

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/GELATINA E QUITOSANA/COLÁGENO

M. J. Carlos-Salazar*, V. C. A. Martins* e A. M. G. Plepis*

*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos. São Carlos (SP), Brasil
mcarloss@iqsc.usp.br

Resumo: No presente trabalho foi abordada a metodologia de preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas utilizando polímeros de origem natural como quitosana (CS), colágeno (CL) e gelatina (G). Também foi utilizado o poliânion tripolifosfato de sódio (TPP), como agente reticulante para induzir a formação de nanopartículas por gelificação iônica. A quitosana foi primeiramente despolimerizada (CSD). Foram preparadas diferentes formulações de nanopartículas CSD/G/TPP e CSD/CL/TPP, que foram caracterizadas por FTIR, MEV e DLS. Os espectros FTIR sugerem que a gelatina ou colágeno e a quitosana formam a nanopartícula reticulada com TPP. O MEV indica que essas nanopartículas secas são menores que 200 nm e que o tamanho das nanopartículas preparadas com gelatina, não foi dependente da proporção utilizada. Para as nanopartículas de colágeno, o aumento da quantidade desta proteína tem influência direta no diâmetro das partículas em solução.

Palavras-chave: Quitosana, gelatina, colágeno, tripolifosfato, nanopartículas poliméricas.

Abstract: In the present work was addressed the methodology of polymeric nanoparticles preparation and characterization using polymers of natural source such as chitosan (CS), collagen (CL) and gelatin (G). Also was used the sodium tripolyphosphate polyanion (TPP) as crosslinking agent to induce the nanoparticles formation by ionic gelation. The chitosan was first depolymerized (CSD). Different formulations of CSD/G/TPP and CSD/CL/TPP nanoparticle were prepared, and also characterized by FTIR, SEM, DLS. The FTIR spectra suggest that the gelatin or collagen and chitosan form nanoparticles crosslinked with TPP. SEM suggest that dried nanoparticles are smaller than 200 nm. The nanoparticles size prepared with gelatin is independent of the proportion used. For the collagen nanoparticles, the increment in the protein quantity has direct influence on the particles diameter.

Keywords: Chitosan, gelatin, collagen, tripolyphosphate, polymeric nanoparticles.

Introdução

O campo da nanotecnologia tem se desenvolvido nos últimos anos e diferentes tipos de materiais nanométricos estão sendo aplicados nas áreas médicas, de alimentos, farmacêuticos, entre outras [1,2]. Para os

sistemas de liberação controlada de fármacos a nanotecnologia manifesta sua importância na utilização dos nanocarreadores, que podem ser na forma de lipossomas, nanopartículas, dendrímeros, etc [3,4]. Os sistemas de liberação controlada oriundos de polímeros oferecem algumas vantagens como uma melhor biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade [5,6].

A quitosana é um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligações β (1 \rightarrow 4), obtida da desacetilação da quitina que é extraída do exoesqueleto dos artrópodes e alguns moluscos. Este polímero é muito utilizado na preparação de nanomateriais para aplicação médica devido a suas propriedades como a atividade antimicrobiana, efeito coagulante, efeito analgésico, aceleração de cicatrização, mucoadesividade, entre outras [7,8].

O colágeno é a principal proteína fibrosa constituinte do tecido conectivo, encontrado nos tendões, cartilagem, matrizes orgânicas ósseas e até nas córneas. Algumas propriedades tais como a imunogenicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, fazem desta proteína uma boa opção para preparação de biomateriais [9]. A gelatina é obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno, mantendo também as propriedades de seu precursor [10].

A proposta deste trabalho foi preparar e caracterizar nanopartículas feitas com gelatina e quitosana ou colágeno e quitosana, usando tripolifosfato de sódio como agente reticulante, a serem usadas para possíveis aplicações como nanocarreadores.

Materiais e métodos

Materiais – A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula, pela desmineralização, desproteinização e desacetilação conforme descrito anteriormente [11], com as seguintes características: grau de desacetilação: 87,8 %, Mw = 296,14kDa. A quitosana foi despolimerizada [12] e caracterizada (grau de desacetilação: 81,0 %, Mw = 5,48kDa).

O colágeno foi obtido a partir do tendão bovino por tratamento alcalino de 120 h e extraído em ácido acético pH 3,5 [11].

A Gelatina (50-100kDa) foi adquirida da Sigma-Aldrich, o tripolifosfato de sódio da Labsynth.

Preparação de nanopartículas – A preparação das nanopartículas foi feita por uma adaptação do processo

descrito por Fan W. et al, 2012 [13]. Uma solução 0,5 mg mL⁻¹ de quitosana (CSD) foi misturada com gelatina(G) ou colágeno (CL) de acordo com a Tabela 1. A solução foi ajustada a pH 4,8, aquecida a 60°C durante 10 min e colocada num banho de gelo com agitação de 100 rpm sendo posteriormente adicionado TPP 0,5 mg mL⁻¹. A suspensão formada foi sonicada (42 kHz, 30 min), centrifugada a 16000 rpm durante 30 min e as nanopartículas (NP) obtidas foram lavadas e ressuspensas em água. As amostras foram denominadas de acordo com a proporção entre CSD e a proteína.

Tabela 1: Condições para preparação de nanopartículas.

Nanopartícula	mL de CSD	mL de G	mL de CL
NP CSD/G 4:1	12,0	3,0	-
NP CSD/G 2:1	10,0	5,0	-
NP CSD/G 1:1	7,5	7,5	-
NP CSD/CL 4:1	12,0	-	3,0
NP CSD/CL 2:1	10,0	-	5,0
NP CSD/CL 1:1	7,5	-	7,5

Caracterização de nanopartículas

Espectroscopia no Infravermelho – Foi utilizado um espectrofotômetro FTIR Shimadzu IR Affinity-1 e as medidas feitas em num intervalo de 400-4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras acumuladas.

Microscopia Eletrônica de Varredura – As fotomicrografias foram obtidas num equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. O metalizador usado foi um Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein). As amostras foram secas sobre lâminas de silício, por 2 h a 50°C.

Espalhamento de luz dinâmico – A distribuição de tamanho de partícula foi obtida num equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. A amostra foi diluída (1:5), sonicada por 30 min a 42 kHz e centrifugada por 15 min a 3500 rpm antes da medida.

Resultados e Discussões

Espectroscopia FTIR – Como mostrado na Figura 1, foram obtidos os diferentes espectros no infravermelho dos materiais de partida e das nanopartículas NP CSD/G 2:1 e NP CSD/CL 2:1. Pode-se observar no espectro da Figura 1a as principais bandas da quitosana: a banda de estiramento da amida I em 1647 cm⁻¹ assim como a banda de deformação da amina em 1559 cm⁻¹. Outra banda característica foi a de vibração da estrutura piranosídica do grupo –C-O-C entre 1097 e 1077 cm⁻¹. No espectro da gelatina (Figura 1b) foi possível observar em 1654 cm⁻¹ a banda de estiramento –C=O (amida I), em 1541 cm⁻¹, a banda de estiramento do N-H acoplado com o grupo CN (amida II).

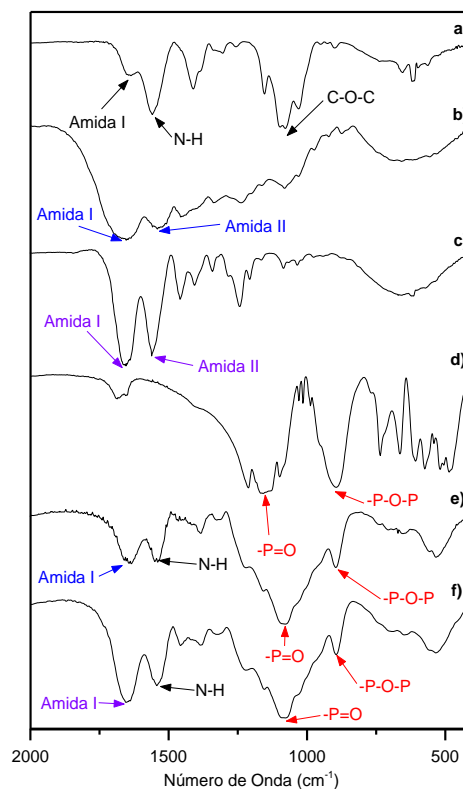


Figura 1. Espectros FTIR de a) CSD, b) G, c) CL, d) TPP, e) NP CSD/G 2:1, f) NP CSD/CL 2:1

No espectro do colágeno (Figura 1c) observaram-se as bandas da amida I em 1652 cm⁻¹ e amida II em 1559 cm⁻¹. No espectro do tripolifosfato de sódio (Figura 1d) encontramos a banda de estiramento do grupo –P=O em 1160 cm⁻¹ e a banda de 894 cm⁻¹ que é atribuída à vibração de estiramento do grupo –P–O–P. Com estes quatro espectros dos materiais de partida podemos reconhecer nos espectros das nanopartículas alguns grupos principais de cada um deles. O espectro da nanopartícula NP CSD/G 2:1 (Figura 1e) mostra a banda da amida I em 1651 cm⁻¹ e a banda em 1538 cm⁻¹ atribuída à amina protonada.

Para a banda de amida I é importante observar que ocorre um aumento em sua intensidade em relação ao espectro da quitosana, o que é uma evidência da presença da gelatina na amostra. A banda que aparece em 1080 cm⁻¹ está presente no espectro da quitosana que está sobreposto com a banda da vibração de estiramento do grupo –P=O (TPP) devido ao alargamento desta banda. Observa-se ainda outra banda pertencente ao TPP em 891 cm⁻¹ atribuída ao grupo –P–O–P. As principais bandas no espectro da NP CSD/CL 2:1 (Figura 1f) são similares, pois são observadas as bandas da amida I em 1651 cm⁻¹, da amina protonada em 1542 cm⁻¹, a banda em 1077 cm⁻¹ da quitosana e a banda em 894 cm⁻¹ referente ao TPP. Estes espectros sugerem a incorporação da gelatina ou colágeno com a quitosana na matriz polimérica assim como também a presença do TPP.

Microscopia Eletrônica de Varredura – A Figura 2 mostra as nanopartículas obtidas nas várias formulações

preparadas. Pode-se observar que em todos os casos as nanopartículas secas têm valores inferiores a 200 nm, com pouca aglomeração nos casos das formulações NP CSD/G 4:1, NP CSD/G 2:1, NP CSD/G 1:1, devido ao fato da utilização de polímeros de menor massa molar, como a gelatina e a quitosana despolimerizada. No caso de NP CSD/CL 4:1, NP CSD/CL 2:1, a aglomeração foi pequena devido à menor quantidade de colágeno presente. Na amostra NP CSD/CL 1:1, é observado aglomeração que leva a um maior tamanho de partícula devido ao uso do colágeno que tem uma maior massa molar e maior proporção na formulação.

Espalhamento de luz dinâmico – O comportamento de aglomeração observado anteriormente foi confirmado pelas medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as nanopartículas em solução como se pode observar na Figura 3. As nanopartículas preparadas com as misturas de quitosana e gelatina mostraram distribuições de tamanhos próximos, com pouca alteração no tamanho (Tabela 2), pode se observar que a tendência é a de aumentar o tamanho e o índice de polidispersividade (PDI) com o aumento da quantidade de gelatina contida na nanopartícula. O valor mínimo encontrado foi de 236,9 nm e 0,126 de PDI para o caso de NP CSD/G 4:1.

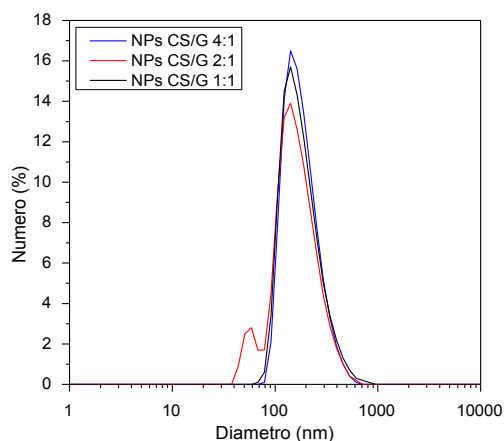


Figura 3. Distribuição de diâmetro de partícula de NPs CS/G (4:1, 2:1 e 1:1)

Tabela 2: Diâmetro e Índice de Polidispersividade das nanopartículas obtidos por DLS.

Nome	Diâmetro (nm)	PDI
NP CSD/G 4:1	236,9 ± 1,6	0,126 ± 0,02
NP CSD/G 2:1	240,6 ± 3,5	0,143 ± 0,01
NP CSD/G 1:1	265,7 ± 2,1	0,190 ± 0,02
NP CSD/CL 4:1	251,9 ± 2,9	0,200 ± 0,02
NP CSD/CL 2:1	367,1 ± 4,3	0,247 ± 0,01
NP CSD/CL 1:1	858,6 ± 12,1	0,394 ± 0,03

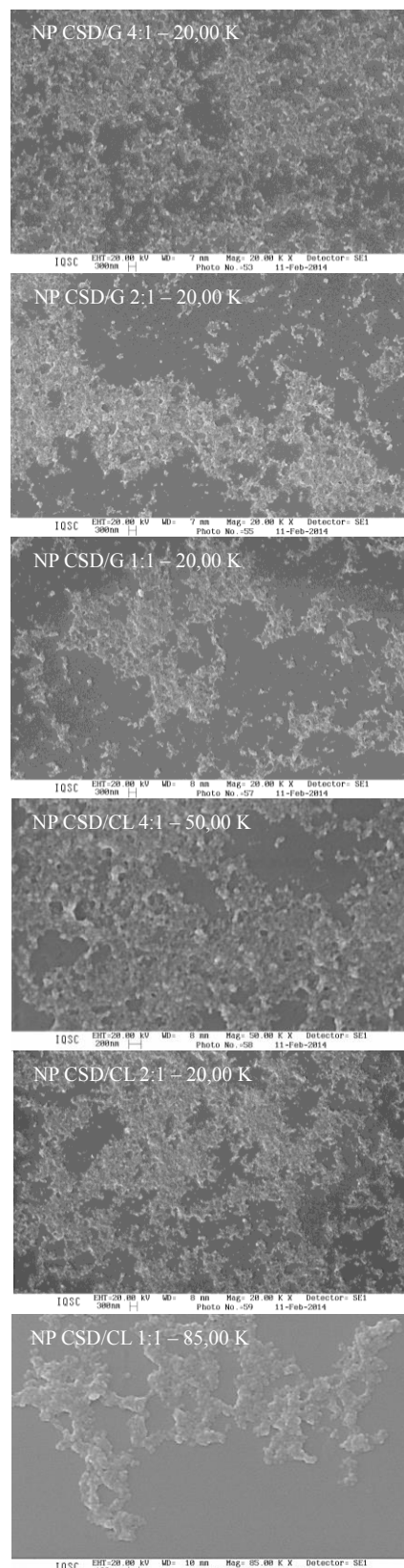


Figura 2. Fotomicrografias por MEV das nanopartículas.

A distribuição de diâmetro de partícula em solução para as nanopartículas preparadas com quitosana e colágeno são mostrados na Figura 4, pode-se observar que um aumento na quantidade de colágeno gera

partículas maiores com maior PDI, chegando a alcançar no caso de NP CSD/CL 4:1 um diâmetro médio de 251,9 nm e 0,394 de PDI. Todos os valores para cada mistura são mostrados na Tabela 2.

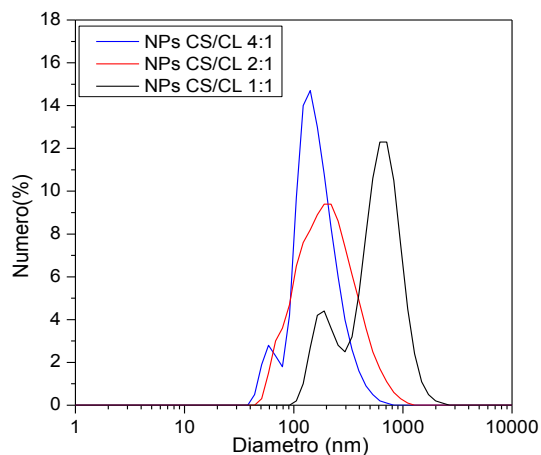


Figura 4. Distribuição de diâmetro de partícula de NPs CS/CL (4:1, 2:1 e 1:1)

Estes resultados indicam que o colágeno produz nanopartículas de maior tamanho pela sua alta massa molar (300 kDa) comparado com as nanopartículas feitas com gelatina de menor massa molar (50-100 kDa).

Conclusão

As nanopartículas de quitosana-gelatina apresentaram um tamanho não dependente da formulação usada. No caso das nanopartículas de quitosana-colágeno, estas são dependentes da quantidade de colágeno, pois apresentaram maior tamanho quanto maior a quantidade de colágeno usada para prepará-las. Além disso, estas nanopartículas são maiores que as preparadas com gelatina.

Agradecimentos

M. J Carlos-Salazar é bolsista CAPES. Os autores agradecem ao Prof. Dr. Marcel Tabak e ao Dr. Adriano O. Carvalho do IQSC-USP, pelas medidas DLS.

Referências

[1] Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today*. 2010. 15(19/20): 842-850.
 [2] Sozer N, Kokini JL. Nanotechnology and its application in the food sector. *Trend and Biotechnology*. 2009. 27(2): 82-89.

[3] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Application. *Nano Lett*. 2010. 10: 3223-3230.
 [4] Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. 2012. 64: 1020-1037.
 [5] Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2010. 1: 149-173.
 [6] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010. 75: 1-18.
 [7] Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. 59: 46-58.
 [8] Costa Silva HSR, Dos Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*. 2006. 29(4): 776-785.
 [9] Parenteau-Bariel R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Application. *Materials*. 2010. 3:1863-1887.
 [10] Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 2011. 25: 1813-1827.
 [11] Horn M, Martins C, Plepis A. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*. 2009. 77(2): 239-243.
 [12] Mao S, Shuai X, Unger F, Simons M, Bi D, Kissel T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004. 281: 45-54.
 [13] Fan W, Yan W, Xu X, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surface B: Biointerface*. 2012. 90: 21-27.