



Influência do metanol na obtenção de esferas de quitosana por gelificação ionotrópica

Metanol influence on the chitosan spheres obtainment by ionotropic gelation

Milena Costa silva¹

Resumo: Esferas de quitosana são alvo de vários estudos e aplicações na área médica, em especial na indústria farmacêutica como carreador de fármaco e também para a produção de estruturas tridimensionais porosas, a partir da agregação das esferas. Neste trabalho, apresentamos uma perspectiva de estudo para modificação da morfologia das esferas de quitosana, a partir da adição de metanol. As esferas foram obtidas a partir da técnica de gelificação ionotrópica, que parte do gotejamento da solução de quitosana, em solução de sulfato de sódio 5%. Foram avaliadas soluções de quitosana com a adição de 20, 40 e 60% de metanol, com o objetivo de avaliar a influência do metanol nas propriedades das esferas. Para acompanhar a incorporação do metanol na quitosana, foi realizada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para observar o comportamento térmico das amostras em função do aumento das concentrações de metanol, foi utilizada a calorimetria exploratória diferencial (DSC). As mudanças morfológicas foram verificadas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Diante dos resultados de DSC tem-se que o aumento do fluxo de calor é inversamente proporcional a adição do solvente metanol nas amostras, ou seja, a adição do metanol teve influência significativa nas propriedades térmicas das esferas. Já por FTIR, verificou-se que o aumento da transmitância é proporcional a quantidade do metanol nas esferas. Por MEV, observou-se o aumento da quantidade de macroporos para as esferas com 20 e 40% de álcool, já as esferas com 60% apresentam os macroporos foram suprimidos e a superfície mostrou-se rugosa.

Palavras-chave: Esferas; quitosana; gelificação ionotrópica.

Abstract: Chitosan spheres are the subject of various studies and applications in the medical field, particularly in the pharmaceutical industry as a drug carrier, and also for the production of porous three-

¹ Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

dimensional structures from the aggregation of spheres. In this paper, we present a study of prospects for change in the morphology of chitosan spheres, from the addition of methanol. The spheres were obtained from ionotropic gelation technique, which part of the drip chitosan solution in sodium sulphate solution 5%. Chitosan solutions were evaluated by adding 20, 40 and 60% methanol in order to evaluate the influence of methanol on the properties of the spheres. To monitor the incorporation of methanol in the chitosan spectroscopy was performed on Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). To observe the thermal behavior of the samples due to the increase of methanol concentrations, it used the Differential Scanning Calorimetry (DSC). Morphological changes were observed from Scanning Electron Microscopy (SEM). Given the DSC data it follows that the increase of heat flow is inversely proportional to the addition of the methanol solvent in the samples, or the addition of methanol had a significant influence on thermal properties of the spheres. Already by FTIR, it was found that the increase in transmittance is proportional to the amount of methanol in the spheres. By SEM, it was observed increased amount of macroporosity to the beads 20 and 40% alcohol, as the beads with 60% have macropores were removed and the surface was found to be roughened.

Keywords: Beads; chitosan; ionotropic gelation.

1. Introdução

A quitosana é um polímero natural derivado de exoesqueletos de insetos, artrópodes, tais como cascas de crustáceos, mariscos como camarões, caranguejos, e bicos de cefalópodes, bem como as paredes celulares de fungos, sendo assim de grande importância econômica e ambiental, pois as carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (Jayakumar et al. (2011); Dash et al. (2011); Shukla et al. (2013); Mendes et al. (2011); Liu et al. (2007).

Este biopolímero pode ser encontrado em várias formas no que se refere ao peso molecular médio e o grau de desacetilação, e esta diversidade é aumentada exponencialmente pela fácil modificação química da quitosana, que permite sua otimização para diversas aplicações (Bierbrauer *et al.* (2014); Dash *et al.* (2011); Kean & Thanou (2010)). Li *et al.* (2013), obtiveram esferas ocas com base do copolímero quitosana/poli(N-isopropilacrilamida), preparadas para a liberação controlada do fármaco Fluorouracil, onde obteve-se um sistema que pode servir para a liberação controlada de fármacos hidrofílicos a longo prazo. Yan *et al.* (2012), estudaram o efeito da liberação de fármacos em microcápsulas nanoporosas fabricados pelo método de camada-a-camada de PLGA (Poli ácido láctico-co-ácidoglicólico) e quitosana, com o fármaco Fluorouracil, assumiram uma liberação sustentada, especialmente numa solução ácida, podendo chegar a liberação de 93% para cerca de 53 horas a pH fisiológico. Shanmuganathan *et al.* (2008), desenvolveram microesferas de quitosana carregadas com doxiciclina, utilizando a técnica de água-em-óleo envolvendo também a técnica de gelificação iônica, onde obtiveram uma liberação brusca de 42% em 6 horas e mantida uma concentração de equilíbrio de 72% em 24 horas. Na área biomédica, a quitosana tem sido investigada na cicatrização de ferimentos, curativos, administração de medicamentos, na área de nanobiotecnologia, cirurgia cardiovascular, terapia gênica e engenharia de tecidos (Gnavi *et al.* (2013); Park *et al.* (2013); Thein-Han & Misra (2009)). Na área farmacêutica, no contexto de liberação de fármacos, a quitosana tem sido utilizada como um transportador potencial para administração controlada de fármacos específicos e macromoléculas, e em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica, e na obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas e DNA. As micros e as nanoesferas à base de quitosana são amplamente utilizadas na concepção de sistemas terapêuticos e tem sido utilizada com sucesso em vários fármacos, como por exemplo; amoxicilina e tetraciclina (Thein-Han & Misra (2009); Sinha *et al.* (2004); Balan & Verestiuc (2004); Jayakumar *et al.* (2011); Lourenço (2006); Yue (2014); Dash *et al.* (2011)). Diferentes métodos têm sido utilizados e propostos para preparar esferas de quitosana, como por onde as microcápsulas exemplo separação de fase (coacervação) (Jaeghere *et al.* (2013); Martin *et al.* (2014); Ghanbar *et al.* (2013)), técnica de

evaporação/extração de solventes (Ma & Liu (2010), secagem por pulverização Dash *et al.* (2011) e gelificação ionotrópica (Dash *et al.* (2011); Ma & Liu (2010). Na técnica de gelificação ionotrópica, a quitosana é dissolvida numa solução ácida aquosa, tornando-a solúvel. Esta solução é então injetada através de uma seringa com agulha, gota a gota, e ficam dispersas numa solução coagulante, sob agitação constante. A reação entre as espécies de cargas opostas faz com que a quitosana se submeta a gelificação ionotrópica, precipitando na forma de partículas esféricas na solução coagulante (Dash *et al.* (2011)). Este processo de gelificação ocorre devido à formação de ligações cruzadas inter e intramolecular nas cadeias do polímero (Ashwini *et al.*, 2012). No método de gelificação ionotrópica, a solução de coagulante é um dos parâmetros importantes na produção das esferas (Ma & Liu, (2010)).

Portanto o objetivo do presente trabalho foi desenvolver esferas de quitosana com a adição do solvente metanol, pelo método de gelificação ionotrópica.

2. Materiais e Métodos

Para a realização desta pesquisa foram utilizados os seguintes materiais: Quitosana em pó de médio peso molecular, com grau de desacetilação entre 75 – 85%; Tampão de Fosfato Salino (PBS), o sulfato de sódio (Na_2SO_4); Ácido Acético P.A. ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$).

A solução de quitosana (2% m/v) foi preparada por meio da dissolução do polímero na forma de pó com uma solução de ácido acético (1% v/v), com agitação mecânica constante a temperatura ambiente por cerca de 24 horas. Em seguida foram adicionados 20, 40 e 60% de metanol, nas soluções de quitosana. Posteriormente as esferas foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, que parte do gotejamento da solução de quitosana, por meio de uma seringa de 5 mL acoplada com uma agulha de dimensões 0,45 mm x 13 mm (26G x ½”). O gotejamento ocorreu com o auxílio de uma bomba de infusão, com razão de 26 mL/h em uma solução coagulante de sulfato de sódio (5% m/v). Em seguida as esferas foram lavadas com uma solução de PBS.

Para avaliar a morfologia das esferas obtidas, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico. As medições de tamanhos de esferas (n=10) e poros foram realizadas com auxílio do software Image Processing and Analysis in Java (Image J), a partir das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Foi aplicada a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial, no equipamento DSC 8500 Perkin Elmer, com o objetivo de observar o comportamento térmico das esferas, ocorridas na primeira curva de aquecimento. Utilizou-se para a realização do ensaio atmosfera de

nitrogênio 50 mL/min, com taxa de aquecimento de 10°C/min, foi utilizada a massa de $1,5 \pm 0,10$ mg acondicionada em cadinho de alumínio.

As amostras foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho de ($450 - 4500 \text{ cm}^{-1}$) com transformada de Fourier (FTIR), em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer.

3. Resultados

Na Figura 1 tem-se a micrografia das esferas de quitosana com e sem solução alcoólica obtidas pelo método de gelificação iônica, onde a partir desta técnica é possível obter partículas esféricas.

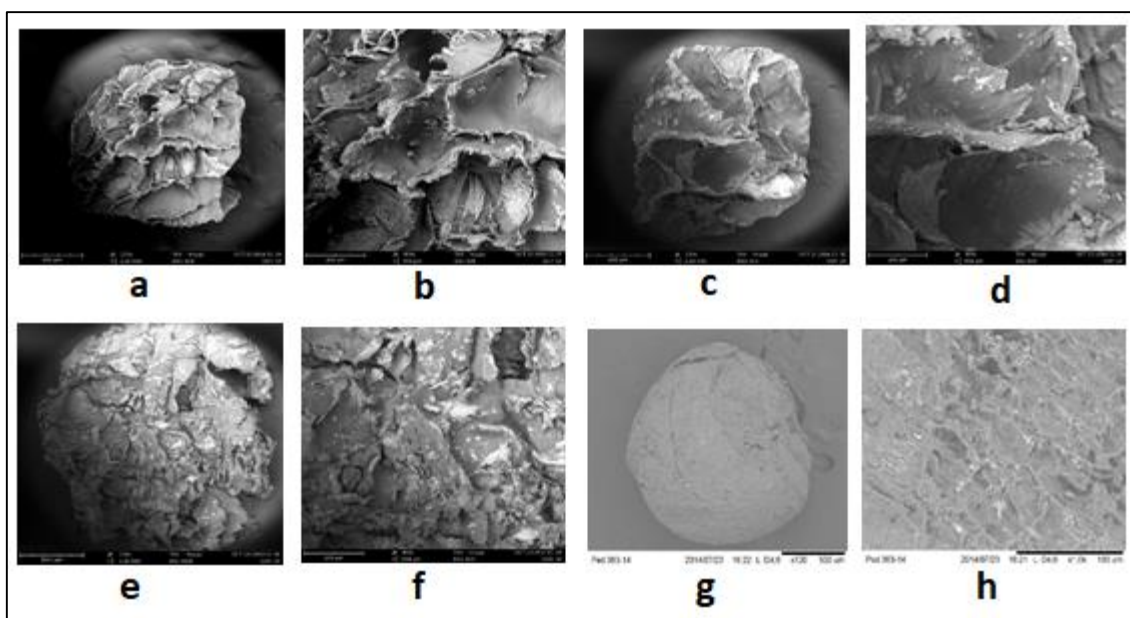


Figura 1: Micrografias das esferas de quitosana (a) aumento de 120x e (b) 300x; (c) esferas de quitosana com 20% de metanol aumento de 120x e (d) 300x; (e) esferas de quitosana com 40% de metanol aumento de 120x e (f) 300x e (g) esferas de quitosana com 60% de metanol aumento de 120x e (h) 300x

A Figura 1 evidencia as análises das esferas de quitosana sem metanol e com 20, 40 e 60% de metanol. A partir da micrografia das esferas de quitosana (Figura 1 (a)), verifica-se esferas com diâmetro médio de $1480 \mu\text{m} \pm 90,0$ ($n=6$), verifica-se também a presença de rugosidade em sua superfície, (Figura 1 (b)). As esferas com 20% de metanol (Figura (c) e (d)), apresentaram um diâmetro médio de $1510 \mu\text{m} \pm 79,3$ ($n=6$), com poros presentes em toda a esfera. Já as esferas obtidas com 40% de metanol (Figura (e) e (f)), apresentaram poros bem maiores e um tamanho médio de partícula de $1590 \mu\text{m} \pm 87,8$ ($n=6$). E a partir das Figuras (g) e

(h), verifica-se que o excesso de metanol, ou seja, 60% de metanol na solução de quitosana, ocasionou em esferas com ausência de poros maiores e com superfície bastante áspera e rugosa, o que provavelmente permitirá uma melhor adesão e proliferação de células, corroborando com Luo *et al.* (2013), que verificou em seus estudos que uma concentração de álcool maior de 50% na quitosana origina esferas com superfície áspera e irregular. De acordo Ashwini *et al.* (2012), as esferas com superfície mais rugosa e porosa, provavelmente permitirá uma melhor adesão do que aquelas partículas que apresentam uma superfície com textura mais densa. Segundo Hoffman (2002), as esferas são geralmente formadas por aprisionamento de certa quantidade de água através de emaranhamentos moleculares e/ou forças secundárias incluindo iônicas, pontes de H e as forças hidrofóbicas. Portanto, fatores que afetam essas forças motrizes, como a composição do solvente, temperatura e concentração de sólidos, também afetam a formação de grânulos durante o processo de gelificação.

A Figura 2 mostra os resultados obtidos pelas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial do (a) sulfato de sódio em pó, e das esferas de (b) quitosana sem metanol, (c) quitosana com 20% metanol, (d) quitosana com 40% metanol e (e) quitosana com 60% metanol.

A partir do termograma da esfera de quitosana sem metanol (Figura 2 (b)), observa-se picos endotérmicos em 146,9; 235,5 e 285,53°C o pico endotérmico em 146,9°C é atribuído à perda de componentes voláteis ou a possibilidade de relaxamento da cadeia. Os picos endotérmicos em cerca de 235°C e 285°C provavelmente estão relacionados com as interações eletrostáticas entre o polímero e os íons do sulfato, ocorrendo também desvios para temperaturas maiores, conforme observado no termograma do sulfato de sódio (Figura 2 (a)), onde os picos característicos do sulfato de sódio foram identificados em 219 e 246°C. Tem-se que a adição do metanol na solução de quitosana teve influência significativa nas propriedades térmicas das esferas de quitosana. De acordo com o termograma das esferas com 20, 40 e 60% de metanol, (Figura 2 (c), (d) e (e)), respectivamente, tem-se que o primeiro pico que é referente a perda dos componentes voláteis, foi deslocado para temperaturas menores e com intensidade de fluxo de calor bem menor, quando comparadas com as esferas de quitosana sem metanol (Figura 2 (b)), onde o aumento de álcool nas amostras, ocasionou a diminuição de fluxo de calor para este pico.

Já o segundo e o terceiro pico são referentes as interações eletrostáticas entre a matriz polimérica, a quitosana, com os íons sulfatos, do sulfato de sódio utilizado para a produção das esferas. As temperaturas para o segundo pico, foram de 226,33; 229,45 e 227,34°C para as amostras com 20, 40 e 60% de metanol, respectivamente. O terceiro pico, que também corresponde a interação da quitosana com os íons sulfatos, é mais evidente para a amostra com 40% e 60% de metanol sendo sua temperatura máxima em 277,3 e 270,25 °C respectivamente, porém no termograma das esferas com 20% de metanol (Figura 2 (c)), verifica-se o desaparecimento deste pico.

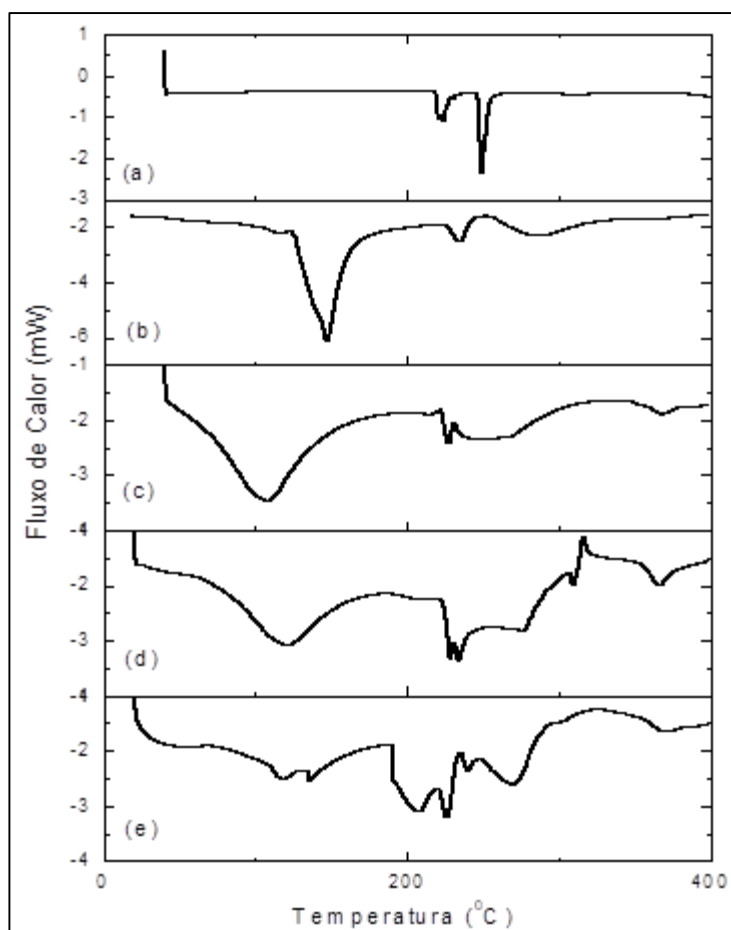


Figura 2: DSC do sulfato de sódio (a), das esferas de quitosana (b) quitosana sem metanol, (c) quitosana com 20% metanol, (d) quitosana com 40% metanol e (e) quitosana com 60% metanol.

Na Figura 3, tem-se o espectro de FTIR das esferas de (a) quitosana sem metanol, (b) quitosana com 20% metanol, (c) quitosana com 40% metanol e (d) quitosana com 60% metanol.

A Figura 3 (a) mostra os espectros obtidos a partir da esfera de quitosana sem metanol, onde percebe-se regiões com vibrações características da quitosana (3000 a 3665cm^{-1}).

As bandas em 1323 a 1379cm^{-1} e 3264 a 2918cm^{-1} , permaneceram nas mesmas regiões, porém com intensidade ligeiramente menor, destacando a banda em 1411cm^{-1} correspondente ao grupo amina (NH_2), que quase desapareceu. É possível observar que as bandas nas regiões de 1020 a 1100cm^{-1} correspondentes as aminas alifáticas, foram deslocadas para $1095, 170\text{cm}^{-1}$, e as bandas em 1647 e 1568cm^{-1} , foram deslocadas para 1624 e 1511cm^{-1} .

Nas demais curvas de FTIR para 20, 40 e 60% de metanol, verifica-se a permanência das bandas referente a quitosana, porém tem-se uma maior intensidade de transmitância nas curvas, principalmente nas bandas de 3600 a 3200cm^{-1} que são referentes ao dos grupos O-H. portanto tem-se que o aumento da porcentagem de metanol das amostras é proporcional ao aumento da intensidade de transmitância.

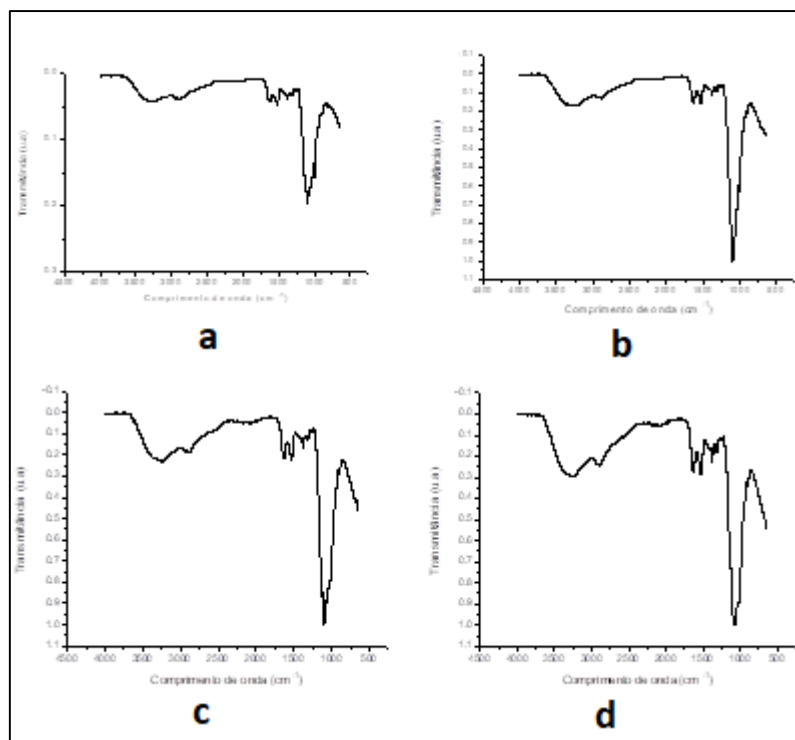


Figura 3: FTIR das esferas de (a) quitosana sem metanol, (b) quitosana com 20% metanol, (c) quitosana com 40% metanol e (d) quitosana com 60% metanol.

4. Conclusão

Conclui-se que adição do metanol na solução de quitosana teve influência significativa na morfologia das esferas, sendo a superfície das esferas altamente dependente da concentração de metanol, podendo ser obtidas partículas de macroporos para concentrações com 20 e 40%, já para as amostras com 60%, obteve-se esferas com superfície rugosa e ausência de macroporos.

5. Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e ao Ministério da Saúde do Brasil.

6. Referências

- ASHWINI, R. M., R. B., RAHUL, R. P., NILKANTH, S. P. & DEVAKI, C. U. 2012. Formulation and Optimization of Drug-Resin Complex Loaded Mucoadhesive Chitosan Beads of Repaglinide Using Factorial Design. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 24, 62-70.
- BALAN, V. & VERESTIUC, L. 2014. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Journal Polymer*, 53, 171-188.

- BIERBRAUER, K. L.; ALASINO, R. V.; MUÑOZ, A.; BELTRAMO, D. M. & STRUMIA, M. C. 2014. Characterization and bacterial adhesion of chitosan-perfluorinated acid films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 201–208.
- DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R.M. & CHIELLINI, E. Progress in Polymer Science. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Special Issue on Biomaterials*, 36, 8, 981–1014, 2011.
- GHANBAR, H.; LUO, C.J.; BAKHSHI, P.; DAY, R. & EDIRISINGHE, M. 2013. Preparation of porous microsphere-scaffolds by electrohydrodynamic forming and thermally induced phase separation”. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 5, 2488-2498.
- GNAVI, S., BARWIG, C., FREIER, T., HAASTERT-TALINI, K., GROTHE, C. & GEUNA, S. 2013. Chapter One – The Use of Chitosan-Based Scaffolds to Enhance Regeneration in the Nervous System. *International Review of Neurobiology*, 109, 1–62.
- HOFFMAN, A. S. 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1, 3–12.
- JAEGHERE, W.; GEEST, B.G.; VAN BOCXLAER, J.; REMON, J.P.; VERVAET, C. & FONSECA, A. A. 2013. Formulation of poorly water-soluble drugs via coacervation – A pilot study using febantel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85,3, 930-935.
- JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., KUMAR, P.T. S., NAIR, S.V. & TAMURA, H. 2011. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29, 3, 322–337.
- KEAN, T. & THANOU, M. 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1, 3–11.
- LI, G.; GUO, L.; WEN, Q. & ZHANG, T. 2013. Thermo-and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 69-74.
- LIU, C., XIA, Z. & CZERNUSZKA, J. T. 2007. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85, 7, 1051–1064.
- LOURENÇO, V. A. 2006. *Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- MA, L. & LIU, C. Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. 2010. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 2, 448–453.
- MARTIN, J. R.; GUPTA, M. K; J. M; YU, F.; DAVIDSON, J. M.; GUELCHER, S. A. & DUVALL, C. L. 2014. A porous tissue engineering scaffold selectively degraded by cell-generated reactive oxygen species. *Biomaterials*, 35, 2, 3766-3776.
- MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C. DE., CASTRO, H. F. DE. & GIORDANO, R. De L. 2011. Aplicação de quitosana como suporte de para uma imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34, 5, 831-840.
- MÜLLER, V.; PIAI, J. F.; FAJARDO, A. R.; FÁVARO, S. L.; RUBIRA, A. F. & MUNIZ, E. C. 2011. Preparation and Characterization of Zein and Zein-Chitosan Microspheres with Great Prospective of Application in Controlled Drug Release. *Journal of Nanomaterials*, 10, 1-6.
- PARK, H., CHOI, B., HU, J. & MIN, L. 2013. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9, 1.
- SHANMUGANATHAN, S.; SHANMUGASUNDARAM, N.; ADHIRAJAN, N.; RAMYAA LAKSHMI, T.S. & BABU, M. 2008. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydrate Polymers*, 73, 2, 201–211.
- SHUKLA, S. K., MISHRA, A. K., AROTIBA, O. A. & MAMBA, B. B. 2013. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46–58.
- SINHA, V.R., SINGLA, A.K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., BANSAL, K. & DHAWAN, S. 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Review. International Journal of Pharmaceutics*, 274,1-2, 1–33.

- THEIN-HAN, W. W. & MISRA, R. D. K. 2009. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5,4,1182-1197.
- YAN, S.; RAO, S.; ZHU, J.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; DUAN, Y.; CHEN, X. & YIN, J. 2012. Nanoporous multilayer poly(L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 2, 443–451.
- YUE, W. 2014. Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 101, 857–863.