversamente proporcional ao grau de reticulação. Para embasar ainda mais as observações feitas até o momento, foram realizadas análises para a determinação dos grupos NH₂. Os resultados da Tabela 13 mostraram que a amostra 4 perdeu 49,21% de seus grupos amino originais enquanto que a amostra 8 perdeu 84,95%.

Tabela 13 - Determinação de perda de grupos NH₂.

Amostra	Mol NH ₂ /g	Perda de NH ₂ (%)
gelatina B	0,00860	-
4	0,00438	49,21
8	0,00130	84,95

Fonte: O autor, 2017.

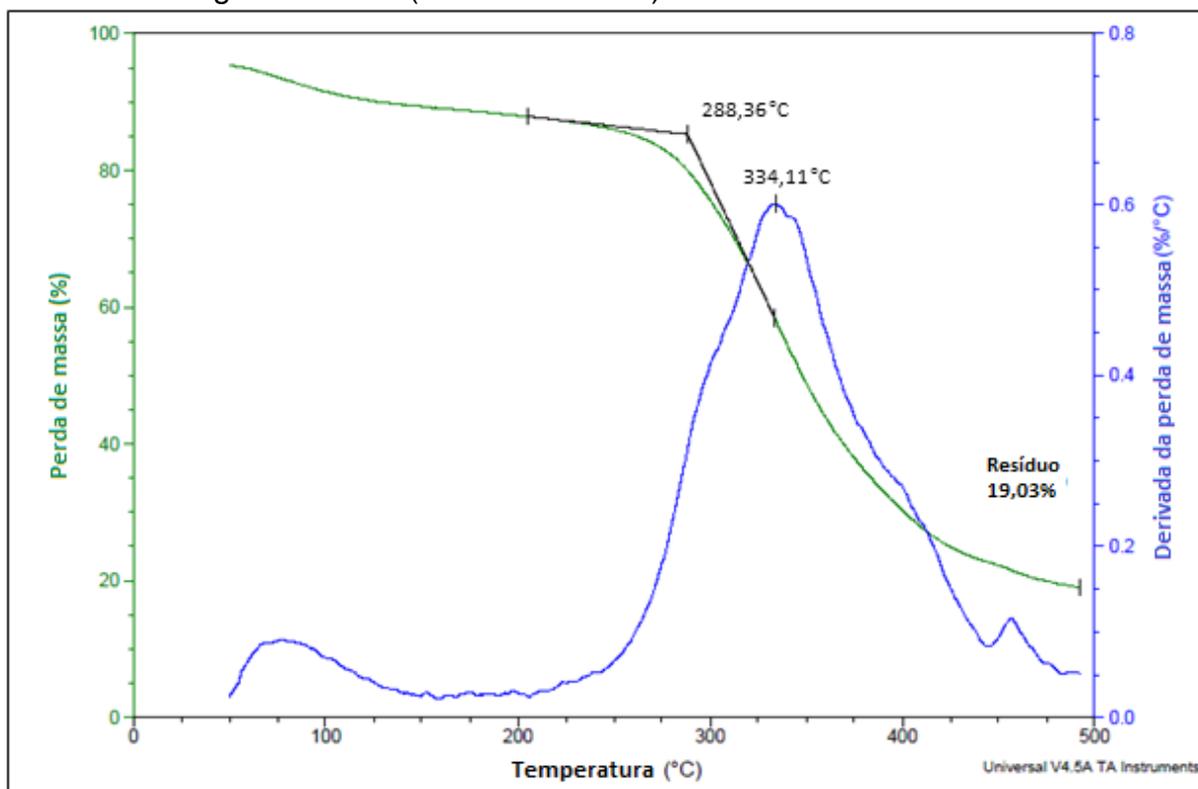
Estes valores conseguem fazer distinção entre as amostras quando se trata de reticulação. Percebe-se que a amostra cujo percentual de frutose na síntese foi maior (amostra 8) perdeu maior percentual de grupos NH_2 . Consequentemente, formou maior número de ligações polímero-reticulante indicando assim, ser esta a amostra que define o melhor percentual de reticulante para a fabricação das microesferas de gelatina reticuladas com frutose. A partir desta etapa a amostra 8 foi renomeada como amostra AF (amostra reticulada com frutose).

4.2.4 Comparação das propriedades das amostras reticuladas com frutose (AF) com as amostras reticuladas com glutaraldeído (GBG03)

Pelos motivos anteriormente explicados, a análise direta do grau de reticulação das amostras foi inviabilizada pela dificuldade de aquisição do TNBS. Por este motivo e também para que se pudesse ter mais uma ferramenta de medida indireta do grau de reticulação da gelatina, análises termogravimétricas foram realizadas para as amostras AF e GBG03, a fim de compará-las. A degradação das amostras ocorreu até 500 °C.

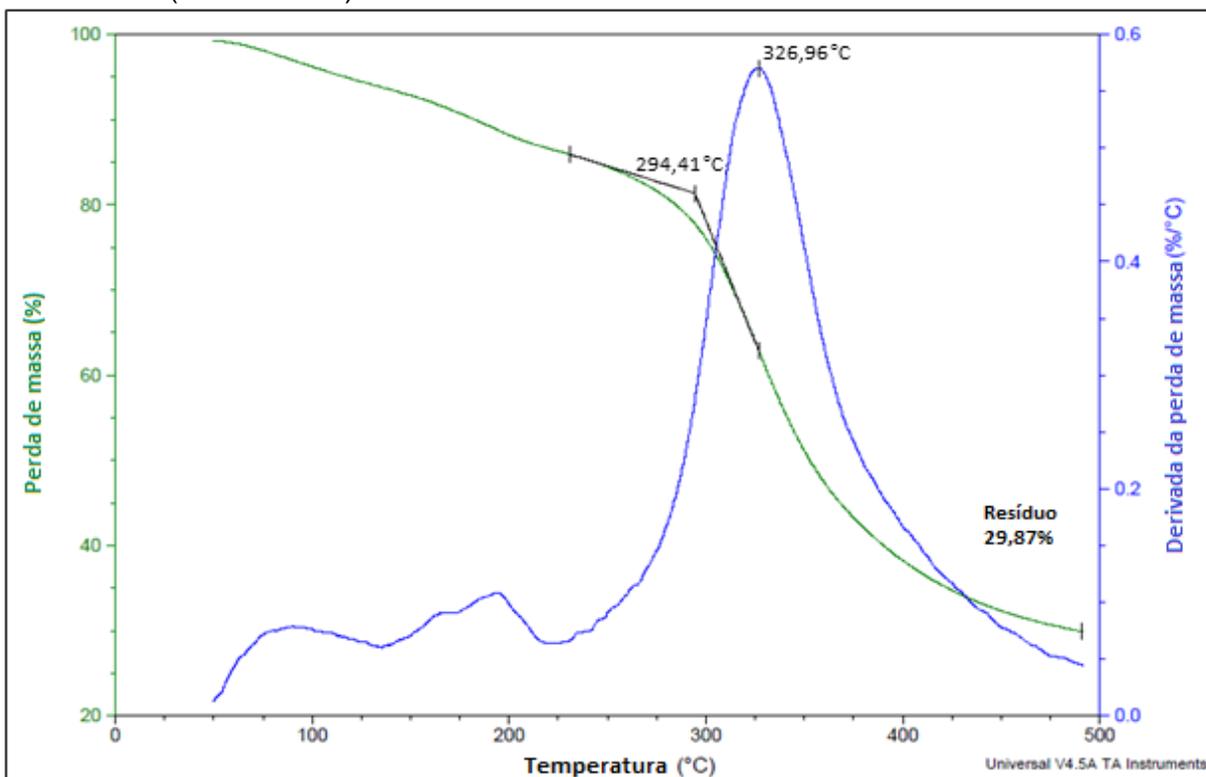
As Figuras 29 e 30 mostram as curvas de degradação térmica para as amostras GBG03 e AF, respectivamente.

Figura 29 - Curvas de degradação térmica das microesferas reticuladas com glutaraldeído (amostra GBG03).



Fonte: O autor, 2017.

Figura 30 - Curvas de degradação térmica das microesferas reticuladas com frutose (amostra AF).



Fonte: O autor, 2017.

As curvas de degradação mostram a temperatura de início da degradação (T_{onset}), a temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima (T_{maxdeg}) e o percentual em massa de resíduo após a análise. A amostra reticulada com glutaraldeído (GBG03) apresentou T_{onset} igual a 288,36 °C enquanto a amostra reticulada com frutose (AF) apresentou T_{onset} igual a 294,41 °C. Levando-se em consideração que o erro experimental da análise é de ± 3 °C, pode-se observar que a temperatura de início de degradação é cerca de 2 °C maior para as microesferas reticuladas com frutose. Comparando-se o percentual em massa de amostra que permanece como resíduo após o término da análise, pode-se perceber que para amostra AF este percentual é cerca de 10% maior.

Os valores de T_{onset} e de percentual de resíduo observados para as duas amostras em questão convergem para uma única hipótese: a amostra AF possui maior grau de reticulação que a amostra GBG03. Quanto mais reticulada se encontra a amostra, maior quantidade de energia na forma de calor deve ser fornecida a fim de quebrar as ligações intra e intermoleculares resultando em maior T_{onset} . Por outro lado, quanto maior for a quantidade de resíduos, maior o percentual de ligações que não foram quebradas, sugerindo um maior grau de reticulação.

Outra informação importante das microesferas reticuladas com frutose que se pode retirar da análise termogravimétrica é que, assim como as demais amostras, a degradação de suas cadeias poliméricas se inicia em temperaturas muito superiores à temperatura de sua provável aplicação (temperatura do corpo humano).

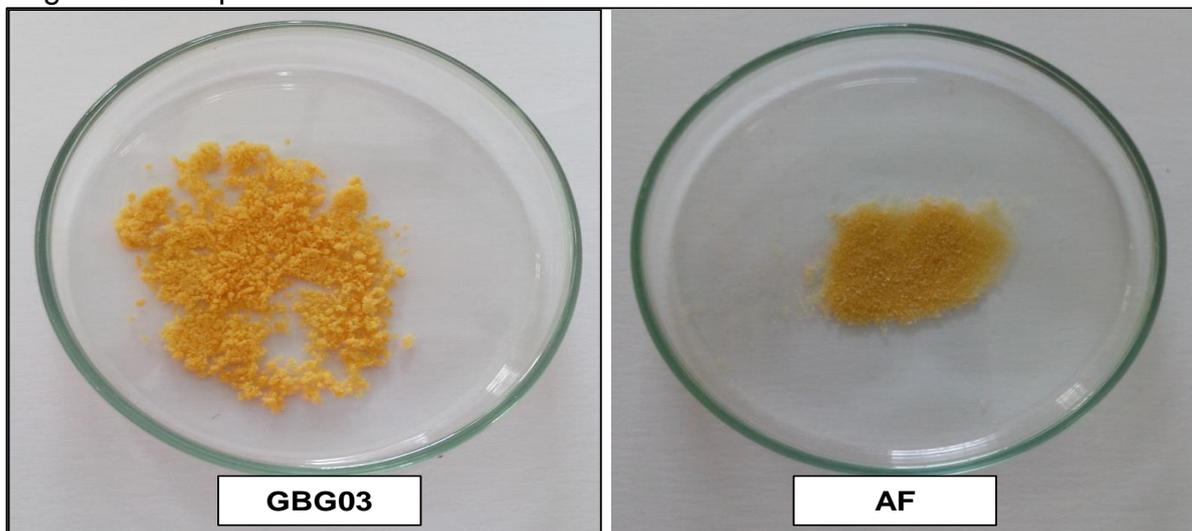
4.2.5 Morfologia da amostra AF

A Figura 31 mostra os aspectos visuais das microesferas GBG03 e AF. A presença de reticulações confere coloração amarelo alaranjado para as microesferas. Sendo assim, como pode ser visto na Figura 31, há indícios visuais de reticulação em ambas as amostras.

Deseja-se, nesta Tese, a obtenção de biocompósitos magnéticos na forma esférica. Este formato, em especial, é utilizado com muita frequência para liberação controlada de fármacos onde a via de entrada no sistema biológico é por injeção intravenosa ou intraarterial. Neste sentido, as microesferas de gelatina reticuladas com frutose apresentaram bom controle morfológico, morfologia esférica e tamanhos

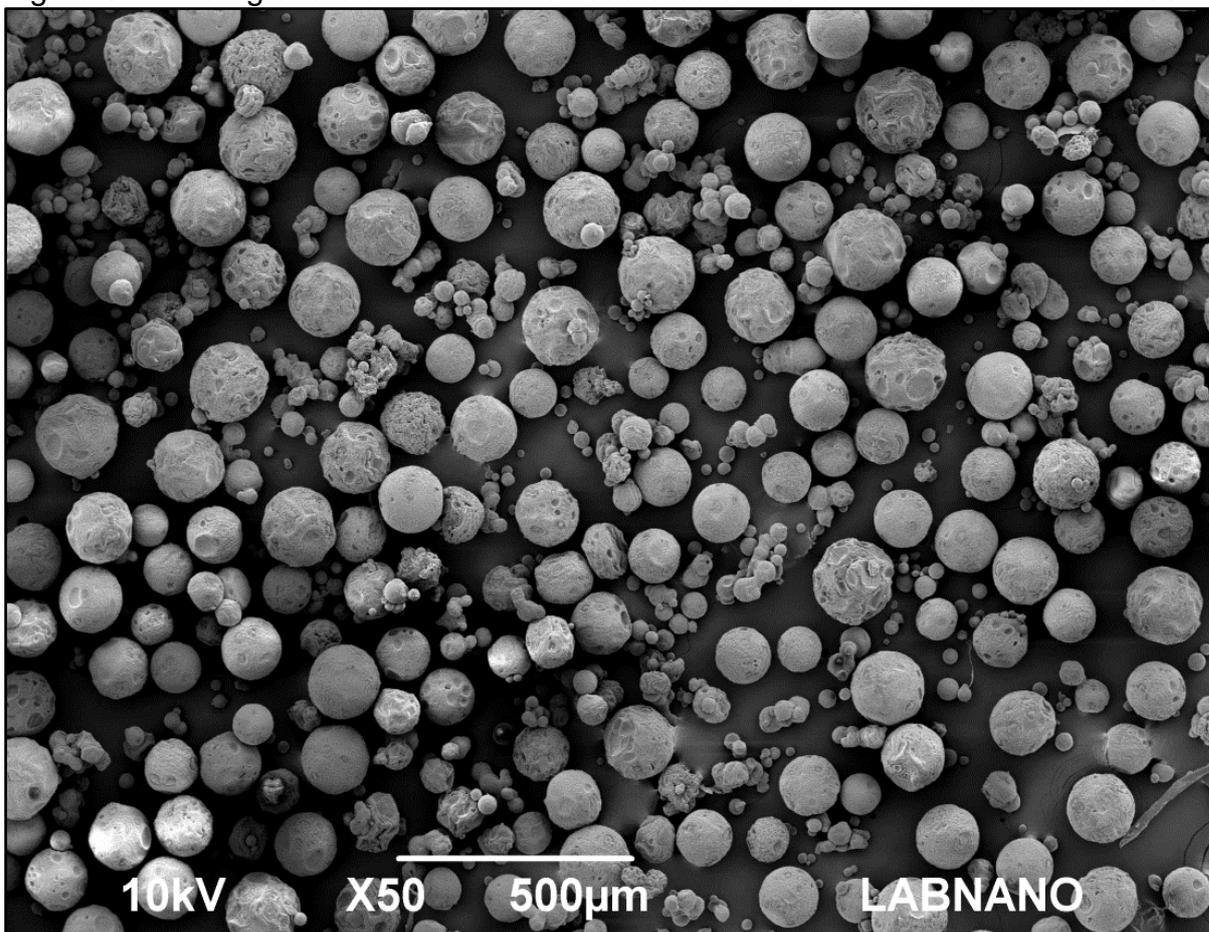
na faixa de 30 μm a 150 μm , como pode ser visto na micrografia eletrônica apresentada na Figura 32.

Figura 31 - Aspecto visual das amostras GBG03 e AF.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 32 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra AF com aumento de 50X.

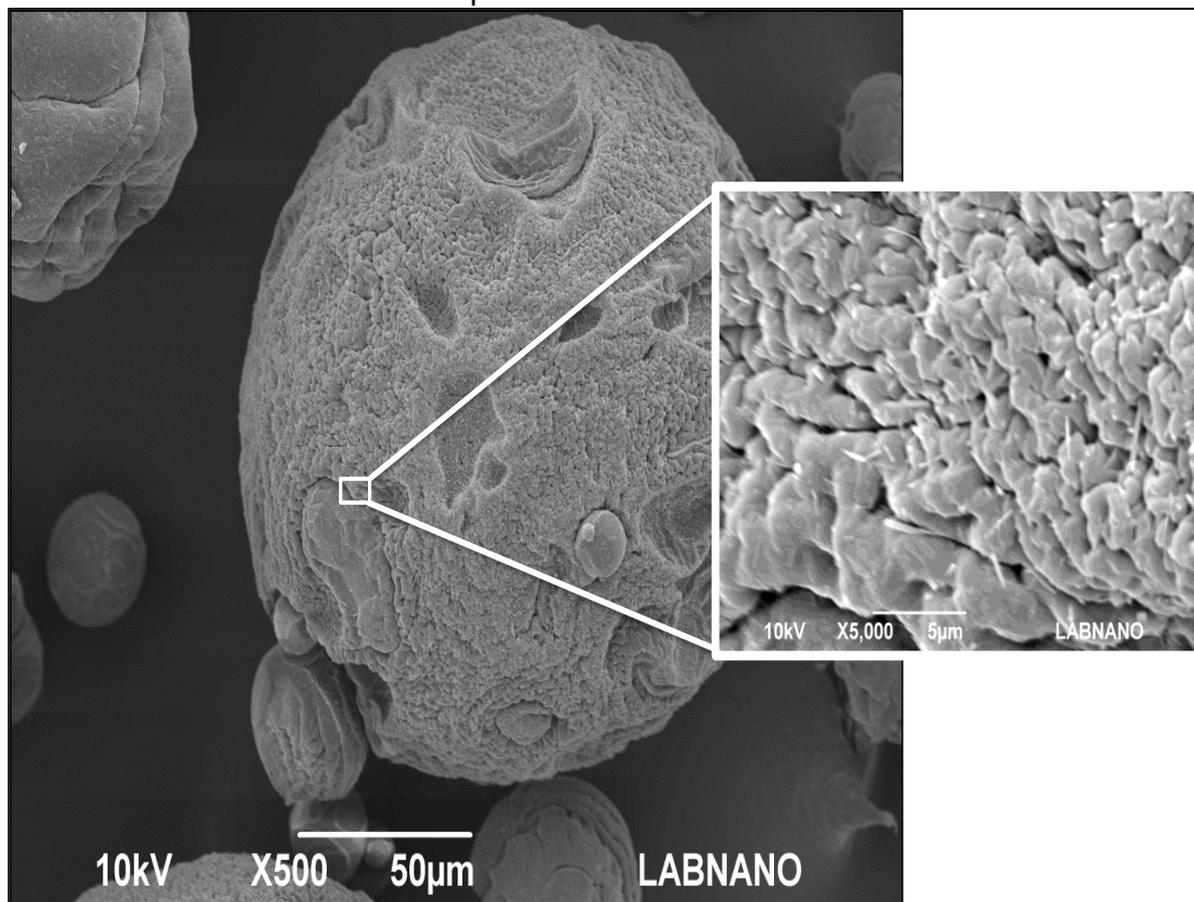


Fonte: O autor, 2017.

A micrografia eletrônica de varredura da Figura 33 mostra maiores ampliações de uma microesfera retirada da amostra AF. Pode-se observar que superfície da microesfera é porosa e apresenta uma rugosidade e entrelaçamento peculiares.

A presença de porosidade para a aplicabilidade das microesferas de gelatina como dispositivo para liberação controlada de fármacos é um aspecto positivo, visto que é necessário que o fármaco tenha contato com a maior área específica possível a fim de que maiores concentrações de medicamento possam ser incorporadas por unidade de volume do suporte. Também pode ser visto que as microesferas apresentam rugosidade. Essa rugosidade foi ocasionada pela ausência de surfactante na etapa de obtenção da emulsão. Neste trabalho, optou-se pela não utilização de reagentes, que mesmo em pequenas quantidades, pudessem aumentar a citotoxicidade do dispositivo como um todo. Por este motivo, nenhuma molécula surfactante (que em geral são citotóxicos) foi utilizada.

Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra AF com aumento de 500X e detalhe da superfície com aumento de 5000X.



Fonte: O autor, 2017.

4.3 Utilização de glicose como agente de reticulação

Assim como a frutose, a glicose também se encontra em equilíbrio com sua forma cíclica em meio aquoso, sendo necessárias alterações no meio reacional para que a carbonila do sacarídeo esteja disponível para a reação química. No tópico 5.2 deste trabalho, observou-se que os testes de dissolução da proteína em meio aquoso indicaram que as menores solubilidades para amostras reticuladas com frutose foram obtidas quando a amostra foi produzida com o pH e o tempo em seus níveis mais altos.

As análises complementares mostraram que, apesar da concentração não apresentar significância estatística, a amostra mais reticulada foi obtida com a utilização do maior percentual de frutose. Para esta etapa de trabalho, decidiu-se comparar a efetividade da reticulação ao se utilizar frutose com a efetividade da reticulação quando se utiliza glicose. Sabe-se que apesar de frutose e glicose serem monossacarídeos, estas moléculas apresentam grupos funcionais diferentes e, portanto, reatividades diferentes. A literatura indica que a carbonila aldeídica da glicose apresenta reatividade maior que a carbonila cetônica da frutose (ALLINGER et al., 1976). No entanto, é necessário verificar se este padrão de reatividade se repete ao se utilizar valores de pH e tempo mais elevados que os encontrados na literatura.

Com este intuito, foi realizado um planejamento de experimentos fatorial fracionário do tipo 2^{4-1} , cujos valores aplicados para os níveis, assim como os fatores, se encontram na Tabela 14.

Neste planejamento, optou-se por utilizar uma variação de tempo entre 10 e 30 minutos ao invés de uma variação entre 10 e 60 minutos a fim de minimizar o tempo gasto na execução dos experimentos e uma variação de pH entre 8 e 9 porque sabe-se que o pH muito elevado leva à degradação das cadeias proteicas da gelatina (Gioffrè et al., 2012).

Para melhores resultados estatísticos foram realizados quatro pontos centrais, conforme pode ser visto na Tabela 15. Todos os experimentos (incluindo os pontos centrais) foram realizados em duplicata. Todas as amostras obtidas com a execução deste planejamento foram submetidas a testes de dissolução de proteínas pelo método do biureto. Os resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 14 - Fatores e níveis experimentais para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.

Amostra	Reticulante	Tempo (min)	% reticulante (m/v)	pH
1	glicose	30	50	8
2	frutose	10	50	8
3	glicose	10	50	9
4	glicose	10	100	8
5	frutose	30	50	9
6	glicose	30	100	9
7	frutose	10	100	9
8	frutose	30	100	8
central 1	glicose	20	75	8,5
central 1'	glicose	20	75	8,5
central 2	frutose	20	75	8,5
central 2'	frutose	20	75	8,5

Fonte: O autor, 2017.

Tabela 15 - Resultados do percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas pelo planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.

Amostra	Gelatina dissolvida (%)
1	70,11
2	60,19
3	80,82
4	50,50
5	76,30
6	73,45
7	57,01
8	26,85
central 1	60,26
central 1'	81,92
central 2	73,58
central 2'	72,41

Fonte: O autor, 2017.

Com os resultados da Tabela 15 foi realizada a análise da variância (ANOVA), cujos resultados se encontram na Tabela 16.

Ao analisar a Tabela 16, percebe-se que os valores p para todos os fatores estudados são estatisticamente irrelevantes quando se incluem na análise os efeitos de segunda ordem.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas pelo planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.

	SS	MS	F	p
Reticulante (1)	214,387	214,387	1,279763	0,321171
Tempo (2)	0,410	0,410	0,002445	0,962937
% reticulante (3)	792,219	792,219	4,729068	0,095314
pH (4)	798,601	798,601	4,767162	0,094387
1*2	86,396	86,396	0,515729	0,512380
1*3	82,240	82,240	0,490925	0,522129
1*4	19,877	19,877	0,118651	0,747850
Erro	670,085	167,5210		
Total SS	2664,441			

Fonte: O autor, 2017.

Para verificar se realmente os parâmetros estudados não interferem na solubilidade (e conseqüente reticulação da amostra), foi realizada a análise da variância ignorando estes efeitos. A ANOVA para este planejamento considerando apenas os efeitos de primeira ordem pode ser vista na Tabela 17. Esta Tabela mostra que há relevância estatística para os fatores pH e percentual de reticulante na amostra.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) sem efeitos de segunda ordem para percentual de gelatina dissolvida das amostras obtidas para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.

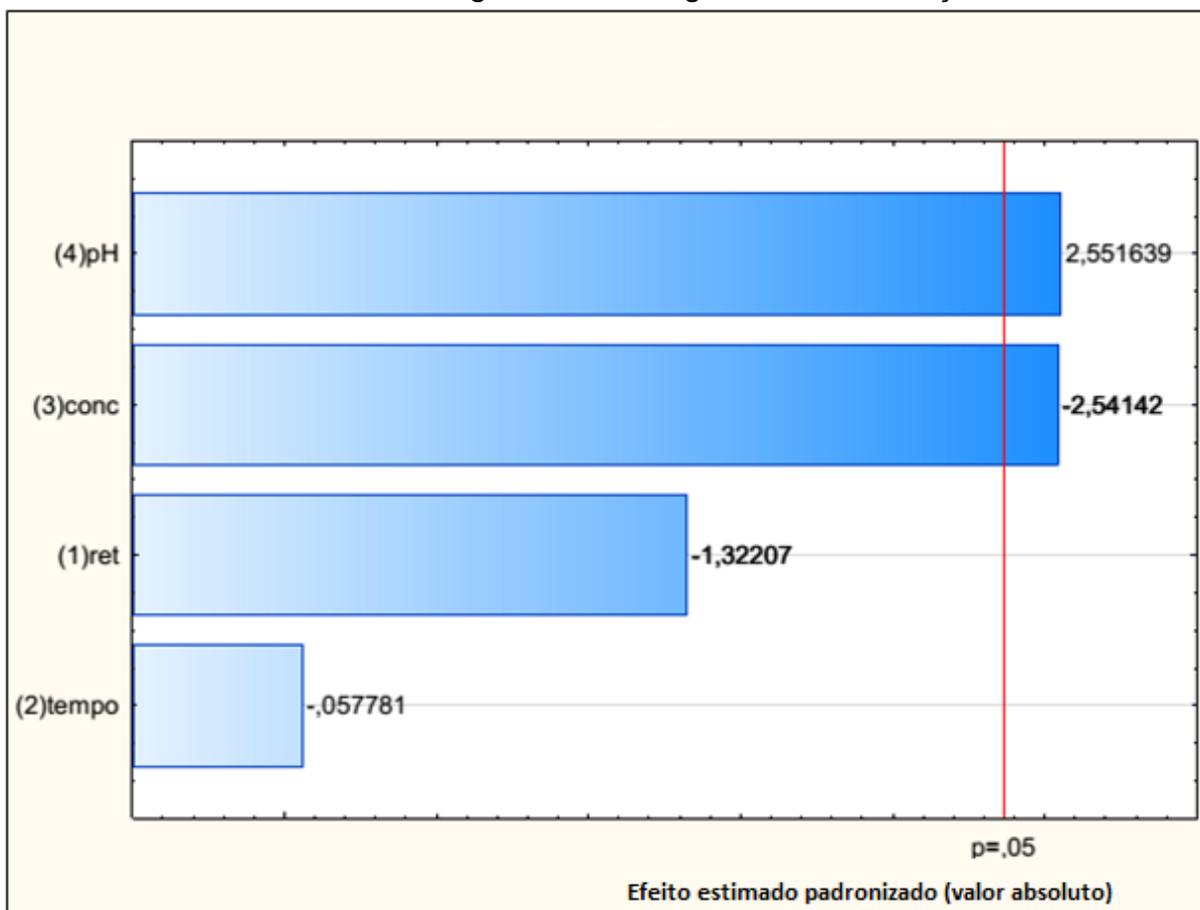
	SS	MS	F	p
Reticulante	214,377	214,3765	1,747292	0,227776
Tempo	0,410	0,4095	0,003338	0,955544
% reticulante	792,219	792,2190	6,457040	0,038604
Ph	798,601	798,6006	6,509054	0,038032
Erro	858,835	122,6907		
Total SS	2664,441			

Fonte: O autor, 2017.

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 34), percebe-se que o pH influencia positivamente a solubilidade das amostras enquanto a concentração do reticulante influencia de maneira negativa. Em outras palavras, a solubilidade das microesferas produzidas aumentam com o aumento do pH e com a diminuição da concentração de reticulante.

O fato de a solubilidade das amostras aumentar quando o pH está em seu nível mais elevado (pH = 9), demonstra que, mesmo que a reticulação da gelatina com a utilização de açúcares seja aumentada com a elevação do pH reacional, a exposição das cadeias proteicas a este pH já é suficiente para que haja possível degradação.

Figura 34 - Gráfico de Pareto para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.



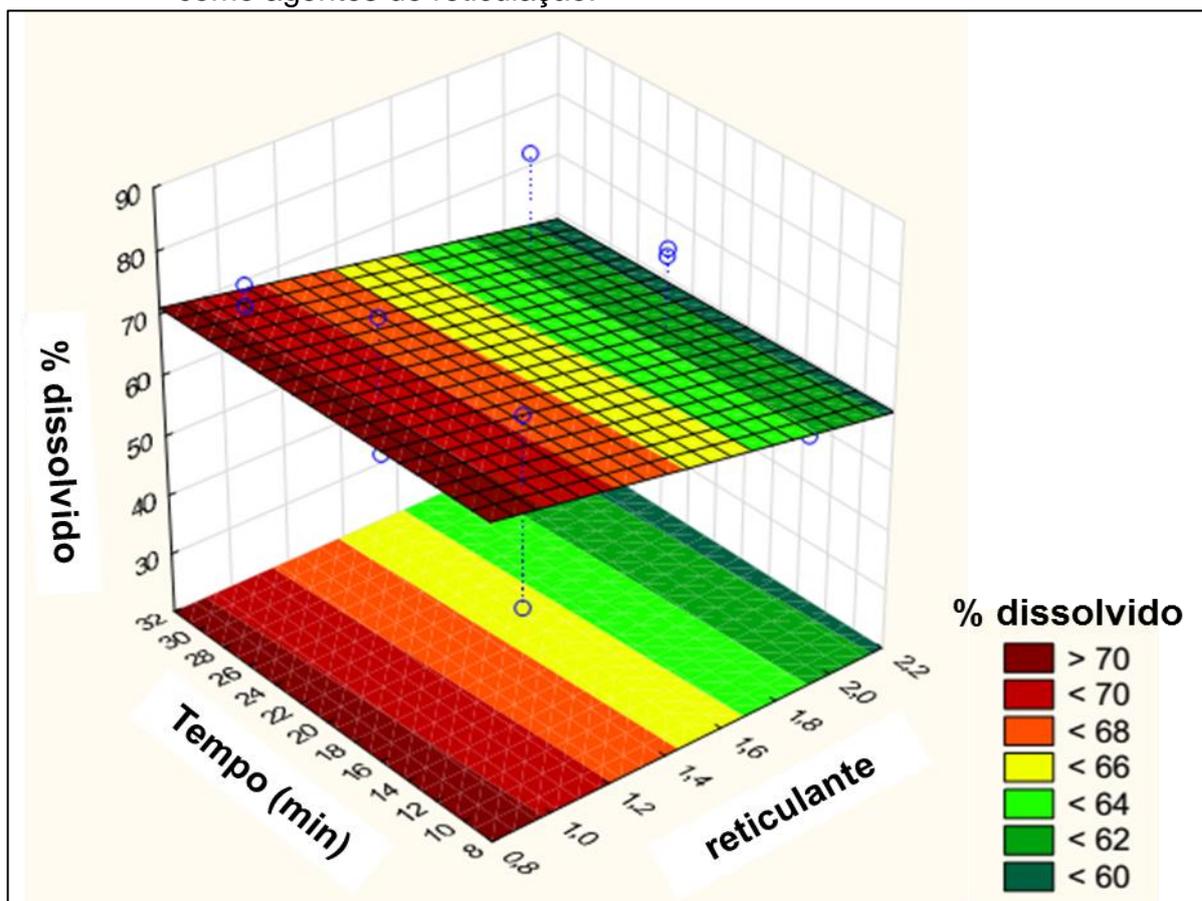
Fonte: O autor, 2017.

Para melhor análise dos dados, deve-se fazer a visualização das superfícies de resposta geradas pelo planejamento de experimentos. As Figuras 35, 36 e 37 mostram estas superfícies.

A Figura 35 mostra a superfície de resposta para tempo em função do tipo de reticulante. Analisando conjuntamente estes dois fatores, observa-se neste gráfico que para o reticulante 1 (glicose), as amostras apresentaram solubilidade de cerca de 70%. Para as amostras obtidas com o reticulante 2 (frutose), a solubilidade foi de cerca de 62%. Também se observa que, para ambos os reticulantes, o percentual de material dissolvido se mantém praticamente constante em todos os tempos de aquecimento da emulsão, o que indica que o tempo não interfere nesta propriedade nas condições estudadas. Os menores valores de solubilidade observados para a frutose indicam que esta molécula é um reticulante melhor para as cadeias de gelatina visto que o objetivo principal da reticulação é justamente diminuir a solubilidade das amostras em meio aquoso. Por meio destas observações, pode-se

concluir que, mesmo que o tipo de agente reticulante não demonstre na análise de variância que possui significância estatística, a superfície de resposta mostra que menores solubilidades e melhores propriedades para as microesferas são obtidas com o uso da frutose ao invés da glicose.

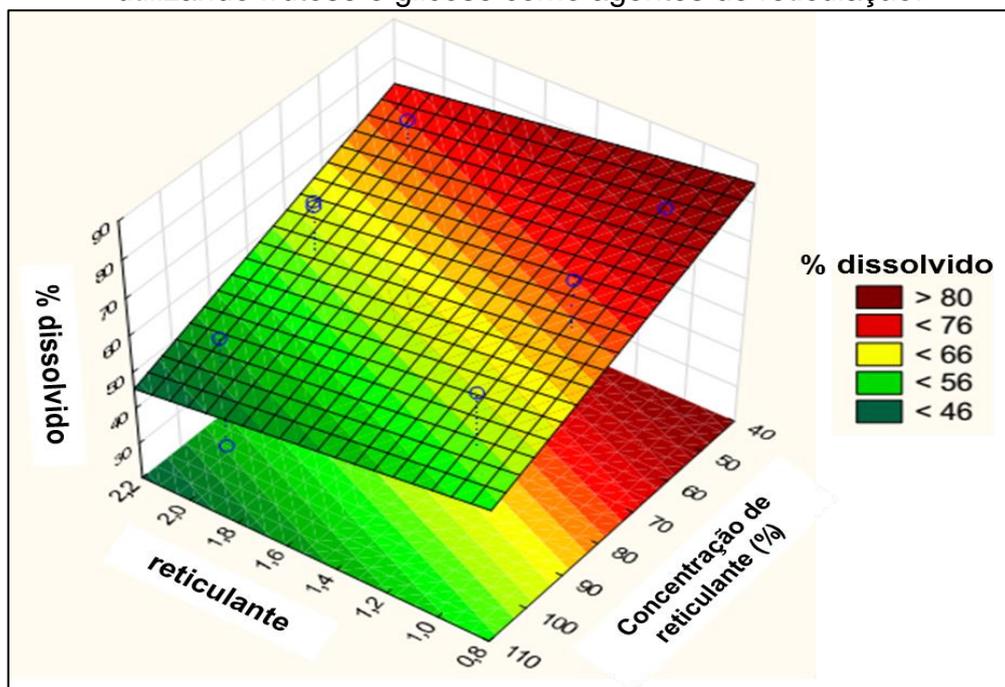
Figura 35 - Superfície de resposta para tempo em função do tipo de reticulante para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.



Fonte: O autor, 2017.

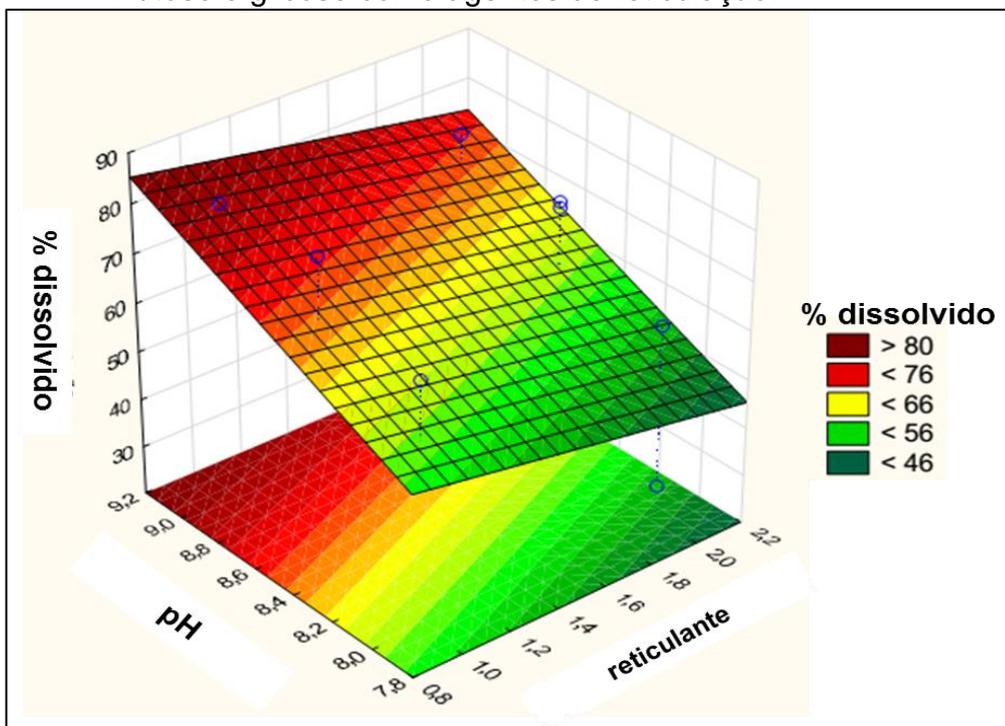
A Figura 36 mostra a superfície de resposta para tipo de reticulante em função de sua concentração. A tendência geral definida por esta superfície é de que os menores valores de percentual dissolvido foram obtidos utilizando-se reticulante 2 (frutose) e maiores concentrações de reticulante. Esses resultados são compatíveis com os resultados apresentados na Figura 35 e também com os obtidos no planejamento de experimentos estudado no item 4.2 desta Tese.

Figura 36 - Superfície de resposta para tipo de reticulante em função de sua concentração para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 37 - Superfície de resposta para pH em função do tipo de reticulante para o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.



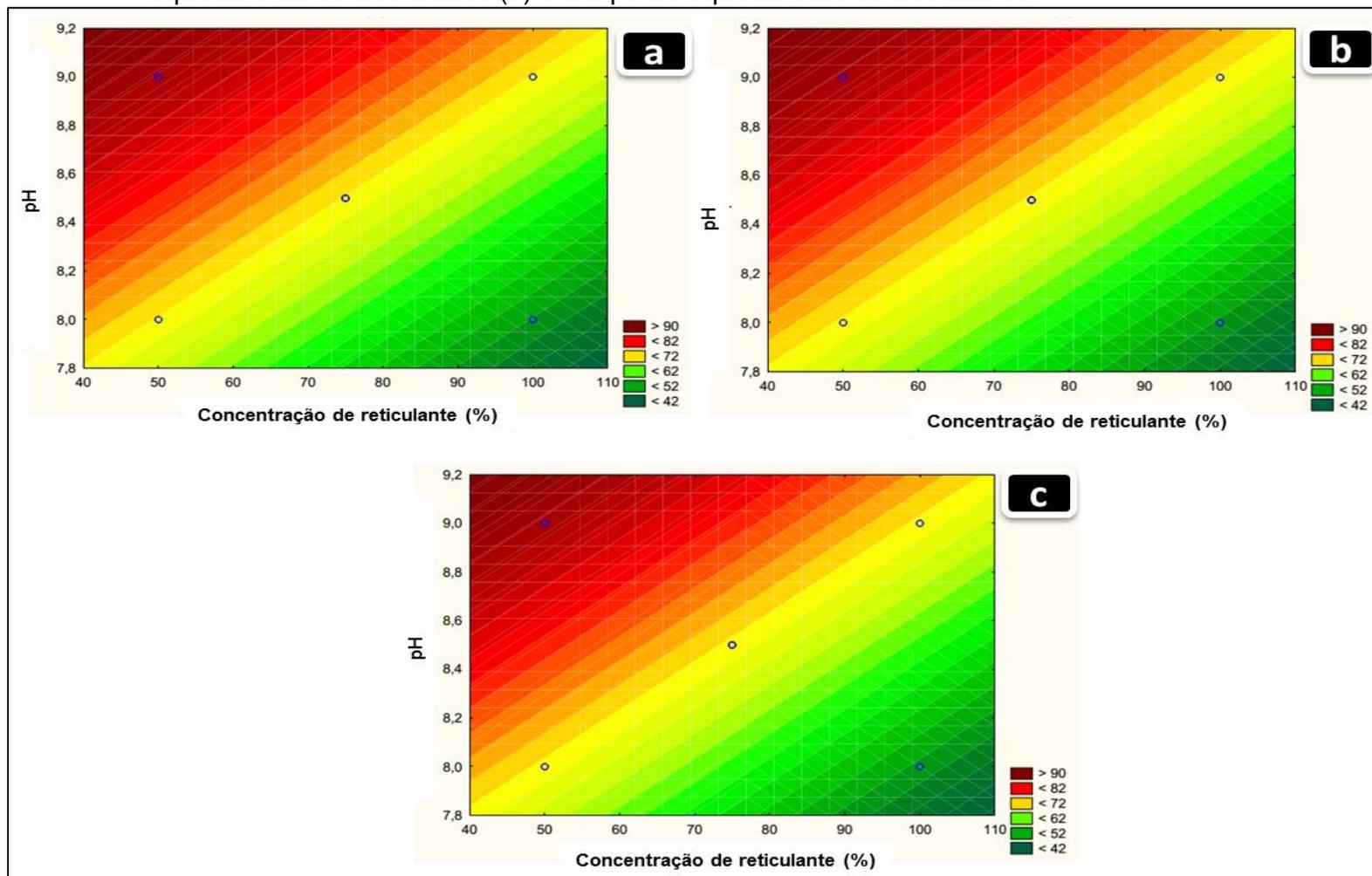
Fonte: O autor, 2017.

A Figura 37 mostra a superfície de resposta para pH em função do tipo de reticulante. Observa-se que, mais uma vez, o melhor reticulante para gelatina é frutose por apresentar menores valores de solubilidade. Com relação ao pH do meio reacional, a superfície mostra que as amostras obtidas com pH 8 apresentaram melhores resultados.

Quando se comparam os gráficos de contorno dos fatores que têm relevância estatística (pH e concentração do reticulante) para um mesmo reticulante em tempos variados como mostra a Figura 38, observa-se que o perfil dos gráficos permanecem inalterados. Esta observação demonstra que, ao contrário do que acontece com o tipo de reticulante, que não tem representatividade estatística, mas podem-se mudar as propriedades da microesfera, o tempo de aquecimento não possui representatividade estatística nem altera a solubilidade das amostras.

A mesma comparação quando se utilizam os gráficos de contorno as amostras obtidas quando se utiliza frutose apresenta resultados idênticos, ou seja, o tempo de aquecimento não altera o percentual de dissolução das amostras.

Figura 38 - Gráficos de contorno do planejamento de experimentos utilizando glicose como reticulante para pH em função da concentração de reticulante com tempo de aquecimento de 10 minutos (a), tempo de aquecimento de 20 minutos (b) e tempo de aquecimento de 30 minutos.



Fonte: O autor, 2017.

A Tabela 18 apresenta os melhores resultados obtidos nesta etapa da Tese. Como se observa, a solubilidade diminui pela metade simplesmente pela troca de agente de reticulação. O que confirma a escolha da frutose como sendo melhor agente de reticulação do que a glicose. Diante destes resultados, as próximas etapas desta Tese serão realizadas utilizando-se frutose em detrimento da glicose.

Tabela 18 - Melhores resultados obtidos com o planejamento de experimentos comparativo utilizando frutose e glicose como agentes de reticulação.

Amostra	Reticulante	Gelatina dissolvida (%)
4	glicose	50,50
8	frutose	26,85

pH = 8 e concentração de reticulante = 100% (m/v)

Fonte: O autor, 2017.

4.4 Estudo comparativo da utilização de genipina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), glutaraldeído e frutose como agentes de reticulação

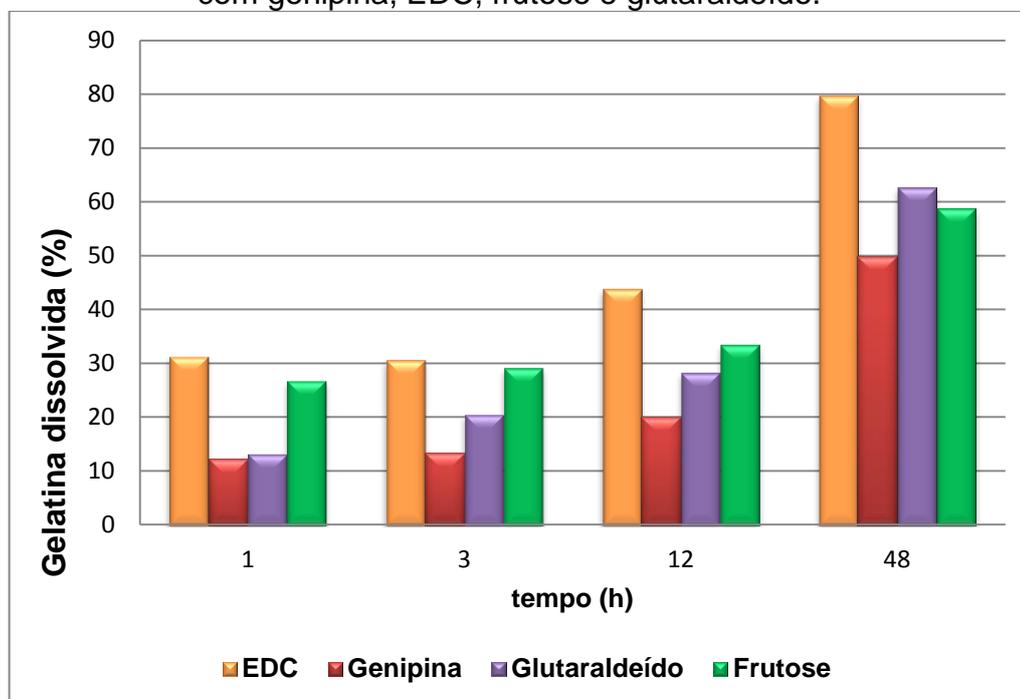
Com o objetivo de se obterem microesferas de gelatina que apresentem menor solubilidade com menor grau de citotoxicidade possível, foram comparadas microesferas que foram reticuladas com genipina, EDC, frutose ou glutaraldeído. Os três primeiros reticulantes são moléculas com baixa citotoxicidade que estão sendo sugeridas como substitutas ao reticulante tradicional e citotóxico (glutaraldeído). As amostras foram submetidas a testes solubilidade da gelatina em água e testes de degradação enzimática (simulando o meio fisiológico).

4.4.1 Solubilidade em água

Nesta etapa da Tese, microesferas de gelatina foram reticuladas com genipina, EDC, frutose ou glutaraldeído utilizando-se tempo de reação de 1h. As amostras foram colocadas em meio aquoso à temperatura de 37 °C e o percentual

de gelatina dissolvida no meio foi analisado após 1h, 3h, 12h e 48h de imersão da amostra. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 39.

Figura 39 - Testes de solubilidade em água para amostras reticuladas com genipina, EDC, frutose e glutaraldeído.



Fonte: O autor, 2017.

Para todos os períodos de tempo investigados, percebe-se um aumento no percentual da dissolução de material gelatinoso, o que já era esperado por causa da hidrofiliabilidade das cadeias de gelatina com a água.

Ao término das 48h de análise, os resultados mostram que a menor solubilidade e, conseqüentemente, melhor matriz para uso em dispositivos biomédicos, é atribuída à genipina, um dos reticulantes propostos para a substituição do glutaraldeído.

Em oposição a este resultado, a molécula de EDC se apresenta como sendo o pior reticulante segundo os resultados da análise. Seus percentuais de gelatina dissolvida são, em todos os tempos estudados, maiores que os demais reticulantes.

Também pode-se observar que, apesar de apresentar percentuais de gelatina dissolvida relativamente altos (comparando-se com os demais reticulantes) nos tempos iniciais da análise, a frutose apresenta resultados próximos ao do glutaraldeído e chega a ser menor quando se observa a análise em seu maior tempo. Considerando que a possível aplicação deste material será para a liberação

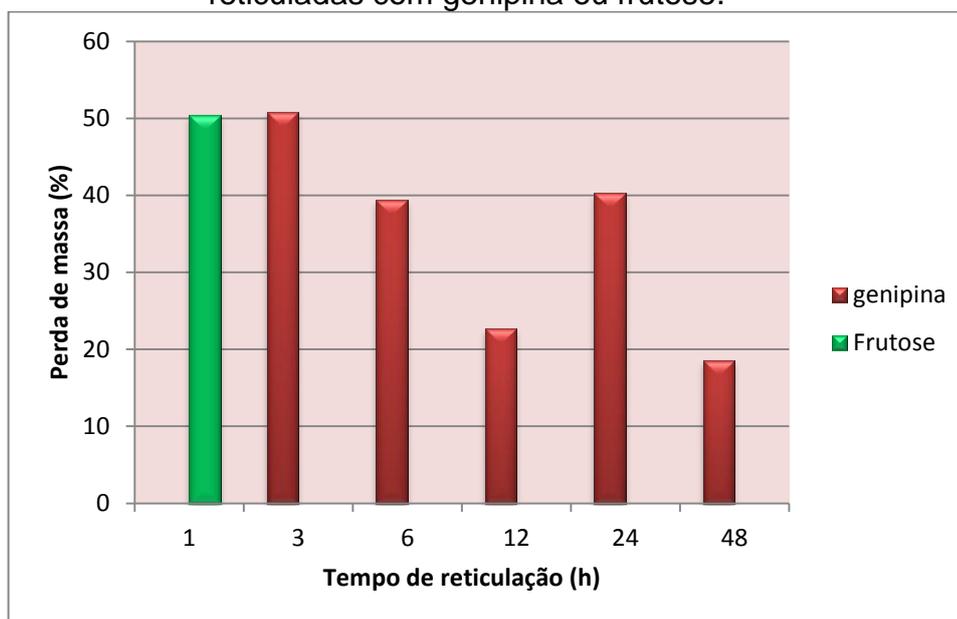
controlada de fármaco, o perfil de solubilidade desta amostra confere um aspecto positivo para as microesferas reticuladas com frutose visto que se almeja um dispositivo que solubilize parcialmente nos momentos iniciais (para liberar parte da carga farmacêutica) e permaneça insolúvel ainda por muitas horas.

4.4.2 Testes de degradação enzimática

Neste teste, a reação de reticulação das microesferas foi realizada utilizando-se genipina, EDC ou glutaraldeído com tempos de reação de 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h. Amostras reticuladas com frutose foram sujeitas a apenas 1h de reticulação porque temperatura e pH elevados (condições experimentais necessárias para a efetiva reticulação com frutose) ocasionam a degradação das cadeias proteicas se o tempo de exposição for elevado. As amostras foram colocadas em solução aquosa de colagenase (enzima responsável pela quebra das moléculas proteicas no meio fisiológico) e à temperatura de 37 °C, para simular o meio fisiológico. O percentual de gelatina dissolvida foi analisado após 1h de imersão da amostra no ambiente simulado. Os resultados devem fazer distinção do grau de reticulação das amostras visto que amostras mais reticuladas devem perder menor percentual de massa ao longo do tempo pois são mais difíceis de se degradar por causa das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas por fornecerem maior resistência ao material. Os resultados obtidos podem ser vistos nas Figuras 40, 41, 42 e 43.

Os resultados desta análise para as amostras reticuladas com genipina (Figura 40) mostram que a perda de massa diminui significativamente quando o tempo de reação aumenta, indicando assim, que há aumento de reticulação. Comparando-se a degradação sofrida pelas amostras de genipina com a degradação sofrida pelas amostras de frutose, percebe-se que a amostra de frutose, mesmo tendo sido reticulada por um período de apenas 1h, se comportaria no corpo humano de maneira muito semelhante àquela reticulada com genipina por um período de 3h.

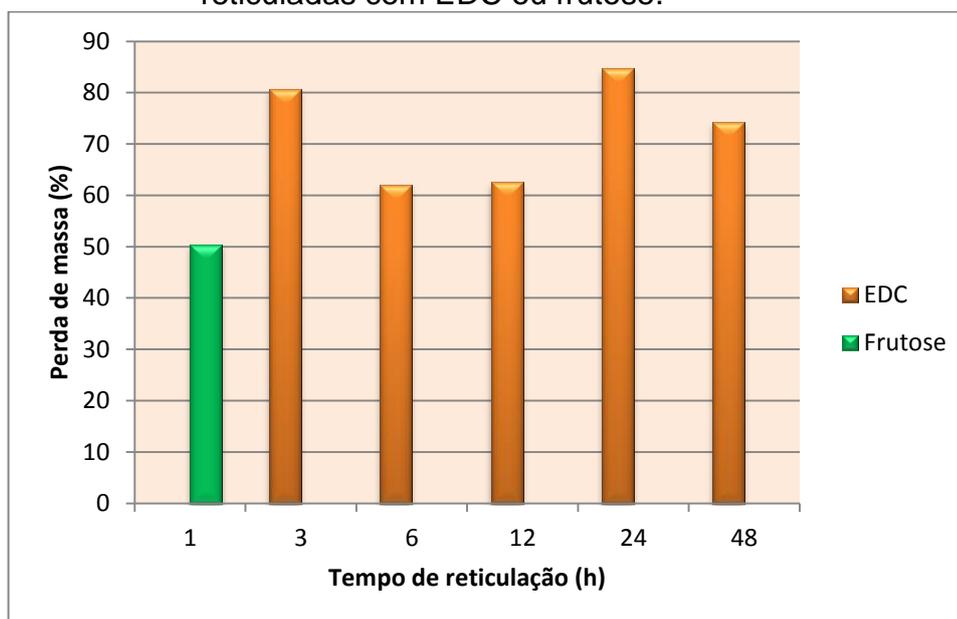
Figura 40 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com genipina ou frutose.



Fonte: O autor, 2017.

A Figura 41 mostra os resultados para as amostras reticuladas com EDC e frutose. As amostras reticuladas com EDC mostraram baixa resistência frente à degradação enzimática visto que altos percentuais de massa foram perdidos mesmo quando o tempo de reticulação da amostra foi de 48h. Comparando-se com a amostra reticulada com frutose já se pode afirmar que esse sacarídeo é um reticulante mais eficaz que EDC para a gelatina. Também se pode afirmar que, nas condições estudadas nesta Tese, o perfil de degradação enzimática de EDC inviabiliza esta molécula como agente reticulante de microesferas de gelatina para aplicação como dispositivo para liberação controlada de fármaco visto que alta perda de massa da matriz polimérica levaria a altas taxas de liberação da carga farmacêutica logo nos momentos iniciais do contato com o meio fisiológico.

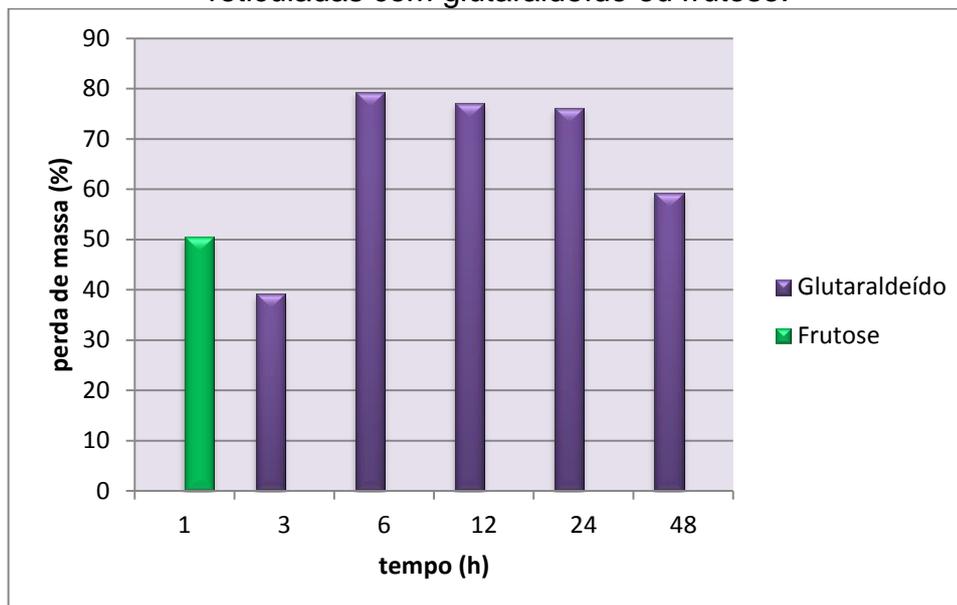
Figura 41 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com EDC ou frutose.



Fonte: O autor, 2017.

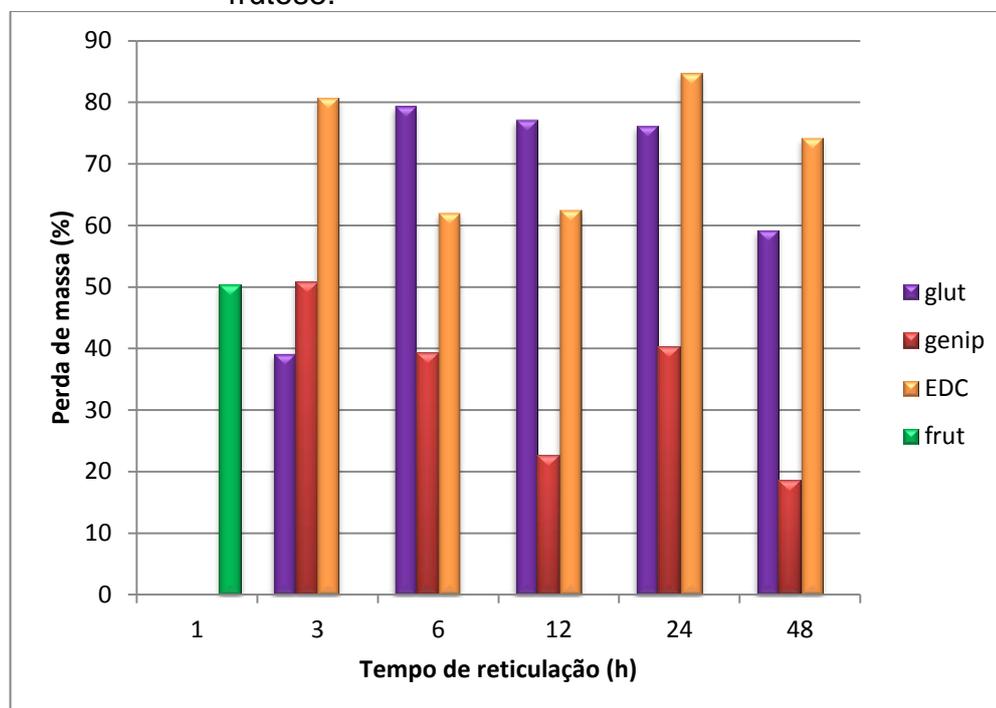
A degradação enzimática sofrida pelas amostras reticuladas com glutaraldeído é mostrada na Figura 42. Percebe-se que a amostra que foi reticulada por 3h apresentou menor perda de massa, sendo esta a amostra com melhor resistência frente à degradação no ambiente simulado. Além disso, percebe-se também que o aumento do tempo de reação não favorece a reticulação com este reticulante visto que a degradação aumenta significativamente com a utilização de tempos de reação maiores que 3h. Comparando-se as amostras reticuladas com glutaraldeído com as que foram reticuladas com frutose percebe-se que a perda de massa difere em torno de 10% para as duas amostras quando o tempo de reticulação é baixo. Este resultado faz do glutaraldeído um melhor agente de reticulação visto que apresenta melhor desempenho nestas condições. No entanto, a diferença de perda de massa encontrada não é tão elevada a ponto de inviabilizar as amostras reticuladas com frutose para a aplicação proposta nesta Tese.

Figura 42 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com glutaraldeído ou frutose.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 43 - Testes de degradação enzimática das microesferas reticuladas com genipina, EDC, glutaraldeído ou frutose.



Fonte: O autor, 2017.

A Figura 43 mostra um comparativo entre todos os reticulantes estudados. Os resultados mostram que, em geral, as amostras reticuladas com genipina apresentam os menores percentuais de degradação, indicando que estas estão mais

reticuladas que as demais, inclusive mais reticuladas que o glutaraldeído. As amostras reticuladas com EDC apresentam altas taxas de perda de massa em todos os tempos estudados mas, quando comparada às amostras reticuladas com o reticulante tradicional (glutaraldeído), seu desempenho foi melhor para tempos de reticulação de 6h e 12h. Em se tratando de frutose, percebe-se que, mesmo com menor tempo de reticulação, seu percentual de degradação é semelhante ao do glutaraldeído, chegando a ser menor, inclusive, para amostras nas quais a reticulação com glutaraldeído foi realizada em tempos superiores a 3 horas.

De acordo com estes resultados, pode-se classificar o desempenho das amostras da seguinte forma:

- amostras reticuladas com genipina apresentaram melhores desempenhos em todos os tempos, tendo a amostra reticulada por 48 h a menor perda de massa;
- amostras reticuladas com glutaraldeído apresentaram o segundo melhor desempenho quando o tempo de reticulação é de 3 horas e apresentaram baixo desempenho para tempos de reticulação maiores que 3 horas;
- amostras reticuladas com frutose apresentaram o terceiro melhor desempenho mesmo tendo sido reticulada com apenas 1 hora de reação;
- amostras reticuladas com EDC apresentaram o pior desempenho dentre os reticulantes estudados.

Comparando-se os resultados de degradação enzimática juntamente com os resultados para solubilidade em água que foram discutidos no tópico anterior, percebe-se que, a genipina demonstra ser a melhor escolha a ser feita pois apresenta os melhores resultados. Esta escolha além de conferir melhores propriedades para as microesferas de gelatina, também resulta na minimização dos efeitos citotóxicos no dispositivo.

No entanto, para a produção em larga escala, uma demanda industrial, por exemplo, a utilização deste reticulante pode ser inviabilizada pelo alto custo do processo. Este custo é aumentado inicialmente pelo valor do reticulante. Nesta Tese foram gastos cerca de R\$ 880,00 por grama de microesferas que foram reticuladas com genipina. Além disso, o melhor desempenho da genipina foi observado com tempo de reticulação de 48 horas, o que aumenta ainda mais o custo do processo considerando-se gastos com remuneração de funcionários, energia elétrica, etc.

O segundo melhor reticulante com baixa citotoxicidade foi a frutose. Quando se analisa este reticulante sob o ponto de vista econômico, percebe-se que o custo envolvido em uma futura fabricação em escala industrial não inviabilizaria o processo visto que é um composto barato (cerca de R\$ 2,25 por grama de microesfera reticulada) e de fácil aquisição, além de necessitar de apenas 1h de reação. Por estes motivos, os demais estudos desta tese foram realizados utilizando-se a frutose como agente de reticulação para as microesferas de gelatina.

4.5 Preparo dos biocompósitos

O principal objetivo desta Tese é preparar e caracterizar dispositivos biomédicos para transporte e liberação magneticamente controlados de fármacos. Por este motivo, biocompósitos à base de gelatina e frutose foram preparados na presença de um material magnético.

Existem inúmeros materiais magnéticos que poderiam ser utilizados. No entanto, o material magnético adequado para a fabricação dos dispositivos propostos neste trabalho deverá apresentar alta magnetização de saturação, superparamagnetismo e alta compatibilidade com as cadeias de gelatina. Por esta razão, nesta etapa foram testados três diferentes materiais magnéticos para a fabricação dos biocompósitos. Primeiramente optou-se por utilizar magnetita em detrimento dos demais óxidos magnéticos de ferro (maghemita e hematita), pois apresenta maior magnetização de saturação. No entanto, sua magnetização pode ser influenciada pela rota de síntese e pelos reagentes utilizados no seu preparo. Por estes motivos, foram sintetizadas duas magnetitas sólidas: uma obtida a partir de sulfato ferroso e outra obtida a partir de cloreto ferroso.

Com o objetivo de maximizar a interação polímero-magnetita e, conseqüentemente, aumentar a incorporação de material magnético e minimizar a perturbação na morfologia dos biocompósitos, decidiu-se também sintetizar um fluido magnético onde gelatina foi utilizada como surfactante.

A Tabela 19 mostra a descrição dos materiais magnéticos produzidos e a Tabela 20 mostra o material magnético utilizado em cada amostra de biocompósito.

Tabela 19 - Descrição dos materiais magnéticos sintetizados.

Amostra	Descrição
MG1	Magnetita sólida obtida a partir de sulfato ferroso
MG2	Magnetita sólida obtida a partir de cloreto ferroso
FLU1	Fluido magnético à base de gelatina e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso

Fonte: O autor, 2017.

Tabela 20 - Material magnético utilizado no preparo dos biocompósitos.

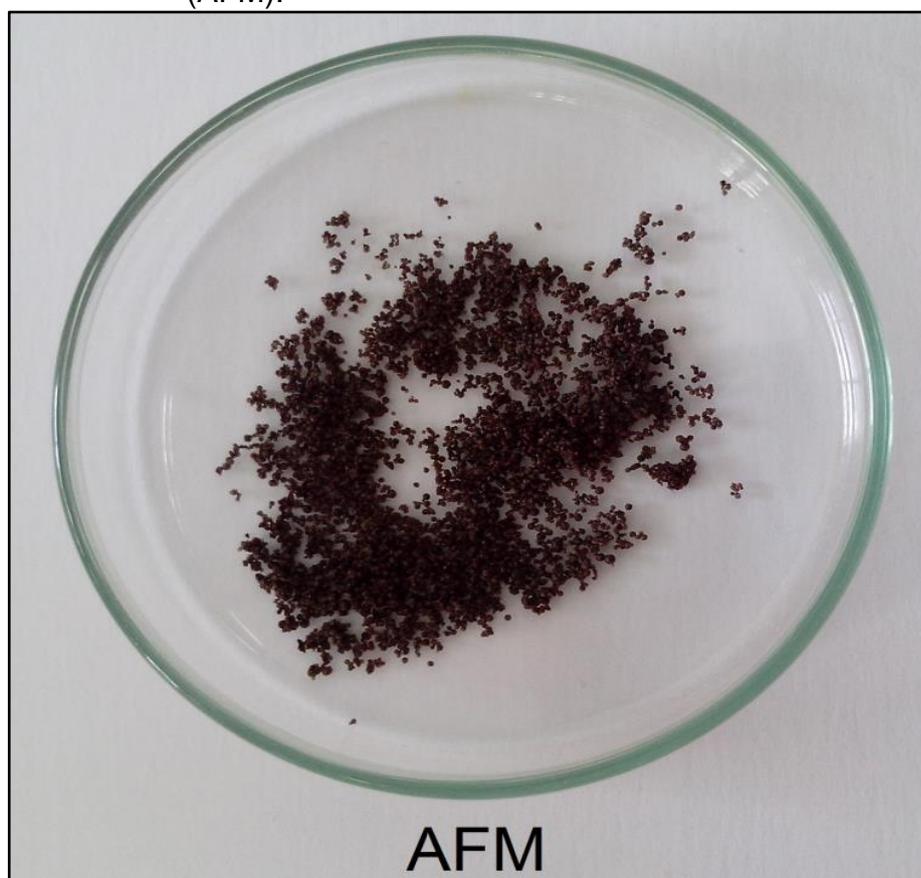
Amostra	Material magnético
AFM	MG1
AFM2	MG2
AFM3	FLU1

Fonte: O autor, 2017.

4.5.1 Morfologia dos biocompósitos

A Figura 44 mostra o aspecto visual dos biocompósitos AFM. Observou-se que os biocompósitos apresentaram morfologia esférica e coloração marrom escuro por causa da presença de material magnético. Não foram observadas partículas de coloração clara, indicando assim, que houve distribuição homogênea do material magnético nas microesferas. Todas as demais amostras preparadas nesta etapa apresentaram características visuais semelhantes às da amostra AFM.

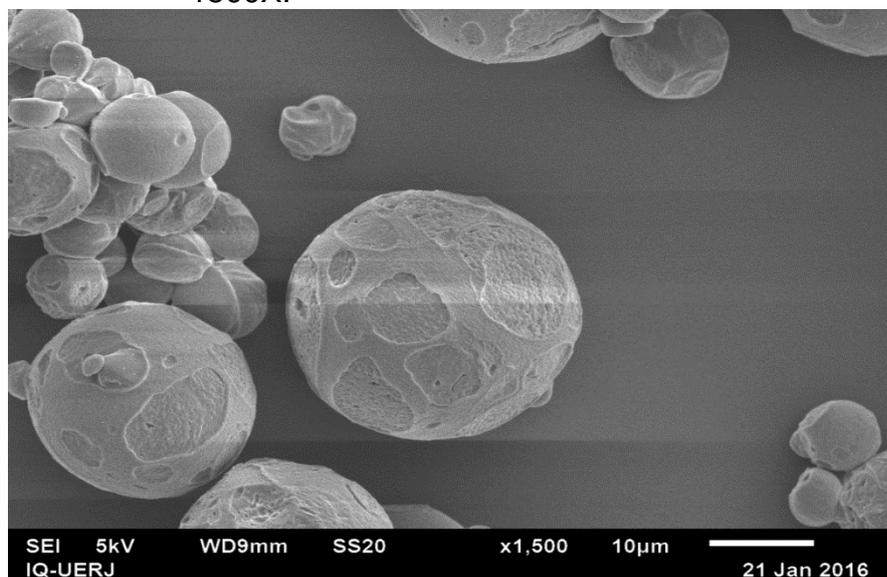
Figura 44 - Aspecto visual de microesferas à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM).



Fonte: O autor, 2017.

A análise da superfície dos biocompósitos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para avaliar a influência do material magnético sobre a morfologia das microesferas se fez necessário primeiramente a visualização da superfície das microesferas reticulada com frutose sem a presença da magnetita (amostra AF). Como pode ser observado nas Figuras 45 e 46. A Figura 45 apresenta a visão geral das partículas. Foram obtidas partículas com formato esférico e com tamanhos entre 5 a 40 μm (microesferas). Todas as microesferas observadas apresentaram marcas superficiais. As marcas observadas na superfície podem ser atribuídas às colisões ocorridas entre as gotas de solução gelatinosa na etapa de formação da emulsão. Quando o sistema é resfriado para a formação das microesferas, as partículas solidificam mantendo as marcas destas colisões.

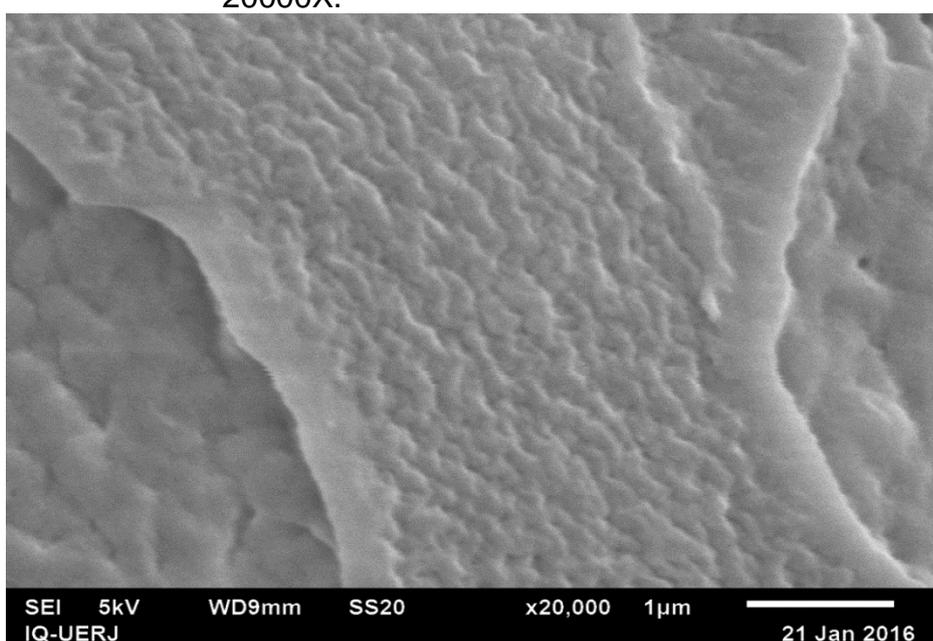
Figura 45 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina e frutose (AF) com aumento de 1500X.



Fonte: O autor, 2017.

A Figura 46 mostra a superfície de uma microesfera da amostra AF com ampliação de 20000 vezes. Observa-se que a microesfera possui superfície rugosa. Esta rugosidade é resultante do processo de desidratação ao qual as microesferas são submetidas no preparo das mesmas.

Figura 46 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina e frutose (AF) com aumento de 20000X.



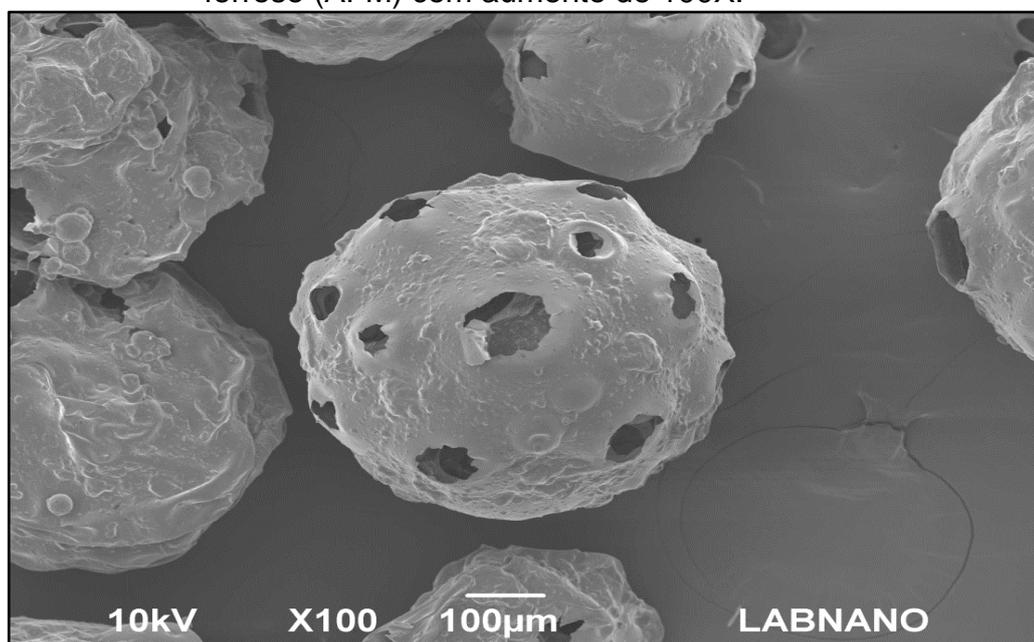
Fonte: O autor, 2017.

As Figuras 47 e 48 mostram micrografias eletrônicas de varredura das microesferas magnéticas reticuladas com frutose (amostra AFM). Na Figura 47, observa-se com muita nitidez que a presença da magnetita obtida com sulfato ferroso interferiu diretamente na morfologia das microesferas. Em decorrência da adição deste material magnético foram visualizadas microesferas muito maiores que as não-magnéticas. Enquanto a amostra AF apresentou microesferas variando entre 5 e 40 μm , a amostra AFM apresentou tamanhos médios de 300 μm . Outro aspecto morfológico influenciado pela adição da magnetita de sulfato foi a presença de poros. Como pode ser visto na Figura 47, a amostra AFM apresentou um número alto de poros por microesfera e, além disso, como pode ser visto na Figura 48, estes poros tem diâmetro muito grande (maior que 50 μm).

O aumento significativo do tamanho das microesferas não é desejável para a aplicação em dispositivos que serão utilizados como carreador de fármaco a ser introduzido no sistema biológico via arterial pois pode levar ao entupimento dos vasos sanguíneos.

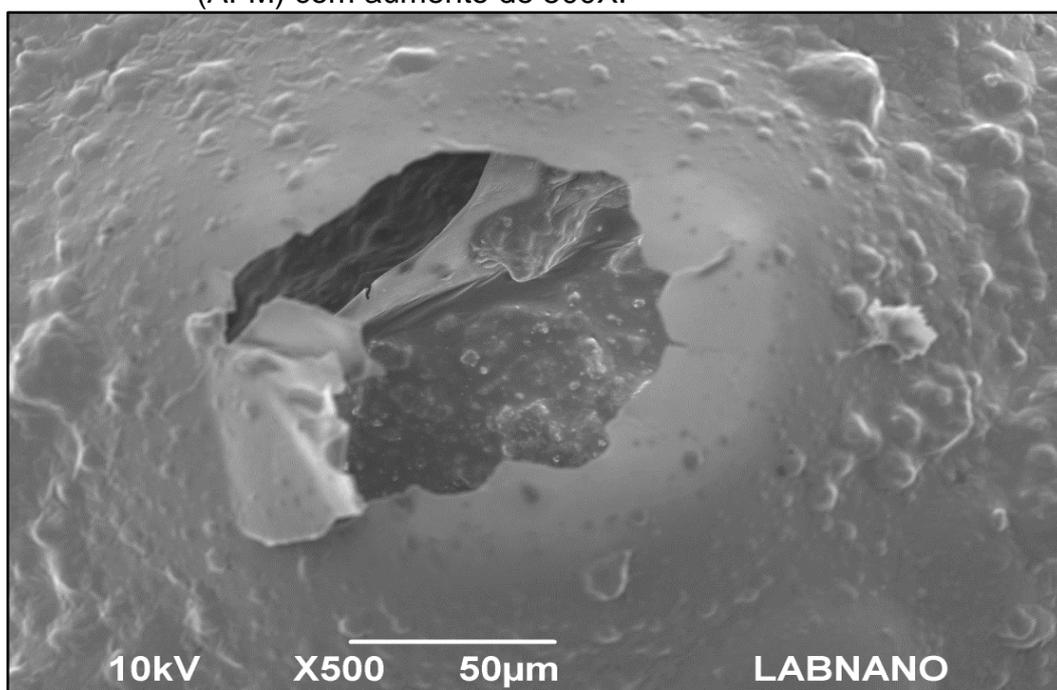
A presença de poros muito grandes na superfície das microesferas de gelatina também é vista como uma propriedade ruim visto que aumenta a superfície de contato polímero-água quando a microesfera estiver no meio fisiológico. Com o aumento da superfície de contato, conseqüentemente, aumenta-se a solubilidade da amostra. Além disso, com poros de diâmetro elevado há uma probabilidade maior de lixiviação do material magnético e também da carga farmacêutica. Por estes motivos, a magnetita obtida com sulfato ferroso não é um bom material magnético para a obtenção do dispositivo proposto nesta Tese.

Figura 47 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM) com aumento de 100X.



Fonte: O autor, 2017.

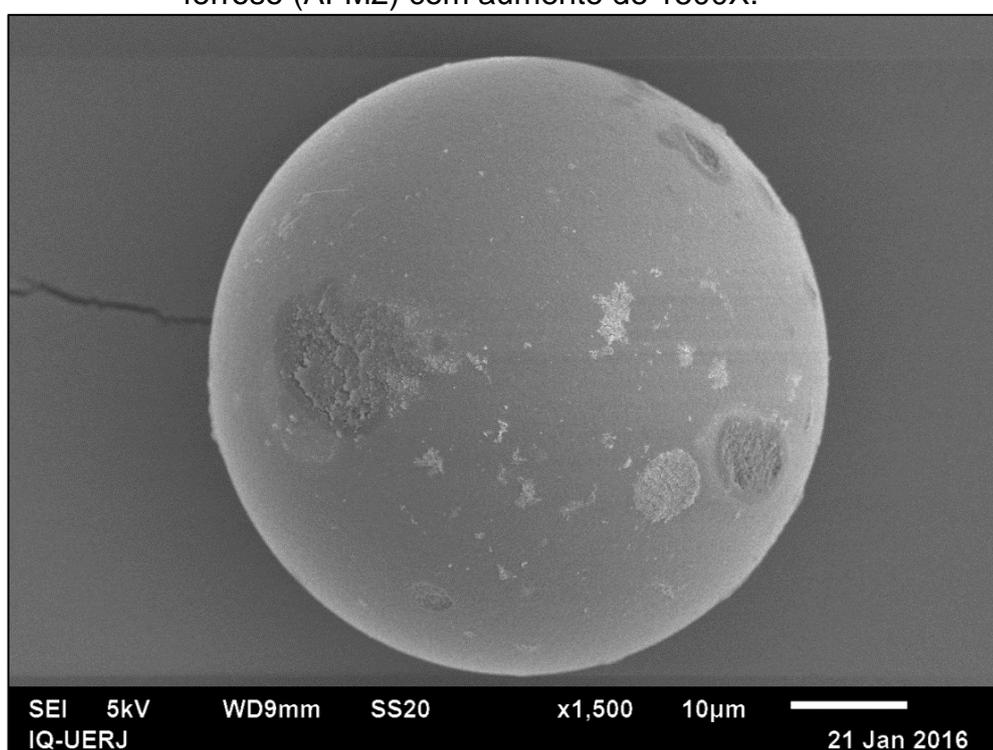
Figura 48 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso (AFM) com aumento de 500X.



Fonte: O autor, 2017.

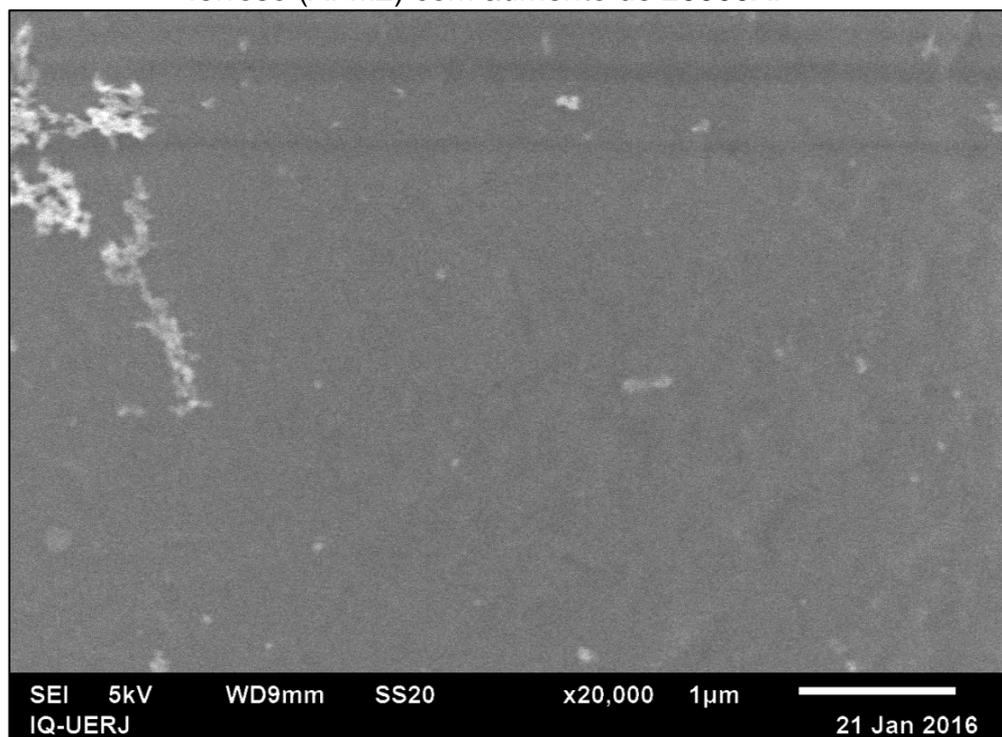
As Figuras 49 e 50 mostram as micrografias da amostra AFM2. Esta amostra foi preparada com a utilização de magnetita obtida com cloreto ferroso. Comparando-se com a amostra não-magnética (Figuras 45 e 46), observa-se que a amostra AFM2 apresenta menos marcas de colisão provenientes da preparação da amostra (Figura 52) e superfície mais lisa (Figuras 49 e 50) com relação aos tamanhos, as microesferas obtidas estavam na faixa de 5 a 60 μm .

Figura 49 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso (AFM2) com aumento de 1500X.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 50 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso (AFM2) com aumento de 20000X.



Fonte: O autor, 2017.

Comparando-se as duas magnetitas utilizadas, pode-se afirmar que a magnetita obtida com cloreto é mais adequada para a obtenção de biocompósitos, pois analisando morfologicamente é a que causa menor perturbação na superfície das microesferas.

4.5.2 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas mais importantes para a aplicabilidade de um dispositivo em meio biológico são a magnetização de saturação (M_S), a coercividade ou campo coercivo (H_C) e a magnetização residual (M_R). A Tabela 21 mostra os valores destas três propriedades para todos os materiais magnéticos preparados nesta Tese.

Tabela 21 - Propriedades magnéticas dos materiais magnéticos sintetizados.

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (G)	M_R (emu/g)	M_R/M_S
MG1	53,91	37,82	2,93	0,05
MG2	61,6	18,9	1,82	0,03
FLU1	1,49	20,21	0,09	0,06

Fonte: O autor, 2017.

Primeiramente analisou-se a magnetização de saturação destes materiais. A magnetização de saturação dos dispositivos que são aplicados em meio biológico é inversamente proporcional ao campo magnético utilizado externamente, pois como o gradiente magnético diminui com o aumento da distância até o alvo, dispositivos com baixa magnetização de saturação necessitarão de campos magnéticos externos com altos valores para que se consiga o gradiente magnético ideal para transportar o dispositivo até o local desejado (Arruebo et al., 2007). Quanto maior o campo magnético externo obtido por um equipamento, maior será seu custo e manutenção. Dessa forma, é ideal que o dispositivo biomédico possua a maior magnetização de saturação possível.

Observando-se os valores de magnetização de saturação da Tabela 21, percebe-se que a magnetização de saturação da amostra MG2 é da ordem de 61 emu/g, a da amostra MG1 é da ordem de 53 emu/g, enquanto a amostra FLU1 tem cerca de 1,5 emu/g de magnetização. Comparando-se com valores encontrados na literatura (HUANG; YANG, 2007, CHOUBEY; BAJPAI, 2010), pode-se dizer que as duas magnetitas sólidas produzidas (MG1 e MG2) possuem susceptibilidade magnética adequada para a fabricação de dispositivos biomédicos. O mesmo não se aplica ao fluido magnético pelo fato de apresentar baixa magnetização de saturação.

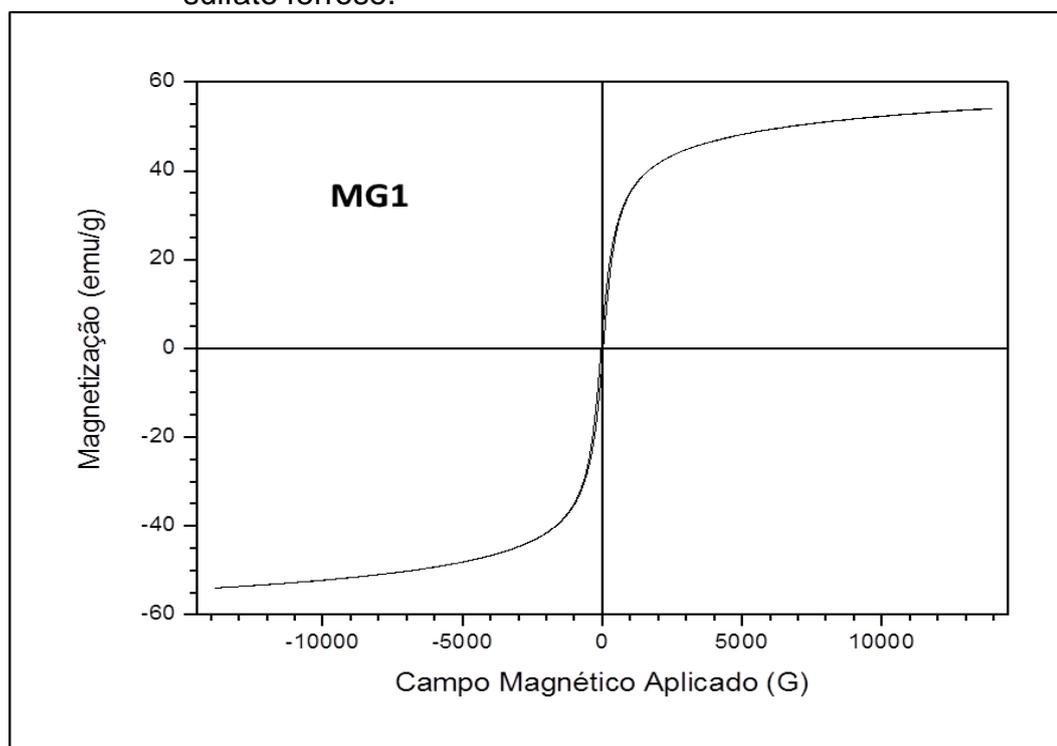
O fluido utilizado neste trabalho foi produzido utilizando-se gelatina como surfactante. O surfactante confere estabilidade ao fluido e, neste caso, melhoraria a incorporação de magnetita pelos biocompósitos. Contudo, foi visualizada uma magnetização de saturação tão baixa para o fluido a ponto de inviabilizar sua aplicação. Esta baixa magnetização indica que o material sintetizado apresenta baixo magnetismo. Provavelmente, a gelatina utilizada como surfactante impediu a formação de magnetita e formaram-se, em sua maioria, óxidos de ferro não-magnéticos.

Quando se compara o contra-íon utilizado na síntese, percebe-se que a magnetita obtida a partir de cloreto ferroso (MG2) apresenta a maior magnetização

dentre todas, o que indica que a escolha do contra-íon do sólido iônico que fornece os íons Fe^{2+} é essencial para as propriedades magnéticas da magnetita produzida. É usual que sulfato ferroso seja utilizado na síntese de magnetita porque cloreto ferroso é um reagente de custo elevado e muito instável (se oxida a cloreto férrico facilmente). No entanto, o contra-íon sulfato por ser formado por um agregado de cinco átomos, é um íon muito volumoso e atrapalha a formação do retículo cristalino e, conseqüentemente, a estrutura de rede da magnetita obtida. Por outro lado, cloreto sendo um íon de menor tamanho, possibilita que os íons Fe^{2+} estejam mais livres para a formação dos cristais de magnetita e, por isso, melhora a magnetização de saturação do material sintetizado. Ainda falando sobre a magnetita MG2, pode-se afirmar que, pelo fato de apresentar o maior valor de magnetização, esta amostra é o material magnético mais adequado (dentro do universo estudado) quando o objetivo é maximizar a exatidão no transporte do fármaco, com a utilização de campo magnético externo mínimo.

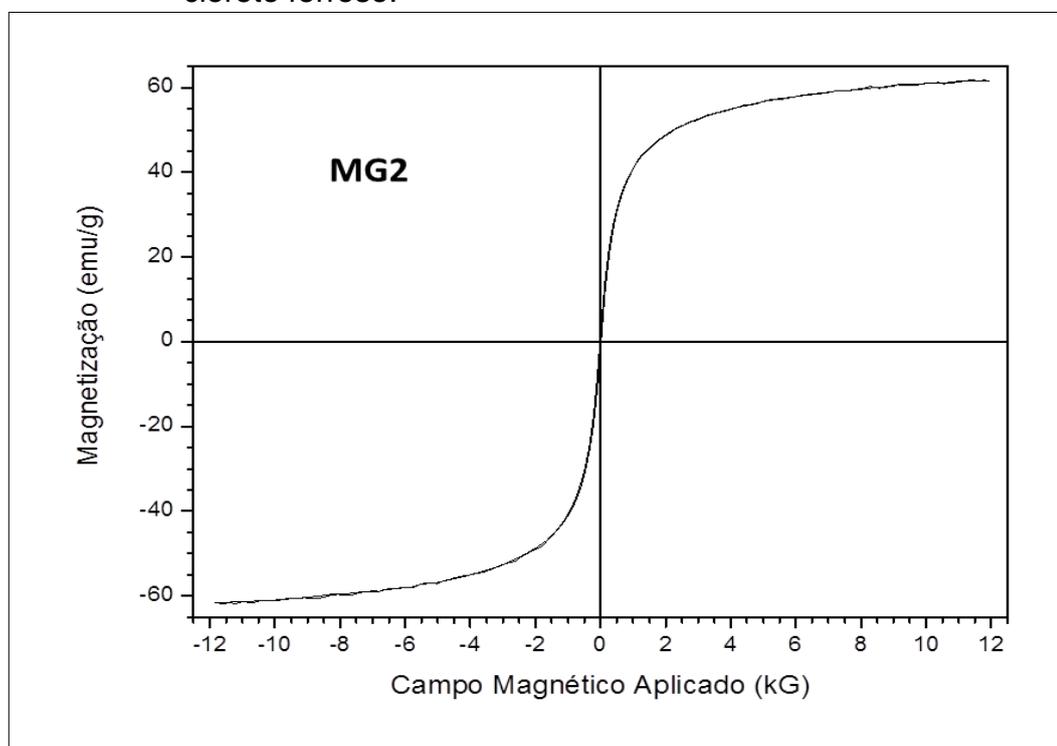
Para a aplicação em meio biológico, outra propriedade desejável é a presença de superparamagnetismo. Na ausência desta propriedade, as partículas tendem a se manter aglomeradas após a retirada do campo magnético, o que pode levar ao entupimento dos vasos sanguíneos. Primariamente, o superparamagnetismo de uma amostra é visualizada pela ausência de histerese em sua curva de magnetização. As Figuras 51, 52 e 53 mostram as curvas de magnetização para os materiais magnéticos MG1, MG2 e FLU1, respectivamente.

Figura 51 - Curva de magnetização da magnetita sólida obtida a partir de sulfato ferroso.



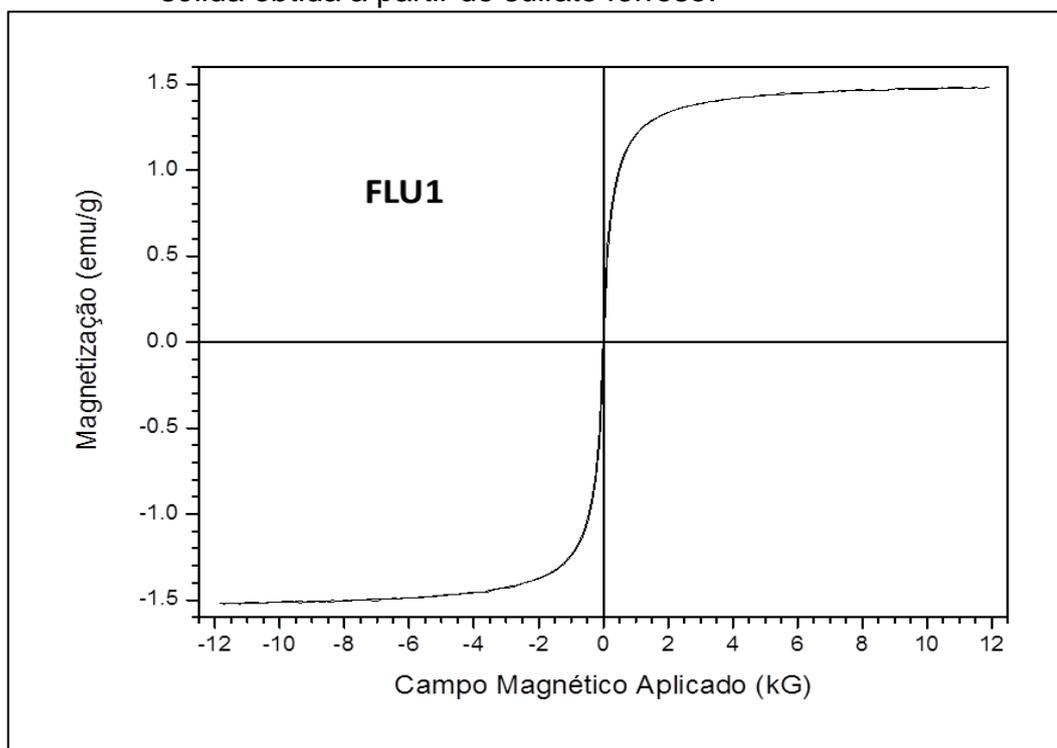
Fonte: O autor, 2017.

Figura 52 - Curva de magnetização da magnetita sólida obtida a partir de cloreto ferroso.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 53 - Curva de magnetização do fluido magnético à base de magnetita sólida obtida a partir de sulfato ferroso.

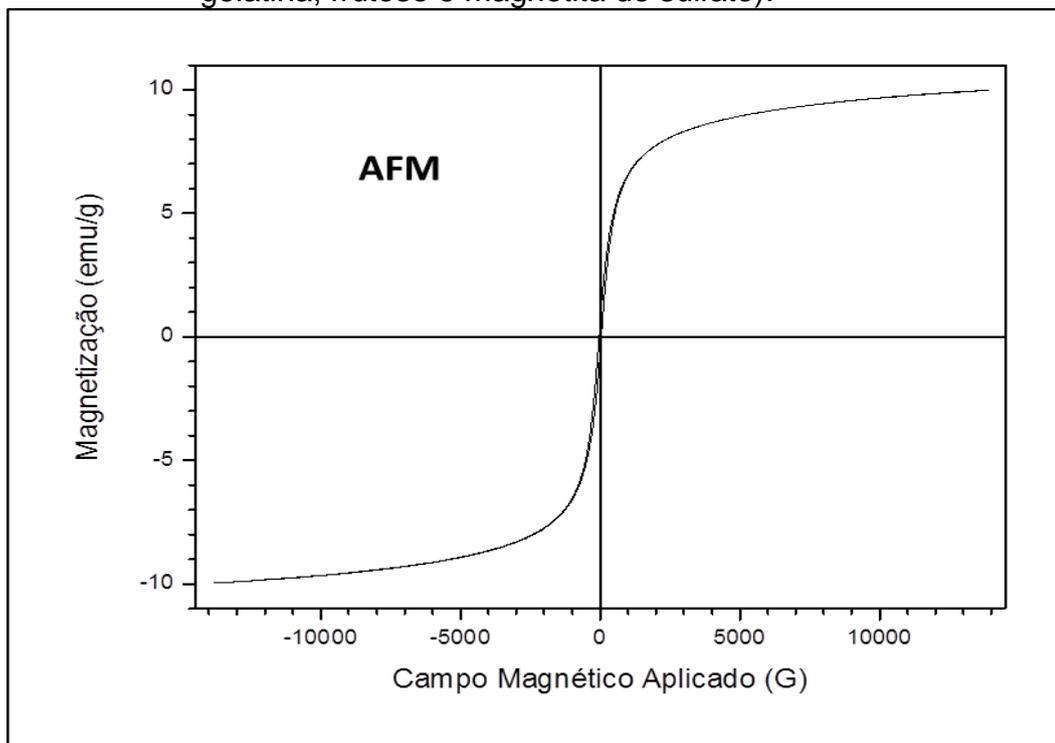


Fonte: O autor, 2017.

Pode-se observar a ausência de histerese em todas as três curvas de magnetização. Esta observação é um indicativo da presença de superparamagnetismo. No entanto, somente se pode afirmar que a amostra é superparamagnética após a análise dos valores de campo coercivo (H_c), campo magnético remanescente (H_R) e da razão M_R/M_S , que se encontram na Tabela 21. Todas as amostras apresentam valores de H_c e H_R diferentes de zero, porém a razão M_R/M_S é compatível com materiais superparamagnéticos (SANTA MARIA et al., 2005).

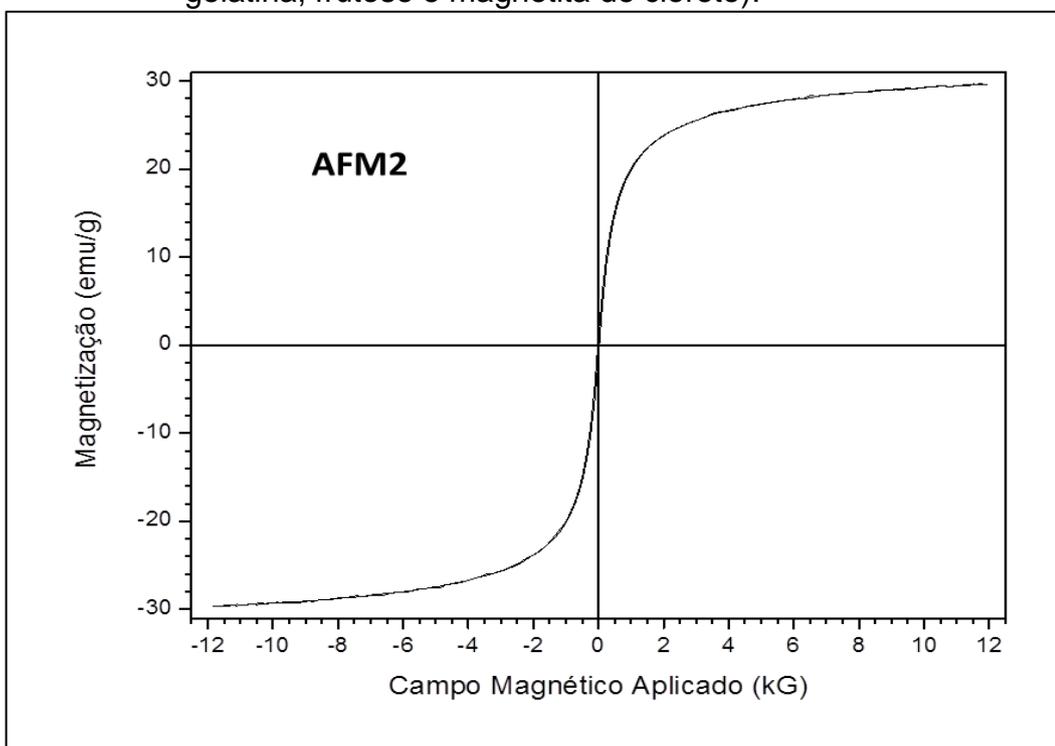
As Figuras 54 e 55 mostram as curvas de magnetização para os biocompósitos à base de gelatina, frutose e magnetita (amostras AFM e AFM2), enquanto que a Tabela 22 mostra os valores numéricos das propriedades magnéticas.

Figura 54 - Curva de magnetização do biocompósito AFM (à base de gelatina, frutose e magnetita de sulfato).



Fonte: O autor, 2017.

Figura 55 - Curva de magnetização do biocompósito AFM2 (à base de gelatina, frutose e magnetita de cloreto).



Fonte: O autor, 2017.

Tabela 22 - Propriedades magnéticas dos biocompósitos AFM (à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de sulfato ferroso) e AFM2 (à base de gelatina, frutose e magnetita obtida a partir de cloreto ferroso).

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (G)	M_R (emu/g)	M_R/M_S
AFM	9,96	38,54	0,58	0,05
AFM2	29,6	20,67	0,99	0,03

Fonte: O autor, 2017.

Os valores de magnetização de saturação para os biocompósitos (Tabela 22) são valores mais baixos que os obtidos para os materiais magnéticos puros (Tabela 21). Este comportamento já era esperado visto que o biocompósito é composto por materiais magnéticos (magnetita) e não-magnéticos (gelatina e frutose), o que ocasiona a diminuição das propriedades magnéticas como um todo. Comparando-se a magnetização das duas amostras entre si, observa-se que a magnetização da amostra AFM2 (preparada com magnetita de cloreto) é cerca de três vezes maior que a magnetização da amostra AFM (obtida com magnetita de sulfato). Diante desta observação pode-se afirmar que a amostra AFM2 é a melhor escolha para liberação controlada de fármaco, pois maior magnetização acarreta em maior efetividade de alcance dos tecidos alvo, além de requerer menor campo magnético externo, o que minimiza custos com o tratamento do paciente.

Com relação às curvas de magnetização (Figuras 54 e 55), visualiza-se um perfil semelhante ao dos materiais magnéticos puros: ausência de histerese indicando superparamagnetismo, que deve ser confirmado ou não pelos valores de coercividade e magnetização remanescente. Os dados da Tabela 22 apresentam valores não-nulos para estas duas propriedades. Entretanto, quando o campo coercivo encontrado para as amostras (38,54 G para AFM e 20,67 G para AFM2) é comparado ao campo magnético total, que foi utilizado para a realização da análise (15.000 G), percebe-se que menos de 0,27% do campo total é utilizado para neutralizar a magnetização remanescente. Aliando esta informação com o fato de ambos biocompósitos apresentarem valores da magnetização remanescente próximos de zero, pode-se dizer que há superparamagnetismo nas amostras e, conseqüentemente, há uma probabilidade muito baixa de que as partículas se aglomerem com a retirada do campo magnético externo. Dessa forma, os

biocompósitos são adequados para futura aplicação em transporte e liberação controlada de fármacos.

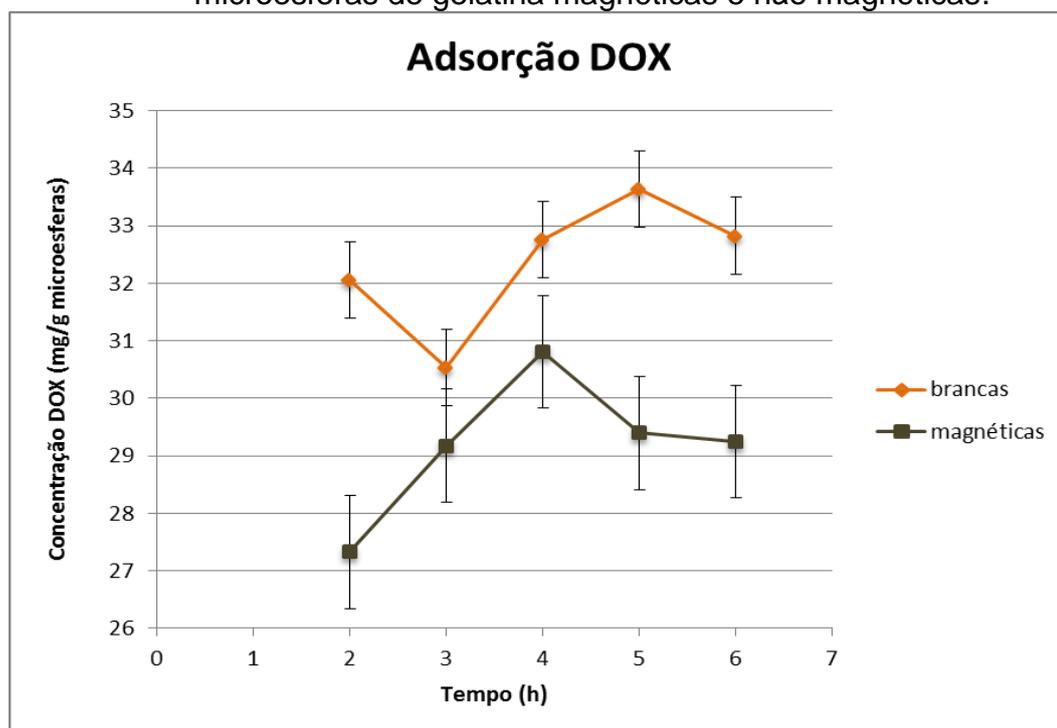
Outro aspecto a ser observado é o parâmetro comercial. Dispositivos comerciais apresentam magnetização de saturação da ordem de 23 emu/g (www.genscript.com). Sendo assim, a amostra AFM, que apresenta valor de magnetização de saturação abaixo dos valores encontrados em dispositivos comerciais, não é adequada para comercialização. Por outro lado, a amostra AFM2 possui magnetização de saturação adequada (magnetização superior) para que seja utilizada comercialmente com aplicabilidade satisfatória.

Por estes motivos, a amostra AFM2 foi utilizada nos testes de incorporação e liberação do fármaco escolhido nesta Tese (doxorrubicina).

4.6 Incorporação e liberação *in vitro* de doxorrubicina (DOX)

As microesferas magnéticas AFM2, assim como microesferas não-magnéticas (brancas) foram imersas por diferentes intervalos de tempo em solução aquosa de doxorrubicina 0,5 mg/mL, a fim se comparar a efetividade de incorporação do fármaco. A concentração de doxorrubicina que foi incorporada pelas microesferas nos diferentes tempos pode ser visualizada na Figura 56.

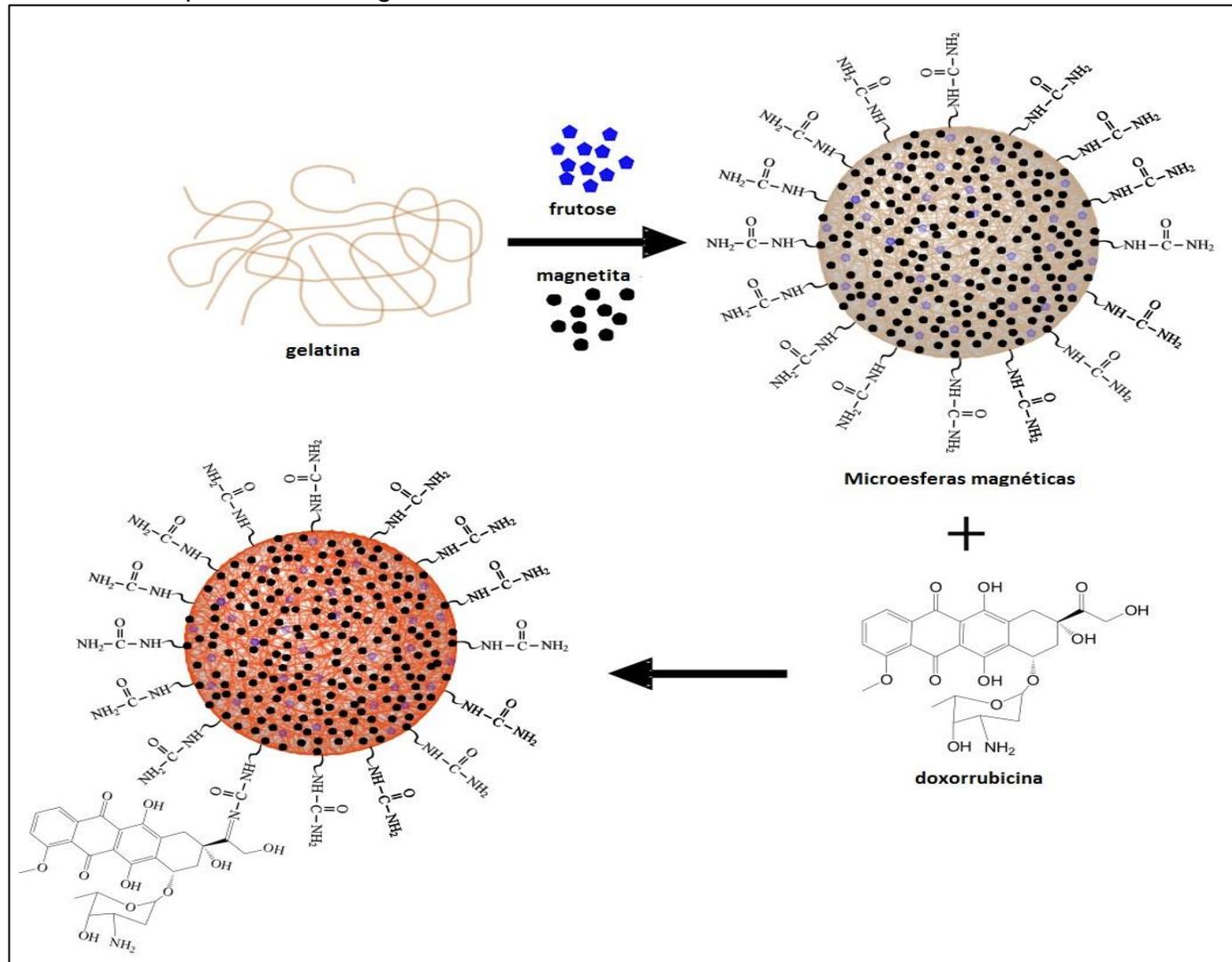
Figura 56 - Influência do tempo na incorporação de doxorrubicina pelas microesferas de gelatina magnéticas e não magnéticas.



Fonte: O autor, 2017.

Pode-se visualizar na Figura 56 que as microesferas preparadas na ausência de material magnético apresentaram melhores concentrações de fármaco incorporado ao dispositivo em todos os tempos estudados. Estes resultados podem ser explicados pela forma como o fármaco se liga às cadeias de gelatina. Sabe-se que a doxorrubicina liga-se às cadeias proteicas preferencialmente através dos terminais glicilglicínicos (WU et al., 2013). Estes terminais possuem porções amídicas características e a doxorrubicina liga-se ao aminoácido substituindo os dois hidrogênios terminais da amida, como pode ser visto na Figura 57. Quando as microesferas em questão possuem material magnético agregado a elas, a quantidade de terminais glicilglicínicos disponíveis diminui consideravelmente visto que a magnetita sofre forte interação eletrostática com os grupos $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ presentes na gelatina. Por este motivo, há maior possibilidade de serem formadas novas ligações fármaco-gelatina em microesferas sem a presença de magnetita.

Figura 57 - Esquema da ligação da doxorrubicina aos terminais glicilglicínicos das cadeias poliméricas de gelatina.



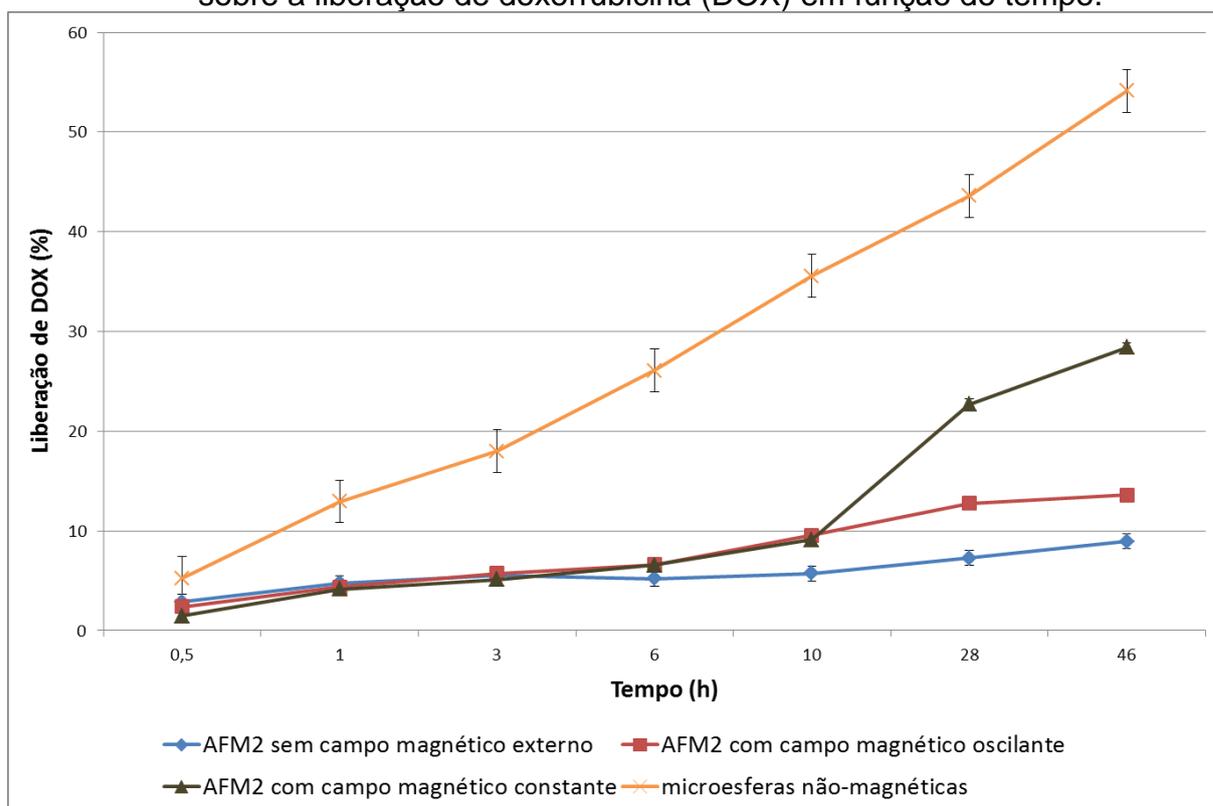
Fonte: O autor, 2017.

Para os testes de liberação da doxorubicina foram estudados quatro situações diferentes:

- Amostra AFM2 submetida a um campo magnético externo constante;
- Amostra AFM2 submetida a um campo magnético externo oscilante;
- Amostra AFM2 na ausência de campo magnético externo;
- Amostra não-magnética (branca).

Os resultados destes testes podem ser vistos na Figura 58. Observa-se que, assim como a incorporação de doxorubicina pelas microesferas não magnéticas foi maior, sua liberação também o foi para todos os tempos analisados. Este perfil de liberação não apresenta características ideais se o objetivo for liberar o fármaco da maneira mais gradual possível. Dessa forma, as amostras não-magnéticas já podem ser excluídas, pois não têm potencial para a aplicação desejada nesta Tese.

Figura 58 - Influência do campo magnético externo e da presença de magnetita sobre a liberação de doxorubicina (DOX) em função do tempo.



Fonte: O autor, 2017.

Quando se compara a liberação do fármaco com a utilização de dispositivos magnéticos, percebe-se que a liberação é significativamente reduzida pela presença

de magnetita e que essa liberação não apresenta diferença estatística relevante nas primeiras 6h de contato do dispositivo com o meio aquoso.

A partir das primeiras 6 horas, verifica-se a diferenciação dos perfis de liberação e que dependem diretamente da maneira como as microesferas são submetidas ao campo magnético externo. As menores porcentagens de liberação do fármaco foram obtidas para as amostras que não foram submetidas a nenhum campo externo, e os maiores percentuais foram observados para aquelas com a influência de campo magnético constante. A presença de campo magnético externo ao sistema oferece um certo grau de agitação para as amostras pois há sempre a tendência de alinhamento de domínios partícula-magneto. Essa agitação torna-se mais perceptível quando o campo magnético é oscilante e, sendo as partículas, altamente magnéticas e apresentando superparamagnetismo, pode-se visualizar com muita facilidade grande agitação das partículas. Essa agitação torna a liberação do fármaco mais facilitada se for comparada com a liberação ocorrida quando as partículas não foram sujeitas ao magnetismo exterior. No entanto, quando a agitação é elevada e ocorre com uma grande velocidade o alinhamento/desalinhamento dos domínios magnéticos da microesfera, há interferência significativa na porosidade dos dispositivos. Essa interferência normalmente ocasiona fechamento de poros e, conseqüentemente, dificuldade na liberação das moléculas de fármaco por desorção.

Em 46 horas de análise, observou-se que, independente do campo magnético externo, menos de 30% do fármaco incorporado pelos biocompósitos foi liberado para o meio aquoso. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que os perfis de liberação se adequam aos objetivos desta Tese e vai além, visto que os três perfis diferentes podem ser utilizados para adequar a liberação do medicamento às necessidades farmacológicas de cada paciente individualmente somente alterando-se a maneira como o paciente será submetido ao campo magnético externo.

CONCLUSÕES

Pode ser concluído que:

- Foi possível preparar e caracterizar microesferas magnéticas à base de gelatina e magnetita que têm alto potencial para liberação controlada de doxorubicina.
- A reticulação da gelatina com a utilização de frutose foi fortemente influenciada pelo pH reacional e pelo tempo de aquecimento da emulsão, os quais influenciaram diretamente na solubilidade das amostras.
- O método do reagente de biureto foi adequado para a determinação do percentual de gelatina dissolvido em meio aquoso.
- Microesferas de gelatina com propriedades adequadas para a aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos foram obtidas com a utilização de pH 9, tempo de aquecimento de 60 minutos e concentração de frutose de 100% (m/m).
- As microesferas reticuladas com frutose apresentaram propriedades térmicas levemente melhores que as reticuladas com o agente de reticulação convencional (glutaraldeído).
- A adição de magnetita na síntese de microesferas de gelatina para a obtenção de biocompósitos magnéticos levou à formação de microesferas com poros de grande diâmetro.
- Foi possível a obtenção de biocompósitos com comportamento superparamagnético e com magnetização de saturação superior à de dispositivos comerciais.
- A presença de campo magnético externo diminuiu consideravelmente a liberação de doxorubicina dos biocompósitos.
- Foi possível obter três diferentes perfis de liberação de doxorubicina somente variando-se como os biocompósitos são submetidos à ação do campo magnético externo.

REFERÊNCIAS

ADHIRAJAN, N.; SHANMUGASUNDARAM, N., BABU, M. Gelatin microspheres cross-linked with EDC as a drug delivery system for doxycycline: Development and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, p. 659-671, 2007.

All about gelatine. Disponível em: <

http://www.gelatine.org/fileadmin/user_upload/downloads/press/publications_downloads/GME_all_about_gelatine_en.pdf >. Acesso em: 28 ago.2012.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S. A.; 1976. p. 621-636.

AMADORI, S.; TORRICELLI, P.; RUBINI, K.; FINI, M.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A. Effect of sterilization and crosslinking on gelatin films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, p. 69, 2015.

AMALI, A. J.; RANA, R. K. Stabilisation of Pd(0) on surface functionalised Fe₃O₄ nanoparticles: magnetically recoverable and stable recyclable catalyst for hydrogenation and Suzuki-Miyaura reactions. *Green Chemistry*, v. 11, p. 1781-1786, 2009.

AN-HUI, L.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007 apud BEDE, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

ARRUEBO, M.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nanotoday**, v. 2, p. 22-32, 2007.

BEDE, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BHAT, R.; KARIM, A. A. Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1326-1333, 2014.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipina. **Biomaterials**, v. 23, p. 4827-4832, 2002.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, p. 821-833, 2014.

CHEN, H.; OUYANG, W.; MARTONI, C.; AFKHAMI, F.; LAWUYI, B.; LIM, T.; Prakash, S. Investigation of genipin cross-linked microcapsule for oral delivery of live bacterial cells and other biotherapeutics: preparation and in vitro analysis in simulated human gastrointestinal model. **International Journal of Polymer Science**, v. 2010, p. 985137, 2010.

CHOUBEY, J.; BAJPAI, A. K. Investigation on magnetically controlled delivery of doxorubicin from superparamagnetic nanocarriers of gelatin crosslinked with genipin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p. 1573-1586, 2010.

CHOY, W. B. CHENG, F. CHOI, H. KIM, K. K. Monodisperse Gelatin Microspheres as a Drug Delivery Vehicle: Release Profile and Effect of Crosslinking Density. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 758-765, 2008.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C.; DAVIS, S. S. Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. **Biomaterials**, v. 19, p. 1641-1649, 1998.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; OSTI, M.; SQUARZONI, G.; MENEGATTI, E.; DAVIS, S. S.; NASTRUZZI, C. Dextran cross-linked gelatin microspheres as a drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, p. 153-160, 1999.

CRISTIANO, C. M. Z.; FAYAD, S. J.; PORTO, L. C.; SOLDI, V. Protein-based films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC): effects of the cross-linker and film composition on the permeation rate of p-hydroxyacetanilide as a model drug. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 21, p. 340-348, 2010.

CUI, L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P. Preparation and characterization of ipn hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31-38, 2014.

DE CLERCQ, K.; SCHELFHOUT, C.; BRACKE, M.; DE WEVER, O.; VAN BOCKSTAL, M.; CEELLEN, W.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a strategy to prevent postsurgical peritoneal adhesions: In vitro and in vivo characterization. **Biomaterials**, v. 96, p. 33-46, 2016.

DEL GAUDIO, C.; BAIGUERA, S.; BOIERI, M.; MAZZANTI, B.; RIBATTI, D.; BIANCO, A.; MACCHIARINI, P. Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats. **Biomaterials**, v. 34, p. 7754-7765, 2013.

GAIHRE, B.; ARYAL, S.; KHIL, M. S.; KIM, H. Y. Encapsulation of Fe₃O₄ in gelatin nanoparticles: Effect of different parameters on size and stability of the colloidal dispersion. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, p. 21-30, 2008.

GAIHRE, B.; KHIL, M. S.; KANG, H. K.; KIM, H. Y. Bioactivity of gelatin coated magnetic iron oxide nanoparticles: in vitro evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 573-581, 2009.

GENNADIOS, A.; WELLER, L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**, v. 44, p. 63-69, 1990.

GIOFFRÈ, M.; TORRICELLI, P.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; BIGI, A. Role of pH on stability and mechanical properties of gelatin films. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, p. 67 - 77, 2012.

GHOEL, M. C., PARIKH, R. K., AMIN, A. F. & SURATI, A. K. Preparation and formulation optimization of sugar crosslinked gelatin microspheres of diclofenac sodium. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 67, p. 575-581, 2005.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; MIKOS, A. G.; JANSEN, J. A. Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: An in vitro degradation study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 91B, p. 555-561, 2009.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E. ; HERAS, A. Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1750-1762, 2010.

HATHOUT, R.M; OMRAN, M. K. Gelatin-based particulate systems in ocular drug delivery. **Pharmaceutical development and technology**, v. 21, p. 379-386, 2016.

HIWALE, P.; LAMPIS, S.; CONTI, G.; CADDEO, C.; MURGIA, S.; FADDA, A. M.; MONDUZZI, M. In Vitro release of lysozyme from gelatin microspheres: Effect of cross-linking agents and thermoreversible gel as suspending medium. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 3186-3193, 2011.

HOLLAND, S. J.; TIGHE, B. J. Polymers for biodegradable medical devices. The potential of polyesters as controlled macromolecules release systems. **Journal of controlled Release**, v. 4, p. 155-180, 1986.

HUANG, L.; YANG, M. Behaviors of controlled drug release of magnetic-gelatin hydrogel coated stainless steel for drug-eluting-stents application. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, n. 310, p. 2874-2876, 2007.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomaterials**, v. 18, p. 95-105, 1997.

KUIJPERS, A. J; ENGBERS, G.H.; KRIJGSVELD, J.; ZAAT, S. A.; DANKERT, J.; FEIJEN, J. Cross-linking and characterization of gelatin matrices for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition**, v. 11, p. 225- 243, 2000.

LAI, J. Y.; LI, Y. T. Influence of cross-linker concentration on the functionality of carbodiimide cross-linked gelatin membranes for retinal sheet carriers. **Journal of Biomaterials Science**, v. 22, p. 277-295, 2011.

LAMA, P. L.; KOK, S.H.L.; BIANC, Z. X.; LAMA, K.H.; TANGA, J. C.O.; LEE, K.K.H.; GAMBARI, R.; CHUI, C. H. D-glucose as a modifying agent in gelatin/collagen matrix and reservoir nanoparticles for *Calendula officinalis* delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 277-283, 2014.

LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 2, p. 201-214, 1981.

LI, M.; GUO, Y.; WEI, Y.; MACDIARMID, A.G.; LELKES, P. I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 27, p. 2705-2715, 2006.

LIEN, S. M.; TE LI, W.; HUANG, T. J. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. **Materials Science Engineering C**, v. 28, p. 36-43, 2008.

LIANG, H. C.; CHANG, W. H.; LIN, K. J.; SUNG, H. W. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In-vitro and in vivo studies. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 65, p. 271-282, 2003.

LU, Y.; ZHANG, G.; SUN, D.; ZHONG, Y. Preparation and evaluation of biodegradable flubiprofen gelatin microspheres for intra-articular administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, p. 515-524, 2007.

MA, W.; TANG, C.; YIN, S.; YANG, X.; QI, J. Genipin-crosslinked gelatin films as controlled releasing carriers of lysozyme. **Food Research International**, v. 51, p. 321-324, 2013.

MAMANI, H. N. C. **Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase**. 2004. 100 p. Dissertação (mestrado em Alimentos e nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

MASUTANI, E. M.; KINOSHITA, C.K.; TANAKA, T. T.; ELLISON, A. K. D.; YOZA, B. A. Increasing thermal stability of gelatin by uv-induced cross-linking with glucose. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 979636, 2014.

MO, X.; IWATA, H.; MATSUDA, S.; IKADA, Y. Soft tissue adhesive composed of modified gelatin and polysaccharides. **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 11, p. 341-351, 2000.

NICKERSON, M.T.; PATEL, J.; HEYD, D.V.; ROUSSEAU, D.; PAULSON, A. T. Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, p. 298-302, 2006.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; JANSSENS, S.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 1213-1225, 2012.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3-8, 2014.

PITT, C. G. The controlled parental delivery of polypeptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 59, p. 173, 1990.

PLICHTA, Z.; LENFELD, J.; BENEŠA, M. J.; SCOUTENB, W. H. Preparation of gelatin spherical microparticles in aqueous polymer suspension. **Reactive Polymers**, v. 23, p. 183-186, 1994.

RANA, S.; GALLO, A.; SRIVASTAVA, R. S.; MISRA, R. D. K. On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic carrier for drug delivery: Functionalization, conjugation and drug release kinetics. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 233-242, 2007.

RAO, K.M.; RAO, K. S.V.K.; RAMANJANEYULU, G.; HA, C. S. Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 788-795, 2015.

RUJITANAROJA, P.; PIMPHAB, N.; SUPAPHOLA, P. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. **Polymer**, v. 49, p. 4723-4732, 2008.

SAMAD, A.; SULTANA, Y.; KHAR, R. K.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K. Gelatin microspheres of rifampicin cross-linked with sucrose using thermal gelation method for the treatment of tuberculosis. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 83-89, 2009.

SANTA MARIA, L. C.; COSTA, M. A. S.; SOARES, J. G. M.; WANG, S. H.; SILVA, M. R. Preparation and characterization of manganese, nickel and cobalt ferrites submicron particles in sulfonated crosslinked networks. **Polymer**, v. 46, p. 11288-11293, 2005.

SARAVANAN, M.; BHASKAR, K.; NARAYANAN, N. V.; MAHARAJAN, G.; PILLAI, K. S. Diclofenac sodium loaded gelatin magnetic microspheres for intra-arterial administration: formulation, characterization and in vitro release studies. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 142, p. 347-351, 2003.

SARAVANAN, M.; ANBU, J.; MAHARAJAN, G.; PILLAI, K. S. Targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres formulated for intra-arterial administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, p. 366-378, 2008.

SCHOEVAART, R.; KIEBOOM, T. Galactose dialdehyde as potential protein cross-linker: proof of principle. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 899-904, 2002.

SCHULER, B. J. **Evaluation of Novel Cross-linking Agents for Gelatin/Collagen Matrices**. 2004. 297 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Pharmaceutics) - School of Pharmacy, West Virginia University, West Virginia, EUA, 2004.

SCHOEVAART, R.; KIEBOOM, T. Galactose dialdehyde: the forgotten candidate for a protein cross-linker? **Carbohydrate Research**, v. 334, p. 1-6, 2001.

SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R. M. Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. Cambridge: VCH; 1991 apud GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

SIIMON, K.; SIIMON, H.; JARVEKULG, M. Mechanical characterization of electrospun gelatin scaffolds cross-linked by glucose. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, p. 26-37, 2015.

SINGH, S.; RAMA RAO, K.V.; VENUGOPAL, K.; MANIKANDAN, R. Alteration in dissolution characteristics of Ggelatin-containing formulations. A Review of the problem, test methods, and solutions. **Pharmaceutical Technology**, abril, p. 36-58, 2002.

SOUZA, J. V. S. **Preparação e caracterização de biocompósitos à base de gelatina e nanopartículas de magnetita reticulados com sacarose**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química - área de concentração Polímeros) - Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157-170, 2012.

TERENCE, M. C. **Obtenção de um sistema de liberação controlada de drogas a partir do PVAL irradiado com radiação gama**. 2002. 135p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações.) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

TETI, G.; BIGI, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; GIARDINO, R.; FINI, M.; MAZZOTTI, A. FALCONI, M. Morphological evaluation of adhesion and proliferation of osteoblast like cells grown on gelatin/genipin scaffold. **Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 965-970, 2013.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. Crosslinking of gelatin with carbodiimines. **Tissue Engineering**, v. 2, p. 307-313, 1996.

TOUYAMA, R.; INOUE, K.; TAKEDA, Y.; YATSUZUKA, M.; IKUMOTO, T.; MORITOME, N.; SHINGU, T.; YOKOI, T.; INOUE, H. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1571-1578, 1994.

TRUONG-LE, V. L.; WALSH, S.M.; SCHWEIBERT, E.; MAO, H.; GUGGINO, W. B.; AUGUST, J.T.; LEONG, K. W. Gene Transfer by DNA-Gelatin Nanospheres. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 361, p. 47-56, 1999.

UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 3181-3198, 1999.

ULUBAYRAM, K.; AKSU, E.; GURHAN, S. I. D.; SERBETCI, K.; HASIRCI, N. Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 13, p. 1203-1219, 2002.

URANGA, J.; LECETA, I.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Cross-linking of fish gelatins to develop sustainable films with enhanced properties. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 82-90, 2016.

VANDELLI, M. A.; RIVASI, F.; GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 175-184, 2001.

VENKATACHALAM, N.; MCMAHON, D. J.; SAVELLO, P. A. Role of protein and lactose interactions in the age gelation of ultra-high temperature processed concentrated skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1882-1894, 1993.

VERT, M. Design and Synthesis of Bioresorbable Polymers for the Controlled Release of Drugs. In: ILLUM, L.; DAVIS, S.S. **Polymers in Controlled Drug Delivery**, London, The Bath. p. 117-130, 1987 apud TERENCE, M. C. **Obtenção de um sistema de liberação controlada de drogas a partir do PVAL irradiado com radiação gama**. 2002. 135p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações.) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

WIJK, A.V.; SIEBUM, A.; SCHOEVAART, R.; KIEBOOM, T. Enzymatically oxidized lactose and derivatives thereof as potential protein cross-linkers. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2921-2926, 2006.

WU, C.; WEI, S.; LU, W.; HE, S.; GAO, W.; WANG, T.; LI, X.; XIE, J. Studies on Adriamycin magnetic gelatin microspheres. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 1-7, 1995.

WU, D.C.; CAMMARATA, C. R.; PARK, H. J.; RHODES, B. T.; OFNER III, C. M. Preparation, drug release, and cell growth inhibition of a gelatin: Doxorubicin conjugate. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 2087-2096, 2013.

WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, p. 023501, 2015.

Food and Drug Administration. Disponível em:
<www.accessdata.fda.gov/spl/data/45ec1cfe-1efc-47fc-be2c-9c96b0b786f4/45ec1cfe-1efc-47fc-be2c-9c96b0b786f4.xml> Acesso em: 22 março 2016.

www.chemicell.com/products/nanoparticles/docs/PI_fluidMAG-DP_4103.pdf.
Acesso em: 08 jan. 2014.

www.genscript.com/reference_peer-reviewed_literature_3777.html?journal=ACS%20Appl%20Mater%20Interfaces.&pubmed_id=23470159. Acesso em: 08 jan. 2014.

www.ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&n s=NCI_Thesaurus&code=C456. Acesso em: 22 março 2016.

YAO, C.; LIU, B.; CHANG, C.; HSUB, S.; CHEN, S. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 204-208, 2004.

YONG, W.; SUN, Y.; ZHANG, H.; LIU, J. Preparation and characteristics test of Adriamycin magnetic gelatin microspheres. **Jiefangjun Yaoxue Xuebao**, v. 23, p. 272-275, 2007.

YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A. G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 256 - 274, 2005.

ZHANG, B.; XING, J.; LIU, H. Preparation and application of magnetic microsphere carriers. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 1, p. 96-101, 2007.

ZHANG, W.; SHANG, D. Preparation and controlled release of berberine magnetic gelatin drug microsphere. **Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu**, v. 13, p. 9287-9290, 2009.