

Análise de Microesferas de Quitosana via intramuscular

V. B. Schul*, I. Alvim**, M. I. Ré**, A. L. Cecchini*

*Departamento de Patologia/Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

**Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, Brasil

e-mail: vitorschul@yahoo.com.br

Abstract: MEQs (chitosan microspheres) were injected (i.m.) in mice and its toxicity was evaluated. It was observed an increase of creatine kinase (CK) activity in the serum of animals treated with cross-linked MEQs, confirm the histopathological results, which demonstrate a greater inflammatory infiltrate and the muscle fibers. Cross-linked MEQs with l-glyceraldehyde (GAL) and with no cross-link (SR) shown maximal edematogenic activity after 24hs of the injection. Though, the sodium triphosphate (TPP) and GAL cross-linked MEQs have a promising future as a drug carrier and for the intramuscularly controlled drug liberation.

Keywords: Chitosan, controlled delivery system

Introdução

Sistemas de liberação controlada oferecem um caminho alternativo para regular a duração e localização específica de agentes terapêuticos. A veiculação de medicamentos em micro ou nanoesferas aperfeiçoa a capacidade de ação do fármaco de escolha, diminui os efeitos adversos e melhora sua eficácia. A microencapsulação de macromoléculas faz com que o fármaco chegue intacto em seu sítio específico de absorção, prolongando seu tempo de residência[1]. Um polímero que mostra grande versatilidade para a encapsulação de fármacos é a quitosana[2,3]. Por causa de sua carga positiva em pH fisiológico a quitosana é bioadesiva, o que aumenta sua retenção no local de aplicação. É um polissacarídeo biocompatível e biodegradável solúvel apenas em meio aquoso de baixo pH com baixa toxicidade[4,5]. A reticulação é o processo pelo qual agentes químicos interligam as cadeias poliméricas de quitosana para a formação de uma estrutura tridimensional. E esta interligação pode ser por meio de ligações covalentes irreversíveis ou interações iônicas reversíveis[4,6].

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade das MEQs SR obtidas pela técnica de *spray drying* e reticuladas com TPP e GAL, na administração intramuscular de concentrações crescentes das micropartículas inertes (sem fármaco).

Materiais e Métodos

Animais – Camundongos Swiss machos (22-25g), provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Estadual de Londrina e aprovado pelo Comitê de Ética da UEL.

Preparação das MEQs por spray drying – Foi utilizada quitosana purificada, MM 455.000 Da, grau de desacetilação 74,8%, Cyrbe[®]. A viscosidade da solução de quitosana foi medida a 25,0 ± 0,1°C usando um viscosímetro de Brookfield DVII-L.

Reticulação das MEQs com GAL – de acordo com [7].

Reticulação das MEQs com TPP – Adicionou-se 100 ml de solução de TPP 1,0% em 500 mL de solução de quitosana 2,5 %. Posteriormente, deixou-se a mistura no agitador por 1 hora. Em seguida, a solução foi seca no *spray drying*.

Reticulação das MEQs com TPP – Morfologia: Microscopia eletrônica de varredura com um microscópio JEOL JSM5200.

Análise granulométrica – Foi utilizado o método de difração a laser em aparelho Malvern Mastersizer/E (Malvern Instruments, Inglaterra).

Carga Superficial (Pontencial Zeta) – Foi determinada segunda metodologia descrita em [8].

Atividade Edematogênica – Os camundongos receberam injeção subcutânea na região subplantar da pata de solução PBS (pH 7,2). O edema foi medido com auxílio de um paquímetro de baixa pressão 0,01mm (Mytutoyo, Japão, Caliper-Kroeplin) e expresso em porcentagem de edema induzido [9].

Atividade Miotóxica – As MEQs reticuladas com TPP, GAL e SR diluídas em PBS foram injetadas i.m. no gastrocnêmio de uma das patas traseiras dos camundongos. Após três horas da injeção o sangue foi coletado da cauda, em capilares e imediatamente centrifugado e a atividade creatina quinase (CK) foi determinada (Oliver, 1963; Szasz, 1975).

Histopatologia – Os camundongos receberam injeção i.m. de PBS, MEQs SR, MEQs reticuladas com TPP ou com GAL. Os músculos foram retirados após 6, 24 e 72 hs e 1 semana da injeção e processados para os cortes histológicos.

Hematócrito – Foi determinado de cada animal de acordo com a tabela de porcentagem de hematócrito.

Tabela 1: Potencial Zeta e o diâmetro das partículas de quitosana SR e reticulada com TPP e GAL.

Microesferas	Potencial Zeta (mV)	10% Diâmetro (µm)	50% Diâmetro (µm)	90% Diâmetro (µm)
SR	+ 20,2 ± 0,6	0,967	3,42	13,44
GAL	+ 8,5 ± 2,2	0,601	7,337	16,52
TPP	+ 17,2 ± 0,9	1,032	3,990	9,180

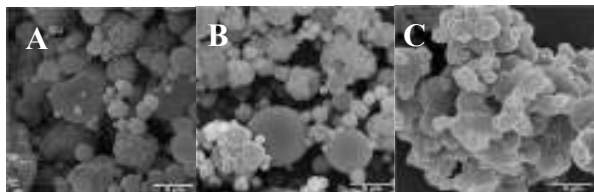


Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura de MEQs; (A) SR, (B) reticuladas com GAL e (C) reticuladas com TPP, obtidas pela técnica de *spray dryer* (aumento de 3000X).

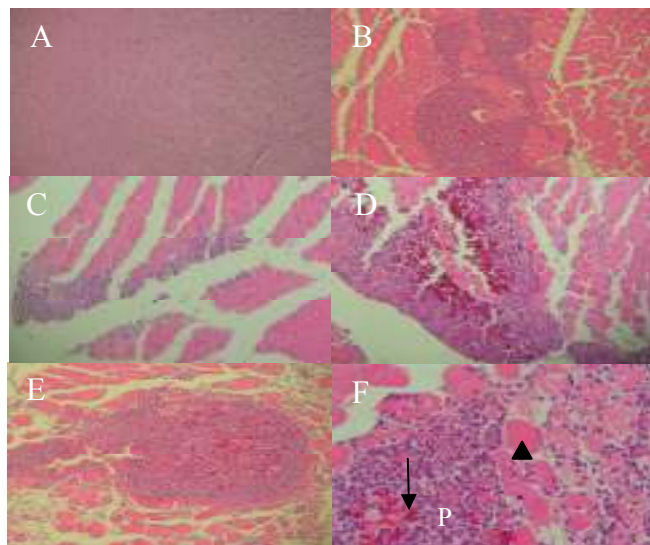


Figura 2: Cortes histológicos de músculo gastrocnemius de camundongos com A) PBS; 240µg/mL de MEQs-SR em B) 6 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das MEQs após 1 semana da inoculação no tecido (seta) e de fibras musculares intactas (ponta de seta) e células polimórficas (P). Aumento de 30x, (a), (b), (c), (d) e (e) e 120x(f).

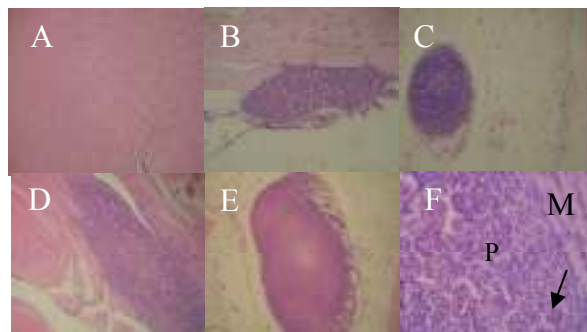


Figura 3: Cortes histológicos de músculo gastrocnemius de camundongos tratados com A) PBS; ou 240µg/mL de MEQs reticuladas com GAL em B) 6 horas; C) 24 horas; D) 72 horas; E) 1 semana; F) Detalhe das MEQs no tecido (seta), células polimórficas (P) e músculo (M). Aumento de 30x em (a), (b), (c), (d) e (e) e 120x em (f).

Tabela 2: Quantificação de CK do soro e hematócrito do sangue de camundongos após a injeção das MEQs SR, reticulada com TPP e GAL.

Amostra	CK (U/L)	Hematócrito (%)
PBS	131	45,5
SR (40µg)	186	45,5
SR (120µg)	156	44,5
SR (240µg)	139	45
GAL (40µg)	658*	47
GAL (120µg)	1678*	48
GAL (240µg)	1941*	46,5
TPP (40µg)	419*	45
TPP (120µg)	658*	47
TPP (240µg)	2377*	51

*p<0,001

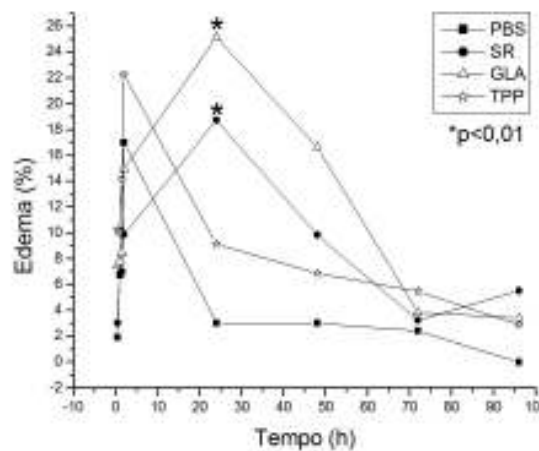


Gráfico 1: Avaliação de edema causado por MEQs reticuladas e não-reticuladas inoculadas vai subplantar em camundongos; *p<0,01 em relação ao controle.

Resultados

As MEQs preparadas pela técnica de *spray drying* apresentaram forma irregular, com a presença de algumas partículas esféricas, e superfície não totalmente lisa, com grande número de rugosidades. A distribuição granulométrica e a análise da carga superficial das MEQs está representado na tabela 1 e a figura 1 mostra a presença de grandes rachaduras ou rupturas superficiais e uma tendência das MEQs reticuladas com TPP em se agregarem, quando comparadas com as microsferas não reticuladas e as reticuladas com GAL.

Os animais tratados com PBS i.m. apresentaram fibras musculares organizadas e íntegras, sem infiltrado inflamatório e destruição do parênquima grau 0 (dado não apresentado). Os animais tratados com MEQs não reticuladas nos tempos de 6, 24, 72 horas e 1 semana na concentração de 240µg/mL apresentaram as mesmas características de graus 2, 4, 1 e 2 (Figura 2).

Os tratamentos com MEQs reticuladas com TPP, nos tempos de 6, 24, 72 horas e 1 semana (240µg/mL) apresentou parâmetros semelhantes aos encontrados anteriormente de graus 1, 4, 4 e 2, respectivamente (dado não apresentado).

Os animais tratados com GAL nos tempos de 6, 24, 72 horas e 1 semana na concentração final de 240µg/mL apresentaram fibras musculares intactas e organizadas, infiltrado polimórfico e destruição parcial de grau 2, 4, 3 e 3, respectivamente, com presença de microsferas na lesão até no tempo observado de 1 semana (Fig. 3).

Os animais tratados com MEQs SR na concentração de 240µg/mL apresentou o menor valor da CK, 139 U/L, conforme a Tabela 2. Os animais tratados com injeção i.m. de MEQs reticuladas e não reticuladas, assim como os animais tratados com PBS não apresentaram modificação significativa no hematócrito (Tabela 2). Não houve atividade edematogênica significativa quando os animais foram tratados com MEQs reticuladas com TPP, sendo o edema apresentado semelhante ao controle no tempo de 2 horas. As MEQs SR apresentaram edema de pata significativo apenas 24hs após a injeção sub-plantar, resultado semelhante quando do tratamento com a partícula reticulada com GAL (gráfico 1).

Discussão

O método de *spray drying* utilizado para a preparação das MEQs mostra-se útil para a fabricação de micropartículas como sistemas de liberação controlada para aplicação intramuscular em relação ao tamanho das micropartículas e a esfericidade, porém nesse trabalho estas características não se assemelharam à literatura. A reticulação das MEQs produzidas por *spray drying* pode limitar a hidratação e a degradação das MEQs, permitindo maior tempo de liberação do fármaco. As MEQs SR apresentam uma rápida degradação[10]. Os tratamentos realizados com as MEQs mostraram biocompatibilidade com o tecido muscular. Os reticulantes, apesar de desencadearem

resposta inflamatória de maior duração quando comparados com as da quitosana SR, apresentaram boa biocompatibilidade tecidual, sem causar danos irreparáveis ao tecido muscular.

As MEQs SR, nas 3 concentrações avaliadas, apresentaram lesão muscular e infiltrado polimórfico até as 24 horas após o tratamento. Esta lesão coincide com o valor máximo de edema sub-plantar, o que demonstra uma resposta inflamatória de caráter agudo. No entanto, a lesão desencadeada não se mostra intensa ao ponto de ocasionar destruição das fibras musculares locais, como necrose tecidual. Isto é reforçado pelo resultado encontrado com a análise da enzima CK, que não apresentou aumento significativo, levando-se em conta que a CK é medida 3 horas após a administração das MEQs.

A resposta aguda que é montada após a inoculação das MEQs SR é reforçada pelo fato de o edema sub-plantar não persistir até as 96 horas pós-tratamento, e a lesão muscular local regredir com o aumento do tempo após a inoculação, não havendo mais partículas no tempo de 72 horas. Também, pelo fato de ter ocorrido presença de infiltrado inflamatório até 1 semana após a injeção, apesar de brando, a presença de partículas neste período reforça a manutenção do processo inflamatório.

O desenvolvimento da resposta inflamatória influencia na velocidade de liberação do fármaco, assim como, na velocidade de degradação das MEQs, pois ambas são influenciadas pelo pH. O local onde ocorre uma resposta inflamatória tende a sofrer diminuição do pH local, o que favorece a degradação das MEQs e conseqüente aumento na velocidade de liberação do fármaco. A comparação dos resultados obtidos demonstra que as MEQs reticuladas com GAL permanecem no tecido por mais tempo, seguida pelas MEQs reticuladas com TPP e, por último, as MEQs SR.

Conclusão

A busca por vias seguras para a administração de sistemas de liberação controlada de fármacos vem aumentando na atualidade. Assim como, a busca por métodos de avaliação que venham assegurar a biocompatibilidade e segurança do dispositivo utilizado.

No presente trabalho, a avaliação da utilização de MEQs reticuladas e SR como sistemas de liberação controlada de fármacos pela via intramuscular mostrou que essas micropartículas são biocompatíveis. As respostas inflamatórias desencadeadas no tecido muscular por ambas as MEQs teve seu pico máximo nas 24 horas após a administração, caminhando para a estabilização e regresso do processo inflamatório nos tempos seguintes.

O processo inflamatório não se mostrou agressivo ao ponto de ocasionar lesões como, necrose, tumorigênese, ou outro tipo de dano mais grave. Os dados obtidos com o edema sub-plantar e a creatina quinase estão de acordo com o encontrado na análise histológica, e a análise do hematócrito ficou dentro da normalidade, o que aponta para a não ocorrência de danos sistêmicos.

Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar a ocorrência de acúmulo de MEQs nos órgãos vitais, assim como, a avaliação da administração das MEQs por outras vias, como a subcutânea. Também, fazer testes *in vitro* para complementar os dados encontrados.

Agradecimentos

Ao Programa de Iniciação Científica da UEL pelo apoio financeiro, ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) e ao Prof. Dr. Rubens Cecchini do Laboratório de Radicais Livres da UEL.

Referências

- [1] Thanou, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E. (2001), "Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 50, p. S91-S101.
- [2] Di Martino, A., Sittinger, M., Risbud, M.V. (2005) "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering", *Biomaterial*, v. 26, p. 5983-5990.
- [3] Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N. (2000) "Cellular responses to chitosan *in vitro*: The importance of deacetylation", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 11, p. 773-778.
- [4] Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R. (2004) "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34.
- [5] Lee, K.Y., Ha, W.S., Park, W.H. (1995) "Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives", *Biomaterials*, v. 16, p. 1211-1216.
- [6] Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R. (2004) "Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52.
- [7] Vandelli, M.A., Rivasi, F., Guerra, P., Forni, F., Arletti, R. (2001) "Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 215, p. 175-184.
- [8] Oliveira, B.F., Santana, M.H., Ré, M.I. (2005) "Spray-Dried chitosan microspheres cross-linked with d.l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 3, p. 353-360.
- [9] Cecchini, A.L., Cecchini, R., Ward, R.J., Soares, A.M., De Oliveira, A. H., Giglio, J. R., Arantes, E. C. (2004) "Effect of crotafotina on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms", *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 138, n.4, p. 429-36.
- [10] Fwu-Long, M., Yu-Chiun, T., Hsiang-Fa, L., Hsing-Wen, S. (2002) "In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant", *Biomaterial*, v. 23, p. 181-191.