



IPG Politécnico
da Guarda
Polytechnic
of Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Licenciatura em Farmácia

Ana Luísa Almeida Torres

julho | 2014





Escola Superior de Saúde

Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
PROFISSIONAL II

ANA LUÍSA ALMEIDA TORRES

RELATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE LICENCIADO
EM FARMÁCIA

Julho | 2014



Escola Superior de Saúde

Instituto Politécnico da Guarda

CURSO FARMÁCIA - 1º CICLO

4º ANO / 2º SEMESTRE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL II

ESTÁGIO EM INVESTIGAÇÃO

NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DA
ESCLEROSE MÚLTIPLA

MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM
ALGINATO

ANA LUÍSA ALMEIDA TORRES

ORIENTADORES: MAXIMIANO RIBEIRO E PAULA COUTINHO

Julho | 2014

SIGLAS

BSA – Albumina Sérica de Bovino

EM – Esclerose Múltipla

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

mAbs – Anticorpos Monoclonais

PEA – Potenciais Evocados Auditivos

PES – Potenciais Evocados Somato-sensoriais

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

SLC – Sistemas de Liberação Controlada

SNC – Sistema Nervoso Central

ABREVIATURAS

mg – Miligramas

mL – Mililitros

μL - Microlitros

RESUMO

A Esclerose Múltipla é uma doença com uma prevalência em Portugal de 20.01 a 60 por 100000 habitantes. Existem diversas terapêuticas implementadas para o tratamento desta doença e ao longo dos últimos anos as mesmas têm vindo a ser melhoradas. Como forma de colmatar várias limitações destas terapêuticas os últimos esforços prendem-se com a criação sistemas de libertação controlada de fármacos baseados, nomeadamente, na utilização de biomateriais. No presente estudo foi testada a aplicação de micropartículas de Quitosano e Alginato no desenvolvimento de sistemas terapêuticos para o tratamento da Esclerose. Os resultados evidenciam a estabilidade dos sistemas microparticulados em meio ácido e a libertação da proteína modelo em meio entérico.

PALAVRAS-CHAVE: Micropartículas; quitosano; alginato; BSA; encapsulação; perfil de libertação; testes de solubilidade; Esclerose Múltipla

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS BASEADOS EM BIOTECNOLOGIA	7
1.2. CARATERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS	8
1.2.1. Alginato	8
1.2.2. Quitosano	9
1.3. LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	10
1.4. BSA.....	11
1.5. MÉTODO DE BRADFORD	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1 MATERIAIS.....	12
2.2. OBJETIVO	11
2.3. MÉTODOS	12
2.3.1. Síntese de micropartículas de Quitosano	12
2.3.2. Encapsulamento de BSA	13
2.3.3. Revestimento das partículas de Quitosano com Alginato	13
2.3.4. Avaliação do perfil de liberação das micropartículas	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO A 2% COM BSA.....	15
3.2. ENCAPSULAMENTO DE BSA NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO	15
3.3. CARATERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO.....	16
3.4. ENCAPSULAMENTO DE BSA NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO	16
3.5. PERFIL DE LIBERTAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO	17
3.6. PERFIL DE LIBERTAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO	17
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	19
6. BIBLIOGRAFIA	20

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla é uma doença autoimune na qual o sistema imunitário destrói o sistema nervoso gerando uma série de sintomas. É mais comum nas mulheres do que nos homens e os sintomas geralmente aparecem por volta dos 30 anos. A prevalência da doença em Portugal é de 20.01 a 60 por 100,000 habitantes. É uma doença crónica, desmielinizante, degenerativa, inflamatória e devastadora do SNC (cérebro e medula espinal). A EM é uma doença autoimune em que o sistema imunitário não tem capacidade de reconhecer as suas células e diferenciá-las de corpos estranhos levando á autodestruição dos próprios tecidos. O principal alvo desta doença é a mielina, camada protetora dos axónios que auxiliam a transmissão de impulsos nervosos. Quando ocorre um ataque do sistema imunitário à mielina formam-se cicatrizes que se agrupam, formando as denominadas escleroses ou placas (1).

As causas que originam esta doença ainda permanecem desconhecidas, no entanto pensa-se que a EM seja causada por uma determinada predisposição genética e um fator ambiental desconhecido. Os potenciais fatores ambientais que podem levar ao aparecimento desta doença são infeções, défice de vitamina D e tabagismo (2).

O diagnóstico é feito através de ressonâncias magnéticas, exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) por punção lombar ou pelo estudo dos potenciais evocados (3).

A RNM, abreviatura de “Ressonância Nuclear Magnética”, utiliza um forte campo magnético que cria imagens do cérebro e da medula espinal. A ressonância magnética mostra lesões da substância branca. Este tipo de exame tem também revelado que os doentes com EM podem apresentar áreas de inflamação na mielina sem sintomas clínicos. Existe alguma correlação entre a ressonância magnética e a progressão da doença, mas a correlação não é muito clara e é difícil de interpretar. Isto significa, infelizmente, que não é possível usar os resultados da ressonância para prever o desenvolvimento da doença (4).

No exame conhecido como “punção lombar”, utiliza-se uma agulha para recolher uma amostra de um líquido que envolve o cérebro e a medula espinal (o líquido céfalo-raquidiano).

Este líquido, nos doentes com EM, apresenta alterações específicas que traduzem a presença de inflamação: um aumento do número de células inflamatórias e da quantidade de proteínas inflamatórias. Este exame é particularmente doloroso. Em cerca de 20 por cento dos doentes submetidos a este exame surgem dores de cabeça e/ou tonturas, mas estes sintomas desaparecem após poucas horas (4).

Através de um exame que consiste na medição dos «potenciais evocados» ou «respostas evocadas» podem ser avaliadas determinadas fibras nervosas. Na EM é possível ver se a condução de certos impulsos nervosos se encontra lentificada nas fibras nervosas (devido à desmielinização). Quanto maior for a desmielinização, mais lenta é a transmissão dos impulsos(4).

Os PEV (PEV – Potenciais Evocados Visuais) verificam a velocidade a que o nervo óptico transmite os impulsos nervosos.

Neste exame, a pessoa que está a ser estudada olha para um determinado padrão num ecrã de TV. Através de uns eléctrodos (fios) encostados à parte posterior da cabeça é possível medir com precisão a velocidade a que o nervo óptico transmite impulsos nervosos (4).

No exame PES (PES – Potenciais Evocados Somato-sensoriais) são administrados ao doente pequenos choques eléctricos no tornozelo ou no pulso. Mais uma vez, a velocidade da transmissão dos impulsos nervosos é registada através de fios ligados à parte posterior da cabeça. O exame PEA (PEA – Potenciais Evocados Auditivos) utiliza os mesmos métodos (estímulos sonoros, fios ligados à cabeça) para medir a velocidade a que as mensagens são transmitidas ao longo dos nervos auditivos e, em Potenciais Evocados Motores, estuda os impulsos nervosos transmitidos pelo sistema motor (o sistema que controla os movimentos do corpo) (4).

Neste exame, é colocado um electroímã sobre a cabeça. Quando o ímã é ligado, surge uma breve tensão nos músculos da perna ou do braço consoante o local da cabeça estimulado. A velocidade a que os músculos reagem a estes estímulos magnéticos (que são transmitidos através do cérebro e da medula espinal) pode ser medida com precisão com esta técnica. (4)

Algumas das terapias até agora aprovadas para o tratamento da EM são os interferões (Betaferon®, Rebif® e Avonex®), os corticosteróides (Solu-Medrol®, Deltasone®, Decadron®), o Copolímero1 (acetato de glatiramer - Copaxone®), os imunomoduladores (ciclofosfamida - Endoxan®, teriflunomida - Aubagio® e fingolimod - Gilenya®), os anticorpos monoclonais (alemtuzumab - Lemtrada® e natalizumab Tysabri®), o quimioterápico mitoxantrona (Novantrone®) e por fim o anti-inflamatório dimetil- fumarato (Tecfidera®) (3) (5) (6) (7) (8) (9).

Os Interferões são proteínas libertadas pelo corpo quando ocorre uma inflamação e que podem reduzir ou estimular a inflamação. Existem três grupos de Interferões: alfa, beta e gama. Os Interferões beta parecem ser os melhores para reduzir a actividade inflamatória na EM. Existem dois tipos de Interferões beta: o Interferão beta-1a e o Interferão beta-1b. Até à data ainda não se realizaram estudos comparativos da eficácia destes dois tipos de Interferões, mas ambos parecem reduzir o risco de ocorrência de surtos na EM em cerca de 30 por cento. A gravidade dos surtos é menor e os danos na substância branca, observados em ressonância magnética, são também reduzidos.

Os estudos efectuados com o Interferão beta-1a mostram também que existe um efeito benéfico na progressão da incapacidade.

O Interferão beta-1b foi testado em doses administradas em dias alternados sob a pele (injecção subcutânea). O Interferão beta-1a foi testado de duas formas: injecção semanal no tecido muscular (intramuscular) ou três vezes por semana de forma subcutânea. Se o médico

assistente entender apropriado, as injeções podem ser aplicadas pelo próprio doente ou por algum familiar que tenha recebido formação para o efeito.

Os efeitos secundários produzidos pelos Interferões beta podem dividir-se em efeitos locais (que se produzem no local onde a injeção é administrada) e em efeitos secundários sistémicos. No local da injeção, a pele pode reagir (com vermelhidão e/ou edema). As injeções intramusculares uma vez por semana provocam menos efeitos secundários locais. Os efeitos secundários locais às injeções subcutâneas desaparecem na maior parte das pessoas (mas não em todas) após algum tempo. Os efeitos secundários sistémicos com Interferão têm características semelhantes à gripe – arrepios, dores musculares, dores articulares. Este tipo de reacção ocorre normalmente nas primeiras horas após a injeção, ou nas primeiras semanas ou meses depois do início do tratamento (4).

Os corticosteróides, substâncias relacionadas com as hormonas produzidas pelas glândulas supra-renais, são usadas há muito tempo como tratamento importante para encurtar a duração dos surtos de EM. Os corticosteróides são conhecidos pela sua capacidade de combater a inflamação. Não têm, contudo, qualquer efeito na progressão da EM, mas reduzem a duração de um surto: diminuem o tempo necessário até à recuperação. Os corticosteróides podem ser administrados de vários modos nomeadamente por perfusão venosa. Geralmente o tratamento dura três a cinco dias. O uso prolongado de corticosteróides (i.e., durante meses seguidos) pode provocar efeitos secundários (4).

Os efeitos produzidos pelos corticosteróides são mais notórios durante um surto de EM que se estabeleceu num curto intervalo de tempo – em poucos dias.

O efeito nos sintomas que afectam a força muscular ou nos que afectam a visão é frequentemente melhor do que nos casos de sintomas que afectam o sentido do tacto ou do equilíbrio.

Nem todos os surtos de EM são tratados com corticosteróides. Os surtos menos graves não são habitualmente tratados: o doente apenas repousa e aguarda a melhoria espontânea. (4)

O Copolímero 1 actua como o Interferão beta, protegendo os doentes da ocorrência de surtos. A gravidade dos surtos também é reduzida. O Copolímero 1 é uma proteína artificial que deve ser injectada por via subcutânea diariamente. Estão em curso estudos sobre o efeito do Copolímero 1 nas lesões da substância branca avaliada por ressonância magnética (4).

Os imunomoduladores também designados como modificadores da resposta biológica, representam um papel fundamental na terapêutica antitumoral, na transplantação de órgãos e medula óssea e nas doenças auto-imunes. No caso dos imunomoduladores referidos modificação pretendida da resposta imunológica consiste numa diminuição da mesma, ou seja, os imunomoduladores usados no tratamento desta doença são especificamente imunossuppressores e atuam na diminuição do número de linfócitos (4).

Anticorpos monoclonais (mAbs, na sigla em inglês) são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B parental, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas. Estes mAbs podem ser gerados em laboratório para reconhecer e ligarem-se a qualquer antígeno de interesse (10).

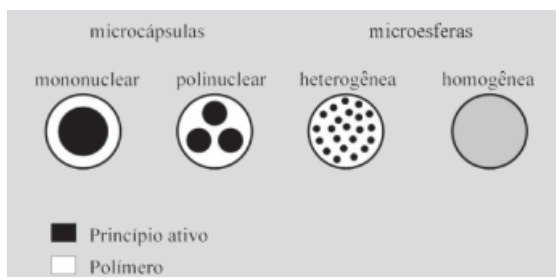
A terapia com a mitoxantrona (um antineoplásico) consiste numa indução da eliminação das células anormais existentes, permitindo assim o crescimento de novas células. Este tipo de terapia reduz drasticamente a atividade da doença em pacientes com esclerose múltipla apesar de ser utilizada no tratamento do cancro (11).

Tendo como base um trabalho desenvolvido no terceiro ano do presente curso, no qual foi feito um questionário a doentes com Esclerose Múltipla, foi possível identificar, através da análise das respostas dos mesmos, a necessidade de desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para formulações orais que reduzam o desconforto da administração terapêutica e mantenham a sua biodisponibilidade e ação farmacológica, colmatando assim esta limitação evidenciada nas terapias existentes para esta patologia específica. Sendo assim, e tendo em conta que os novos sistemas terapêuticos “surgiram da necessidade de minimizar os problemas que se prendem com a administração das formas farmacêuticas tradicionais” (12), foi proposto o desenvolvimento de um sistema microparticulado utilizando biomateriais, designadamente alginato e quitosano.

1.1 NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS BASEADOS EM BIOTECNOLOGIA

Os novos sistemas terapêuticos biotecnológicos têm sido bastante estudados uma vez que possuem diversas vantagens face às terapêuticas tradicionais nomeadamente: menor toxicidade, menor dose necessária para atingir o mesmo efeito terapêutico e ainda por possuírem uma maior biodisponibilidade. Sendo assim, quando um sistema terapêutico de base biotecnológica é criado com sucesso consegue-se uma libertação controlada do fármaco pretendido aumentando a sua eficácia. Estes sistemas consistem na encapsulação de fármacos em sistemas matriciais permitindo que o fármaco atinja o local alvo com o mínimo de alterações possíveis mantendo o mesmo estável e protegido face ao trajeto que tem de percorrer pelo trato gastrointestinal (13). Dentro dos sistemas matriciais existentes os escolhidos para este estudo foram as micropartículas.

“As micropartículas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanho que varia entre 1 e 1000 μm . Subdividem-se em microcápsulas, sistemas reservatório contendo a substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis, que constituem a membrana da cápsula, e em microsferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica. As microsferas podem ser homogêneas ou heterogêneas



conforme a substância ativa se encontre no estado molecular (dissolvido) ou na forma de partículas (suspensão)” (14) (Imagem 1).

Imagem 1 - Modelo da estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (14)

A tecnologia de microencapsulação pode ser utilizada com vários objetivos entre os quais a produção de formas farmacêuticas de liberação controlada sendo este o principal propósito deste trabalho. “O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido, fácil de se transportar à escala industrial e deve ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e polímero” (14).

Para a realização desta técnica podem ser utilizados diversos materiais no entanto, tendo em conta os recursos disponíveis e as metas que se pretendiam alcançar neste projeto, foram utilizados dois dos biomateriais mais comuns: o Alginato e o Quitosano.

“Um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável” (15). Para desempenhar de maneira satisfatória a função de substituir, aumentar ou suportar uma estrutura o implante deve mimetizar ou compatibilizar com as características do tecido. Existem diferentes tipos de enxertos: autólogos (provém do mesmo indivíduo); homólogos (de um indivíduo da mesma espécie do receptor) e heterólogos (quando a espécie do doador e do receptor não coincidem – bovinos, por exemplo). Os enxertos autólogos, apesar de serem os mais viáveis, apresentam certos inconvenientes como: intervenção numa área do organismo do paciente que se encontra saudável, sujeitando a mesma a alterações; morbidade da área doadora; maior período de convalescença ou ainda susceptibilidade a infecções. Desta forma, implantes com biomateriais sintéticos como cerâmicas e polímeros têm sido amplamente desenvolvidos e aplicados (15).

1.2.CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

1.2.1. Alginato

Consiste num pó branco pálido, inodoro e insípido. Parte principalmente do sal sódico do ácido algínico, ou seja, uma mistura de ácidos poliurónicos composta de resíduos de ácido D-manurónico e ácido L-gulurónico (16)

Polímero natural de relativo baixo custo, de fácil obtenção através das algas castanhas, biocompatível, atóxico e biodegradável, que não necessita utilização de solventes orgânicos ou condições rigorosas de temperatura para a formação das partículas (16).

O alginato tem a capacidade de formar hidrogéis quando em contacto com catiões divalentes como por exemplo o cálcio. A viscosidade do alginato aumenta com a diminuição do pH (17).

Este biomaterial é usado na biomedicina no tratamento de feridas, na engenharia de tecidos e no transporte de fármacos. Os hidrogéis de alginato são compostos por ligações de polímeros hidrofílicos com um grande conteúdo em água. São estruturalmente semelhantes a componentes de base macromolecular existentes no corpo humano e podem ser administrados de forma não invasiva (17).

Para a formação dos hidrogéis deste estudo foi utilizada a técnica de ligação iónica através de catiões divalentes. O Cloreto de Cálcio é um dos compostos mais utilizados neste tipo de ligação uma vez que se trata de um catião divalente que se liga às porções de alginato que possuem o ácido gulurónico. No entanto este composto leva a uma formação rápida e pouco controlada do hidrogel devido à sua elevada solubilidade em soluções aquosas (17).

O alginato pode apresentar uma boa biodegradabilidade se for parcialmente oxidado. A taxa de degradação do mesmo depende do grau de oxidação do alginato e do pH e temperatura do meio (17).

A nível farmacêutico o alginato pode ter a função de agente espessante, gelificante e estabilizante assim como ter um papel importante na libertação controlada de fármacos, nomeadamente no transporte de fármacos com baixo peso molecular e no transporte de proteínas (17) (18).

1.2.2. Quitosano

O quitosano deriva da N-desacetilação da Quitina resultando num copolímero de N-acetilglucosamina e glucosamina. É um amino polissacárido catiónico e caracteriza-se pelo grau de desacetilação que lhe permite ser solúvel em ácido acético quando este grau é menor que 40%. Este composto tem sido muito estudado numa grande variedade de aplicações biomédicas tais como o uso no tratamento de feridas, em membranas de hemodiálise, em sistemas de entrega genética ou de fármacos, em revestimentos de implantes ou ainda na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade sem produção de substâncias tóxicas.

Sugere-se que o quitosano e os seus derivados são candidatos promissores na engenharia de tecidos. (19) A versatilidade do quitosano deve-se à sua natureza intrínseca antibacteriana, capacidade regenerativa e habilidade em formar estruturas porosas. Possui igualmente uma grande afinidade para macromoléculas *in vivo* como por exemplo para a insulina, proteínas e ainda para metais. É importante referir que o mesmo demonstrou ser um facilitador dos

processos de engenharia tecidual devido à sua natureza policatiónica a qual aumenta a atracção entre as células e o polímero (20).

Biodegradabilidade
Biocompatibilidade
Bioadesividade/Mucoadesividade
Promotor da absorção
Actividade antiinflamatória, antifúngica e antibacteriana
Promotor da regeneração de vários tecidos (pele, tecido ósseo...)
Hemoestático
Antitrombogénico
Processabilidade

Tabela 1 – Principais propriedades do quitosano enquanto biomaterial

1.3. LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Quando um fármaco é administrado apenas uma pequena fracção da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de acção.

A libertação controlada de fármacos tem como objectivo principal o controlo temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados. Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioactivos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético. A libertação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de libertação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve actuar. Estes sistemas são designados assim por sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos. Materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido utilizados como suportes de SLC. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados.

O perfil de libertação do fármaco é determinado por uma série de factores, entre eles as características do meio de libertação, as propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero/polímeros e as interacções estabelecidas entre estes. A forma de incorporação do fármaco, o grau de reticulação, a morfologia do material (nomeadamente a presença de poros, o seu tamanho e distribuição) e capacidade de absorção de água são outros factores importantes. Em alguns casos, principalmente nos hidrogéis físicos, a dissolução/desintegração ou degradação da matriz polimérica também afectam significativamente o processo de libertação do fármaco (16).

Para testar os conceitos técnicos, referidos até agora, no projeto em questão foi utilizada a Albumina Sérica de Bovino (BSA) como proteína modelo uma vez que a mesma é largamente utilizada nas fases iniciais do desenvolvimento de sistemas terapêuticos para libertação controlada de fármacos de natureza proteica. O objetivo deste projeto seria testar uma das terapêuticas já existentes na forma de novo sistema terapêutico como por exemplo micropartículas com Natalizumab incorporado (16).

1.4.BSA

É uma proteína de albumina sérica (também conhecida por Fração V) derivada dos bovinos. É muitas vezes utilizada como uma proteína de concentração standard em experiências laboratoriais. A designação de Fração V refere-se ao facto de ser uma fração da albumina original obtida pelo método de purificação de Edwin Cohn. Manipulando as concentrações, o pH e a temperatura Cohn conseguiu obter frações sucessivas do plasma sanguíneo. O processo foi primeiramente comercializado para a albumina humana e posteriormente adaptado para a produção de BSA.

1.5.MÉTODO DE BRADFORD

O método de Bradford é baseado na ligação do corante de azul de Coomassie G-250 à proteína (21).

Este método é muito utilizado por ser rápido, utilizar apenas um reagente corante para quantificação da amostra de proteína, por se poder realizar à temperatura ambiente sem sofrer interferência, por manter estabilidade de cor durante, pelo menos, uma hora ao abrigo da luz e por permitir a quantificação de valores mais baixos de proteína (21).

A interação entre a proteína e o corante provoca a alteração do corante e é detetável a um comprimento de onda de 595nm (22).

A solução de Bradford apresenta modificação de cor quando a proteína está presente de azul acastanhado para azul (21).

O método de Bradford tem a sua aplicação em meios como o plasma, a saliva humana ou o leite humano (21).

1.6.OBJETIVO

O objetivo foi desenvolver um sistema terapêutico microparticulado para a libertação controlada de fármacos com proteção gástrica usando quitosano e alginato. A realização deste processo seria uma iniciação à produção de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da EM.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Cloreto de cálcio dihidratado da Scharlau Chemie S.A. ® (Espanha), Alginato de sódio da Panreac Applichem® (Espanha), Quitosano e Tripolifosfato ambos da Acrós organics® (Espanha), Vinagre de vinho branco (ácido acético) da Cigalou® e BSA da Sigma®.

A solução de suco gástrico artificial e a solução de suco entérico artificial foram desenvolvidas segundo a Farmacopeia Portuguesa.

Na solução do suco gástrico artificial a PH 1,2 utilizaram-se como reagentes cloreto de sódio do laboratório Panreac® e ácido clorídrico a 33% do laboratório José M. Vaz Pereira, S.A.®.

Na solução do suco entérico artificial a pH 6,8 utilizaram-se como reagentes fosfato monopotássico e hidróxido de sódio da Merck®.

A solução do Método de Bradford foi constituída por azul de coomassie (G-250) do laboratório Fisher Scientific®, metanol do laboratório Scharlau® e ácido fosfórico a 85% do laboratório José M.Vaz Pereira, S.A.®.

2.2.MÉTODOS

2.2.1. Síntese de micropartículas de Quitosano

O primeiro procedimento diz respeito à preparação da solução de Quitosano a 2%. Para esta preparação são feitos os cálculos necessários e é pesado o quitosano. Posteriormente é realizada a dissolução da BSA no Quitosano sob agitação, obtendo-se uma solução final de 2 ml de Quitosano a 2% com BSA a 20 mg/ml. A solução referida em último lugar foi colocada numa seringa e gotejada para um gobelé, o qual contém Tripolifosfato a 8% (Imagem 2).

Este processo é realizado porque para a formação de micropartículas é necessário haver uma reticulação/precipitação do quitosano. Quando o quitosano entra em contato com o Tripolifosfato ocorrem reações de interações iónicas que dão origem à formação de partículas esféricas quando em agitação. Sendo assim, previamente ao processo de síntese de micropartículas foi feita uma pesagem da proteína em estudo (BSA). Paralelamente, são feitos



os cálculos e a respetiva pesagem e obtém-se uma solução de Quitosano a 2% e uma solução de Tripolifosfato a 8%.

Imagem 2. Micropartículas de Quitosano depois de gotejadas para Tripolifosfato

As partículas obtidas são filtradas, pesadas e a sua massa dividida em quatro grupos. É feita uma primeira avaliação da percentagem de encapsulação de BSA através de espectrofotometria.

2.2.2. Quantificação de BSA por espectrofotometria

Para se quantificar a concentração de BSA nas amostras, estas são analisadas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595nm. A conversão do valor de absorvância em quantidade de BSA é determinada através da reta de regressão linear obtida na curva de calibração. Para se conseguir determinar a eficiência da encapsulação da BSA em quitosano é necessário traçar a reta de calibração com diferentes concentrações de BSA (mostrada nos resultados).

A reta de calibração é representada pela equação geral:

$$y = mx + b$$

em que **y** representa a absorvância e **x** a concentração. Desta forma após a obtenção da equação específica para este caso e da medição das absorvâncias obtidas depois da filtração das partículas de quitosano a 2% com BSA precipitado em tripolifosfato a 8% seria apenas necessário substituir o **y** pelos valores de absorvância e obter-se assim a concentração de BSA libertado.

Para se traçar a reta de calibração diluiu-se o BSA de forma a obter as concentrações de 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL e 1,5 mg/mL. De cada uma destas soluções retiraram-se 20µL de adicionaram-se 500µL da solução de Bradford e 500µL de água. A absorvância foi, para todas as amostras, medida a um comprimento de onda de 595 nm.

Para calcular a percentagem de encapsulamento de BSA na solução de Quitosano são retiradas cinco alíquotas de 40µL de Tripolifosfato onde estiveram mergulhadas as micropartículas de quitosano e a cada uma delas adicionados 1000µL de solução de Bradford para serem medidas as suas respectivas absorvâncias no espectrofotômetro. Com base nas absorvâncias obtidas e na equação da recta de calibração previamente construída é realizado o cálculo concentração de BSA, a massa de BSA pela seguinte equação

$$c = m \times V$$

em que **c** representa a concentração, **m** a massa em mg e **V** o volume em mL e a percentagem de encapsulação.

Esta percentagem de encapsulação permite-nos saber qual a massa de BSA que se encontra incorporada no quitosano.

2.2.3. Revestimento das partículas de Quitosano com Alginato

Com o objetivo de aumentar a estabilidade do sistema e permitir que o fármaco seja transportado ao local alvo sem sofrer alterações as partículas de quitosano previamente formadas da mesma forma que no ponto 2.2.1. são inseridas numa solução de Alginato a 1%. Após a imersão em Alginato as partículas são colocadas sobre agitação numa solução de Cloreto de Cálcio a 4% para que as mesmas sofram as alterações referidas na introdução do presente

estudo. Depois de cerca de 10 minutos as novas partículas de Quitosano agora revestidas com Alginato são filtradas e pesadas de novo.

Para determinar se houve uma manutenção da quantidade de proteína dentro das micropartículas são retiradas cinco alíquotas de 40 μ L da solução de Cloreto de Cálcio a 4%, adicionados 1000 μ L de reagente de Bradford a cada uma e medidas as respectivas absorvâncias.

2.2.4. Avaliação do perfil de liberação da BSA encapsulada em micropartículas

Foram selecionadas duas soluções tampão: uma solução de ácido gástrico artificial e uma solução de suco entérico artificial.

O suco gástrico artificial, tal como a definição indica, simula as condições do meio gástrico do corpo humano. Este suco possui na sua constituição água, enzimas, sais inorgânicos, uma pequena quantidade de ácido láctico e ácido clorídrico o qual é o principal responsável pelo pH ácido do meio (1,2).

Da mesma forma o suco entérico artificial simula o suco entérico produzido no intestino delgado. Este constitui uma solução constituída por enzimas e possui um pH alcalino de 6,8. É no intestino que ocorre a maior absorção de substância ativa. Uma vez que os fármacos são facilmente solúveis passam para os inúmeros vasos sanguíneos existentes neste local do corpo.

Sendo assim é feita uma solução de suco gástrico artificial constituída por cloreto de sódio, água e ácido clorídrico a 1M com o intuito de obter uma solução com pH de 1,2. Este pH é acertado com o auxílio do medidor de pH. Paralelamente é feita uma outra solução de suco entérico artificial constituída por fosfato monopotássico, água e hidróxido de sódio a 0,2M com o intuito de obter uma solução com pH de 6,8. Este pH é acertado com o auxílio do medidor de pH.

As partículas obtidas previamente são submetidas a ambos os sucos a uma temperatura constante de 37°C em banho maria.

Inicialmente mergulham-se em suco gástrico durante duas horas sendo que ao fim de uma hora as mesmas são filtradas e o suco renovado. Nessa renovação são retiradas cinco alíquotas de 40 μ L do suco onde estiveram mergulhadas e medidas as respectivas absorvâncias. De seguida, passadas as duas horas, as partículas são mergulhadas no suco entérico durante o mesmo tempo e é feita a sua renovação ao fim de uma hora e ao fim de duas horas. As alíquotas de 40 μ L deste suco são retiradas com o mesmo intervalo das anteriores, ou seja de hora a hora, e são medidas as suas absorvâncias. Depois da última renovação do suco entérico as partículas são deixadas imersas até ao dia seguinte sendo aí medidas as suas absorvâncias. Os tempos escolhidos para a realização deste estudo, no que diz respeito à avaliação dos perfis de liberação das

micropartículas, tiveram como base um artigo científico no qual as micropartículas eram usadas para a incorporação de insulina.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO A 2% COM BSA

Depois de formadas as partículas procedeu-se à sua observação, à sua pesagem e as mesmas são fotografadas.

Foi possível verificar que apresentavam um aspeto esbranquiçado, quase esférico, viscoso e facilmente moldáveis.

Foi medido o seu peso e este encontrava-se em média entre as 0,400 g e as 0,450 g por grupo de partículas.

As partículas referidas anteriormente podem ser visualizadas na imagem 3.



Imagem 3. Micropartículas de Quitosano

3.2.ENCAPSULAMENTO DE BSA NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Com base na reta de calibração construída e depois de medidas as absorvâncias das alíquotas retiradas do Tripolifosfato onde estiveram imersas as micropartículas foi feito o cálculo da percentagem de encapsulamento da proteína em estudo.

Conseguimos determinar que a percentagem de encapsulamento se encontrou em média nos 99,465% Estes dados tiveram como base a seguinte equação:

$$\% \textit{ encapsulação} = 100 - \frac{m}{V} \times 100$$

Sendo assim, apresenta-se o seguinte cálculo no primeiro ensaio:

$$\% \textit{ encapsulação} = 100 - \frac{0,156814}{20} \times 100$$

O resultado deste cálculo é 99,21593%.

No segundo ensaio é feito o seguinte cálculo:

$$\% \text{ encapsulação} = 100 - \frac{0,054122}{20} \times 100$$

Deste cálculo surge o resultado de 99,72939%.

Fazendo a média dos resultados podemos calcular a média da percentagem de encapsulação dos dois ensaios, ou seja, 99,465%.

Esta percentagem teve também a seguinte recta de calibração como base:

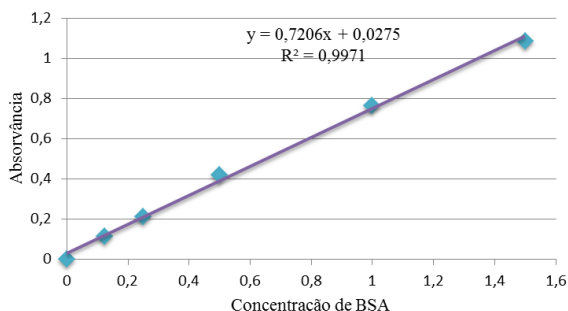


Gráfico 1. Retas de calibração

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO

Depois de mergulhadas em Alginato e precipitadas em Cloreto de Cálcio as partículas são novamente observadas, pesadas e fotografadas (imagem 4).

Verificou-se que estas apresentavam um aspeto esférico, transparente na camada mais exterior e esbranquiçado no interior e com uma estrutura consistente.



Imagem 4. Partículas de Quitosano a 2% revestidas com Alginato a 1%

O seu peso encontrava-se em média entre os 0,650 g e os 2,200 g (o que demonstrou que houve um aumento significativo do peso das partículas depois de revestidas) por grupo de partículas e as mesmas podem ser visualizadas na imagem seguinte.

3.4. ENCAPSULAMENTO DE BSA NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO

Tal como no caso das micropartículas de Quitosano foram usadas alíquotas retiradas do sobrenadante, neste caso alíquotas de Cloreto de Cálcio, para determinar se houve uma manutenção da percentagem de encapsulamento de BSA ou se houve perdas da mesma durante o último revestimento.

Tendo como base as absorvâncias medidas nessas alíquotas e a percentagem de encapsulação medida anteriormente foi possível determinar que foram perdidas em média 0,023 mg de BSA durante o processo de revestimento das micropartículas de Quitosano com Alginato.

3.5.PERFIL DE LIBERTAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO

As micropartículas de Quitosano são submetidas a meio ácido, ou seja, são colocadas em tubos com suco gástrico artificial. O perfil de liberação destas partículas pode ser visualizado no gráfico 2.

Foi possível verificar que ao fim de 2h foi atingido o pico de liberação o que significa que o objetivo de transportar a proteína até ao intestino não foi atingido. Desta forma as micropartículas de quitosano não foram consideradas bons sistemas terapêuticos para a liberação controlada de BSA.

3.6.PERFIL DE LIBERTAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO REVESTIDAS COM ALGINATO

As micropartículas de Quitosano revestidas com Alginato são submetidas ao suco gástrico artificial.

Ao fim de uma hora foi possível verificar que houve uma percentagem de liberação da proteína muito baixa.

Ao fim de duas horas e tendo em conta as absorvâncias medidas das novas alíquotas e das anteriores foi possível verificar que, durante o tempo em que as micropartículas estiveram submersas no suco gástrico artificial, a massa libertada para esse aumentou pouco.

Seguidamente as micropartículas referidas foram submetidas à solução de suco entérico artificial.

Depois de uma hora verificou-se que a percentagem de liberação de BSA aumentou significativamente.

Ao fim de duas horas foi possível calcular, tendo em conta todos os valores de absorvância medidos, a quantidade de proteína libertada durante as quatro horas de ensaio e verificou-se que a percentagem de liberação aumentou mais durante o tempo em que as micropartículas foram submetidas ao suco entérico do que durante o tempo em que estiveram submetidas ao suco gástrico. Só ao fim de 4h é que se atingiu o pico de liberação de BSA. (Gráfico 2)

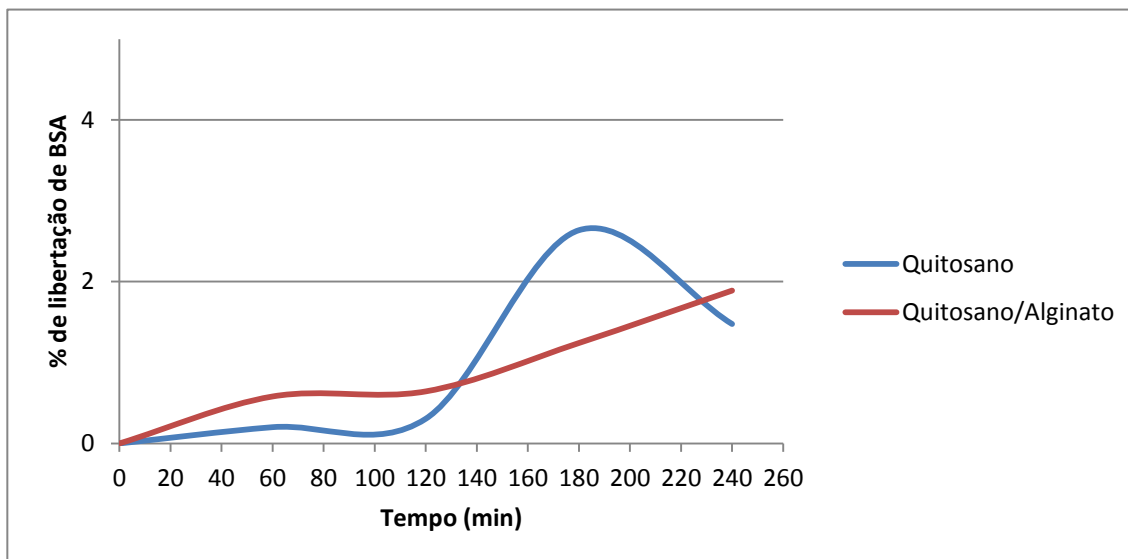


Gráfico 2 – Perfil de liberação de BSA nas micropartículas de quitosano e de quitosano revestido de alginato em suco gástrico e suco entérico (durante as primeiras 2 horas e durante as 2 horas seguintes respectivamente)

4. DISCUSSÃO

Para a preparação de novos sistemas terapêuticos é necessário utilizar biomateriais dotados de biocompatibilidade e biodegradabilidade que possam, do mesmo modo, trazer vantagens ao nível da sua manipulação em laboratório e, no caso deste trabalho, darem origem a uma terapêutica promissora no que diz respeito à sua administração.

O Quitosano e o Alginato são materiais biocompatíveis e biodegradáveis amplamente utilizados na área da Biotecnologia. Do mesmo modo, e face à natureza química do natalizumab (natureza proteica), foi usada uma proteína modelo largamente utilizada nas fases iniciais do desenvolvimento de sistemas terapêuticos, a BSA, de forma a simular o comportamento a esperar em diferentes condições físico-químicas naturalmente encontradas no organismo.

Tendo em conta que o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da Esclerose Múltipla, substituindo assim as terapêuticas injetáveis já existentes, é importante referir que a criação de terapêuticas de administração oral com base nestes biomateriais pode vir a ser promissora.

Os resultados obtidos mostram que estes biomateriais possuem características importantes no processo de elaboração de micropartículas. Foi possível verificar que as micropartículas constituídas apenas por Quitosano apresentavam uma estrutura pouco estável e que por isso libertavam o seu conteúdo em proteína antes do tempo pretendido. No entanto, quando estas micropartículas foram revestidas com Alginato, este problema foi resolvido devido a um fortalecimento da sua morfologia e estrutura. Com o mesmo objetivo, durante a síntese de micropartículas, houve um ajustamento da concentração de Quitosano e da solução de Tripolifosfato. Deste modo, uma vez que as micropartículas apresentavam uma estrutura instável (o que levou a uma menor percentagem de encapsulação da proteína) a concentrações

de 1% e 4% para o Quitosano e para o Tripolifosfato respectivamente, as concentrações finais utilizadas foram de 2% e de 8%.

Os resultados obtidos também podem ser explicados pela possível oscilação de temperatura a que as micropartículas estiveram sujeitas, pela instabilidade na elaboração do reagente de Bradford e pelo acerto de pH das soluções artificiais de suco gástrico e suco entérico.

Desta forma foi possível perceber que as micropartículas constituídas apenas por Quitosano não são sistemas de liberação fiáveis. No entanto, quando as mesmas são revestidas com Alginato o seu perfil de liberação é melhorado, havendo uma liberação gradual da proteína incorporada em função do tempo. Tendo em conta os resultados obtidos conclui-se que as micropartículas de Quitosano revestidas com Alginato são as mais viáveis e portanto mais apropriadas para as necessidades exigidas inicialmente.

5. CONCLUSÃO

No âmbito deste estudo foram desenvolvidas com sucesso micropartículas com BSA incorporada com o objetivo de serem a base de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da Esclerose Múltipla.

Os resultados obtidos suportam a ideia de que os biomateriais como, neste caso, o Quitosano e o Alginato são promissores nas futuras terapêuticas para o tratamento de inúmeras patologias uma vez que se mantêm estáveis em ambiente ácido, quando associados no caso deste estudo, conservando, deste modo, a quantidade de proteína que têm incorporada.

No futuro, estes sistemas de liberação controlada de fármacos poderão ser utilizados na incorporação de fármacos com administração oral para o tratamento da Esclerose Múltipla, sendo que para os objetivos deste estudo serem alcançados faltou a sua otimização com o uso do fármaco específico para o tratamento da doença referida.

Como perspetiva futura seria de interesse prosseguir com o projeto de forma a realizar ensaios de citotoxicidade, ensaios de morfologia através de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) e ainda ensaios para determinação do potencial zeta. Depois de terminada esta avaliação e otimizado o processo de produção destas micropartículas o objetivo final seria especificar a substância a ser incorporada como, por exemplo, proceder à substituição de BSA por Natalizumab ou por outro fármaco utilizado no tratamento da Esclerose Múltipla e otimizar de novo o processo com esta alteração. O objetivo final seria a criação de um novo fármaco, de administração oral, com base nestes novos sistemas de liberação controlada.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Yueting, Zhang, Taylor, Guo B. e Hongtao, Lu.** Promoting remyelination for the treatment of multiple sclerosis: Opportunities and challenges. 2013.
2. Arquivos de Neuro-Psiquiatria. [Online] 2000. [Citação: 22 de Julho de 2014.] http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-282X2000000300010&script=sci_arttext.
3. **Federação Internacional de Esclerose Múltipla.** Atlas de Esclerose Múltipla. [Online] 2008. [Citação: 22 de Julho de 2014.] http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf.
4. SPEM - Sociedade Portuguesa de Esclerose Múltipla. [Online] 2014. [Citação: 29 de Julho de 2014.] <http://www.spem.org/esclerose-multipla/diagnostico>.
5. **Vinod , Ramgolam S., et al., et al.** B Cells as a Therapeutic Target for IFN- β in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. 2011.
6. **Jeffery, Douglas R.** Recent advances in treating multiple sclerosis: efficacy, risks and place in therapy. 2013.
7. **Harrison, Daniel M, et al., et al.** Treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis with high-dose cyclophosphamide induction followed by glatiramer acetate maintenance. 2013.
8. **Gutkowski, Krzysztof, Chwist, Alina e Hartleb, Marek.** Liver Injury Induced by High-Dose Methylprednisolone Therapy: A Case Report and Brief Review of the Literature. 2011.
9. **Groves, A , Kihara, Y e Chun, J.** Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. 2013.
10. Anticorpos Monoclonais - Recepta Biopharma. [Online] 2012. [Citação: 29 de Julho de 2014.] <http://www.receptabiopharma.com.br/site/anticorpos-monoclonais/>.
11. American Academy of Neurology. [Online] 17 de Abril de 2002. [Citação: 29 de Julho de 2014.] <https://www.aan.com/>.
12. Novos sistemas farmacêuticos para administração oral. [Online] 2012. [Citação: 22 de Julho de 2014.] <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3744/1/disserta%C3%A7%C3%A3o%20final%20-%20Novos%20Sistemas%20Terap%C3%AAuticos%20para%20Adminis.pdf>.
13. **Marques, Inês e Lopes, Carla Martins.** Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. *Novos Sistemas Terapêuticos Nanotecnológicos*. Porto : Edições Universidade Fernando Pessoa, 2009. ISSN 1646-0480.6.
14. **Silva, Catarina, et al., et al.** Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. 2003.
15. Biomateriais - Biofabris. [Online] 2014. [Citação: 29 de Julho de 2014.] <http://biofabris.com.br/pt/biomateriais/>.

16. **Coimbra, Patricia Manuela Almeida.** Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. Coimbra : s.n., 2010.
17. **Lee, Kuen Yong e Mooney, J. David.** *Alginate: Properties and biomedical applications.* 2011.
18. **Reis, Catarina Pinto, et al., et al.** *Alginate Microparticles as Novel Carrier for Oral Insulin Delivery.* 2006.
19. **Croisier, Florence e Jérôme, Christine.** *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering.* 2012.
20. Biomateriais à base de quitosano com aplicação médica e odontológica: Revisão de literatura. [Online] 2008. [Citação: 22 de Julho de 2014.] <http://www.revodontolunesp.com.br/files/v37n2/v37n2a09.pdf>.