



Maria José Capelas de Moura

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE QUITOSANO PARA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INJETÁVEL

Tese de Doutoramento na área científica de Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria José Capelas de Moura

Preparação e Caracterização de Hidrogéis de Quitosano para Administração por Via Injetável

Tese de Doutoramento na área científica de Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo
Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil

Instituições:

Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra

Coimbra
2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar
(...)”*

Fernando Sabino

*Ao meu pai
(In memoriam)*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de diversas instituições e pessoas a quem quero apresentar os meus sinceros agradecimentos.

Correndo o risco de cometer alguma injustiça, da qual antecipadamente me penitencio, não quero porém deixar de invocar aqueles que, de modo mais próximo e distinto, contribuíram decisivamente para a concretização de mais uma etapa da minha formação académica. A eles desejo expressar a minha profunda gratidão e estima.

À Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo e à Professora Doutora Maria Helena Gil, quero expressar o meu sincero agradecimento pela orientação científica, pela revisão crítica desta dissertação, enfim, pelo contributo prestado para o resultado final do trabalho. Um Obrigada muito especial à Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo, a quem muito devo, por me ter aberto as portas à ciência há mais de 20 anos, pelo apoio e acompanhamento científico, desde então, em todo o meu percurso académico e, mais ainda, pela amizade construída. O meu profundo reconhecimento é extensivo à Professora Doutora Maria Helena Gil que, apesar de não me conhecer, me acolheu amavelmente no seu grupo de investigação e depositou em mim a confiança necessária para levar avante este projeto.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita, professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço ter proporcionado os meios técnicos e humanos para a realização dos estudos in vivo.

Ao Dr. Tiago, técnico do Laboratório de Patologia Experimental do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço o incansável apoio facultado no âmbito dos estudos de experimentação animal. O meu agradecimento é extensivo à Doutora Andreia Figueiredo, Médica Dentista. Foi graças ao elevado profissionalismo e permanente boa disposição de ambos, que determinados procedimentos cirúrgicos se tornaram um pouco mais apazíveis de suportar.

À Professora Doutora Maria Helena Figueiredo, professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, desejo expressar o meu profundo agradecimento pela amável disponibilidade e pela orientação e apoio científico na realização dos estudos histológicos. Não posso deixar de destacar a relevância de tão prestimosa contribuição para a elaboração do Capítulo 8 desta dissertação.

Ao Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira, professor do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, sou muito agradecida pelo apoio e facilidades concedidas na utilização do reómetro e, também, no esclarecimento dos resultados reológicos alcançados.

Ao Professor Doutor Arménio Coimbra Serra, professor convidado do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, o meu agradecimento pela ajuda prestada na interpretação dos espectros de FTIR.

Ao Doutor Henrique Faneca, investigador do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, com quem partilhei muitas dúvidas e dificuldades, estou imensamente agradecida pela prestimosa ajuda na realização dos testes de citotoxicidade celular e, mais importante, pela amizade desde sempre demonstrada.

Ao Engenheiro Vitor Redondo, técnico da Unidade de Granulometria do Laboratório de Ensaios e Desgaste & Materiais do Instituto Pedro Nunes, desejo apresentar o meu agradecimento pela disponibilidade sempre manifestada e pela colaboração na execução das análises granulométricas.

Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e ao Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, pela disponibilização das condições materiais necessárias e indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho experimental.

Não posso deixar de agradecer a todos os colegas do grupo de Polímeros do Departamento de Engenharia Química, a simpatia e amabilidade com que sempre me receberam e o apoio prestado nos momentos em que me sentia completamente perdida no laboratório.

A todos os meus Professores, um particular agradecimento pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes anos.

E como os últimos são os primeiros, uma palavra muito especial para a minha Família, em particular para a minha Mãe, Dindinha, Irmã e Sobrinhos, para o Belmiro e para os meus Amigos de sempre que, de um modo discreto mas decisivo, me apoiaram incondicionalmente e me deram a coragem e a força necessárias para trilhar o longo caminho que culminou com a realização desta dissertação. Para todos eles, o meu mais profundo Obrigada e as minhas desculpas pelas muitas horas de ausência.

RESUMO

Para além da capacidade de reter grandes quantidades de água, os hidrogéis apresentam propriedades muito atrativas para aplicações na área biomédica e farmacêutica, designadamente a capacidade para mimetizar os tecidos naturais, bem como propriedades mecânicas e velocidade de degradação ajustáveis e facilidade de aplicação através de meios minimamente invasivos, por exemplo, a injeção. Adicionalmente, um hidrogel injetável passível de ser formado *in situ* deve apresentar um mecanismo de transição sol-gel adequado para aplicações clínicas, ou seja, deve ser inicialmente líquido, de modo a facilitar a injeção e a distribuição homogénea de células, ou do princípio ativo, e ser capaz de gelificar rapidamente, sob condições fisiológicas, após injeção.

Os hidrogéis de base quitosano destacam-se pela sua variedade, versatilidade e propriedades intrínsecas (biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade). Vários métodos têm sido usados para preparar hidrogéis de quitosano, como seja a reticulação física, baseada em interações iónicas e/ou secundárias, ou a reticulação química que usa a ligação covalente para unir as cadeias poliméricas. Embora os sistemas reticulados fisicamente tenham como principal vantagem a formação do hidrogel à temperatura do corpo humano, apresentam algumas desvantagens, designadamente a fraca estabilidade estrutural e reduzidas propriedades mecânicas. Em contrapartida, os sistemas reticulados por via química exibem melhores propriedades mecânicas e elevada estabilidade, estando a sua principal limitação normalmente relacionada com a toxicidade dos agentes reticulantes.

No presente trabalho pretendeu-se preparar um sistema injetável de base quitosano para transporte e libertação de fármacos, capaz de ser produzido *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH, recorrendo a um mecanismo de reticulação combinado (co-reticulação), usando como reticulante físico, o sal fosfato dissódico de glicerol, e como reticulante químico, o genipin. Deste modo, pretendeu conjugar-se as vantagens de cada um dos dois tipos de reticulação, nomeadamente a termossensibilidade conferida pela reticulação física e a estabilidade estrutural resultante de redes reticuladas quimicamente.

Numa primeira fase, caracterizou-se exaustivamente o sistema co-reticulado. As propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas, o controlo do tempo de gelificação, a taxa de degradação, a capacidade de intumescimento e a citotoxicidade dos hidrogéis foram alguns aspetos considerados relevantes para a caracterização do hidrogel enquanto sistema injetável para transporte e libertação de fármacos. O estudo do efeito da concentração do reticulante químico foi outro tópico igualmente analisado. Além disso, o comportamento/propriedades do sistema co-reticulado foi sempre confrontado com o resultante do processo de reticulação puramente física.

Numa segunda fase, testaram-se as potencialidades dos hidrogéis desenvolvidos para a libertação de fármacos, designadamente de um antitumoral – a cisplatina. Foram usadas diferentes estratégias para incorporar a cisplatina nos hidrogéis. Primeiramente incorporou-se o fármaco, na forma livre,

por dissolução diretamente na matriz polimérica. De seguida, e com o intuito de prolongar no tempo a libertação do agente terapêutico, procedeu-se à incorporação no hidrogel de sistemas de libertação independentes contendo o fármaco pré-encapsulado, designadamente lipossomas e microesferas. Por último, realizou-se um estudo experimental *in vivo*, em modelo animal, para avaliar a formação e a permanência dos hidrogéis no local de injeção. Foi também avaliada a resposta inflamatória dos tecidos aos implantes no local de implantação, através de análise macroscópica e análise histológica, após 7 e 30 dias de evolução.

O sistema de libertação aqui proposto, baseado na matriz co-reticulada, é inovador, tendo, tanto quanto é do nosso conhecimento, sido desenvolvido e caracterizado pela primeira vez no presente trabalho. Os resultados mostraram que a metodologia desenvolvida conduziu à formação efetiva de um hidrogel de quitosano co-reticulado, à temperatura de 37 °C e a pH neutro, ou seja, em condições fisiológicas. A característica mais atrativa dos hidrogéis co-reticulados reside na sua capacidade de poderem ser administrados por via injetável, uma vez que são líquidos à temperatura ambiente, e de produzirem estruturas sólidas, altamente porosas, *in situ*. A adição de genipin (em diferentes concentrações) revelou-se capaz de modificar o processo de gelificação das soluções de quitosano neutralizadas, designadamente o tempo de gelificação e as propriedades viscoelásticas, tendo-se refletido, também, em alterações nas propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas dos géis resultantes. Além disso, a presença do reticulante químico melhorou as propriedades viscoelásticas dos géis relativamente ao sistema reticulado fisicamente, e o aumento da sua concentração induziu um reforço das propriedades mecânicas do sistema co-reticulado. Ficou, ainda, demonstrado na presente investigação que propriedades do quitosano, como sejam a biodegradabilidade, a ausência de toxicidade e a elevada capacidade de absorção de água, não se perdem com a co-reticulação dos hidrogéis.

Dos estudos de libertação ficou igualmente demonstrado que, na presença da enzima que atua diretamente na degradação do quitosano (a lisozima), a libertação de cisplatina ocorre de forma contínua e prolongada ao longo do período de teste (quatro semanas). Mais, a conjugação do tipo de reticulação (física e físico-química) e do modo de incorporação do fármaco (disperso na matriz ou encapsulado em lipossomas ou microesferas) permitiu obter perfis de libertação distintos que poderão ser combinados por forma a obter o perfil de libertação desejado para uma dada terapêutica.

O estudo *in vivo* mostrou que as formulações poliméricas líquidas, injetadas subcutaneamente em ratos da linhagem Wistar, produziram os respetivos hidrogéis nos locais de injeção. A análise histológica revelou, após uma semana de evolução, uma acentuada resposta inflamatória, provavelmente, relacionada com o processo de degradação das matrizes, enquanto que aos 30 dias foi notória uma aparente diminuição do volume ocupado pelo material, bem como um decréscimo de células inflamatórias e um predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos.

Face aos resultados apresentados, os hidrogéis desenvolvidos na presente investigação demonstram elevado potencial para aplicações que requeiram libertação prolongada e localizada de cisplatina.

ABSTRACT

In addition to the ability to retain large amounts of water, hydrogels exhibit very attractive properties for application in the biomedical and pharmaceutical fields, in particular the ability to mimic natural tissues, mechanical properties and degradation rates liable to be modulated, and especially the possibility of being applied by minimally invasive means as, for example, injection. Moreover, injectable hydrogels must present sol-gel transition mechanisms suitable to clinical purposes, i.e., must be initially in liquid form, to facilitate injection and to enable the homogeneous distribution of cells or drugs, and should quickly turn into gel under physiological conditions after implantation.

Chitosan-based hydrogels are known by their versatility and intrinsic properties (biocompatibility, biodegradability and non-toxicity) and have been prepared by various methods, namely physical cross-linking, based on ionic and/or secondary interactions, and chemical cross-linking using covalent bonding to attach the polymeric chains. Although physically cross-linked systems can be produced under mild conditions, the resultant matrices present disadvantages as poor stability and weak mechanical properties. The chemically cross-linked systems exhibit, on the contrary, superior performance regarding these properties, the main limitation being, however, the toxicity of most of the cross-linking agents used.

The main purpose of the present study was to prepare an injectable chitosan-based system, able to be produced in situ under physiological conditions of temperature and pH, using a combined cross-linking mechanism (referred to herein as co-cross-linking), with glycerophosphate disodium salt and genipin, respectively as physical and chemical cross-linking agents. The idea is to combine the advantages of each of these two types of cross-linking, i.e., the thermosensitive of physical cross-linking and the stability of chemically cross-linked networks.

Firstly, the co-cross-linked hydrogels have been fully characterized having in mind their eventual application for local drug delivery. Parameters like mechanical and structural properties, gelation time, degradation rate, swelling ability and cytotoxicity, most relevant in injectable hydrogels, have been investigated. The effect of the concentration of the chemical cross-linking agent has been also studied. The behavior/properties of the co-cross-linked systems have been always confronted with the results of the purely physical cross-linking process.

Following, we analyzed the potential of hydrogels as drug release carriers of an antitumor agent such as cisplatin. Different strategies were used to encapsulate cisplatin in hydrogels. First, the drug was incorporated in its free form, by direct dissolution in the polymer matrix during its preparation. Next, with the purpose to increase the release time of the therapeutic agent, the drug was pre-encapsulated in liposomes and microspheres, further added to polymer solution. Finally, we carried out an in vivo study to assess the formation and retention of hydrogels at the injection site.

We also assessed the inflammatory response at the site of implantation, through macroscopic and histological analysis after 7 and 30 days of evolution.

The delivery system developed, which is based on a co-cross-linked matrix, is innovative, and, to the best of our knowledge, has never been tested and characterized. The results show that this strategy of combining chemical and physics mechanisms allows the formation of a co-cross-linked chitosan based hydrogel at a temperature of 37 °C and neutral pH, corresponding to physiological conditions. However, probably the most attractive feature of the co-cross-linked hydrogels produced is their ability to be administered by injection, since they are liquids at room temperature, forming highly porous and solid structures in situ. The addition of genipin proved capable of modifying the gelation process of the neutralized chitosan solution affecting both the gelation time and the viscoelastic properties. Simultaneously changes in morphological, structural and mechanical properties of the resulting gels were observed. As expected, the use of chemically cross-linking mechanism has improved the viscoelastic properties of the hydrogels when compared to the system obtained using only physical cross-linking. Furthermore, the increase of genipin concentration induced the reinforcement of the mechanical properties of the co-cross-linked system. Results also demonstrated that properties of chitosan, such as biodegradability, absence to toxicity and swelling capacity, are preserved in the co-cross-linking of hydrogels.

Drug release studies carried out using the various hydrogels also show that the presence of lysozyme, the enzyme that acts directly on the degradation of chitosan matrices, has a relevant impact on the release profile. It was found that, in lysozyme environments, the release of cisplatin is sustained over the test period (four weeks). Furthermore, the combination of the cross-linking mechanisms (physical or physic-chemical) and the method used to incorporate the drug in the gel (directly dispersed in the matrix or previously encapsulated in liposomes or microspheres subsequently dispersed in the matrix) allow to obtaining different release profiles. These methodologies can thus be combined to obtain a specific release profile, suitable for a given therapy.

The in vivo study confirmed that the liquid polymer formulations subcutaneously injected in Wistar rats produced the hydrogels at injection sites. Histological analysis of tissues revealed, after a week, a strong inflammatory response, probably related to the degradation process of the chitosan matrix. After 30 days an apparent decrease in the volume occupied by the material as well as a decrease in the intensity inflammatory cells and predominance of macrophages, lymphocytes and plasma cells was observed.

From all the above results, it can be concluded that the hydrogels developed in this research work show great potential as drug release carriers for applications requiring in situ administration and sustained release of cisplatin.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Listam-se de seguida as publicações que resultaram do trabalho de investigação desenvolvido nesta tese.

Publicações em Jornais Internacionais com revisão:

- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3823-3829.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheology of chitosan and genipin solutions. *Materials Science Forum* **2008**, Vols. 587-588, 27-31.
- Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3275-3284.
- Moura, M. J. Aplicações do quitosano em libertação controlada de fármacos: algumas considerações. in *Enciclopédia Bioesfera* **2012**, Centro Científico Conhecer, Goiânia (Brasil), 8 (14), 1489-1509.
- Moura, M. J.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linking chitosan hydrogels. *European Polymer Journal* **2013**, 49, 2504-2510.

Participações em Conferências:

- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheology of chitosan and genipin solutions, *IV International Materials Symposium - MATERIAIS 2007*, Porto, Portugal, April 1-4, **2007**. (comunicação em painel)
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Jorge, A. G.; Mendes, J. P.; Gil, M. H. Stabilization of chitosan films by cross-linking with genipin, *IV International Materials Symposium - MATERIAIS 2007*, Porto, Portugal, April 1-4, **2007**. (comunicação oral)
- Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. The potential of a thermosensitive chitosan hydrogel cross-linked in situ with different loads of genipin, *Proceedings of the II International Conference on Tissue Engineering*, (P.R. Fernandes *et al.* eds.), IST PRESS, p. 97-104, **2011** (ISBN 978-989-8481-02-3). (comunicação oral)
- Moura, M. M.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linking chitosan hydrogels, *International Symposium on Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales - AMSALS 2012*, Siófok, Hungary, June 3-6, **2012**. (comunicação em painel)
- Moura, M. J.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. Co-cross-linked chitosan hydrogel as carrier for the local delivery of cisplatin. Liposome inclusion, *International Conference - MATERIAIS 2013*, Coimbra, Portugal, March 25-27, **2013**. (comunicação em painel)

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE PUBLICAÇÕES	xiii
ÍNDICE GERAL	xv
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxvii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 HIDROGÉIS E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	3
1.2 HIDROGÉIS INJETÁVEIS FORMADOS <i>IN SITU</i>	4
1.3 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	5
1.4 ESTRUTURA DA TESE	7
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 2	
HIDROGÉIS DE BASE QUITOSANO: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES	11
2.1 INTRODUÇÃO	13
2.2 POLÍMEROS FREQUENTEMENTE UTILIZADOS NA SÍNTESE DE HIDROGÉIS	14
2.2.1 Polímeros de origem sintética	15
2.2.2 Polímeros de origem natural	17
2.3 O POLÍMERO QUITOSANO	21
2.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE BASE QUITOSANO	24
2.4.1 Reticulação física	25
2.4.2 Reticulação química	28
2.5 REOLOGIA DE HIDROGÉIS	33
2.5.1 Definição de termos e conceitos	34
2.5.2 Materiais viscoelásticos	37
2.5.3 Funções viscoelásticas	38
2.5.4 Ponto de gelificação	40
2.5.5 Testes de avaliação do comportamento reológico	43
2.6 APLICAÇÕES EM SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA	46
2.6.1 Liberação de fármacos a partir de filmes	47
2.6.2 Liberação de fármacos a partir de sistemas de partículas	48
2.6.3 Liberação de fármacos a partir de sistemas injetáveis formados <i>in situ</i>	52
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

CAPÍTULO 3	
MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	73
3.2 MATERIAIS	75
3.3 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS	77
3.4 MORFOLOGIA E ESTRUTURA	84
3.4.1 Microscopia eletrónica de varrimento	84
3.4.2 Porosimetria de intrusão de mercúrio	85
3.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	86
3.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO	86
3.6 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA	88
3.7 CARACTERIZAÇÃO COM VISTA A APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	90
3.7.1 Estudos de degradação <i>in vitro</i>	90
3.7.2 Estudos de citotoxicidade	91
3.7.3 Capacidade de entumescimento	93
3.8 ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	94
3.8.1 Métodos de quantificação da cisplatina	95
3.9 ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	96
3.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
CAPÍTULO 4	
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DOS HIDROGÉIS DE QUITOSANO	101
4.1 INTRODUÇÃO	103
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.2.1 Caracterização morfológica dos hidrogéis	104
4.2.2 Avaliação do grau de reticulação	109
4.3 CONCLUSÕES	119
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
CAPÍTULO 5	
ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE QUITOSANO	123
5.1 INTRODUÇÃO	125
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
5.2.1 Comportamento viscoso das soluções de quitosano	125
5.2.2 Comportamento viscoelástico dos hidrogéis de quitosano	132
5.3 CONCLUSÕES	150
5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
CAPÍTULO 6	
CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS COM VISTA A APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	155

6.1	INTRODUÇÃO	157
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
6.2.1	Estudos de degradação <i>in vitro</i>	158
6.2.2	Estudos de citotoxicidade	164
6.2.3	Avaliação da capacidade de entumescimento	166
6.3	CONCLUSÕES	167
6.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
CAPÍTULO 7		
ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DE CISPLATINA		171
7.1	INTRODUÇÃO	173
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
7.2.1	Libertação de cisplatina a partir da matriz polimérica	174
7.2.2	Libertação de cisplatina a partir de lipossomas dispersos na matriz polimérica	182
7.2.3	Libertação de cisplatina a partir de microesferas dispersas na matriz polimérica	185
7.2.3.1	Caracterização morfológica e granulométrica das microesferas	186
7.2.3.2	Imobilização de cisplatina em microesferas	193
7.2.3.3	Perfis de libertação	195
7.2.4	Comparação dos vários métodos de incorporação de cisplatina nos hidrogéis	198
7.3	CONCLUSÕES	201
7.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202
CAPÍTULO 8		
ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>		205
8.1	INTRODUÇÃO	207
8.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	208
8.2.1	Avaliação macroscópica	208
8.2.2	Avaliação histológica	212
8.3	CONCLUSÕES	220
8.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	221
CAPÍTULO 9		
CONCLUSÕES		223
9.1	CONCLUSÕES FINAIS	225
9.2	PERSPETIVAS FUTURAS	228
ANEXOS		
Anexo A	ENSAIO DA NINDRINA	231
A.1	Preparação da solução de ninidrina	233
A.2	Curva típica de calibração	233

Anexo B	MÉTODO COLORIMÉTRICO COM O-FENILENODIAMINA	235
	B.1 Curva de calibração da cisplatina	237
Anexo C	ENSAIOS REOLÓGICOS: TESTES DE VARRIMENTO EM TEMPO	239
	C.1 Cinéticas de maturação	241

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Preparação e estratégia de administração de um hidrogel pré-formado e de um injetável, ambos contendo células imobilizadas, para aplicação em Engenharia de Tecidos. (adaptado de Jin, 2009)	5
Figura 2.1 -	Estruturas químicas (monoméricas) de alguns polímeros sintéticos: (A) poli(ácido acrílico) (PAA); (B) poli(etilenoglicol) (PEG); (C) poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (p-HEMA); (D) poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) (PNIPAAm); (E) poli(álcool vinílico) (PVA); (F) poli(ácido glicólico) (PGA); e (G) poli(ácido láctico) (PLA).	16
Figura 2.2 -	Estruturas químicas (monoméricas) dos polihidroxialcanoatos: (A) estrutura geral; (B) poli(3-hidroxibutirato); e (C) poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Valores típicos de x , n e R : $x = 1$ a 4 ; $n = 1000$ a 10000 ; e $R =$ grupos alquila (C_mH_{2m+1}) ou grupos alquila funcionalizados. (adaptado de Williams e Martin, 2002)	18
Figura 2.3 -	Estruturas químicas de alguns polissacarídeos: (A) alginato; (B) ácido hialurónico; (C) amilose; e (D) amilopectina.	20
Figura 2.4 -	Estruturas químicas: (A) quitina, 100% acetilada e (B) quitosano.	21
Figura 2.5 -	Representação esquemática da versatilidade da molécula de quitosano. Para baixos valores de pH (inferiores a 6,2) os grupos amina do quitosano encontram-se protonados, conferindo à molécula um carácter policatiónico. Para valores de pH elevados (superiores a 6,5) os grupos amina encontram-se reativos. (adaptado de Dash <i>et al.</i> , 2011)	22
Figura 2.6 -	Estruturas obtidas por: (A) interação iónica e (B) formação de um PEC. (adaptado de Berger <i>et al.</i> , 2004a; Berger <i>et al.</i> , 2004b)	26
Figura 2.7 -	Estrutura de um complexo de quitosano/PVA obtido pelo: (A) método de autoclavagem e (B) método <i>freeze-thaw</i> . (adaptado de Berger <i>et al.</i> , 2004b)	27
Figura 2.8 -	Estrutura de um hidrogel de quitosano, sensível a variações de pH, obtido por copolimerização de enxerto. (adaptado de Berger <i>et al.</i> , 2004b)	28
Figura 2.9 -	Representação esquemática da estrutura de hidrogéis formados por: (A) quitosano autorreticulado; (B) rede polimérica híbrida; e (C) rede semi-interpenetrada. (adaptado de Berger <i>et al.</i> , 2004a)	29
Figura 2.10 -	Imagens relativas à <i>Gardenia jasminoides Ellis</i> : (A) flor e (B) fruto. (C) estrutura química da molécula de genipin.	30
Figura 2.11 -	Reações de reticulação envolvendo o genipin e os grupos amina, em meio ácido ou neutro. R designa a cadeia polimérica contendo grupos amina livres (NH_2). (adaptado de Butler <i>et al.</i> , 2003)	31
Figura 2.12 -	Mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin, em meio ácido ou neutro.	32
Figura 2.13 -	Representação esquemática do processo de gelificação de um polímero: (A) solução polimérica constituída pelos monómeros e agente reticulante dispersos, não reagidos; (B) início da reacção de reticulação através do estabelecimento de ligações polímero-reticulante; (C) transição sol-gel; intensificação das interligações entre as cadeias poliméricas que pode levar à gelificação; e (D) formação de uma rede tridimensional macromolecular, embora se verifique a presença de algumas espécies não reagidas. (adaptado de Franck, 2004)	34
Figura 2.14 -	Representação esquemática do modelo das duas placas paralelas. (adaptado de Mezger, 2006)	35
Figura 2.15 -	Classificação dos fluidos de acordo com o comportamento reológico. (adaptado de Steffe, 1996)	36

Figura 2.16 -	Representação do sistema de medida de um reômetro de pratos paralelos em que o prato superior oscila sinusoidalmente com uma frequência angular ω .	38
Figura 2.17 -	Representação das curvas de tensão e deformação relativas a um sólido elástico puro, a um material viscoelástico e a um líquido viscoso puro. (adaptado de Mezger, 2006)	39
Figura 2.18 -	Representação gráfica de: (A) evolução dos módulos G' e G'' com o tempo; o tempo de gelificação (t_{gel}) corresponde ao instante em que $G' = G''$ e (B) variação da $\tan(\delta)$ com o tempo, para diferentes frequências de oscilação, ω_1 , ω_2 e ω_3 ; o tempo de gelificação (t_{gel}) corresponde ao instante para o qual os valores da $\tan(\delta)$ convergem.	41
Figura 2.19 -	Representação gráfica de um resultado típico de um teste de varrimento em tensão, no qual se mediu o módulo elástico (G') em função da tensão de corte aplicada (τ), para dois materiais com diferentes LVR.	43
Figura 2.20 -	Representação gráfica do resultado de um teste de varrimento em frequência para três sistemas: (A) gel polimérico; (B) solução polimérica concentrada; e (C) solução polimérica diluída.	44
Figura 2.21 -	Representação gráfica do resultado de: (A) teste de varrimento em temperatura, no qual se mediu o módulo elástico, G' , em função da temperatura (T_{gel} é a temperatura de transição sol-gel) e (B) teste de varrimento em tempo, no qual se mediram os módulos elástico, G' , e viscoso, G'' , ao longo do tempo.	46
Figura 2.22 -	Representação esquemática das estruturas de: (A) micro ou nanocápsula e (B) micro ou nanoesfera. (adaptado de Dash e Cudworth, 1998)	49
Figura 2.23 -	Representação esquemática do processo de formação de um lipossoma convencional com uma substância bioativa encapsulada. (adaptado de Mufamadi <i>et al.</i> , 2011)	50
Figura 2.24 -	Preparação de um SLC formado <i>in situ</i> , administrado via intratumoral. (adaptado de Ta <i>et al.</i> , 2008)	53
Figura 3.1 -	Fluxograma das etapas experimentais do desenvolvimento do trabalho.	73
Figura 3.2 -	Estrutura química do fosfato dissódico de glicerol.	75
Figura 3.3 -	Estrutura molecular da cisplatina.	76
Figura 3.4 -	Fluxograma das etapas de preparação e caracterização dos hidrogéis.	79
Figura 3.5 -	Representação esquemática da produção de microesferas de quitosano reticuladas com genipin pelo método da emulsão água-em-óleo.	81
Figura 3.6 -	Exemplificação da reação da ninidrina com espécies que contêm grupos amina livres. (adaptado de Bottom <i>et al.</i> , 2010)	87
Figura 3.7 -	Representação esquemática do sistema de medida (geometria cone/prato) utilizado na realização do trabalho.	89
Figura 3.8 -	Fotografia de um dos animais do estudo, após tricotomia dorsal.	97
Figura 3.9 -	Fotografia de um dos animais do estudo recebendo a injeção subcutânea.	97
Figura 4.1 -	Imagens macroscópicas de: (A) hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogéis de quitosano co-reticulados com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10), em ambos os casos obtidos após maturação em estufa a 37 °C por um período de 12 horas.	104
Figura 4.2 -	Imagens (com duas ampliações diferentes) da estrutura interna dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e dos hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente), obtidas por SEM, após remoção da água por liofilização. O período de maturação dos hidrogéis foi de 12 horas.	106
Figura 4.3 -	Imagens obtidas por ESEM, em condições hidratadas do hidrogel de quitosano	108

	reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e do hidrogel co-reticulado com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10).	
Figura 4.4 -	Curvas de distribuição de tamanhos de poros obtidas para as matrizes liofilizadas cujas imagens são ilustradas na Figura 4.2 (matriz de quitosano-fosfato dissódico de glicerol, C/GP, e matrizes co-reticuladas com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w, C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respectivamente). (O volume de mercúrio referente à amostra C/GP é lido no eixo YY da direita; os restantes no eixo YY da esquerda.)	109
Figura 4.5 -	Espectro de FTIR do quitosano com um grau de desacetilação de 87%.	110
Figura 4.6 -	Espectro de FTIR do genipin.	111
Figura 4.7 -	Espectro de FTIR do fosfato dissódico de glicerol.	112
Figura 4.8 -	Espectros de FTIR: (A) do quitosano (C), do fosfato dissódico de glicerol (GP), do hidrogel de quitosano reticulado com GP (C/GP) e do hidrogel de quitosano reticulado com 0,20% w/w de genipin (C/GE20); e (B) ampliação da região dos espectros entre 1300 e 800 cm^{-1} .	113
Figura 4.9 -	Espectros de FTIR: (A) do hidrogel de quitosano reticulado com fosfato dissódico de glicerol, GP, (C/GP) e de hidrogéis de quitosano co-reticulados com GP e genipin (GE), este último em diferentes concentrações: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respectivamente); e (B) ampliação da região dos espectros entre 1300 e 800 cm^{-1} .	115
Figura 4.10 -	Efeito da concentração de genipin na quantidade de grupos amina livres, em termos de concentração de glicina (μmol de glicina/mg de amostra) nos hidrogéis reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol, GP, (C/GP) e nos hidrogéis co-reticulados com GP e diferentes concentrações de genipin (GE): 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respectivamente). A linha a tracejado corresponde ao quitosano original, em pó.	116
Figura 4.11 -	Grau de reticulação (calculado a partir da equação 3.3) obtido para os hidrogéis de quitosano reticulados com genipin, com (símbolos fechados) e sem (símbolos abertos) a adição de fosfato dissódico de glicerol, ou seja, co-reticulado e reticulado quimicamente, respectivamente.	117
Figura 4.12 -	Esquema proposto para a reticulação dos hidrogéis de quitosano produzidos em condições fisiológicas (de temperatura e de pH) via (A) reticulação física (iônica) e (B) co-reticulação (iônica e covalente).	118
Figura 5.1 -	Influência da concentração de polímero (1,5% e 2,0%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) não neutralizadas (pH = 5,5), à temperatura de 37 °C.	126
Figura 5.2 -	Influência da adição de fosfato dissódico de glicerol na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) de concentração 2,0%, w/w, à temperatura de 37 °C. O gráfico interior mostra as curvas de escoamento de ambas as soluções, para baixos valores de velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$). τ , representa a tensão de corte.	128
Figura 5.3 -	Influência da concentração de genipin, GE (0,05 e 0,10%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 1,5% não neutralizadas, à temperatura de 37 °C.	129
Figura 5.4 -	Influência da concentração de genipin, GE (0,05 e 0,10%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C.	130
Figura 5.5 -	Influência da concentração de genipin, GE, (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C.	131
Figura 5.6 -	Influência da concentração de genipin, GE (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w) na curva de escoamento, para as soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com	132

- fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C. O gráfico interior mostra uma ampliação da zona próxima da origem dos eixos.
- Figura 5.7 - Evolução do módulo elástico (G') de uma solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP) sob aquecimento e arrefecimento controlados de 2 °C/min e à frequência de 1 Hz. 133
- Figura 5.8 - Evolução do módulo elástico (G') de uma solução de quitosano neutralizada com GP à qual foi adicionado 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15) sob aquecimento e arrefecimento controlados de 2 °C/min e à frequência de 1 Hz. 134
- Figura 5.9 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com o aquecimento controlado (2 °C/min), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano **não neutralizadas**, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GE5, C/GE10, C/GE15 e C/GE20, respetivamente). 135
- Figura 5.10 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com o aquecimento controlado (2 °C/min), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano **neutralizadas** com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente). As representações interiores mostram uma ampliação da zona do gráfico para a qual ocorre a interseção dos módulos. 136
- Figura 5.11 - Fotografias de uma solução de quitosano neutralizada com GP, à qual foi adicionado 0,15%, w/w de GE, à temperatura ambiente (A) e do correspondente gel, obtido após aquecimento da solução a 37 °C (B). 137
- Figura 5.12 - Evolução do módulo elástico (G') com o aquecimento controlado (2 °C/min), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano neutralizadas com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE. 138
- Figura 5.13 - Evolução dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') e da tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) na vizinhança da transição sol-gel, a uma frequência de 1 Hz, para a solução de quitosano neutralizada com GP apenas (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15). 140
- Figura 5.14 - Evolução da tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) na vizinhança da transição sol-gel, para diferentes frequências de oscilação (1, 2,5, 5 e 10 Hz), para a solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15). 142
- Figura 5.15 - Evolução da viscosidade complexa na vizinhança da transição sol-gel, à temperatura de 37 °C e frequência de 1 Hz, para a solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15). 143
- Figura 5.16 - Cinética de maturação para duas soluções de quitosano neutralizadas com GP: sem adição de reticulante químico (C/GP) e com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15), a 37 °C, à frequência de 1 Hz e tensão de corte de 1 Pa. Os símbolos a cheio representam G' e os símbolos abertos representam G'' . 144
- Figura 5.17 - Evolução do módulo elástico (G') em função da tensão de corte aplicada, a uma frequência de 1 Hz e à temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após **12 horas de maturação**, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente). 146
- Figura 5.18 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') em função da frequência de oscilação, para uma tensão de corte de 20 Pa e temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após **12 horas de maturação**, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 147

- e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente).
- Figura 5.19 - Evolução da viscosidade complexa em função da frequência de oscilação, para uma tensão de corte de 20 Pa e temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após 12 horas de maturação, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente). 148
- Figura 6.1 - Efeito da concentração de GE nos perfis de degradação *in vitro* dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20), num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (PBS com 1,5 µg de lisozima/mL) a 37 °C. A perda de massa foi calculada através da equação: $perda\ de\ massa\ (\%) = (W_i - W_t)/W_i \times 100$ (equação (3.4)), onde W_i e W_t representam a massa de amostra de hidrogel no início do ensaio e a cada intervalo de tempo, t , respetivamente. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras a incerteza definida como \pm desvio padrão. 159
- Figura 6.2 - Comparação dos perfis de degradação *in vitro* em PBS (símbolos abertos) e em PBS com 1,5 µg de lisozima/mL (símbolos fechados) a 37 °C, dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com 0,05 e 0,20 % w/w de GE (C/GP/GE5 C/GP/GE20, respetivamente). Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras a incerteza definida como \pm desvio padrão. 161
- Figura 6.3 - Mecanismos de degradação de uma matriz polimérica: (A) degradação via superfície e (B) degradação em massa. (adaptado de Edlund e Albertsson, 2002) 162
- Figura 6.4 - Espectro FTIR de uma amostra de hidrogel de quitosano co-reticulado (C/GP/GE15) antes do ensaio de degradação e após 28 dias de degradação, num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (em PBS com 1,5 µg de lisozima/mL). 163
- Figura 6.5 - Imagem do hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,15% w/w de GE (C/GP/GE15): (A) antes do ensaio de degradação e (B) após 28 dias de degradação, num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (PBS com 1,5 µg de lisozima/mL). 163
- Figura 6.6 - Células TSA cultivadas em meio de cultura DMEM-HG, em monocamada, apresentando uma confluência celular de aproximadamente 70%, disponíveis para serem incubadas com os extratos provenientes das matrizes de hidrogel. 165
- Figura 6.7 - Efeito da concentração de GE na viabilidade de células TSA. Os resultados são expressos em termos de percentagem de células de controlo, ou seja, células não tratadas com o meio de extração (valores médios \pm desvio padrão; $n = 6$). (A análise estatística foi realizada utilizando o método de análise de variância (ANOVA) de fator único, seguido pelo teste de Tukey para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA).) 165
- Figura 6.8 - Efeito da concentração de genipin no conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis reticulado fisicamente (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente), em condições de equilíbrio (EWC) a 37 °C. Para cada hidrogel foram realizados três ensaios; as barras representam o desvio padrão associado. O conteúdo de água absorvido, em condições de equilíbrio (EWC), foi calculado através da equação: $EWC\ (\%) = (W_e - W_d)/W_e \times 100$ (equação (3.6)), onde W_e e W_d representam a massa de hidrogel após atingido o estado de equilíbrio e após liofilização, respetivamente. 166
- Figura 7.1 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w (C/GP/GE5/MAT, C/GP/GE10/MAT, C/GP/GE15/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente), obtidos pelo método colorimétrico com OPDA. Perfis de libertação para um longo período (30 dias) 176

- são exibidos, no gráfico superior. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras \pm o desvio padrão.
- Figura 7.2 - Efeito da concentração inicial de CDDP (0,6 e 1,0 mg/mL) na percentagem cumulativa libertada para um hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10/MAT), em PBS a 37 °C. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras \pm o desvio padrão. 178
- Figura 7.3 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de libertação de CDDP, em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulado fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com 0,05 e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente). Perfis de libertação para um curto período (6 h) são exibidos, no gráfico interior, para os mesmos hidrogéis. 180
- Figura 7.4 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS e em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com 0,05 % e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente). Perfis de libertação para um curto período (8 h) são exibidos nos correspondentes gráficos interiores. 181
- Figura 7.5 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, a partir de hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente nos quais a CDDP foi encapsulada em lipossomas (C/GP/LIP) e incorporada diretamente na matriz polimérica (C/GP/MAT). Na figura encontra-se também representado o perfil de libertação para a suspensão lipossomal, Lipoplatin™. 183
- Figura 7.6 - Efeito do tipo de incorporação do fármaco (encapsulado em lipossomas ou disperso na matriz) nos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano co-reticulados com 0,10 e 0,20% w/w de genipin, cuja CDDP se encontra encapsulada em lipossomas (C/GP/GE10/LIP e C/GP/GE20/LIP, respetivamente) ou dispersa na matriz polimérica (C/GP/GE10/MAT e C/GP/GE20/MAT). Perfis de libertação para um longo período (15 dias) são exibidos, no gráfico inferior. 184
- Figura 7.7 - Imagens das microesferas de quitosano reticuladas com genipin obtidas por microscopia ótica (A e B) após três horas de reação e (C e D) após 12 horas de reação. 186
- Figura 7.8 - Imagens obtidas por SEM das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (A e B) após três horas de reação; (C e D) após seis horas de reação; e (E e F) após 12 horas de reação. 187
- Figura 7.9 - Imagens obtidas por SEM da superfície das microesferas de quitosano reticuladas com genipin, após 12 horas de reação. 188
- Figura 7.10 - Efeito da concentração de polímero: 1% (ensaio 9) e 2% (ensaio 24) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: razão mássica genipin/quitosano = 0,06, velocidade de agitação = 800 rpm e tempo de reticulação = 12 h. 190
- Figura 7.11 - Efeito da razão mássica genipin/quitosano: 0,01 (ensaio 18), 0,03 (ensaio 21) e 0,06 (ensaio 24) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: concentração de quitosano = 2%, velocidade de agitação = 800 rpm e tempo de reticulação = 12 h. 191
- Figura 7.12 - Efeito da velocidade de agitação: 800 rpm (ensaio 9) e 400 rpm (ensaio 15) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: concentração de quitosano = 1%, razão mássica genipin/quitosano = 0,06 e tempo de reticulação = 12 h. 192
- Figura 7.13 - Efeito do tempo de reticulação: 3 h (ensaio 7), 6 h (ensaio 8) e 12 h (ensaio 9) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se 193

- constantes: concentração de quitosano = 1%, razão mássica genipin/quitosano = 0,06 e velocidade de agitação = 800 rpm.
- Figura 7.14 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano, reticulados fisicamente (C/GP/MIC) e co-reticulados com 0,05 e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MIC e C/GP/GE20/MIC, respetivamente). Para os mesmos hidrogéis são também exibidos, no gráfico superior, os perfis de libertação para um longo período (28 dias). 196
- Figura 7.15 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS e em PBS com lisozima a 37 °C, para o hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,05% w/w de genipin, ao qual se adicionaram microesferas carregadas com CDDP (C/GP/GE5/MIC). Perfil de libertação a partir do mesmo hidrogel mas com CDDP dispersa na matriz (C/GP/GE5/MAT/MIC) é também incluído no gráfico. Para os mesmos hidrogéis são ainda exibidos, no gráfico superior, os perfis de libertação para um curto período (6 h). 197
- Figura 7.16 - Efeito do modo de incorporação de CDDP: dispersa na matriz (MAT), pré-encapsulada em lipossomas (LIP) e imobilizada em microesferas (MIC) nos perfis de libertação obtidos, em PBS a 37 °C, para hidrogéis: (A) reticulados fisicamente (C/GP) e (B) co-reticulados (C/GP/GE?). 199
- Figura 7.17 - Efeito do modo de incorporação da CDDP nos perfis obtidos, em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis co-reticulados com 0,05% de genipin, em que o fármaco se encontra disperso na matriz e imobilizado em microesferas (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE5/MIC, respetivamente). Inclusão do perfil obtido em PBS para o hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin, cuja CDDP se encontra pré-encapsulada em lipossomas (C/GP/GE10/LIP). 201
- Figura 8.1 - Aspeto macroscópico da região dorsal do animal após o período experimental de: (A) 7 dias e (B) 30 dias. O animal da fotografia (B) foi submetido a tricotomia manual da região dorsal para melhor visualização dos implantes. 209
- Figura 8.2 - Fotografias dos animais exibindo a formação de: (A) hidrogel reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10) no local de injeção, após sete dias de evolução. 210
- Figura 8.3 - Porções de tecido excisado mostrando a formação e permanência do hidrogel: (A) reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10) no local de injeção, após 30 dias de evolução. 211
- Figura 8.4 - Peças de necrópsia exibindo a localização do hidrogel no local de injeção: (A) hidrogel reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10), após fixação em solução de formalina. 212
- Figura 8.5 - Microfotografias mostrando um hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, implantado no tecido celular subcutâneo de um rato com uma semana de evolução. Para além da epiderme e da derme caracterizada por inúmeros folículos pilosos é visível a presença de uma massa eosinofílica, correspondente ao hidrogel, rodeada por uma região de tecido inflamatório. (ampliação 20x) 213
- Figura 8.6 - Maior ampliação de uma região apresentada na Figura 8.5 pondo em evidência uma grande densidade de células inflamatórias em redor do hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin. (ampliação 40x e 100x, respetivamente) 213
- Figura 8.7 - Aspeto histológico de uma região da matriz de quitosano: (A) reticulada fisicamente e (B) co-reticulada com genipin, formando um material poroso, heterogéneo e fortemente eosinófilo. De notar que a matriz co-reticulada apresenta uma estrutura eosinófila com poros de maior dimensão do que os apresentados pela matriz reticulada fisicamente. (ampliação 100x) 214

Figura 8.8 -	Presença de vasos sanguíneos invadindo a matriz de quitosano co-reticulada com genipin, após uma semana de evolução. É também possível identificar a existência de várias células inflamatórias dispersas neste hidrogel. (ampliação 400x)	214
Figura 8.9 -	Imagem histológica de numerosas formações granulares situadas na periferia de um hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, com uma semana de evolução. É visível uma mudança na afinidade tintorial destas formações em relação ao restante hidrogel. (ampliação 400x)	215
Figura 8.10 -	Maior ampliação de uma região representada na Figura 8.9 mostrando, com mais pormenor, as formações granulares provenientes da degradação do hidrogel. (ampliação 1000x)	215
Figura 8.11 -	Presença de uma acentuada resposta inflamatória particularmente evidente em redor da matriz de quitosano: (A) reticulada fisicamente e (B) co-reticulada com genipin, com uma semana de evolução. (ampliação 200x)	216
Figura 8.12 -	Imagens mostrando um predomínio de polimorfonucleares neutófilos existente no infiltrado inflamatório presente no hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, após um período de sete dias de evolução. (ampliação 1000x)	217
Figura 8.13 -	Presença de áreas de hidrogel de quitosano reticulado fisicamente, disperso no tecido conjuntivo da derme após um período de 30 dias de evolução. São, também, visíveis algumas fibras de colagénio, células de natureza fibroblástica e células inflamatórias e alguns vasos sanguíneos. (ampliação 400x)	218
Figura 8.14 -	Presença de áreas de hidrogel de quitosano co-reticulado com genipin, disperso no tecido conjuntivo da derme após um período de 30 dias de evolução. (ampliação 1000x)	218
Figura 8.15 -	Presença de numerosas células macrofágicas contendo partículas de hidrogel reticulado fisicamente. (ampliação 1000x)	219
Figura 8.16 -	Presença de numerosas células macrofágicas contendo partículas de hidrogel co-reticulado com genipin. (ampliação 1000x)	219

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Relação entre algumas propriedades do quitosano e os parâmetros estruturais (grau de desacetilação, GD, e massa molecular, MM). (adaptado de <i>Dash et al.</i> , 2011)	23
Tabela 2.2 -	Resumo de alguns trabalhos, publicados na literatura científica, relativos a sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos de base quitosano.	55
Tabela 3.1 -	Parâmetros de análise da Lipoplatin TM (Batch 90.16) constantes no certificado de análise.	77
Tabela 3.2 -	Condições experimentais para a preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin e respetiva codificação.	82
Tabela 4.1 -	Efeito do tempo reticulação no aspeto físico dos hidrogéis de base quitosano reticulados com diferentes percentagens mássicas de genipin: 0,0% (C/GP), 0,05% (C/GP/GE5), 0,10% (C/GP/GE10), 0,15% (C/GP/GE15) e 0,20% (C/GP/GE20).	105
Tabela 5.1 -	Influência da concentração de genipin na temperatura de transição sol-gel para as formulações de quitosano não neutralizadas e previamente neutralizadas com GP.	137
Tabela 5.2 -	Influência da concentração do reticulante químico (GE) no tempo de gelificação (obtido pelo critério da igualdade dos módulos (critério I) e pelo critério proposto por Winter e Chambon (critério II)) e no expoente de relaxação (n) para diferentes soluções de quitosano.	143
Tabela 5.3 -	Valores dos parâmetros A e B da equação (5.1) para hidrogéis de quitosano, obtidos após 12 horas de maturação , reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente) e correspondentes valores do coeficiente de correlação (R^2). Os intervalos dos parâmetros A e B foram calculados com um nível de confiança de 95%.	149
Tabela 7.1 -	Comparação dos valores da concentração de Pt (ppb) e de CDDP (mg/mL) obtidos por diferentes processos: método colorimétrico com <i>o</i> -fenilenodiamina e ICP-MS - espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo, para a solução de controlo diluída 500× e para a solução lipossomal (Lipoplatin TM) diluída 50000×.	179
Tabela 7.2 -	Condições experimentais (concentração mássica de quitosano, razão mássica genipin/quitosano, velocidade de agitação e tempo de reticulação) para cada um dos ensaios de preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin e respetivos valores do diâmetro médio (D_{50}), dos diâmetros D_{10} e D_{90} e da polidispersividade (índice <i>span</i>), obtidos por difração <i>laser</i> .	189

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

SUMÁRIO

A busca incansável do Homem por padrões superiores de vida e de longevidade tem orientado a comunidade científica na pesquisa de uma nova geração de biomateriais assente na tecnologia de polímeros. Os hidrogéis são um exemplo da nova classe de materiais poliméricos cuja aplicação se tem intensificado nos últimos anos, principalmente, na área biomédica.

Com este capítulo pretende-se tão-somente introduzir o tema da tese, realçando a importância dos hidrogéis, nomeadamente os sistemas injetáveis para aplicações biomédicas, formados *in situ*. São apresentados também os objetivos globais do trabalho e é delineada a organização da tese.

1.1	HIDROGÉIS E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....	3
1.2	HIDROGÉIS INJETÁVEIS FORMADOS <i>IN SITU</i>	4
1.3	MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	5
1.4	ESTRUTURA DA TESE	7
1.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9

1.1 HIDROGÉIS E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorverem quantidades significativas de água ou fluidos biológicos (Hoffman, 2002). Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação, químicos e/ou físicos. Têm uma vasta aplicação no campo farmacêutico e biomédico, nomeadamente em sistemas de libertação controlada (de fármacos, proteínas, células, fatores de crescimento e lipossomas com fármacos pré-encapsulados) e, também, em Engenharia de Tecidos (Cascone e Maltinti, 1999; Drury e Mooney, 2003; Hoffman, 2002; Jeong *et al.*, 2006; Mufamadi *et al.*, 2011; Shoichet, 2010).

No que respeita à libertação controlada, e uma vez que os hidrogéis podem ser preparados com uma vasta gama de tamanhos de poros, são adequados tanto para a libertação de fármacos de pequeno peso molecular, como por exemplo agentes anti-inflamatórios, antissépticos ou antineoplásicos, como para solutos de elevado peso molecular, como proteínas e fatores de crescimento. Por outro lado, a natureza físico-química dos hidrogéis, nomeadamente os de base polissacarídea, semelhante à da matriz extracelular, quer a nível de composição, quer a nível de propriedades mecânicas, torna-os, particularmente, atrativos como materiais de suporte para as células durante a regeneração de tecidos (Drury e Mooney, 2003).

Os hidrogéis para aplicação na área biomédica devem obedecer a dois requisitos fundamentais: ser biocompatíveis e biodegradáveis (Drury e Mooney, 2003; Hoffman, 2002; Shoichet, 2010).

A biocompatibilidade com o organismo é normalmente definida como a capacidade do material ter uma resposta favorável numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contacto com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (Shoichet, 2010). No entanto, não existem materiais totalmente inertes, havendo sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho inserido no organismo. Todavia, modificando algumas propriedades dos materiais é possível minimizar ou controlar a resposta do tecido (Shoichet, 2010).

Os hidrogéis biodegradáveis, como o próprio nome indica, degradam-se quando em contacto com os fluidos orgânicos dando geralmente origem a produtos solúveis, facilmente removíveis do local de implantação e excretados do corpo pelos mecanismos metabólicos normais (Saltzman, 2001). Estes materiais apresentam grande potencial para aplicações biomédicas já que não é necessária uma intervenção cirúrgica para a sua remoção.

No que diz respeito aos métodos de preparação, os hidrogéis podem ser reticulados física ou quimicamente (Hennink e Nostrum, 2002). A reticulação física envolve forças de interação iónica e/ou secundária, como sejam as interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogénio, e ocorre, normalmente, em condições moderadas de temperatura e pH, possibilitando a imobilização de compostos lábeis, tais como proteínas, e promovendo a biocompatibilidade celular. Contudo, os hidrogéis fisicamente reticulados têm, em geral, fracas propriedades mecânicas quando comparados

com os reticulados quimicamente (Adekogbe e Ghanem, 2005; Ahmadi e De Bruijn, 2008). Além disso, são extremamente sensíveis a alterações no meio envolvente (tais como de temperatura, de pH e de força iônica) as quais podem provocar a reversibilidade das ligações e a consequente rotura da rede tridimensional. Pelo contrário, a reticulação química, além de constituir um método simples, origina a formação de redes permanentes, em resultado das ligações covalentes que se estabelecem entre as cadeias do polímero, redes essas que são bastante estáveis do ponto de vista mecânico.

1.2 HIDROGÉIS INJETÁVEIS FORMADOS *IN SITU*

De acordo com a metodologia de síntese, os hidrogéis podem ser classificados em estruturas pré-formadas e em sistemas injetáveis (Mufamadi *et al.*, 2011).

A Figura 1.1 exemplifica, de uma forma simplista, a preparação e a estratégia de administração de um hidrogel pré-formado (ou pré-fabricado) e de um hidrogel injetável, ambos contendo células imobilizadas, para aplicação em Engenharia de Tecidos. As células, retiradas do paciente por biópsia, são isoladas e cultivadas *in vitro*. Depois, são incorporadas no suporte pré-formado ou no precursor do hidrogel injetável e, de seguida, colocadas no doente por implantação ou por injeção, respetivamente.

Como também se pretende ilustrar com a Figura 1.1, os hidrogéis pré-formados são processados *in vitro* e posteriormente implantados *in vivo*, por inserção cirúrgica. Para tal é necessário o conhecimento, *a priori*, do tamanho e da forma da cavidade a ser preenchida o que pode ser problemático no caso de cavidades ou defeitos de tamanho e forma irregulares. Em contrapartida, os sistemas injetáveis são introduzidos no organismo sob a forma de um líquido que gelifica *in situ* (Van Tomme *et al.*, 2008) podendo preencher praticamente qualquer tipo de cavidade, sem recorrer ao uso de técnicas cirúrgicas invasivas, que, além de dispendiosas e arriscadas, são em geral mal aceites pelo paciente. Além do mais, células ou compostos bioativos, tais como fármacos, proteínas ou fatores de crescimento, podem ser facilmente incorporados e suspensos na solução antes da gelificação. Esta estratégia possibilita uma distribuição mais homogénea, quer das células, quer das moléculas na matriz.

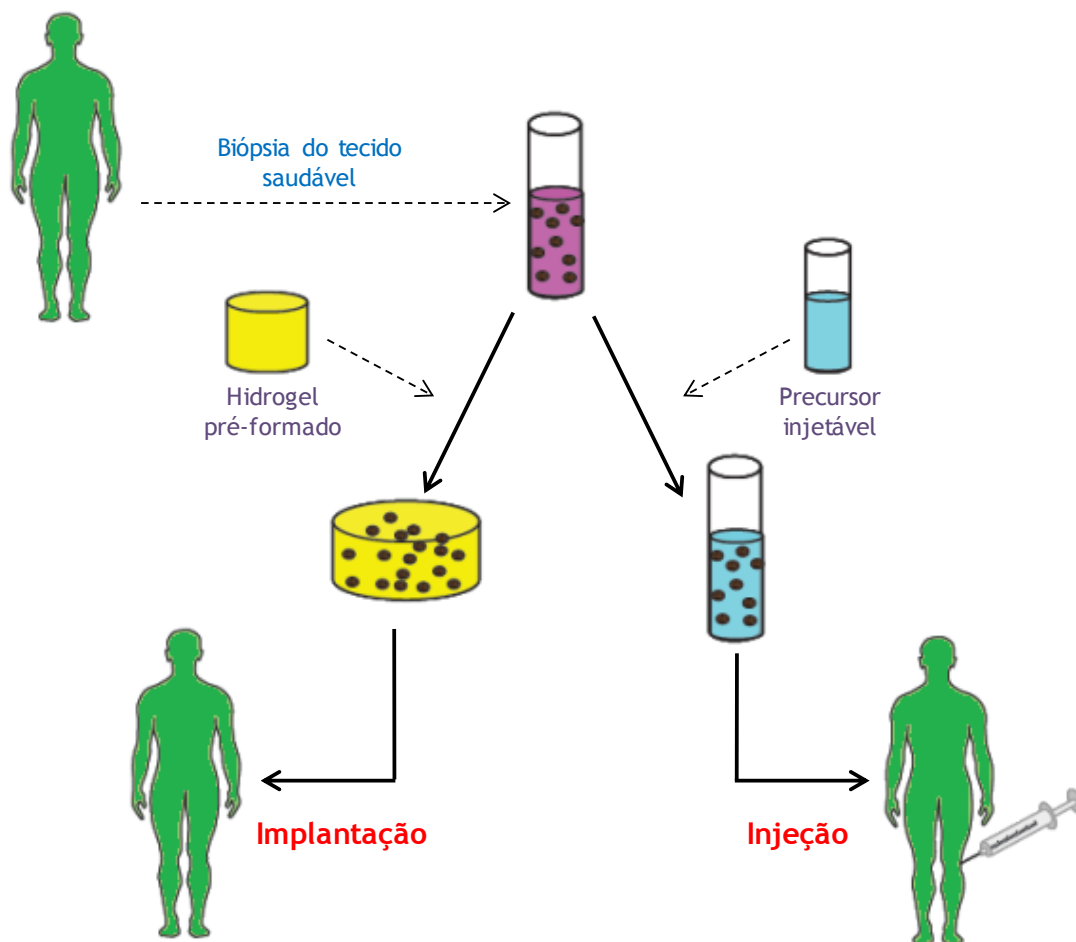


Figura 1.1 - Preparação e estratégia de administração de um hidrogel pré-formado e de um injetável, ambos contendo células imobilizadas, para aplicação em Engenharia de Tecidos. (adaptado de Jin, 2009)

Depois da injeção e solidificação, o hidrogel formado *in situ*, proporciona uma matriz tridimensional temporária à qual as células aderem, proliferam e diferenciam-se dando origem a um tecido novo e funcional ou, então, a partir da qual ocorre a liberação de um agente bioativo no próprio local de ação (Hou *et al.*, 2004). Esta última abordagem tem sido, recentemente, muito investigada como uma nova estratégia para contornar os efeitos colaterais e reduzir os mecanismos de resistência celular a certos fármacos (Brown *et al.*, 2010; Oberoi *et al.*, 2011).

1.3 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

Muitos são os polímeros utilizados na preparação de hidrogéis: polímeros de origem natural, polímeros sintéticos e combinações dos dois. No entanto, os sistemas poliméricos de origem polissacarídea, nomeadamente os hidrogéis de base quitosano, destacam-se pela sua variedade,

versatilidade e propriedades intrínsecas. Entre os fatores motivadores deste interesse estão a grande abundância do polímero na natureza, potenciando um recurso economicamente atrativo, e a presença de um conjunto invulgar de características de elevado interesse para áreas específicas.

O quitosano é um amino polissacarídeo, produzido a partir da quitina, que demonstra elevada capacidade de absorção de água, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. As aplicações deste polissacarídeo são bastante abrangentes, incluindo áreas como o tratamento de águas, a agricultura, a indústria alimentar, biomédica e farmacêutica, entre outras, embora a aplicação mais conhecida, e de certa forma a responsável pela divulgação comercial deste polissacarídeo, seja a sua utilização em produtos dietéticos, mais propriamente como inibidor da digestão de gorduras. Recentemente tem sido dada maior atenção ao uso do quitosano na libertação controlada de fármacos. De facto, a síntese de hidrogéis de base quitosano é uma área em desenvolvimento, constituindo um verdadeiro desafio a obtenção de matrizes poliméricas que respondam a estímulos específicos, que sejam biodegradáveis e biocompatíveis e que sejam obtidas por mecanismos reacionais simples.

O presente trabalho tem por objetivo principal a preparação e caracterização de hidrogéis, de base quitosano, para administração por via injetável. Pretende-se com estes sistemas que, após injeção, seja possível formar no organismo, num curto intervalo de tempo, estruturas estáveis. Além do mais, estas estruturas devem possuir propriedades mecânicas adequadas, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis.

Apesar das inegáveis vantagens dos sistemas injetáveis, os hidrogéis que têm sido desenvolvidos, nomeadamente os que utilizam quitosano, apresentam ainda algumas limitações: os que são reticulados fisicamente apresentam, conforme referido, propriedades mecânicas desfavoráveis e os preparados por reticulação química, usam em geral agentes reticulantes com algum grau de toxicidade (Balakrishnan e Jayakrishnan, 2005). Além disso, apesar do quitosano ser um polímero com elevada aplicação no desenvolvimento de biomateriais, poucas são as formulações constituídas por este polissacarídeo que possuem propriedades que permitam a formação de estruturas *in situ* (Ta *et al.*, 2008).

Assim, numa primeira fase da investigação pretendeu preparar-se um sistema injetável de base quitosano, capaz de gelificar *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e pH. A metodologia utilizada recorre a um mecanismo de reticulação combinado, usando como reticulante físico o sal fosfato dissódico de glicerol e como reticulante químico o genipin. Deste modo, pretende-se conjugar as vantagens de cada um destes dois tipos de reticulação, nomeadamente a termossensibilidade dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente e a estabilidade das redes reticuladas quimicamente.

De salientar que na revisão bibliográfica efetuada, sobre os métodos de preparação de hidrogéis de base quitosano, não foi encontrado qualquer trabalho que foque a combinação da reticulação física e da reticulação química na obtenção de hidrogéis injetáveis formados *in situ*. Assim sendo, o

desenvolvimento de um sistema injetável obtido com base na metodologia proposta constituiu, sem dúvida, o grande desafio do presente trabalho.

A caracterização exaustiva deste sistema, designadamente em termos de morfologia e estrutura, reologia, degradação *in vitro*, capacidade de intumescimento, citotoxicidade e biocompatibilidade, bem como a comparação do seu comportamento/propriedades com sistemas em que são utilizados processos de reticulação apenas física constituíram também objetivos específicos do trabalho. Adicionalmente, o estudo do efeito da concentração do reticulante químico foi igualmente outro parâmetro abordado.

Numa segunda fase testaram-se as potencialidades dos hidrogéis preparados como sistemas injetáveis de transporte e libertação de fármacos, designadamente de um antitumoral – a cisplatina. Este fármaco é altamente eficaz no tratamento de vários tumores sólidos, incluindo cancro de pulmão, colo do útero, testículos, cabeça e pescoço, bexiga e carcinoma de ovário (Canta *et al.*, 2011).

Todavia, o sucesso da terapia neste tipo de tumores depende da libertação adequada do agente terapêutico junto das células tumorais – uma libertação desajustada poderá resultar em células tumorais residuais, que, por sua vez, podem levar ao aparecimento de novos tumores e ao desenvolvimento de células resistentes. Por outro lado, a eficácia da cisplatina é limitada por um conjunto de efeitos colaterais e mecanismos de resistência associados, normalmente, à sua administração por via intravenosa. Estes factos têm motivado a comunidade científica na busca de novas formulações baseadas, por exemplo, na introdução do sistema de transporte (que pode funcionar também como agente de libertação da droga) diretamente no local onde a sua ação é necessária.

Foi neste contexto que se considerou utilizar os hidrogéis aqui desenvolvidos como uma nova estratégia para o transporte e libertação da cisplatina.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

No decurso deste trabalho foram submetidos para publicação alguns artigos (Moura, 2012; Moura *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2013), os quais se tomaram como base para a escrita de alguns capítulos desta tese.

Para além deste capítulo, a tese contempla mais oito capítulos.

O **Capítulo 2** inicia-se com uma introdução geral ao tema abordado neste trabalho, à qual se segue uma revisão generalizada sobre os principais polímeros utilizados na síntese de hidrogéis, em particular sobre o polímero testado – o quitosano. São enumeradas as suas propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas, de biocompatibilidade, bioatividade e biodegradação. São também descritos os principais métodos de preparação de hidrogéis, onde se encontram inseridos os procedimentos aqui adotados, e a sua influência nas propriedades finais das redes resultantes.

Como se pretende preparar um sistema injetável capaz de gelificar *in situ*, a investigação teve, naturalmente, de contemplar a prévia caracterização reológica das soluções poliméricas e dos hidrogéis produzidos. Dada a complexidade do tema decidiu incluir-se, também, neste capítulo, uma revisão sobre o estudo reológico de hidrogéis. O capítulo termina com uma secção dedicada à aplicação dos hidrogéis de base quitosano em sistemas de libertação controlada, dado que se trata de uma das áreas emergentes e inovadoras onde se concentra grande parte da investigação atualmente dedicada a este tipo de hidrogéis.

Os materiais e as metodologias utilizadas na execução experimental do trabalho encontram-se descritos no **Capítulo 3**. Os princípios básicos que sustentam cada uma das técnicas utilizadas são também abordados neste capítulo.

Os Capítulos 4 a 8 são dedicados à apresentação dos resultados e sua discussão. Cada um destes capítulos é iniciado com uma breve introdução, onde são referidos alguns aspetos importantes, diretamente relacionados com os resultados experimentais apresentados nesse mesmo capítulo. A discussão dos resultados inclui sempre uma análise comparativa, quer do comportamento, quer das propriedades, dos hidrogéis que envolvem apenas o processo de reticulação física e dos hidrogéis co-reticulados, ou seja, que envolvem simultaneamente a reticulação física e química, bem como do efeito da concentração do reticulante químico.

Assim, no **Capítulo 4** são apresentados os resultados referentes à caracterização morfológica e estrutural dos vários hidrogéis de base quitosano, enquanto o **Capítulo 5** tem por principal objetivo avaliar, mediante análise reológica, a possibilidade das formulações poliméricas líquidas produzirem hidrogéis *in situ*, à temperatura de 37 °C e a pH próximo de 7.

Como os hidrogéis desenvolvidos no presente trabalho são propostos para aplicações na área biomédica, importa caracterizá-los sob determinados aspetos, considerados os mais relevantes para este tipo de aplicações. Neste quadro, o **Capítulo 6** apresenta os resultados referentes à investigação de propriedades tais como a degradabilidade, a citotoxicidade e a capacidade de intumescimento das várias matrizes.

Uma vez que os hidrogéis aqui desenvolvidos são passíveis de serem produzidos *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH, o **Capítulo 7** contempla os estudos realizados no sentido de utilizar os hidrogéis desenvolvidos como estratégia para o transporte e libertação de um fármaco antitumoral (a cisplatina). Com este objetivo, foi planeado um extenso conjunto de testes de libertação *in vitro*, cujos resultados são apresentados e discutidos ao longo deste capítulo.

Sendo o objetivo último deste trabalho a implantação *in vivo* dos hidrogéis desenvolvidos, o **Capítulo 8** reporta um estudo experimental em modelo animal, naturalmente limitado, mas que pretendeu, fundamentalmente, verificar a formação e permanência dos hidrogéis no local de injeção, bem como avaliar, através de análise histológica, a intensidade da resposta inflamatória.

Embora no final de cada capítulo sejam coligidas as conclusões mais relevantes, o último capítulo, **Capítulo 9**, resume e relaciona as conclusões parcelares e sugere algumas propostas para a continuação deste trabalho.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7241-50.
- Ahmadi, R.; De Bruijn, J. D. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *86*, 824-32.
- Balakrishnan, B.; Jayakrishnan, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable *in situ* forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3941-51.
- Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J-A; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 4678-84.
- Canta, A.; Chiorazzi, A.; Carozzi, V.; Meregalli, C.; Oggioni, N.; Sala, B.; Crippa, L.; Avezza, F.; Forestieri, D.; Rotella, G.; Zucchetti, M.; Cavaletti, G. *In vivo* comparative study of the cytotoxicity of a liposomal formulation of cisplatin (Lipoplatin™). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2011**, *68*, 1001-8.
- Cascone, M. G.; Maltinti, S. Hydrogels based on chitosan and dextran as potential drug delivery systems. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10*, 301-7.
- Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337-51.
- Hennink, W. E.; Van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 13-36.
- Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *43*, 3-12.
- Hou, Q.; De Bank, P. A. Shakesheff, K. M.; Injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14*, 1915-23.
- Jeong, S. H.; Huh, K. M.; Park, K. Hydrogel drug delivery systems. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G., Eds., Taylor & Francis: Boca Raton, 2006 (cap.5).
- Jin, R. *Injectable hydrogels for cartilage tissue engineering*. PhD Thesis, University of Twente, Netherlands, 2009.
- Moura, M. J. Aplicações do quitosano em libertação controlada de fármacos: algumas considerações. In *Enciclopédia Bioesfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia (Brasil), **2012**, *8* (14), 1489-1509.
- Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. *In situ* forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3275-84.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3823-9.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheology of chitosan and genipin solutions. *Materials Science Forum* **2008**, Vols. 587-588, 27-31.
- Moura, M. J.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linking chitosan hydrogels. *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 2504-10.

- Mufamadi, M. S.; Pillay, V.; Choonara, Y. E.; Du Toit, L. C.; Modi, G.; Naidoo, D.; Ndesendo, V. M. K. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *Journal of Drug Delivery* **2011**, 1-19.
- Oberoi, H. S.; Laquer, F. C.; Marky, L. A.; Kabanov, A. V.; Bronich, T. K. Core cross-linked block ionomer micelles as pH-responsive carriers for cis-diamminedichloroplatinum(II). *Journal of Controlled Release* **2011**, 153, 64-72.
- Saltzman, W. M. *Drug Delivery: Engineering principles for drug therapy*. Oxford University Press, USA, 2001.
- Shoichet, M. S. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* **2010**, 43, 581-91.
- Ta, H. T.; Dass, C. R.; Dunstan, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. *Journal of Controlled Release* **2008**, 126, 205-16.
- Van Tomme, S. R.; Storm, G.; Hennink, W. E. *In situ* gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 355, 1-18.

CAPÍTULO 2

HIDROGÉIS DE BASE QUITOSANO: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES

SUMÁRIO

Neste capítulo faz-se uma revisão bibliográfica sobre os hidrogéis de base quitosano. Começa por abordar-se os hidrogéis em geral e as diferentes classes de polímeros usadas na sua síntese, com especial atenção para o polímero quitosano. De seguida descrevem-se os principais mecanismos de preparação de hidrogéis e, de modo a melhor compreender o comportamento viscoelástico destes materiais (não só a técnica utilizada mas também os resultados obtidos), apresentam-se algumas considerações teóricas relacionadas com a reologia de géis. Por último, descrevem-se as principais aplicações dos hidrogéis de quitosano enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos.

2.1	INTRODUÇÃO.....	13
2.2	POLÍMEROS FREQUENTEMENTE UTILIZADOS NA SÍNTESE DE HIDROGÉIS.....	14
2.3	O POLÍMERO QUITOSANO.....	21
2.4	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE BASE QUITOSANO	24
2.5	REOLOGIA DE HIDROGÉIS.....	33
2.6	APLICAÇÕES EM SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA	46
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

2.1 INTRODUÇÃO

Os hidrogéis são redes poliméricas que possuem uma forte afinidade com a água e com a maioria das soluções aquosas. A sua hidrofiliçidade resulta da presença na rede de grupos funcionais hidrofílicos como por exemplo hidroxílicos, carboxílicos entre outros, que interagem suficientemente bem com a água. É, sobretudo, devido à elevada capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água (que pode atingir milhares de vezes o seu peso seco) sem perder a sua estrutura tridimensional, à sua consistência macia e elástica e à baixa tensão superficial com a água e os fluidos biológicos (Fedorovich *et al.*, 2007; Hoffman, 2002; Jeong *et al.*, 2006), que os hidrogéis apresentam propriedades semelhantes às dos tecidos vivos, nomeadamente uma elevada capacidade de mimetizar a matriz extracelular e excelente biocompatibilidade.

A utilização de hidrogéis remonta aos anos 60 quando Wichterle e Lim (Wichterle e Lim, 1960) desenvolveram o hidrogel sintético, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (p-HEMA), que viria a servir de base para a fabricação da primeira lente de contacto gelatinosa. Desde então, esta classe de biomateriais tem sido alvo de grande interesse por parte da comunidade científica. De facto, a literatura é pródiga em trabalhos dedicados à síntese e aplicações de muitos tipos de hidrogéis. De entre as principais aplicações destacam-se o uso tópico no tratamento de queimaduras (Kiyozumi *et al.*, 2007), a utilização em lentes de contacto (Sorbara *et al.*, 2009) bem como em substratos para engenharia de tecidos (Narita *et al.*, 2009), em matrizes para libertação controlada de fármacos (Huang e Yang, 2007), na implementação de músculos artificiais (Bassil *et al.*, 2008; Moschou *et al.*, 2006), no enchimento de osso esponjoso (Zhang *et al.*, 2009), na substituição de cartilagem (Leone *et al.*, 2008), em dispositivos biomédicos (Brannon-Peppas, 1997) além de aplicações em ortodontia, oftalmologia, dermatologia, cosmética, etc.

A síntese de hidrogéis para utilização como biomateriais deve obedecer a alguns requisitos básicos, como por exemplo, não causar danos locais ou sistémicos, isto é, não devem ser tóxicos, carcinogénicos ou radioativos. A biodegradabilidade e a biocompatibilidade são outros fatores de suma importância para o sucesso e viabilidade dos hidrogéis de base polimérica.

Os polímeros biodegradáveis são aqueles que apresentam uma redução da massa molecular quando em contacto com o ambiente biológico. Os principais fatores que afetam a taxa de degradação dos polímeros em meio biológico são: i) a estrutura do polímero, a presença de determinados grupos funcionais e a massa molecular; ii) o estado físico e morfológico do polímero, particularmente se é cristalino ou amorfo; iii) as condições ambientais, como temperatura, pH, humidade e concentração de oxigénio; e iv) a porosidade e interligação entre os poros (Edlund e Albertsson, 2001; Lenz, 1990). A biodegradação pode ser originada, quer pela ação de entidades biológicas, como sejam, células, microrganismos e enzimas, quer pelo ataque de espécies iónicas, radicais livres ou água. Em meio biológico, as formas mais comuns de biodegradação são a hidrólise e a degradação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de serem metabolizados e

excretados pelas vias fisiológicas normais. A biodegradabilidade dos polímeros é um atributo muito explorado na modulação de biomateriais, em particular na libertação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo “desapareça” depois de cumprida a sua função.

Uma outra propriedade complementar e essencial para a ciência dos biomateriais, é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a capacidade do material exibir uma resposta apropriada numa aplicação específica, minimizando reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contacto com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (Shoichet, 2010). No entanto, não existem materiais totalmente inertes, havendo sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho inserido no organismo. Todavia, modificando algumas propriedades dos materiais, é possível minimizar ou controlar essa resposta (Shoichet, 2010). A biocompatibilidade dos hidrogéis é promovida pela elevada capacidade de absorção de água e pela semelhança físico-química dos hidrogéis com a matriz extracelular, quer a nível de composição (particularmente nos hidrogéis de base polissacarídea), quer a nível mecânico. Em geral, os hidrogéis evidenciam bons níveis de biocompatibilidade.

Atualmente é possível preparar hidrogéis com as mais variadas propriedades físico-químicas e biológicas, recorrendo a diversas técnicas. Esta diversidade possibilita a classificação dos hidrogéis com base num grande número de critérios, normalmente relacionados com a sua origem, o seu método de fabricação e as suas características físico-estruturais.

Assim, de acordo com a sua proveniência, os hidrogéis podem ser divididos em sintéticos, naturais ou híbridos (formados por polímeros sintéticos e naturais). Por outro lado, de acordo com o método de reticulação, os hidrogéis podem ser classificados em químicos e físicos. Nos hidrogéis quimicamente reticulados são estabelecidas ligações covalentes irreversíveis entre as cadeias do polímero, enquanto nos hidrogéis fisicamente reticulados as cadeias do polímero se encontram associadas através de interações físicas reversíveis, mais ou menos fortes, que incluem as interações iónicas, as pontes de hidrogénio, as interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas. Os hidrogéis podem, ainda, ser diferenciados em pré-formados e em injetáveis. Enquanto os últimos são estruturas formadas *in situ*, logo após injeção dos precursores, os primeiros são estruturas pré-formadas implantados *in vivo* através de cirurgia. Por último, os hidrogéis podem, ainda, ser classificados de acordo com algumas características físico-estruturais tais como, porosidade (não porosos, microporosos, macroporosos e superporosos), biodegradabilidade (biodegradáveis e não biodegradáveis), taxa de absorção de água (baixa, média, alta taxa de absorção de água e superabsorventes) e sensibilidade a estímulos ambientais (não sensíveis e sensíveis).

2.2 POLÍMEROS FREQUENTEMENTE UTILIZADOS NA SÍNTESE DE HIDROGÉIS

Os polímeros são substâncias constituídas por moléculas de grande dimensão (macromoléculas), caracterizados pela repetição de uma ou mais unidades de dimensões inferiores (monómeros),

ligadas entre si por ligações covalentes. As unidades repetitivas dos polímeros unem-se, de modo a formar uma estrutura linear ou ramificada. As ramificações podem, ainda, interligar-se e formar uma rede tridimensional reticulada denominada hidrogel. Atendendo à sua origem os polímeros podem ser classificados em polímeros sintéticos e naturais.

2.2.1 Polímeros de origem sintética

Os polímeros sintéticos, em oposição aos polímeros naturais, permitem obter, hidrogéis com arquiteturas e propriedades químicas e mecânicas bem definidas. A sua facilidade de síntese permite usar escalas de produção alargadas e simultaneamente modular de maneira controlada e constante características como a resistência, tempo de degradação e microestrutura (Drury e Mooney, 2003; Gomes *et al.*, 2008).

As principais limitações destes polímeros residem, muitas vezes, na falta de biocompatibilidade (os polímeros sintéticos são frequentemente associados a reações inflamatórias, que limitam o seu uso em dispositivos biomédicos) e degradabilidade em condições fisiológicas; embora as redes não degradáveis encontrem sucesso em determinadas aplicações como sejam, lentes de contacto, revestimentos, membranas, etc. Além disso, também apresentam défice de interação com os tecidos vivos. De facto, estes polímeros apresentam falta de bioatividade não exibindo sítios de reconhecimento biológico que permitam às células aderir ao material. No contexto deste trabalho, eles não constituem a primeira escolha.

Os polímeros sintéticos mais usados na síntese de hidrogéis são o poli(ácido acrílico) (PAA) e seus derivados (por exemplo, o poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (p-HEMA), a poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), o poli(etilenoglicol) (PEG) e seus copolímeros, o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ácido láctico) (PLA) (Lee e Yuk, 2007). As estruturas químicas destes polímeros estão apresentadas na Figura 2.1.

O PAA é um gelificante muito utilizado em medicamentos e cosméticos, enquanto o seu derivado, o p-HEMA, é um polímero hidrofílico, muito usado como biomaterial, em particular em lentes de contacto, devido à sua excelente biocompatibilidade (Gan *et al.*, 2009; Hoffman, 2002).

Dos polímeros de base acrilamida, a PNIPAAm é provavelmente a mais estudada. Uma das características mais atrativas deste polímero, enquanto biomaterial, é a sua termossensibilidade (Gan *et al.*, 2009) na região próxima da temperatura fisiológica. Verifica-se que a temperatura de solução crítica inferior (LCST) do polímero em água é de 32,5 °C, o que significa que abaixo da LCST o polímero é hidrofílico e solúvel em água. No entanto, quando aquecido, a uma temperatura superior à LCST forma um gel físico. A principal limitação decorre do facto de não se degradar em meio fisiológico.

O PEG é um polímero hidrofóbico (embora os hidrogéis obtidos a partir deste polímero tenham a capacidade de absorver elevadas quantidades de água), não biodegradável com uma excelente biocompatibilidade. Estas e outras características levaram a agência americana *Food and Drug*

Administration (FDA) a aprovar a sua utilização em diversas aplicações biomédicas, sendo, por essa razão, um dos polímeros sintéticos mais intensamente utilizados e investigados na área biomédica, nomeadamente na preparação de hidrogéis para a libertação de biomoléculas e na preparação de *scaffolds* (Lin e Anseth, 2009).

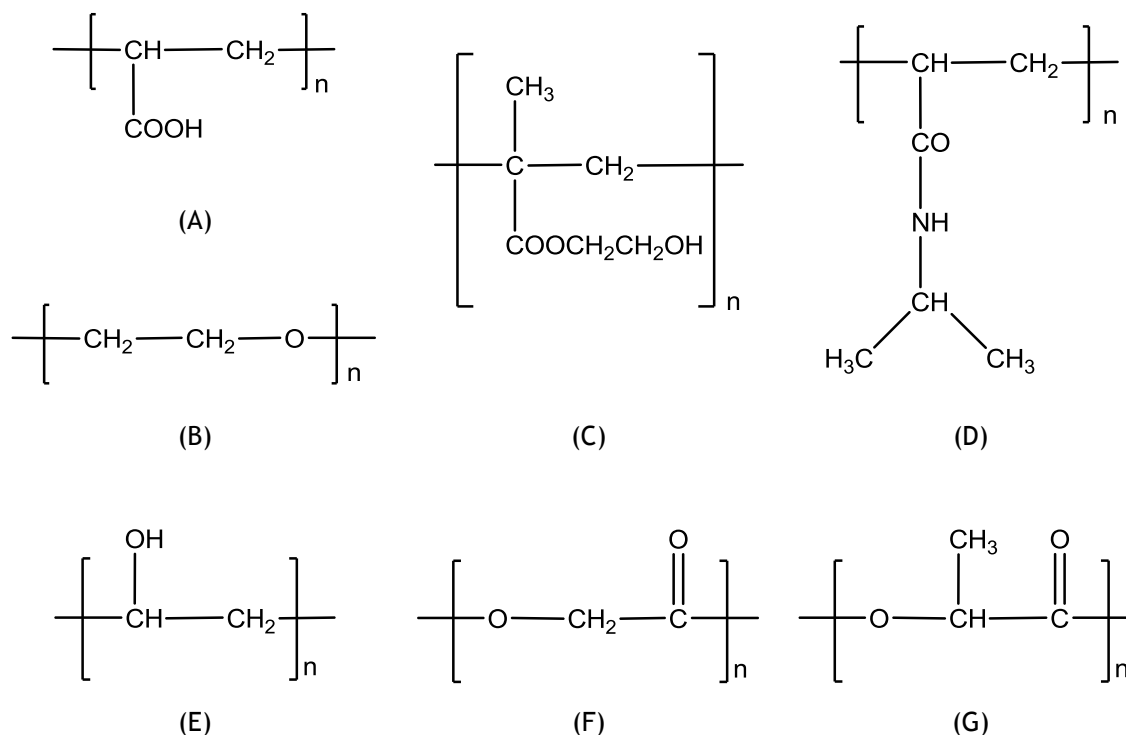


Figura 2.1 - Estruturas químicas (monoméricas) de alguns polímeros sintéticos: (A) poli(ácido acrílico) (PAA); (B) poli(etilenoglicol) (PEG); (C) poli(metacrilato de 2-hidroxiétilo) (p-HEMA); (D) poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm); (E) poli(álcool vinílico) (PVA); (F) poli(ácido glicólico) (PGA); e (G) poli(ácido láctico) (PLA).

Outro polímero sintético, solúvel em água, que tem sido intensivamente estudado devido às suas características atrativas para aplicações médicas é o PVA. A sua elevada hidrofiliabilidade, as suas excelentes propriedades mecânicas, a maleabilidade e a facilidade de processamento em diversas estruturas, nomeadamente em filmes, são algumas das propriedades que têm contribuído para a sua utilização como biomaterial (Mansur *et al.*, 2009). A combinação com outros polímeros, por exemplo com o quitosano, pode produzir misturas biodegradáveis (Sokker *et al.*, 2009). Além disso, não é tóxico.

No grupo dos polímeros sintéticos degradáveis, o PGA e o PLA estão entre os biomateriais mais citados na literatura. As ligações éster destes polímeros são lábeis, o que leva a que eles se degradem por hidrólise não enzimática. Os produtos resultantes da degradação não são tóxicos, podendo ser eliminados na forma de dióxido de carbono e água. São polímeros termoplásticos e

podem ser processados em diferentes formas, microtexturas e porosidade. Encontram grande aplicação principalmente na engenharia de cartilagem e osso (Drury e Mooney, 2003).

2.2.2 Polímeros de origem natural

Os polímeros naturais, ou biopolímeros, são estruturas formadas durante o ciclo de crescimento dos organismos vivos. A sua síntese envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento em cadeia a partir de monómeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (Chandra e Rustgi, 1998; Franchetti e Marconato, 2006). Estes materiais são potenciais candidatos a biomateriais, sobretudo devido à sua semelhança estrutural com os componentes dos tecidos. O facto de conterem monómeros semelhantes, ou mesmo idênticos, aos encontrados nas matrizes orgânicas dos organismos, reduz a possibilidade de ocorrência de problemas associados à toxicidade dos materiais e dos seus produtos de degradação, ou à estimulação de reações inflamatórias crónicas (Dang e Leong, 2006; Van Vlierberghe *et al.*, 2011). No entanto, apresentam algumas desvantagens como por exemplo, resistência mecânica insuficiente e propriedades pouco reprodutíveis, devido à inerente variabilidade das fontes naturais. Por estas razões, a sua aplicação como biomateriais tem sido limitada a pequenas áreas específicas.

Uma característica intrínseca dos polímeros naturais é a sua capacidade de serem degradados por enzimas, garantindo, deste modo, que o implante seja metabolizado por mecanismos fisiológicos, como referido anteriormente. Esta propriedade é relevante em aplicações biomédicas nas quais se pretende que desempenhem uma função específica por um período de tempo temporário, após o qual é esperado que o implante degrade completamente por processos metabólicos normais.

Os polímeros de origem natural podem ser classificados em três principais classes: os polihidroxicanoatos, os polímeros de base proteica e os polissacarídeos.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de poliésteres naturais produzidos por uma grande variedade de bactérias, uma fonte de recurso renovável. A estrutura geral destes poliésteres é apresentada na Figura 2.2. Devido às suas propriedades, incluindo a biodegradabilidade e a biocompatibilidade, estes polímeros apresentam elevado potencial enquanto biomateriais, sendo considerados como uma alternativa promissora aos vários poliésteres sintéticos utilizados atualmente na produção de vários dispositivos biomédicos, como por exemplo, o poli(ácido láctico) e o poli(ácido láctico-*co*-glicólico). Os PHAs mais conhecidos são o poli(3-hidroxiбутirato) e o poli(3-hidroxiбутirato-*co*-3-hidroxiуalerato) (Franchetti e Marconato, 2006; Yu *et al.*, 2006).

As proteínas e os polissacarídeos são outra fonte natural de polímeros com especial relevância na síntese de hidrogéis.

Relativamente às proteínas destacam-se algumas de origem animal como a albumina, a fibrina, o colagénio e a gelatina (obtida a partir da desnaturação química do colagénio) (Breen *et al.*, 2009; Patil, 2003; Ruszczak e Friess, 2003; Wallace e Rosenblatt, 2003; Young *et al.*, 2005) e outras de

origem vegetal, como a proteína de soja e os poliaminoácidos produzidos por microrganismos, como a poli(ϵ -L-lisina) e o poli(γ -ácido glutâmico) (Shih *et al.*, 2006; Song e Zhang, 2009).

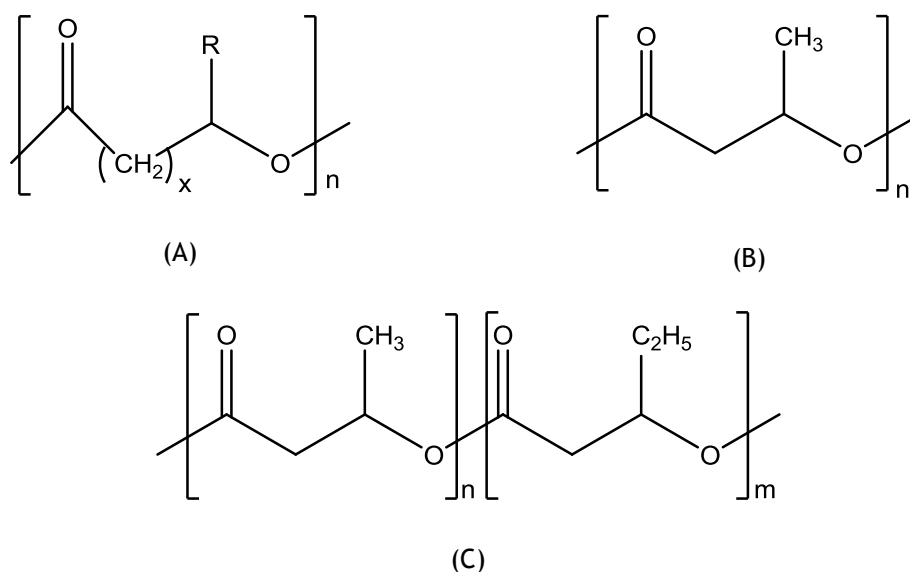


Figura 2.2 - Estruturas químicas (monoméricas) dos polihidroxicanoatos: (A) estrutura geral; (B) poli(3-hidroxiacetato); e (C) poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato). Valores típicos de x , n e R : $x = 1$ a 4 ; $n = 1000$ a 10000 ; e $R =$ grupos alquila (C_mH_{2m+1}) ou grupos alquila funcionalizados. (adaptado de Williams e Martin, 2002)

O colagénio é, de longe, a proteína mais utilizada na síntese de hidrogéis e o principal componente proteico da matriz extracelular do tecido conjuntivo (incluindo a pele, o osso, a cartilagem, os tendões e os ligamentos) (Ruszczak e Friess, 2003; Wallace e Rosenblatt, 2003). Como biomaterial, o colagénio possui importantes características, tais como, baixo índice de irritabilidade ou alergenicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (pela enzima colagenase), interação com as plaquetas ativando o processo de coagulação do sangue (o que se traduz num elevado poder hemostático), capacidade para promover o crescimento celular e, ainda, suscetibilidade a modificações químicas. Em virtude destas propriedades os hidrogéis de colagénio possuem uma elevada aplicabilidade na área biomédica, particularmente no desenho de *scaffolds* para engenharia de tecidos. De entre as principais aplicações destes hidrogéis salientam-se, a reconstrução de tecidos moles, o revestimento de queimaduras e outras lesões, o suporte para crescimento de nervos periféricos e, ainda, aplicações na área farmacêutica (cápsulas para medicamentos), em estética (injeções para preenchimento de defeitos), em cosmética (fabricação de máscaras e cremes) e incorporação em implantes (Neel *et al.*, 2013). Na regeneração do tecido ósseo, o colagénio é muitas vezes combinado com compostos à base de fosfato de cálcio.

Contudo, e devido à origem animal da maioria destes materiais, o risco de imunogenicidade e de transmissão de vetores patogénicos associado às proteínas não pode ser descurado. A estratégia que

tem vindo a ser seguida para ultrapassar estes riscos consiste no desenvolvimento de tecnologias que permitam a obtenção destas proteínas através de fontes não animais como sejam algas e esponjas do mar (Olsen *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos constituem uma classe de hidratos de carbono de alto peso molecular caracterizados pela presença de repetidas unidades monossacarídicas ligadas entre si por ligações glicosídicas. A variedade de monossacarídeos existentes (cerca de 200) associada à variedade de ligações glicosídicas possíveis resulta numa multiplicidade de estruturas polissacarídicas às quais correspondem, naturalmente, hidrogéis com uma elevada versatilidade estrutural e distintas propriedades físico-químicas. A capacidade dos polissacarídeos formarem uma estrutura em gel, mesmo a baixas concentrações, constitui uma das propriedades funcionais mais importantes e mais atraentes deste grupo de polímeros. Hidrogéis, especialmente os sistemas injetáveis formados *in situ*, são frequentemente preparados a partir de polissacarídeos e dos seus derivados, particularmente a partir do ácido hialurónico, do quitosano, entre outros.

Os polissacarídeos são materiais derivados de fontes renováveis, não tóxicos, biocompatíveis e, geralmente, biodegradáveis. A disponibilidade de um grande número de grupos funcionais, nomeadamente hidroxilo, possibilita a estes polímeros um elevado número de modificações químicas, bem como a imobilização de uma enorme variedade de compostos, o que é particularmente relevante para aplicações biomédicas e farmacêuticas (Dumitriu *et al.*, 1996; Rinaudo, 2008).

De entre os polissacarídeos produzidos comercialmente, com aplicação na síntese de hidrogéis, salientam-se a agarose, a carragenina, o dextrano, os derivados da celulose, a pectina, o alginato, o ácido hialurónico, o amido e o quitosano (Lee e Yuk, 2007). Devido ao elevado número e à diversidade de aplicações que proporcionam torna-se impossível, neste trabalho, abordar todos os polissacarídeos com interesse na área biomédica, pelo que somente os mais relevantes serão discutidos.

Assim, de entre os polissacarídeos referidos, o alginato (Figura 2.3 A), polissacarídeo aniónico encontrado nas paredes das células das algas castanhas, é o mais usado na área biomédica, nomeadamente em aplicações endovasculares, no transporte de células, na imobilização de enzimas, entre outras. O que torna este polímero natural tão atrativo é a sua comprovada biocompatibilidade, hidrofiliidade, baixo custo e a facilidade em formar géis em soluções aquosas, devido à interação entre os grupos carboxílicos e catiões divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} e Sr^{2+}) ou trivalentes (Fe^{3+} e Al^{3+}) (Ouwerx *et al.*, 1998). No entanto, este material apresenta uma importante limitação, já que é facilmente degradado por perda desses mesmos iões, o que torna o processo de degradação incontroável e imprevisível.

O ácido hialurónico (Figura 2.3 B) é o maior componente da matriz extracelular da pele, cartilagem e humor aquoso e o único glicosaminoglicano não sulfatado (Shu *et al.*, 2004; Van Vlierberghe *et al.*, 2011). Este glicosaminoglicano é constituído por mais de 50 mil repetições das unidades dissacáridas, N-acetilglicosamina e ácido-D-glicurónico, unidas por ligações glicosídicas do tipo

$\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow3)$ alternadas, o que confere um carácter viscoso às soluções do polímero. Devido às suas funções biológicas (hidratação dos tecidos, difusão de nutrientes, organização dos proteoglicanos na matriz e diferenciação celular) e à sua biodegradabilidade pela enzima hialuronidase, este polímero tem tido uma grande aplicabilidade em engenharia de tecidos (Correia *et al.*, 2011). O facto de ser relativamente caro limita a sua utilização enquanto biomaterial.

O amido é, também, um polissacarídeo relevante na síntese de hidrogéis sobretudo devido ao seu baixo custo, sendo constituído por dois polissacarídeos, a amilose (cadeia linear de moléculas de D-glucose com ligações $\alpha-1,4$, Figura 2.3 C) e a amilopectina (cadeia ramificada de moléculas D-glucose com ligações $\alpha-1,4$ e $\alpha-1,6$, Figura 2.3 D). Este polímero pode formar redes tridimensionais via autoassociação (induzida por alterações de pH, de força iónica ou por processos físicos e térmicos), complexação com sais ou reticulação covalente (Dumitriu *et al.*, 1996). Os hidrogéis de amido podem ser degradados *in vivo* pelas enzimas amilase e glucoamilase. Contudo, a sua baixa solubilidade em água exige o aquecimento das soluções de polímero, o que pode constituir uma limitação quando se pretende encapsular moléculas lábeis como sejam os peptídeos e as proteínas. Hidrogéis de base amido têm sido utilizados para incorporação em implantes ortopédicos, como substituintes ósseos e na produção de sistemas de libertação controlada (Gil e Ferreira, 2006).

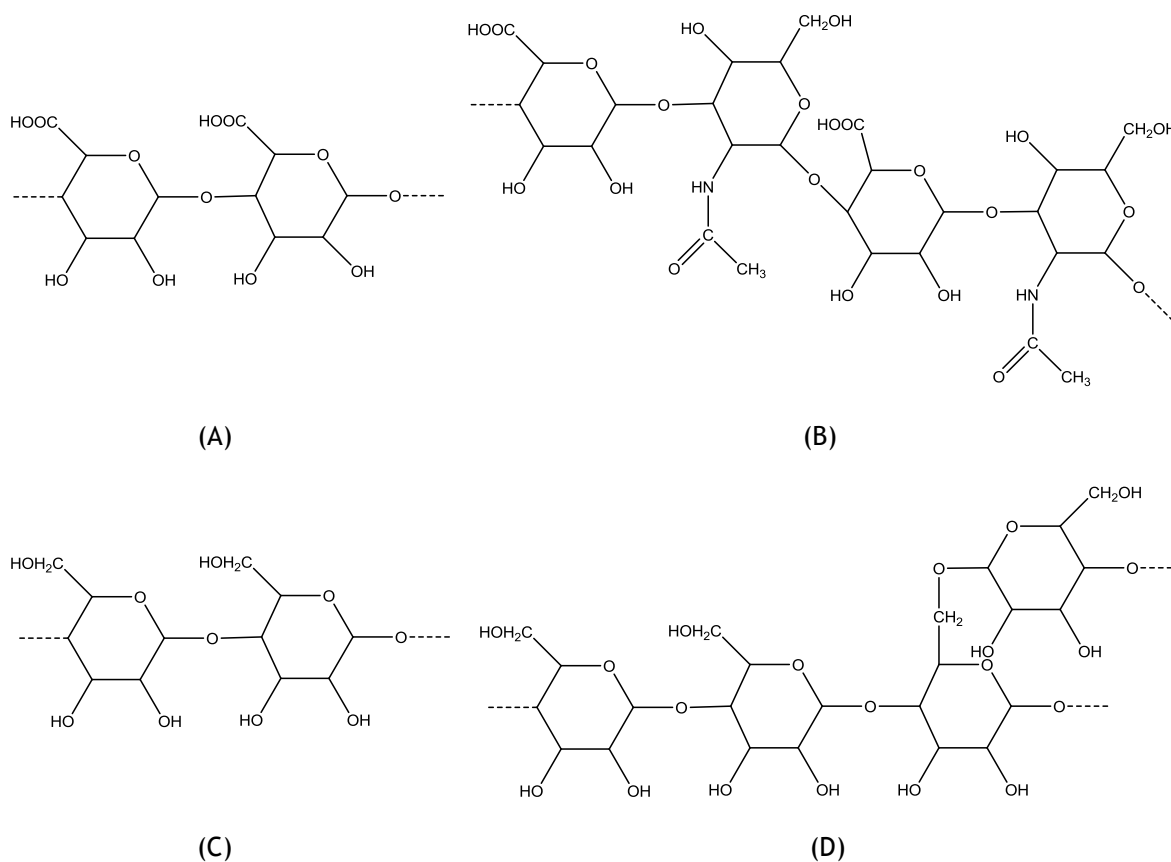


Figura 2.3 - Estruturas químicas de alguns polissacarídeos: (A) alginato; (B) ácido hialurónico; (C) amilose; e (D) amilopectina.

Dada a relevância do quitosano para o presente trabalho optou-se por uma abordagem mais alargada das propriedades físico-químicas, funcionais e estruturais deste polissacarídeo numa secção independente, a qual será apresentada de seguida.

2.3 O POLÍMERO QUITOSANO

O quitosano é um polissacarídeo catiónico de natureza hidrofílica obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina. A quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, é o principal constituinte do exosqueleto dos crustáceos e insetos, encontrando-se também na parede celular de certos fungos. Ambos os polímeros são constituídos por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosose (unidade acetilada) e 2-amina-2-desoxi-D-glucopiranosose (unidade desacetilada) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Aranaz *et al.*, 2009). Enquanto que na quitina predominam as primeiras, no quitosano estas são substituídas, durante o processo de desacetilação, pelas segundas. A Figura 2.4 representa as estruturas químicas da quitina e do quitosano.

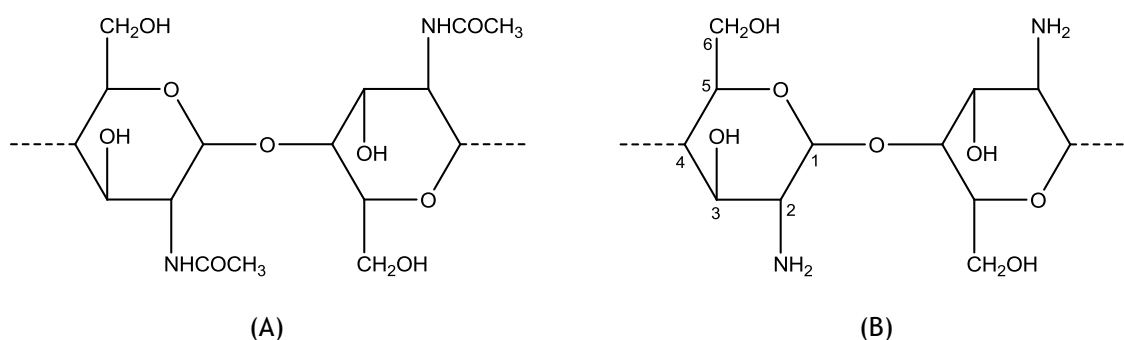


Figura 2.4 - Estruturas químicas: (A) quitina, 100% acetilada e (B) quitosano.

Geralmente designa-se por quitosano todos os derivados da quitina que apresentam um grau de desacetilação igual ou superior a 60% (Gonsalves e Araújo, 2011). As proporções relativas daquelas unidades conferem ao quitosano características estruturais distintas, nomeadamente a nível do grau de desacetilação e da massa molecular. Estas características estruturais afetam diretamente as propriedades físico-químicas e biológicas do polímero. Por exemplo, o grau de desacetilação influencia propriedades, como a biodegradabilidade e a atividade imunológica, uma vez que atua sobre a solubilidade, hidrofobicidade, viscosidade e capacidade de reticulação do polímero (Dash *et al.*, 2011).

A solubilidade em soluções aquosas ácidas (para pH inferior a 6,2) e a insolubilidade em soluções aquosas neutras ou básicas é uma propriedade bem conhecida do quitosano, isto porque a sua solubilização é promovida pela protonação dos grupos NH_2 (Figura 2.5). Assim, quanto maior for o

grau de desacetilação, maior será o número de grupos amina livres na cadeia e consequentemente o número de grupos amina protonados em solução.

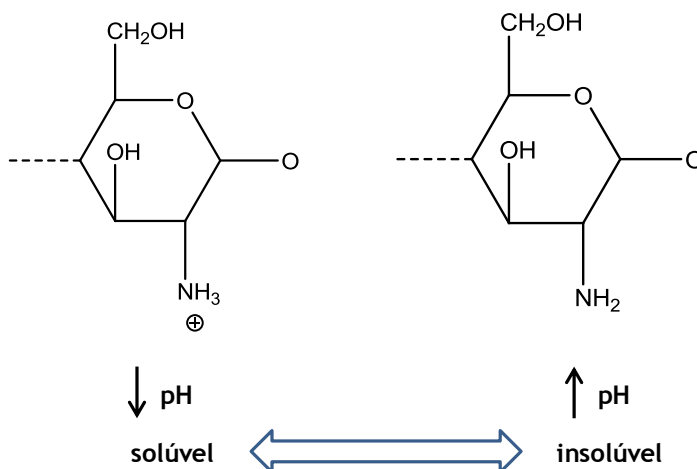


Figura 2.5 - Representação esquemática da versatilidade da molécula de quitosano. Para baixos valores de pH (inferiores a 6,2) os grupos amina do quitosano encontram-se protonados, conferindo à molécula um carácter policatiónico. Para valores de pH elevados (superiores a 6,5) os grupos amina encontram-se reativos. (adaptado de Dash *et al.*, 2011)

A par do grau de desacetilação, a massa molecular é também um parâmetro importante que condiciona, de modo significativo, a solubilidade do quitosano.

A viscosidade das soluções de quitosano aumenta com a concentração do polímero e com o grau de desacetilação e diminui com a temperatura. A viscosidade também influencia propriedades biológicas tais como o poder de cicatrização, a osteogénese e a biodegradação do polímero pela lisozima.

A literatura reporta que o quitosano com baixo grau de desacetilação tende a degradar mais rapidamente. As velocidades de degradação muito rápidas causam uma acumulação de amino-sacarídeos que podem induzir resposta inflamatória. Vários estudos salientam que o quitosano com baixo grau de desacetilação induz resposta inflamatória, enquanto o de elevado grau de desacetilação causa resposta mínima nos tecidos adjacentes devido à baixa velocidade de degradação (Ruel-Gariépy e Leroux, 2004).

A distribuição dos grupos acetilo também parece afetar a biodegradabilidade. O arranjo e a distribuição homogénea destes grupos na cadeia polimérica resultam em velocidades de degradação enzimática muito baixas.

Vários estudos revelam que a velocidade de degradação também é afetada pelo comprimento das cadeias poliméricas e consequentemente pela massa molecular. A par da velocidade de degradação do quitosano, também o grau de cristalinidade é inversamente proporcional ao grau de desacetilação.

A citocompatibilidade do quitosano tem sido avaliada *in vitro* com células epiteliais, endoteliais e miocárdicas, fibroblastos, condrócitos, hepatócitos, queratinócitos, entre outras. Os estudos revelam que a presença de grupos amina livres promove a interação entre o quitosano e as células. Desta forma, a adesão e a proliferação celulares são favorecidas pelo aumento do grau de desacetilação. A correlação direta entre o grau de desacetilação do quitosano e a adesão das células tem sido observada em inúmeros trabalhos, e é considerada de grande relevância no desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos.

Outras propriedades biológicas, tais como efeito analgésico, antitumoral, hemostático, antimicrobiano, antioxidante, etc., são também afetadas pelos parâmetros físicos/estruturais do quitosano. Na Tabela 2.1 encontra-se listada a relação entre algumas das propriedades (químicas e biológicas) exibidas pelo quitosano e os parâmetros estruturais (grau de desacetilação, GD, e massa molecular, MM).

Tabela 2.1 - Relação entre algumas propriedades do quitosano e os parâmetros estruturais (grau de desacetilação, GD, e massa molecular, MM). (adaptado de *Dash et al.*, 2011)

<i>propriedade</i>	<i>parâmetro estrutural</i> ⁽¹⁾	<i>referências bibliográficas</i>
Química		
solubilidade	↑GD	Chatelet <i>et al.</i> , 2001; Cho <i>et al.</i> , 2000; Khan <i>et al.</i> 2002; Schiffman e Schauer, 2007; Yi <i>et al.</i> , 2005; Zhang e Neau, 2001; Zhou <i>et al.</i> , 2008
crystalinidade	↓GD	Aiba, 1992; Aranaz <i>et al.</i> , 2009; Hirano <i>et al.</i> , 1989; Huang <i>et al.</i> , 2004; Kurita <i>et al.</i> , 2000; Sashiwa <i>et al.</i> , 1991; Suh e Matthew, 2000; Zhang e Neau, 2001; Tomihata e Ikada, 1997; Kofuji <i>et al.</i> , 2005; Shigemasa <i>et al.</i> , 1994
biodegradabilidade	↓GD, ↓MM	Kofuji <i>et al.</i> , 2005
viscosidade	↑GD	Kofuji <i>et al.</i> , 2005
biocompatibilidade	↑GD	Chatelet <i>et al.</i> , 2001; Schipper <i>et al.</i> , 1996
Biológica		
bioadesividade	↑GD, ↑MM	El-Kamel <i>et al.</i> , 2007; He <i>et al.</i> , 1998; Huang <i>et al.</i> , 2004; Lehr <i>et al.</i> , 1992; Roldo <i>et al.</i> , 2004
atividade antimicrobiana	↑GD, ↑MM	Helander <i>et al.</i> , 2001; Okamoto <i>et al.</i> , 2002
efeito analgésico	↑GD	Allan <i>et al.</i> , 1984; Ohshima <i>et al.</i> , 1987; Okamoto <i>et al.</i> , 1993; Okamoto <i>et al.</i> , 2002
antioxidante	↑GD, ↓MM	Park <i>et al.</i> , 2004b; Peng <i>et al.</i> , 1998; Xing <i>et al.</i> , 2005
efeito hemostático	↑GD	Kim e Rajapakse, 2005; Klokkevold <i>et al.</i> , 1999; Park <i>et al.</i> , 2004a; ; Rao e Sharma, 1997; Yang <i>et al.</i> , 2008

⁽¹⁾ ↑ - diretamente proporcional à propriedade; ↓ - inversamente proporcional à propriedade

Ao longo das últimas décadas o quitosano tem sido exaustivamente investigado e utilizado como biomaterial. As suas características apelativas como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a ausência de toxicidade, propriedades de adsorção, bioadesividade, atividade contra fungos, bactérias e vírus e poder hemostático contribuem, obviamente, para esse facto. Além disso, o quitosano apresenta na sua estrutura grupos funcionais (amina e hidroxilo) que podem ser usados para promover a derivatização química das moléculas ou a sua ligação a grupos específicos. Desta forma a molécula natural pode ser modificada e, conseqüentemente, as suas características físicas e químicas alteradas e a sua aplicabilidade específica melhorada. Uma característica singular do quitosano reside no facto deste polissacarídeo apresentar, de entre todos os biopolímeros, o maior carácter catiónico, uma vez que a maioria dos polissacarídeos apresenta carácter neutro (celulose, dextrano, amido) ou aniónico (alginato, carragenina, xantan) (Ravi Kumar, 2000). Acresce ainda o facto de, o quitosano e os seus derivados poderem ser processados nas mais diversas formas: géis, filmes, membranas, micro e nano partículas, esponjas, fibras e cápsulas (Bansal *et al.*, 2011; Ravi Kumar *et al.*, 2004).

Todas estas propriedades têm sido intensamente exploradas na preparação de hidrogéis de base quitosano para aplicações farmacêuticas e biomédicas tais como substituição de pele humana, implantes ortopédicos e periodontais, cicatrização de feridas, sistemas de libertação controlada de fármacos, suturas cirúrgicas, reconstituição óssea, lentes de contacto, encapsulamento de materiais, construção de biossensores baseados na imobilização de enzimas ou de células vivas, entre outras (Bansal *et al.*, 2011; Gonsalves e Araújo, 2011; Hoemann *et al.*, 2005; Khora e Lim, 2003; Ravi Kumar, 2000; Ravi Kumar *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006; Suh e Matthew, 2000).

2.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE BASE QUITOSANO

A síntese ou modificação de materiais para a obtenção de hidrogéis decorre muitas vezes da necessidade de alterar as propriedades físicas, como sejam por exemplo a necessidade de evitar a dissolução das cadeias hidrofílicas do polímero. Ela implica, vulgarmente, a alteração da rede o que é levado a cabo induzindo a reticulação da estrutura polimérica. A reticulação de cadeias poliméricas é uma modificação química (ou física) que visa unir as cadeias do polímero ou ligá-las às de outros polímeros formando redes poliméricas híbridas, insolúveis.

Geralmente na reticulação utilizam-se polímeros com grupos funcionais tais como hidroxilo, amina, amida, carboxilo e éter. Existem diferentes métodos que podem induzir reticulações nos hidrogéis. O método de reticulação química envolve a formação de ligações covalentes por recurso a agentes reticulantes. Todavia, os agentes utilizados são geralmente tóxicos, o que inviabiliza o uso do hidrogel em sistemas formados *in situ*. Estes efeitos adversos são eliminados quando são utilizados métodos físicos de reticulação (Hennink e van Nostrum, 2002).

2.4.1 Reticulação física

Os hidrogéis reticulados fisicamente podem ser formados por vários tipos de interações de carácter reversível. Estas podem ser interações iónicas, como no caso dos hidrogéis de quitosano ionicamente reticulados e dos complexos polieletrólíticos (PEC's), ou interações secundárias, cujos exemplos são os complexos de quitosano/PVA e os hidrogéis obtidos por copolimerização de enxerto ou pela formação de redes interpenetrantes (Berger *et al.*, 2004a).

Nos hidrogéis ionicamente reticulados, a interação iónica ocorre entre os grupos amina positivamente carregados (protonados) do quitosano e moléculas carregadas negativamente, como sejam iões sulfato, citrato e fosfato. O tripolifosfato de sódio e o fosfato dissódico de glicerol são exemplos de moléculas iónicas, não tóxicas, que combinadas com o quitosano produzem hidrogéis por interação iónica.

Nos PEC's, apesar das interações envolvidas também serem iónicas, as entidades que reagem com o polímero são outros polímeros, naturalmente, de carga oposta.

Os polímeros de carga negativa (aniónicos) mais usados na preparação de PEC's com o quitosano são os polissacarídeos que apresentam grupos carboxilo, tais como o alginato, a pectina e o xantan. Proteínas como o colagénio, polímeros sintéticos como o PAA e mesmo o DNA também têm sido investigados para o mesmo fim (Berger *et al.*, 2004b).

Os PEC's são geralmente polímeros biocompatíveis que exibem intumescimento dependente do pH. São caracterizados por um microambiente hidrofílico, com elevado teor de água e densidade de carga eléctrica. A atração eletrostática entre os grupos amina catiónicos do quitosano e os grupos aniónicos do outro polieletrólito é a principal interação para a formação de um PEC. Uma vez que todas estas interações são puramente físicas, o gel exhibe propriedades reversíveis. No entanto, a aplicação prática deste tipo de hidrogéis é limitada devido à fraca resistência mecânica e fácil dissolução das matrizes.

A Figura 2.6 representa a estrutura de uma rede obtida por interação iónica (A) e outra resultante da formação de um PEC (B).

De salientar que a interação iónica é muitas vezes acompanhada de outras interações secundárias incluindo, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do quitosano e as moléculas iónicas ou interações entre as unidades desacetiladas das cadeias de quitosano após neutralização dos grupos amina. Estas interações melhoram certas propriedades físicas do hidrogel que podem ser moduladas no sentido de realçar uma especificidade do material como seja, por exemplo, sensibilidade a uma variação de temperatura. Um exemplo típico são os hidrogéis de quitosano preparados pela neutralização dos grupos amina com o fosfato dissódico de glicerol (Chenite *et al.*, 2000). Estes hidrogéis, obtidos por interação iónica entre o quitosano e o fosfato dissódico de glicerol, exibem propriedades termossensíveis em meio aquoso, particularmente, apresentam-se no estado líquido à temperatura ambiente e gelificam para temperaturas próximas da temperatura do corpo humano. O mecanismo de gelificação está relacionado com a

neutralização dos grupos amina do polímero e conseqüente aumento das interações hidrofóbicas e de pontes de hidrogénio entre as cadeias do polímero para temperaturas elevadas.

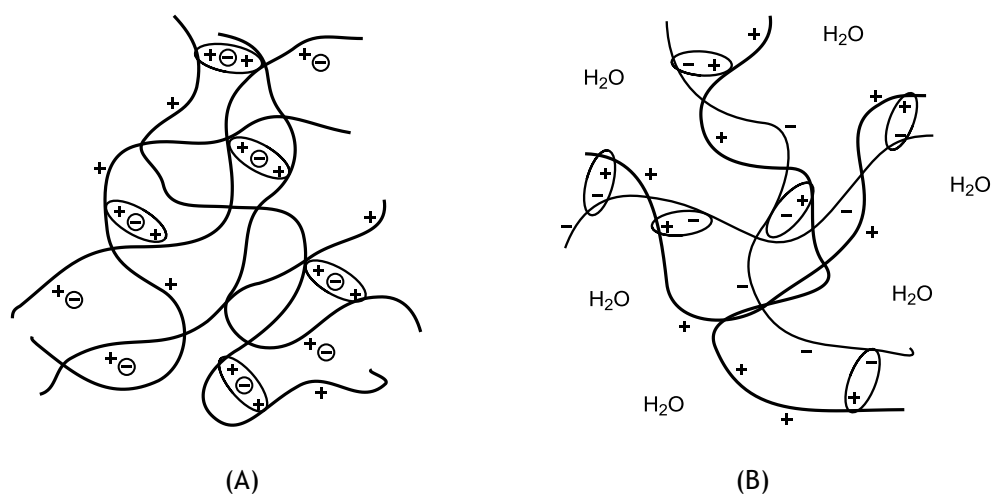


Figura 2.6 - Estruturas obtidas por: (A) interação iônica e (B) formação de um PEC. (adaptado de Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b)

Relativamente aos hidrogéis físicos obtidos por interações secundárias tem-se como principais exemplos, e como anteriormente referido, os complexos de quitosano/PVA e os hidrogéis obtidos por copolimerização de enxerto ou pela formação de redes interpenetrantes (Berger *et al.*, 2004a).

Os complexos de quitosano/PVA têm propriedades semelhantes aos PEC's embora a estrutura do complexo seja considerada como um estágio intermédio entre a estrutura de um PEC e a estrutura de uma rede de quitosano obtida por copolimerização de enxerto. Analogamente ao PEC, o complexo de quitosano/PVA é obtido por interação entre o quitosano e um polímero adicional. No entanto, as interações são secundárias e não iônicas.

De acordo com o método de preparação dos complexos de quitosano/PVA, assim as interações podem ser pontes de hidrogénio ou zonas de junção. Enquanto que nas redes obtidas por autoclavagem ocorrem pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do PVA e os grupos hidroxilo e amina do quitosano, em redes obtidas pela repetição de ciclos de congelação/descongelação (*freeze-thaw*) além destas interações também ocorrem zonas de junção entre as cadeias poliméricas do PVA (Berger *et al.*, 2004b).

A Figura 2.7 representa a estrutura de um complexo de quitosano/PVA obtido pelos métodos anteriormente referidos.

A conjugação de polímeros naturais e sintéticos no desenvolvimento de hidrogéis é feita normalmente por meio de copolimerização de enxerto ou pela formação de vários tipos de redes interpenetrantes.

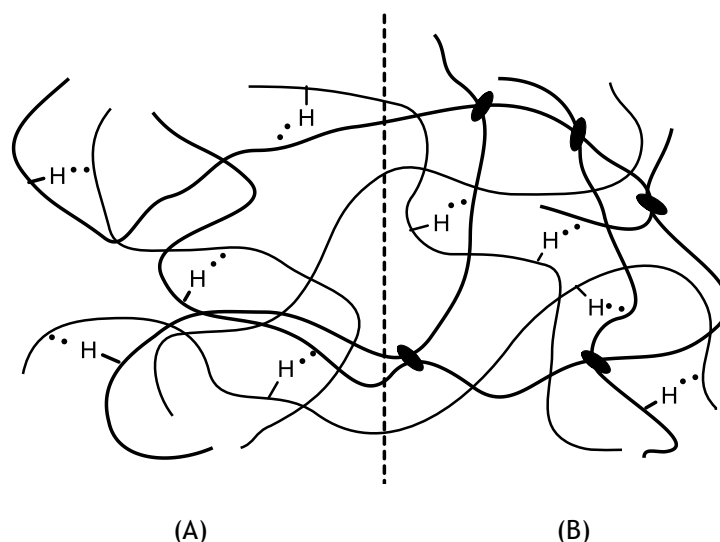


Figura 2.7 - Estrutura de um complexo de quitosano/PVA obtido pelo: (A) método de autoclavagem e (B) método *freeze-thaw*. (adaptado de Berger *et al.*, 2004b)

A técnica de copolimerização de enxerto permite, por enxertia de cadeias apropriadas numa base polimérica, modificar as propriedades físicas e químicas da mesma. Para efetuar o enxerto é necessário criar pontos reativos na base polimérica, suscetíveis de iniciar a polimerização do monômero que se pretende enxertar. Nas copolimerizações de enxerto as cadeias do polímero sintético são geralmente enxertadas nas cadeias do polímero natural, sendo a ativação da base polimérica realizada por métodos químicos (recorrendo ao uso de substâncias que produzem radicais por ação de calor ou de reação de oxidação-redução) ou métodos ditos alternativos, designadamente por exposição a radiação ionizante.

No caso particular do quitosano, a molécula possui dois tipos de grupos reativos onde pode ocorrer o enxerto: o grupo amina nas unidades desacetiladas e os grupos hidroxilo (em C3 e C6), quer nas unidades acetiladas, quer nas desacetiladas. Além disso, pode considerar-se que a preparação de um hidrogel de quitosano por copolimerização de enxerto ocorre em duas fases. A primeira corresponde à ligação covalente de uma molécula funcional - o enxerto - ao grupo reativo do quitosano; a segunda ao desenvolvimento de interações de natureza não covalente que conduzem à formação de uma rede tridimensional por agregação. Todavia, nem sempre a copolimerização de enxerto induz à formação de uma rede (Berger *et al.*, 2004b).

A Figura 2.8 ilustra a estrutura de um hidrogel de quitosano, sensível a variações de pH, obtido por copolimerização de enxerto.

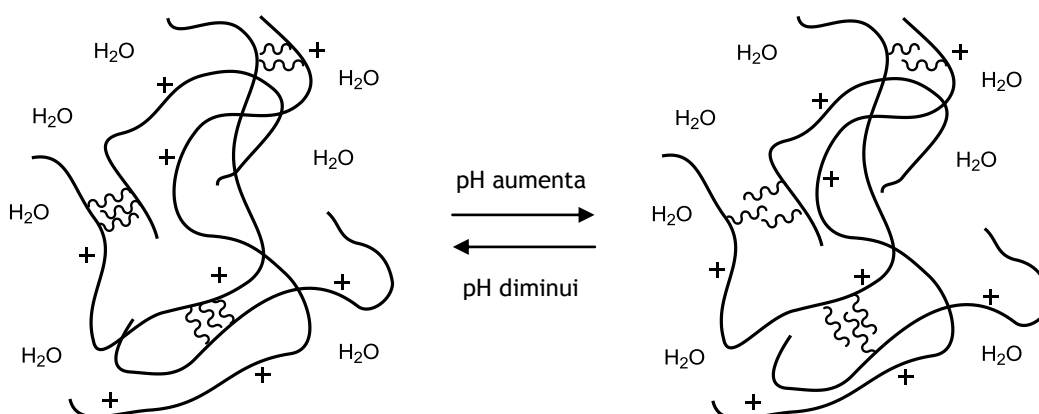


Figura 2.8 - Estrutura de um hidrogel de quitosano, sensível a variações de pH, obtido por copolimerização de enxerto. (adaptado de Berger *et al.*, 2004b)

Nas redes interpenetrantes, as cadeias do polímero sintético são sintetizadas na presença do polímero natural, mas não se ligam covalentemente a este, ficando apenas fisicamente aprisionadas. No entanto, a reticulação entre os dois tipos de cadeia pode ainda ser feita, posteriormente, através da utilização de agentes reticulantes.

De salientar que a combinação de polímeros sintéticos com polímeros naturais, na síntese dos chamados hidrogéis híbridos, permite a conjugação das propriedades destas duas classes de polímeros, o que geralmente resulta em hidrogéis com propriedades bastante atrativas. Em particular, a combinação de polissacarídeos com polímeros sintéticos permite desenvolver materiais que retêm as propriedades favoráveis dos primeiros, como a biocompatibilidade e a biodegradabilidade, ao mesmo tempo que apresentam melhores propriedades mecânicas, mais estabilidade física e, dependendo do polímero utilizado, sensibilidade a estímulos exteriores, como à temperatura ou ao pH (Figura 2.8).

2.4.2 Reticulação química

Embora os hidrogéis reticulados fisicamente tenham a grande vantagem de formar redes tridimensionais sem recurso a modificação química, eles possuem algumas limitações. Num hidrogel fisicamente reticulado é difícil controlar variáveis tais como tempo de gelificação, tamanho de poros, velocidade de degradação, dissolução, etc. Conseqüentemente, quando implantados *in vivo* apresentam um desempenho não reprodutível. Por outro lado, este tipo de hidrogéis apresenta, geralmente, fracas propriedades mecânicas e, por serem formados por ligações reversíveis, são suscetíveis de serem facilmente dissolvidos. Em contrapartida, a reticulação química melhora as propriedades mecânicas do hidrogel e reduz a sua dispersão do local de injeção, quer por fenômenos difusivos, quer por fenômenos convectivos.

A preparação de um hidrogel covalentemente reticulado requer apenas o polímero e o agente reticulante dissolvido num solvente, usualmente a água. Outros componentes podem ser adicionados, como por exemplo polímeros ou moléculas auxiliares para catalisar ou inicializar as reações.

Segundo a literatura (Berger *et al.*, 2004a), os hidrogéis de quitosano covalentemente reticulados podem ser classificados em três tipos: hidrogéis autorreticulados, cujas cadeias do polímero são reticuladas entre si (Figura 2.9 A), hidrogéis de rede polimérica híbrida (Figura 2.9 B) e hidrogéis de rede polimérica semi ou completamente interpenetrada (Figura 2.9 C).

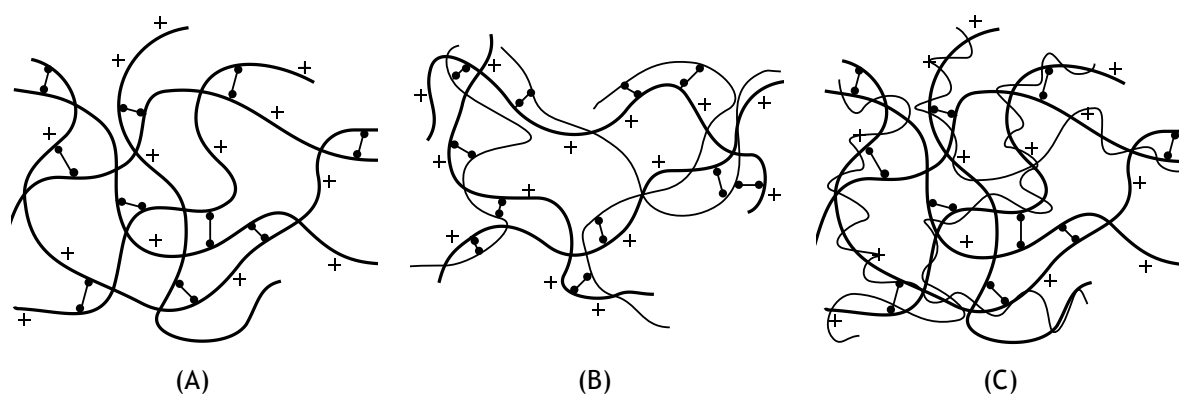


Figura 2.9 - Representação esquemática da estrutura de hidrogéis formados por: (A) quitosano autorreticulado; (B) rede polimérica híbrida; e (C) rede semi-interpenetrada. (adaptado de Berger *et al.*, 2004a)

A estrutura mais simples apresentada diz respeito ao quitosano autorreticulado. Como representado na Figura 2.9 A, a reticulação envolve duas unidades estruturais (monómeros), que podem ou não pertencer à mesma cadeia polimérica de quitosano, e o agente reticulante covalente.

Em hidrogéis formados através de rede polimérica híbrida, a reação ocorre entre a unidade estrutural da cadeia de quitosano e uma unidade estrutural de uma cadeia polimérica de outro tipo (Figura 2.9 B), embora a reticulação de duas unidades estruturais do mesmo tipo e/ou pertencendo à mesma cadeia polimérica não possa ser excluída.

Finalmente, a rede polimérica semi ou completamente interpenetrada contém um polímero não reativo adicionado à solução de quitosano antes de ocorrer a reticulação (Figura 2.9 C). Isto conduz à formação de uma rede de quitosano reticulada na qual um polímero não reativo é aprisionado (semi-interpenetrado). No caso de o polímero adicional poder ser, também, reticulado, formam-se duas redes reticuladas aprisionadas, originando uma completa interpenetração. Na literatura é possível encontrar vários exemplos de redes semi-interpenetradas de quitosano com polietileno glicol (PEG), com fibroína, com óxido de polietileno (PEO) e com polivinilpirrolidona (PVP) e

completamente interpenetradas preparadas com poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) (Dash *et al.*, 2011).

Em cada um dos três tipos de estruturas apresentadas na Figura 2.9, as principais interações que formam a rede, são as ligações covalentes, embora possam ocorrer outros tipos de interações de natureza não covalente, nomeadamente pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas, entre grupos acetilados do quitosano, sobretudo no caso do polímero de baixo grau de desacetilação.

Os agentes de reticulação são moléculas de massa molecular muito menor que a massa molecular das cadeias poliméricas envolvidas e que deverão possuir, pelo menos, dois grupos funcionais reativos de modo a permitir estabelecer “pontes” entre elas. Os dialdeídos, como o glicoxal e, em particular, o glutaraldeído, são os agentes mais utilizados na reticulação química/covalente do quitosano. O principal inconveniente encontrado na utilização destes reticulantes prende-se com o facto de eles serem considerados tóxicos.

Recentemente, o genipin é muito utilizado como agente de reticulação para o quitosano. O genipin é um produto de origem natural, extraído da fruta da *Gardenia jasminoides Ellis* (Figura 2.10). Este fruto tem uma vasta aplicação na medicina tradicional chinesa devido às suas propriedades anti-inflamatórias, diuréticas, coleréticas e hemostáticas (Butler *et al.*, 2003).

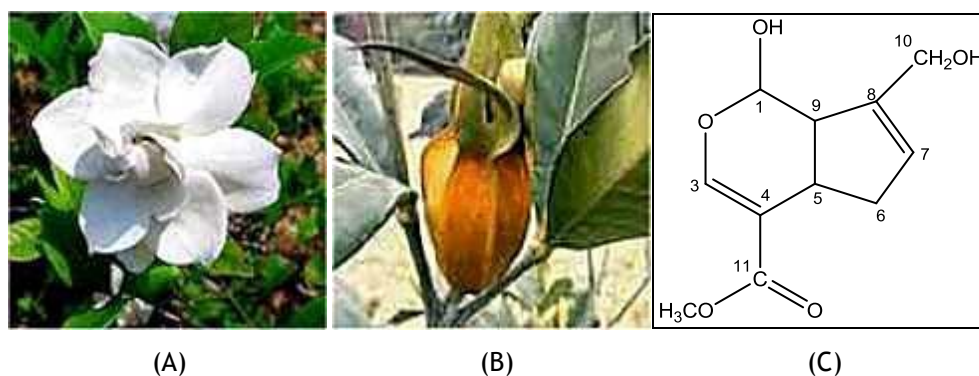


Figura 2.10 - Imagens relativas à *Gardenia jasminoides Ellis*: (A) flor e (B) fruto. (C) estrutura química da molécula de genipin.

Uma das propriedades destacáveis do genipin é a sua capacidade para reagir espontaneamente com aminas primárias, originando pigmentos de coloração verde-azulada na presença de ar. A reação do genipin com materiais que contêm grupos amina, como é o caso do quitosano e alguns peptídeos e proteínas, é influenciada pelo pH do meio reacional e encontra-se descrita na literatura (Butler *et al.*, 2003). Em meio ácido ou neutro a reação ocorre em duas etapas, conforme ilustrado na Figura 2.11.

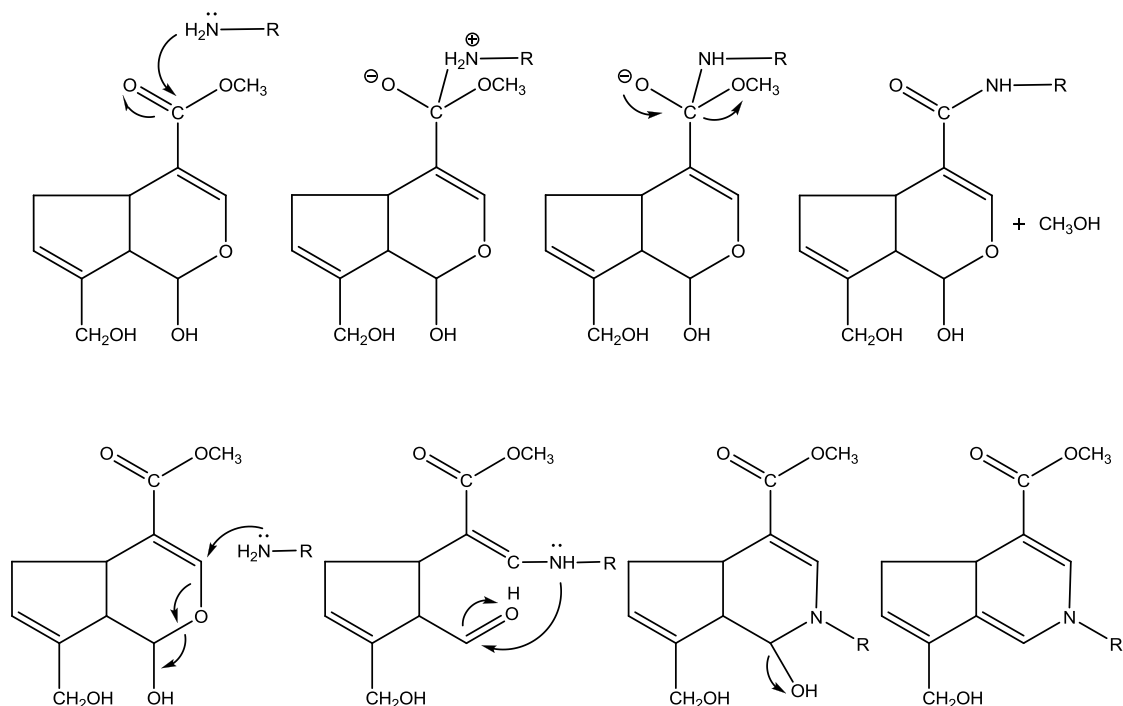


Figura 2.11 - Reações de reticulação envolvendo o genipin e os grupos amina, em meio ácido ou neutro. R designa a cadeia polimérica contendo grupos amina livres (NH₂). (adaptado de Butler *et al.*, 2003)

A primeira etapa, mais lenta, consiste na substituição nucleofílica do grupo éster da molécula de genipin por uma ligação amida secundária entre o quitosano e o genipin, produzindo-se metanol. A segunda etapa, mais rápida, consiste no ataque nucleofílico por parte dos grupos amina do quitosano ao carbono C3 do genipin, dando lugar à formação de um composto heterocíclico do genipin ligado ao resíduo de glucosamina do quitosano. Desta forma, produz-se uma estrutura interligada devido às reações entre os grupos amina do polímero e o genipin.

A coloração verde-azulada resulta da polimerização, induzida pelo radical oxigénio do genipin, que ocorre assim que o seu composto heterocíclico se liga ao polímero na presença de ar.

A Figura 2.12 ilustra o mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin em meio ácido ou neutro, com formação de uma estrutura tridimensional onde ocorrem ligações covalentes, altamente estáveis do ponto de vista físico, entre as cadeias do polímero.

De notar que a reticulação do quitosano com genipin em solução aquosa alcalina é antecedida de uma reação de polimerização entre as moléculas de genipin, dando lugar à reticulação do polímero através de copolímeros de genipin (Mi *et al.*, 2000).

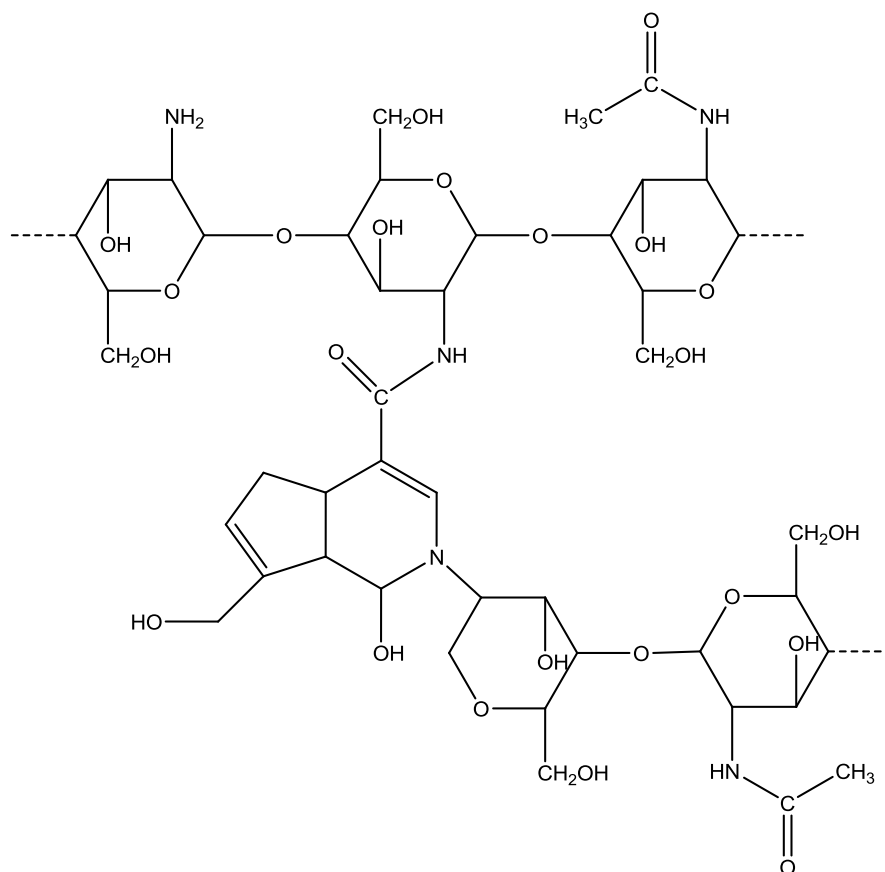


Figura 2.12 - Mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin, em meio ácido ou neutro.

A reticulação covalente do quitosano conduz à formação de uma estrutura porosa permanente permitindo a difusão livre da água e melhorando as propriedades mecânicas dos hidrogéis produzidos. De um modo geral, as propriedades dos hidrogéis reticulados covalentemente, nomeadamente a capacidade de absorção ou retenção de água na estrutura tridimensional, dependem do grau de reticulação da rede formada, isto é, do número de ligações covalentes introduzidas.

Embora a biocompatibilidade do genipin em humanos ainda não tenha sido avaliada, estudos *in vitro* revelam que este reticulante é 10000 vezes menos tóxico do que o glutaraldeído, o que justifica o seu uso em biomateriais (Sung *et al.*, 1999).

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura que reportam a preparação de diferentes estruturas (como por exemplo, membranas, microesferas e esponjas) utilizando soluções à base de quitosano reticuladas com genipin com o intuito de melhorar o desempenho do polímero natural em aplicações farmacêuticas (sistemas de libertação controlada) ou biomédicas (engenharia de tecidos e culturas celulares) (Jin *et al.*, 2004; Karnchanajindanun *et al.*, 2011; Khurma *et al.*, 2005; Muzzarelli, 2009; Silva *et al.*, 2008).

2.5 REOLOGIA DE HIDROGÉIS

A análise do comportamento reológico de hidrogéis tem-se revelado extremamente útil, particularmente na caracterização dos sistemas injetáveis que gelificam *in situ*, na medida em que o conhecimento da reologia destes materiais é crucial para a compreensão do fenómeno da gelificação.

A formação de um gel a partir de uma solução de um biopolímero resulta da transformação de um líquido (a solução) num sólido tipo gel, podendo o processo de gelificação ser monitorizado em tempo real usando técnicas reológicas.

A nível molecular, o processo de gelificação é caracterizado pelo aparecimento no sistema reativo de uma macromolécula de massa molecular infinita (Madbouly e Otaigbe, 2005). Na prática, a perda repentina de escoamento é indicativa do processo de gelificação de uma solução.

A Figura 2.13 representa esquematicamente o processo de gelificação a partir de uma solução polimérica com um agente reticulante incorporado.

Um gel exhibe um comportamento viscoelástico, isto é, possui características de um líquido puramente viscoso e de um sólido elástico puro. As grandes diferenças entre estes dois materiais é que os fluidos são incapazes de resistir a uma tensão tangencial, deformando-se de imediato, isto é, entrando em escoamento até que a tensão actue, enquanto os sólidos apenas se deformam parcialmente até atingirem um equilíbrio (a menos que a tensão seja suficientemente elevada e provoque a rotura da estrutura do material). Por outro lado, a energia requerida para a deformação é dissipada pelo líquido, na forma de calor, e não pode ser recuperada enquanto no caso dos sólidos elásticos a energia requerida para a deformação é armazenada e posteriormente recuperada na totalidade.

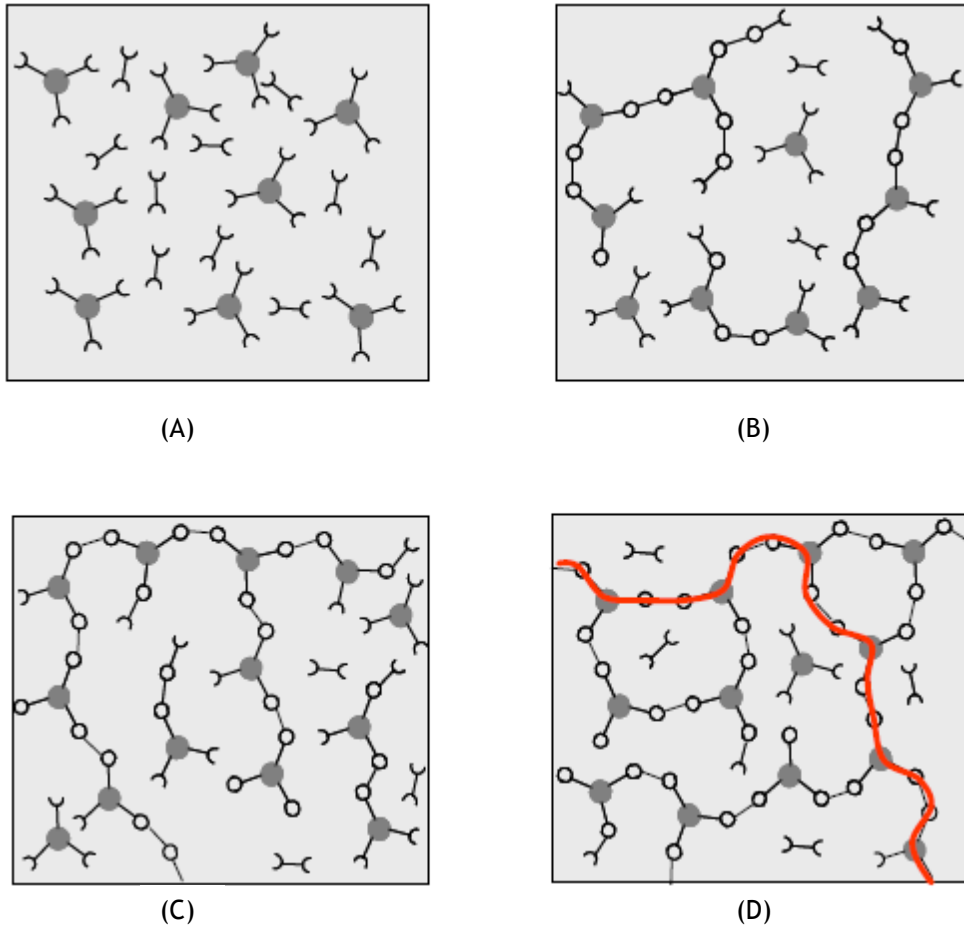


Figura 2.13 - Representação esquemática do processo de gelificação de um polímero: (A) solução polimérica constituída pelos monómeros e agente reticulante dispersos, não reagidos; (B) início da reacção de reticulação através do estabelecimento de ligações polímero-reticulante; (C) transição sol-gel; intensificação das interligações entre as cadeias poliméricas que pode levar à gelificação; e (D) formação de uma rede tridimensional macromolecular, embora se verifique a presença de algumas espécies não reagidas. (adaptado de Franck, 2004)

Convém, pois, antes de caracterizar o comportamento reológico típico de um material viscoelástico, definir alguns termos e conceitos relativos aos fluidos viscosos e aos sólidos elásticos.

2.5.1 Definição de termos e conceitos

Considere-se o exemplo clássico de um fluido contido entre duas placas planas paralelas, de área A separadas por uma distância h , estando a placa inferior estacionária. Se aplicarmos uma força tangencial \vec{F} à placa superior, esta entra em movimento, atingindo uma velocidade U constante, conforme mostra a Figura 2.14. S é o desvio sofrido pela placa superior.

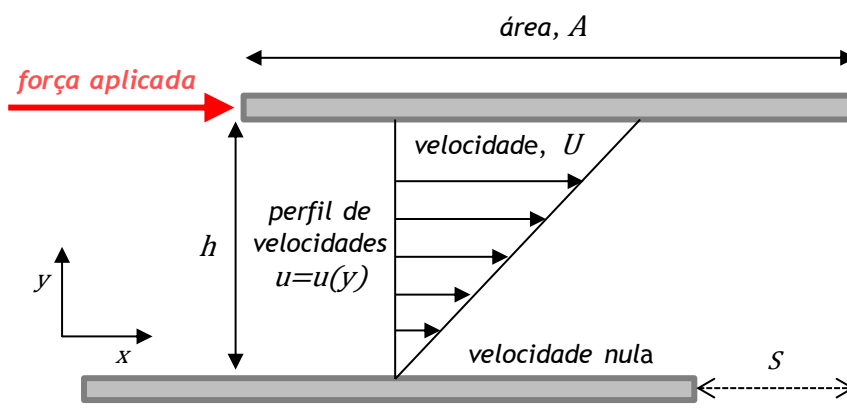


Figura 2.14 - Representação esquemática do modelo das duas placas paralelas. (adaptado de Mezger, 2006)

A força \vec{F} induz uma força com a mesma intensidade mas de sentido contrário (daí que a velocidade da placa seja constante) que é devida ao atrito interno do fluido. A força por unidade de área designa-se por tensão de corte, τ ($= \vec{F}/A$). Dado que as camadas de fluido junto às placas têm a mesma velocidade destas (devido à ausência de escorregamento), origina-se um gradiente de velocidades ao longo da direção y ,

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} \quad (2.1)$$

que será linear em certos casos, e que se designa por velocidade de deformação, ou gradiente de velocidade. Se for válida a lei de Newton para a viscosidade, a tensão de corte (τ) será diretamente proporcional à velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$), ou seja:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (2.2)$$

sendo a constante de proporcionalidade, η , designada por viscosidade dinâmica ou simplesmente viscosidade. Assim, a viscosidade é uma medida da intensidade da agitação permanente entre as partículas do fluido e reflete a resistência do fluido ao escoamento.

Se entre as placas for colocado um sólido elástico em vez de um fluido, observa-se uma deformação, γ , definida como:

$$\gamma = \frac{s}{h} \quad (2.3)$$

e, ao contrário dos fluidos, onde se verifica uma relação direta entre a tensão de corte e a velocidade de deformação, nos sólidos ocorre uma relação entre a tensão de corte e a deformação (Lei de Hooke), expressa pela equação:

$$\tau = E \gamma \quad (2.4)$$

A constante E é designada por módulo de Young. O comportamento elástico de um sólido depende das forças intermoleculares que mantêm a integridade dos seus constituintes. Quando se aplica uma tensão a um material, as ligações entre as moléculas são comprimidas ou expandidas, ocorrendo armazenamento de energia. Quando cessa a tensão, as ligações libertam a energia armazenada e o material retoma a sua forma original. O processo ocorre instantaneamente, e por isso o tempo não é uma variável relevante. Como se disse, em oposição a este comportamento, um líquido ao ser submetido a uma tensão deforma, iniciando o seu escoamento e não recuperando a forma inicial. O escoamento verificar-se-á enquanto a tensão for mantida, sendo o seu comportamento função dela e do respetivo tempo de duração.

Voltando de novo aos fluidos, estes podem classificar-se quanto à relação entre a tensão de corte, τ , e a velocidade de deformação, $\dot{\gamma}$, em Newtonianos e Não Newtonianos, consoante possam ou não ser descritos pela lei de Newton (equação (2.2)). A Figura 2.15 apresenta um esquema de classificação dos fluidos segundo o seu comportamento reológico.

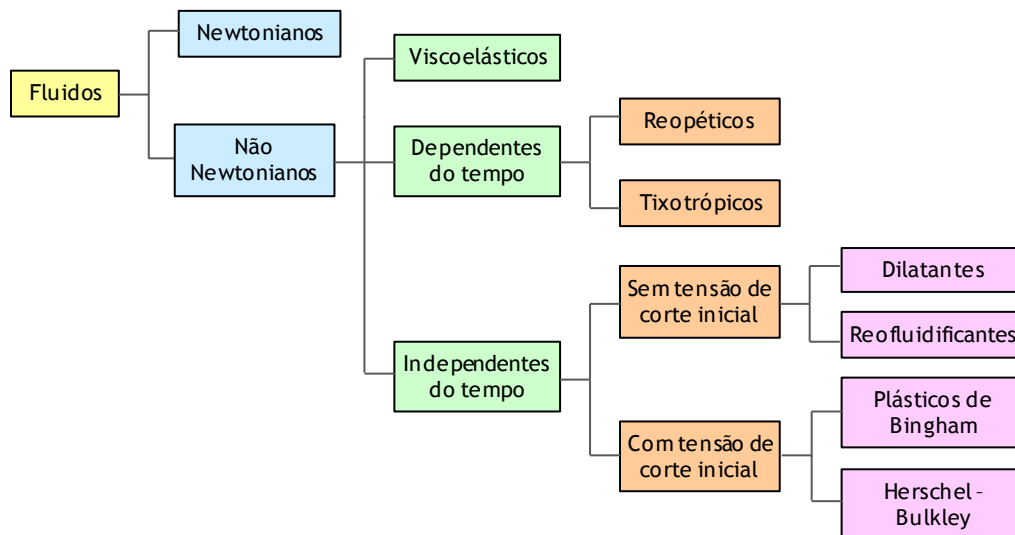


Figura 2.15 - Classificação dos fluidos de acordo com o comportamento reológico. (adaptado de Steffe, 1996)

Os fluidos Não Newtonianos não apresentam, em geral, uma relação linear entre a tensão de corte e a velocidade de deformação, podendo os valores da viscosidade variar em função da tensão de corte, sendo, neste caso, a viscosidade denominada de viscosidade “aparente”. Para algumas situações, a viscosidade aparente diminui com a tensão de corte (fluidos reofluidificantes), noutras aumenta (fluidos dilatantes). Estas designações referem-se, contudo, a fluidos Não Newtonianos cujo comportamento é independente do tempo, por oposição aos que denotam um comportamento dependente do tempo, como os tixotrópicos (cuja viscosidade diminui para uma dado gradiente de velocidade ao longo do tempo) e os reopéticos (que exibem comportamento oposto).

Por último, e ainda englobados nos fluidos Não Newtonianos, surgem os fluidos viscoelásticos, que, conforme referido, apresentam características intermédias entre sólidos elásticos e fluidos viscosos, e que serão discutidos mais detalhadamente na secção seguinte.

2.5.2 Materiais viscoelásticos

Como se referiu, um líquido puramente viscoso caracteriza-se por dissipar energia através do escoamento (uma deformação não recuperável), enquanto um sólido elástico puro tem a capacidade de armazenar energia durante a deformação e de a libertar após remoção da força externa que a origina, voltando à forma inicial.

Todavia, os materiais viscoelásticos, como o próprio nome indica, não se comportam nem como líquidos puramente viscosos nem como sólidos elásticos puros, exibindo uma componente viscosa, consonante com a lei de Newton para a viscosidade e uma componente elástica em sintonia com a lei de Hooke. Ou seja, quando submetidos a uma tensão constante entram em escoamento, tal como os fluidos, mas armazenam parte da energia fornecida (em vez de a dissiparem completamente na forma de calor). Por outro lado, tal como os sólidos, exibem recuperação da forma após cessação do estímulo, ainda que não totalmente, uma vez que houve dissipação parcial de energia durante a deformação.

A dependência das propriedades viscoelásticas de um gel com o tempo pode ser observada a partir de testes oscilatórios em regime dinâmico, levados a cabo num equipamento denominado reómetro. Estes testes caracterizam-se pela imposição de uma tensão (ou de uma deformação) ao material que se encontra entre duas superfícies paralelas, relativamente próximas, uma das quais sujeita a um movimento oscilatório sinusoidal de frequência angular ω (Figura 2.16).

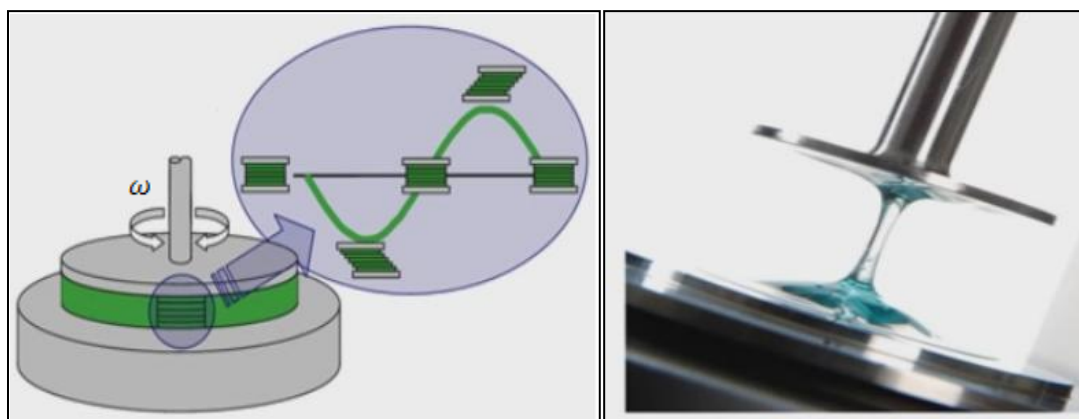


Figura 2.16 - Representação do sistema de medida de um reômetro de pratos paralelos em que o prato superior oscila sinusoidalmente com uma frequência angular ω .

A essência da análise oscilatória em regime dinâmico consiste em testar a amostra de uma forma não destrutiva, aplicando tensões (ou deformações) muito reduzidas evitando, desta forma, alterações indesejáveis da estrutura do material em estudo. As componentes elástica e viscosa do material podem ser quantificadas em simultâneo e o processo de gelificação monitorizado em tempo real.

2.5.3 Funções viscoelásticas

A partir da análise oscilatória em regime dinâmico é possível caracterizar a amostra quanto à sua capacidade elástica, ou de armazenamento de energia, através da quantificação experimental do módulo elástico (ou conservativo), G' , e quanto à sua componente viscosa, através do módulo viscoso (ou dissipativo), G'' , em função da frequência angular (ω). Estes testes são conduzidos na região viscoelástica linear, LVR (*Linear Viscoelastic Region*), a qual é caracterizada por um comportamento linear do material, ou seja, a razão entre a deformação e a tensão é independente da amplitude da variável de entrada (deformação ou tensão aplicada), na gama de frequências utilizada.

Por exemplo, se os testes forem realizados sob tensão controlada é aplicado ao material em estudo uma pequena tensão de corte (τ) sinusoidal, do tipo,

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t) \quad (2.5)$$

sendo a deformação resultante também uma função sinusoidal do tempo, com a mesma frequência mas com um desfasamento angular δ relativamente à tensão:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2.6)$$

onde τ_0 e γ_0 são, respetivamente, as amplitudes máximas de tensão e deformação, ω a frequência angular, t o tempo e δ o ângulo de desfasamento ou ângulo de dissipação (Malkin, 1994).

O ângulo de dissipação (δ) varia entre 0 e $\pi/2$ (ou 0 e 90°), correspondendo $\delta = 0$ a um sólido elástico puro (sólido de Hooke) e $\delta = \pi/2$ a um fluido puramente viscoso (fluido Newtoniano).

A Figura 2.17 representa as curvas de tensão e deformação relativas a um sólido elástico puro, a um material viscoelástico e a um líquido viscoso puro.

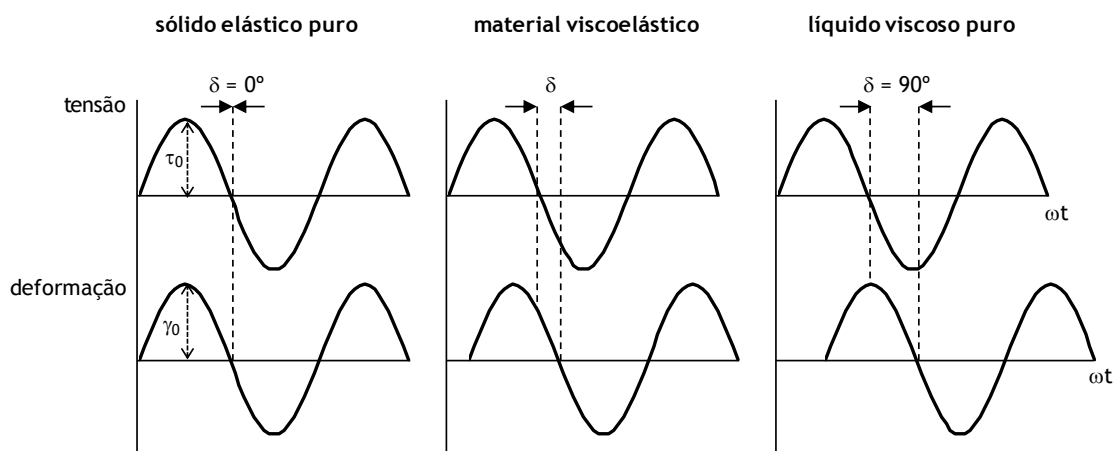


Figura 2.17 - Representação das curvas de tensão e deformação relativas a um sólido elástico puro, a um material viscoelástico e a um líquido viscoso puro. (adaptado de Mezger, 2006)

Os módulos G' e G'' são dados pelas seguintes expressões:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad (2.7)$$

e

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \quad (2.8)$$

Um outro parâmetro utilizado no estudo do comportamento viscoelástico de um material é a tangente de dissipação ($\tan(\delta)$), definida pela razão entre o módulo dissipativo (G'') e o módulo conservativo (G'),

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (2.9)$$

Este parâmetro traduz uma medida do grau de viscoelasticidade do material, ou seja, se o comportamento se aproxima mais de um sólido elástico, $\tan(\delta) < 1$ ($G' > G''$), ou se se assemelha mais a um líquido viscoso, $\tan(\delta) > 1$ ($G'' > G'$). Quando os comportamentos viscoso e elástico se encontram equilibrados, isto é, quando se verifica a igualdade dos módulos ($G' = G''$), então $\tan(\delta) = 1$. Esta situação traduz um importante critério de análise da transição sol-gel, o qual é usado na determinação do ponto de gelificação.

A resistência total à deformação é dada pelo módulo complexo, G^* , que pode ser representado por:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (2.10)$$

A resistência total ao fluxo é representada pela viscosidade complexa (η^*) que pode ser obtida a partir do módulo complexo (G^*) e da frequência angular (ω), de acordo com a equação:

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad (2.11)$$

A medição das propriedades viscoelásticas de um hidrogel permite analisar a influência de fatores físico-químicos, tais como a concentração de polímero e de reticulante, a temperatura, o pH, entre outros, no mecanismo de gelificação e inferir o seu efeito a nível da organização molecular, nomeadamente ao nível do aumento progressivo de interligações no interior da rede polimérica observado durante o processo de gelificação (Lin-Gibson *et al.*, 2003). No entanto, o aspeto mais relevante da caracterização reológica de um gel consiste na análise do comportamento viscoelástico na vizinhança da transição sol-gel. Este assunto será abordado de seguida.

2.5.4 Ponto de gelificação

Quando estão reunidas as condições favoráveis para a gelificação, ocorrerá um processo de associação intermolecular que leva à progressiva agregação de moléculas até que se atinge um ponto crítico onde a rede molecular ocupa todo o espaço disponível. Este ponto, definido por ponto de gelificação (ou ponto de gel), é o parâmetro mais importante de todo o processo de gelificação e é caracterizado pela mudança brusca das propriedades físicas e viscoelásticas do sistema (Madbouly e Otaigbe, 2005). Na prática a perda repentina do escoamento é a característica mais comum e convencional de identificar a transição sol-gel.

Muitos trabalhos encontrados na literatura reportam a determinação do ponto de gelificação com base em métodos simples baseados em critérios macroscópicos, nomeadamente o “método da

esfera em queda” (*falling ball method*) e o “método do tubo invertido” (*test tube inverting method*) (Shravani e Lakshmi, 2011; Sun *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). No entanto, estes métodos apresentam pouco rigor e excessiva dependência das condições experimentais. Em contrapartida, os ensaios oscilatórios dinâmicos ultrapassam muitas das limitações referidas.

Experimentalmente, existem vários critérios reológicos para detetar o ponto de gelificação. Um desses critérios e, provavelmente o mais aplicado, baseia-se na determinação do instante em que G' iguala G'' e, portanto, $\delta = 45^\circ$, para uma dada frequência de oscilação. Ou seja, o instante a partir do qual o carácter elástico predomina relativamente ao carácter viscoso (Job *et al.*, 2007; Lin-Gibson *et al.*, 2003; Madbouly e Otaigbe, 2005; Weng *et al.*, 2007). Um exemplo ilustrativo da aplicação deste critério está patente na Figura 2.18 A. Embora este critério tenha sido aplicado à gelificação de vários biopolímeros (Lopes da Silva *et al.*, 1998; Montembault *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2007), nem sempre o tempo para o qual $G' = G''$ é independente da frequência de oscilação. Uma vez que o tempo de gelificação é uma propriedade intrínseca do material, o critério para a sua determinação não pode, portanto, ser dependente das condições experimentais aplicadas. Assim, o tempo correspondente a $G' \cong G''$ não pode ser considerado um critério geral para a definição do ponto crítico que caracteriza a transição sol-gel, embora o tempo obtido por esse critério deva ser próximo do tempo real da transição sol-gel.

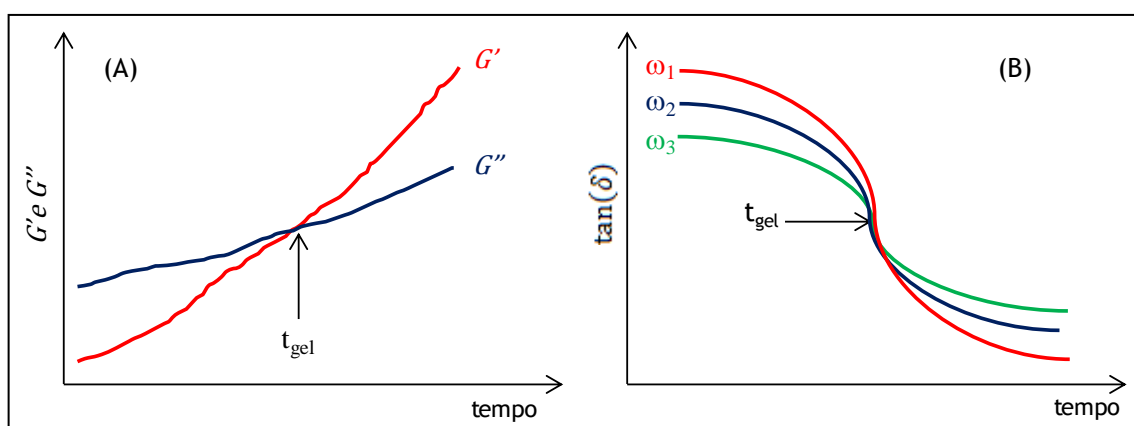


Figura 2.18 - Representação gráfica de: (A) evolução dos módulos G' e G'' com o tempo; o tempo de gelificação (t_{gel}) corresponde ao instante em que $G' = G''$ e (B) variação da $\tan(\delta)$ com o tempo, para diferentes frequências de oscilação, ω_1 , ω_2 e ω_3 ; o tempo de gelificação (t_{gel}) corresponde ao instante para o qual os valores da $\tan(\delta)$ convergem.

Um critério alternativo, atualmente considerado mais rigoroso para avaliar o instante correspondente à transição sol-gel, foi proposto por Winter e Chambon (Chambon e Winter, 1987; Winter e Chambon, 1986; Winter e Mours, 1997). Estes autores mostraram que, no ponto de

gelificação, a dependência dos módulos G' e G'' com a frequência segue um comportamento que pode ser descrito pela lei da potência, ou seja,

$$G' = k' \omega^n \quad (2.12)$$

e

$$G'' = k'' \omega^n \quad (2.13)$$

onde, k' e k'' são constantes e n é o expoente de relaxação, o qual está relacionado com parâmetros microestruturais, tais como concentração, massa molecular e conformação do polímero.

Se as relações descritas pelas equações (2.12) e (2.13) forem válidas numa gama alargada de frequências, a tangente de dissipação, $\tan(\delta)$, pode ser escrita como:

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} = \tan\left(\frac{n\pi}{2}\right) \quad (2.14)$$

com n restrito a valores compreendidos entre 0 e 1. O valor de $n = 0$ corresponde ao comportamento limite de um sólido elástico puro (sólido de Hooke) enquanto $n = 1$ ao de um fluido viscoso puro (fluido Newtoniano).

A equação (2.14) permite retirar duas conclusões. Em primeiro lugar, implica que no ponto de gelificação a tangente de dissipação é independente da frequência, pelo que $\tan(\delta) \neq f(\omega)$. Então, a representação gráfica da $\tan(\delta)$ versus tempo, para várias frequências de oscilação, permite definir o ponto de gelificação (t_{gel}) como sendo o instante de tempo para o qual os valores da $\tan(\delta)$ convergem. Além disso, o valor de n pode ser diretamente obtido a partir do valor da $\tan(\delta)$ naquele ponto. Um exemplo ilustrativo da aplicação deste critério é mostrado na Figura 2.18 B. Em segundo lugar, apenas para os casos em que n é igual a 0,5 é que o tempo de gelificação obtido pelo critério de igualdade dos módulos ($G'' = G'$) e pelo critério de Winter e Chambon ($\tan(\delta) \neq f(\omega)$, no ponto de gelificação) é coincidente (Chambon e Winter, 1987).

A validade da teoria de Winter e Chambon tem-se revelado adequada para descrever uma enorme variedade de sistemas poliméricos reticulados, quer fisicamente, quer quimicamente (Chenite *et al.*, 2001; Lin-Gibson, 2003; Madbouly e Otaigbe, 2005; Weng *et al.*, 2007).

Apesar da relevância do comportamento viscoelástico no ponto de gelificação para os hidrogéis injetáveis de base quitosano, poucos são os trabalhos encontrados na literatura que focam o comportamento do sistema na vizinhança sol-gel. De facto, grande parte dos estudos reológicos tem por principal objetivo a obtenção das funções viscoelásticas com vista a avaliar os aspetos conformacionais e a estabilidade da rede polimérica durante o processo de gelificação (El-hefian e Yahaya, 2010; Hwang e Shin, 2000).

2.5.5 Testes de avaliação do comportamento reológico

Do ponto de vista experimental, um estudo reológico típico consiste na realização de um conjunto de testes fundamentais. Considerando o exemplo de um reómetro de tensão controlada, em que é aplicada uma tensão sinusoidal com uma frequência angular ω , os testes a realizar podem ser de vários tipos como se descreve de seguida.

Testes de varrimento em tensão

Estes testes permitem determinar a estabilidade mecânica do material e consistem na medição dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') para valores de tensão crescentes, mantendo a frequência de oscilação e a temperatura constantes. Sob estas condições, a amostra em estudo é deformada até ao ponto em que as ligações internas entre as moléculas ou agregados são destruídas e grande parte da energia do sistema é irreversivelmente perdida na forma de calor. Desta forma, é possível determinar o ponto crítico, ou seja, o valor de tensão a partir do qual os módulos elástico e viscoso dependem da tensão aplicada. Por esse motivo, os ensaios de varrimento em tensão devem ser realizados em primeiro lugar por forma a determinar o limite da região viscoelástica linear (LVR).

A Figura 2.19 ilustra um resultado típico de um teste de varrimento em tensão para dois materiais com diferentes LVR.

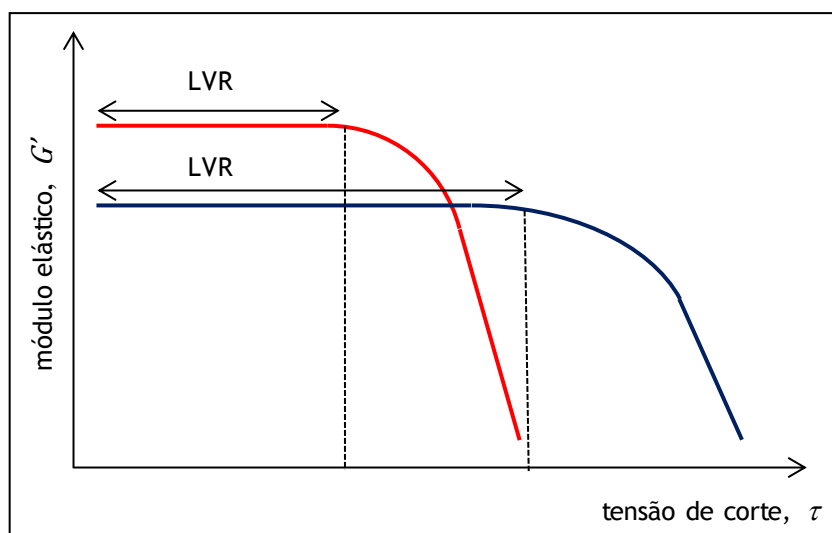


Figura 2.19 - Representação gráfica de um resultado típico de um teste de varrimento em tensão, no qual se mediu o módulo elástico (G') em função da tensão de corte aplicada (τ), para dois materiais com diferentes LVR.

Testes de varrimento em frequência

Nestes testes medem-se os módulos dinâmicos, G' e G'' , numa gama crescente de frequências de oscilação (tipicamente usa-se um intervalo de frequências entre 10^{-2} e 10^2 Hz) mantendo uma amplitude de tensão constante dentro da região viscoelástica linear. O resultado deste teste é normalmente conhecido como o espectro mecânico do material. Os testes de varrimento em frequência são utilizados para determinar diferenças estruturais entre hidrogéis, nomeadamente a nível de conformação e de interações intermoleculares das redes poliméricas.

A Figura 2.20 mostra um resultado típico de um teste de varrimento em frequência para três sistemas (gel polimérico, solução polimérica concentrada e solução polimérica diluída) submetidos a análise reológica oscilatória. O comportamento dos sistemas é caracterizado pela variação das funções viscoelásticas G' , G'' e η^* em função da frequência.

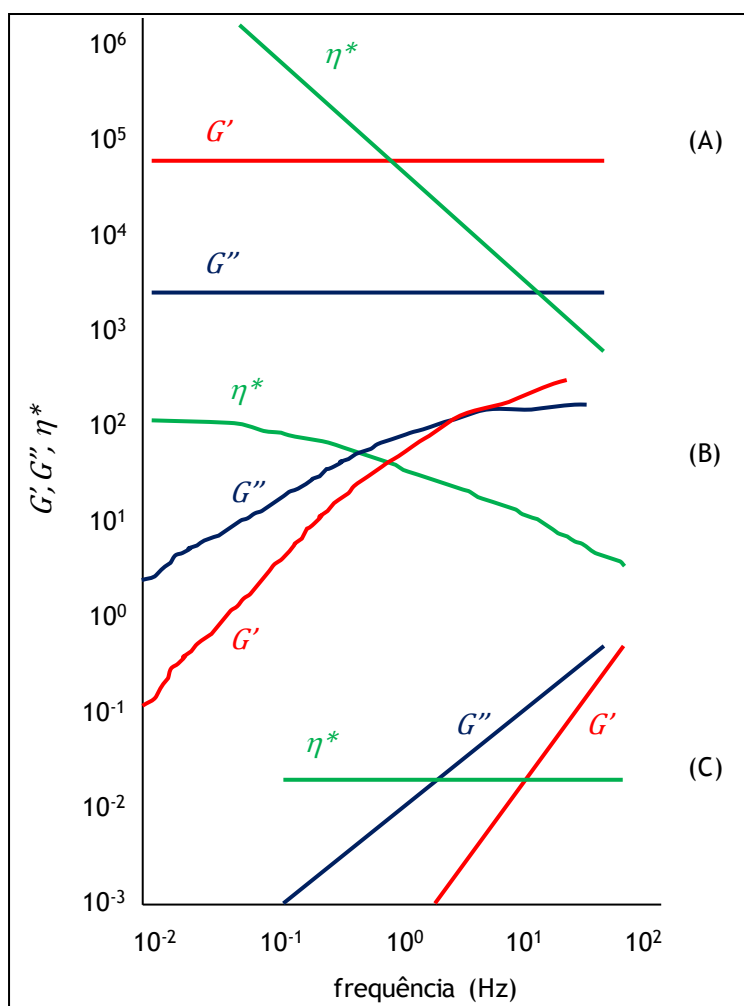


Figura 2.20 - Representação gráfica do resultado de um teste de varrimento em frequência para três sistemas: (A) gel polimérico; (B) solução polimérica concentrada; e (C) solução polimérica diluída.

A Figura 2.20 A representa um perfil característico de um gel polimérico. O módulo G' é muito maior que o módulo G'' em toda a gama de frequências, isto é, o sistema apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos G' e G'' são essencialmente independentes da frequência de oscilação, como esperado para uma rede elástica. Este comportamento reflete a existência de uma rede tridimensional. Quanto maior o valor de G' , maior é o carácter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis. A viscosidade dinâmica complexa, η^* , diminui linearmente com o aumento da frequência.

A Figura 2.20 B representa o comportamento típico de uma solução polimérica concentrada. Para valores baixos de frequência, o comportamento é semelhante ao de um líquido e G'' predomina devido à reorganização da rede. À medida que a frequência aumenta, ocorre distorção da rede, com G' aumentando mais rapidamente que G'' . Deste modo, os módulos tornam-se praticamente iguais e, no momento em que se intersectam, fica definido o ponto de gelificação. A partir do momento que G' é maior que G'' , há predominio do carácter sólido.

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na Figura 2.20 C, onde o módulo G' é significativamente mais baixo que o módulo G'' , ambos tendendo para zero para valores de frequência baixos. Nesta gama de frequências os movimentos translacionais das moléculas através do solvente predominam, resultando numa perda de energia. Para frequências mais elevadas, ocorre maior movimento das cadeias do polímero e, conseqüentemente, a energia armazenada aumenta. Deste modo, G' aproxima-se de G'' . A viscosidade dinâmica complexa, η^* , apresenta um comportamento praticamente independente da frequência.

Testes de varrimento em temperatura

Nestes testes os valores de G' e G'' são determinados em função da temperatura, para uma frequência de oscilação e para uma tensão de corte constantes. Estes testes, designados correntemente por curvas de aquecimento/arrefecimento, são usados para investigar as alterações estruturais ocorridas na rede em consequência do aumento de temperatura, durante a formação do gel. Nos hidrogéis, são particularmente úteis para determinar a temperatura de transição sol-gel e estudar a termorreversibilidade das matrizes.

A Figura 2.21 A ilustra um resultado típico de um teste de varrimento em temperatura, para dois hidrogéis que apresentam diferentes temperaturas de transição sol-gel.

Testes de varrimento em tempo

Nestes testes determinam-se os módulos dinâmicos, G' e G'' , em função do tempo mantendo-se constantes a tensão, a frequência de oscilação e a temperatura. Estes ensaios podem ser usados para monitorizar a cinética de maturação dos hidrogéis.

Um resultado típico de um teste de varrimento em tempo é ilustrado na Figura 2.21 B.

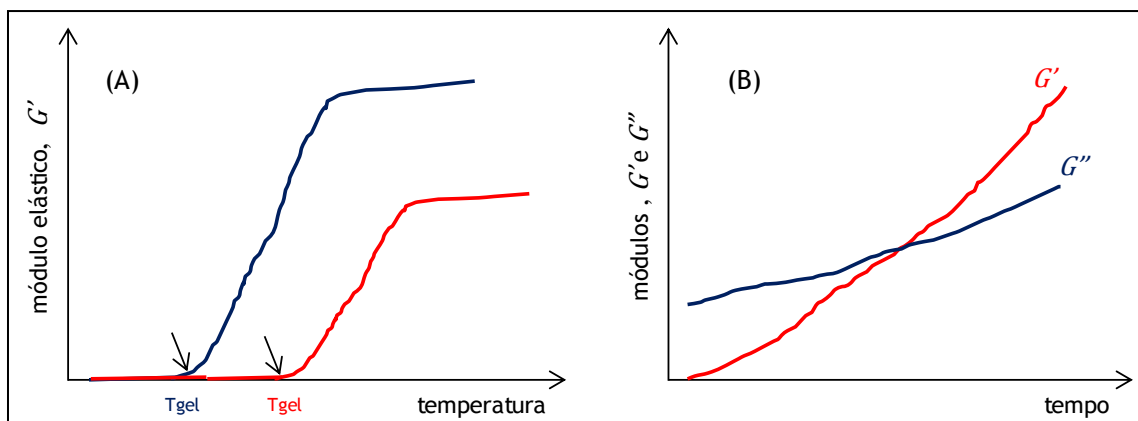


Figura 2.21 - Representação gráfica do resultado de: (A) teste de varrimento em temperatura, no qual se mediu o módulo elástico, G' , em função da temperatura (T_{gel} é a temperatura de transição sol-gel) e (B) teste de varrimento em tempo, no qual se mediram os módulos elástico, G' , e viscoso, G'' , ao longo do tempo.

De salientar que os testes dinâmicos a uma dada frequência são muito úteis para monitorizar alterações nas propriedades viscoelásticas dos hidrogéis durante transições estruturais ou durante a maturação (Mezger, 2006). Os ensaios oscilatórios são relevantes neste tipo de aplicações uma vez que, quando os testes são efetuados na região viscoelástica linear, a amplitude é suficientemente pequena para não interferir com a microestrutura ou o mecanismo de gelificação e maturação do gel.

Pretende-se com as considerações apresentadas nesta secção, relativas à reologia dos hidrogéis, contribuir para uma melhor compreensão da técnica reológica utilizada, bem como fornecer uma melhor interpretação dos resultados obtidos ao longo do trabalho.

2.6 APLICAÇÕES EM SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA

O crescente interesse do quitosano na área farmacêutica e biomédica tem gerado oportunidades de desenvolvimento de biomateriais, principalmente através de modificações químicas e físicas, as quais têm promovido no polímero novas atividades biológicas para fins específicos. Estas estratégias incluem a combinação do quitosano com outros polímeros (quer naturais, quer sintéticos) e materiais inorgânicos (como a hidroxiapatite) para a produção de materiais compósitos (Peng *et al.*, 2006; Pramanik *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

No contexto desta revisão não é possível discutir todas as aplicações do quitosano e dos seus derivados enquanto biomateriais, mesmo que sucintamente, devido ao seu elevado número e diversidade. Todavia, dada a relevância dos sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos para o presente trabalho, optou-se por considerar os aspetos mais inovadores destes sistemas, nomeadamente dos sistemas constituídos por nanopartículas e por matrizes injetáveis formadas *in situ*.

Os SLC têm por objetivo prolongar e melhorar o controlo da administração de fármacos por forma a otimizar a sua ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais. Entenda-se por “fármaco” todos os compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético.

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura referentes ao desenvolvimento de sistemas poliméricos de base quitosano para libertação controlada de fármacos sob as mais diversas formas (filmes, micro e nanopartículas, matrizes injetáveis, adesivos, implantes, etc.) e vocacionados para as mais diversificadas aplicações (oftalmológicas, periodontal e bucal, gástricas, anticancerígenas) (Agnihotri *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2011; Dash *et al.*, 2011; Nair e Laurencin, 2006; Pedro *et al.*, 2009; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000; Sokker *et al.*, 2009). Por exemplo, uma simples pesquisa no Google com as palavras-chave “chitosan” e “drug delivery” resulta em cerca de 700000 ocorrências.

2.6.1 Libertação de fármacos a partir de filmes

A principal aplicação dos filmes enquanto SLC é a libertação de fármacos por via transdérmica. A libertação ocorre a partir da matriz polimérica de forma contínua, sem, no entanto, atingir níveis tóxicos no organismo e danificar as células da membrana epitelial. A grande vantagem da libertação transdérmica face, por exemplo, à via oral reside na proteção do fármaco da biotransformação pré-sistémica e da hidrólise enzimática no trato gastrointestinal (Rasool *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2006). Acresce, ainda, o facto de a libertação poder ser interrompida por simples remoção da estrutura.

A facilidade do quitosano para ser processado na forma de filmes deu lugar às primeiras aplicações investigadas deste polímero natural. De uma forma geral, os filmes de quitosano possuem propriedades físicas e mecânicas dependentes do grau de desacetilação (percentagem de grupos amina presentes) e da massa molecular do polímero, elevada flexibilidade e estabilidade física, para além de serem facilmente hidratáveis (Hwang *et al.*, 2003). No campo farmacêutico são muito utilizados como sistemas de libertação controlada de fármacos e no revestimento de comprimidos (Agnihotri *et al.*, 2004; Liu e Lin, 2010; Mengatto *et al.*, 2012). Adicionalmente, alguns trabalhos encontrados na literatura realçam o elevado potencial dos filmes de quitosano no tratamento de feridas cutâneas (Ferreira *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Para além do fármaco poder ser administrado de forma localizada e a libertação ocorrer progressivamente no local de ação, estas estruturas protegem a ferida, absorvem a transpiração, têm ação antibacteriana, apresentam boa compatibilidade, favorecem a cicatrização, ao estimular a proliferação de fibroblastos, não são

tóxicas e proporcionam elevado conforto. A própria estrutura química do quitosano, semelhante à da matriz extracelular, reforça a utilização deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador de tecidos.

A combinação do quitosano com colagénio, na obtenção de estruturas compósitas para regeneração de pele, também tem sido reportada na literatura (Faikrua *et al.*, 2009).

Na Tabela 2.2 encontra-se alguns exemplos de aplicações dos filmes de quitosano e seus derivados enquanto SLC de fármacos.

2.6.2 Liberação de fármacos a partir de sistemas de partículas

Um dos processos utilizados para a obtenção de um SLC é a associação da substância bioativa a um sistema transportador, o qual se encarrega de a conduzir ao respetivo local de ação. Este objetivo pode ser conseguido através da encapsulação das substâncias bioativas em sistemas poliméricos, tais como micropartículas e nanopartículas, entendendo-se por nanopartícula uma partícula cujas dimensões estão compreendidas entre 1 e 100 nm (Vert *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, numerosos estudos têm demonstrado que a eficácia terapêutica de um fármaco pode ser modificada e melhorada pelo uso de sistemas à escala micrométrica, como micropartículas, ou de sistemas à escala nanométrica, como lipossomas e nanopartículas (Agnihotri *et al.*, 2004; Caldorera-Moore e Peppas, 2009; Mufamadi *et al.*, 2011; Sailaja *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

O termo partícula é genérico e, quando aplicado à liberação controlada de fármacos, refere-se a dois tipos diferentes de estruturas: cápsulas e esferas. A Figura 2.22 ilustra a diferença entre estes dois tipos de estrutura.

Dependendo do método de preparação, as partículas podem apresentar uma estrutura de reservatório, constituídas por um invólucro polimérico disposto em redor de um núcleo, no qual o fármaco se encontra dissolvido ou disperso podendo também estar adsorvido na parede polimérica. Neste caso designam-se por microcápsulas ou nanocápsulas (Figura 2.22 A). Aquelas que são constituídas por uma matriz polimérica maciça, onde o fármaco se encontra uniformemente disperso ou solubilizado são designadas por microesferas ou nanoesferas (Figura 2.22 B).

Diversos materiais poliméricos têm sido utilizados na preparação destas partículas. Todavia, a biodegradabilidade dos polímeros é um dos requisitos fundamentais na modulação de SLC, uma vez que é desejável que um material introduzido no organismo seja reabsorvido depois de cumprida a sua função, sem necessidade de recorrer a intervenção cirúrgica para a sua remoção (Hafeti e Amsden, 2002).

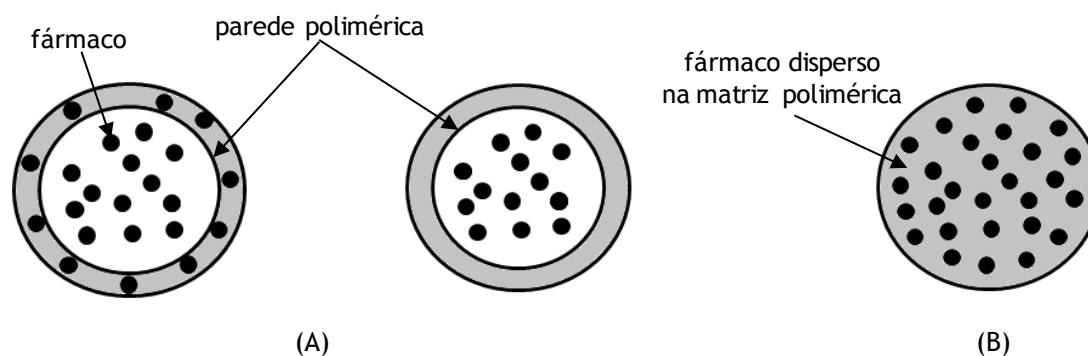


Figura 2.22 - Representação esquemática das estruturas de: (A) micro ou nanocápsula e (B) micro ou nanoesfera. (adaptado de Dash e Cudworth, 1998)

As vantagens decorrentes da aplicação de sistemas de partículas como transportadores de fármacos devem-se a vários fatores. Em primeiro lugar, a encapsulação do fármaco numa matriz proporciona a proteção deste contra a degradação e/ou inativação precoce. Desta forma, é possível aumentar a permanência da substância bioativa na circulação sanguínea, reduzindo-se, assim, o número de doses necessárias, a quantidade de fármaco e, conseqüentemente, a toxicidade. Em segundo lugar, a libertação de forma progressiva e controlada do fármaco garante a manutenção de concentrações no intervalo de ação terapêutica. Por outro lado, estes sistemas podem ser administrados pelas vias convencionais de administração de medicamentos.

Relativamente aos sistemas de libertação constituídos por micropartículas, estes têm aplicação nos casos em que se pretende uma libertação local lenta e contínua, como por exemplo, em vacinas e no tratamento de doenças crônicas localizadas e são, de uma forma geral, administrados por via oral (Sinha *et al.*, 2004). Na verdade, devido às suas dimensões, estes sistemas nem sempre podem ser administrados por via intravenosa, ao contrário dos sistemas nanométricos, e também não são capazes de atravessar as barreiras biológicas *in vivo*. Assim, os sistemas nanométricos têm suscitado um grande interesse sobretudo em aplicações injetáveis por via intravenosa, na libertação em superfícies da mucosa, como a nasal e a ocular, e, mais recentemente, em terapia genética (Wang *et al.*, 2011). De salientar ainda que os materiais à escala nanométrica podem apresentar propriedades físico-químicas, elétricas, termodinâmicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores.

Os lipossomas constituíram a primeira proposta como matrizes para libertação de compostos bioativos à escala nanométrica (Mufamadi *et al.*, 2011). Os lipossomas são sistemas lipídicos constituídos por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas concêntricas formando vesículas esféricas de tamanho variável (20 nm a alguns micrómetros de diâmetro). As bicamadas lipídicas estão separadas entre si por espaços aquosos, sendo também aquoso o espaço interno do lipossoma. A Figura 2.23 representa, de forma

esquemática, o processo de formação de um lipossoma convencional com um agente bioativo encapsulado.

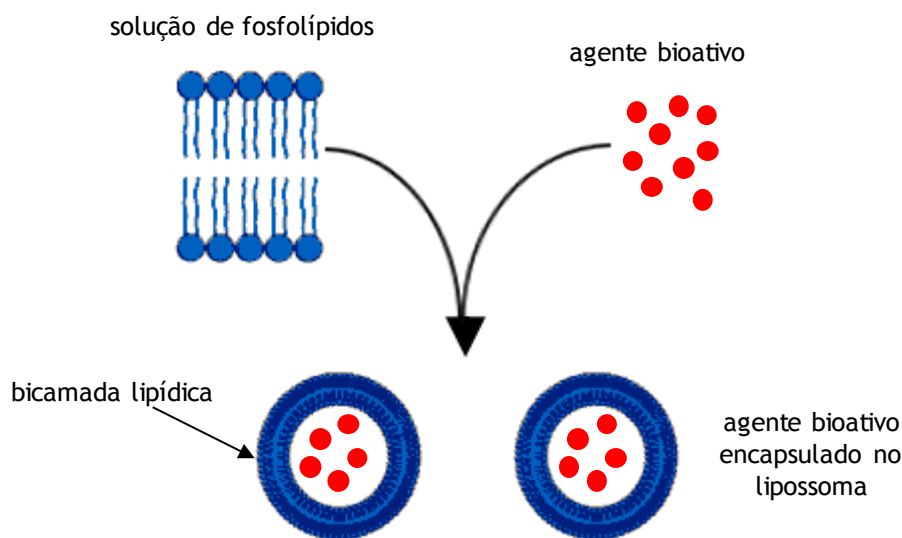


Figura 2.23 - Representação esquemática do processo de formação de um lipossoma convencional com uma substância bioativa encapsulada. (adaptado de Mufamadi *et al.*, 2011)

Contudo, a estabilidade dos lipossomas, sob a forma líquida, é reduzida devido a fenômenos de agregação e/ou fusão e, também, ao facto dos fosfolípidos, constituintes das vesículas, sofrerem hidrólise e oxidação em meio aquoso. Os fenômenos de instabilidade das vesículas podem mesmo levar à perda do material encapsulado antes de atingido o local de libertação desejado.

Assim, o desenvolvimento de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas constitui uma alternativa promissora aos sistemas lipossomais. O menor custo dos polímeros, em relação aos fosfolípidos, e a maior estabilidade e durabilidade são algumas das vantagens das nanopartículas poliméricas relativamente àqueles sistemas.

Adicionalmente, o uso de nanopartículas para encapsulação de fármacos de natureza proteica também tem sido reportado na literatura (des Rieux *et al.*, 2006). A administração deste tipo de fármacos tem sido normalmente feita por via injetável, isto porque a administração oral resulta numa baixa biodisponibilidade, devido à instabilidade destes fármacos em ambiente gastrointestinal e à sua fraca permeabilidade através do tecido da mucosa intestinal. O aumento da biodisponibilidade quando se utilizam nanopartículas deve-se à capacidade que estas têm de proteger eficazmente o fármaco do meio físico-químico e enzimático do trato gastrointestinal e de, simultaneamente, aumentarem a absorção deste, pela promoção do transporte através da mucosa.

Vários trabalhos encontrados na literatura reportam que as nanopartículas, especialmente as de tamanho compreendido entre 10 e 100 nm, possuem um elevado potencial enquanto veículo de

transporte de agentes citotóxicos. Estas partículas são capazes de circular pela corrente sanguínea sem escapar pelas paredes dos respectivos vasos. No entanto, a vascularização de um tumor sólido difere funcionalmente e morfológicamente da vascularização de um tecido normal. Os vasos sanguíneos do tumor têm, em geral, uma distribuição mais heterogênea, um diâmetro maior e são mais permeáveis. Além disso, possuem paredes com grandes poros, o que permite que as nanopartículas possam sair e, facilmente, penetrar no interior das células tumorais libertando o citostático e evitando, assim, destruir os tecidos sãos (Zhang *et al.*, 2006).

Os sistemas de partículas de base quitosano têm sido bastante estudados na modulação de SLC sobretudo porque o quitosano possui uma combinação de propriedades químicas e biológicas muito atrativa. Nestes sistemas, a libertação do princípio ativo depende das características físico-químicas da matriz polimérica. Assim, mediante a manipulação de parâmetros, como sejam a concentração, a massa molecular e o grau de desacetilação do quitosano, ou através da sua modificação com outros polímeros e/ou materiais inorgânicos é possível obter sistemas com perfis de libertação adequados a situações específicas.

Uma das áreas onde as nanopartículas de quitosano têm despertado grande interesse é a da libertação na mucosa ocular. A libertação de fármacos a nível ocular efetuada pelas formulações tradicionais disponíveis comercialmente resulta normalmente numa biodisponibilidade do fármaco bastante baixa devido à rápida eliminação deste do local de ação pelos mecanismos de limpeza/proteção do olho. Em contrapartida, as formulações líquidas de nanopartículas de quitosano carregadas de fármaco aumentam significativamente a biodisponibilidade, ao prolongarem o tempo de residência na área pré-corneal (Sailaja *et al.*, 2010). A elevada capacidade mucoadesiva do quitosano, traduzida pela interação eletrostática entre as suas cargas positivas e as cargas negativas da mucina (principal constituinte do muco) ocular, parece ser uma propriedade chave no sucesso destas formulações para uso oftálmico.

Estudos muito recentes revelam que nanopartículas de quitosano são capazes de entregar o DNA no interior das células humanas com resultados muito encorajadores no controlo e na diminuição do crescimento desregulado de células cancerígenas (Gaspar *et al.*, 2011).

Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram significativa atividade antitumoral do próprio quitosano, o que abre excelentes perspetivas à aplicação deste polímero natural no tratamento de tumores cancerígenos (Wang *et al.*, 2011).

Na Tabela 2.2 encontram-se alguns exemplos de aplicações do quitosano e seus derivados, sob a forma de partículas, enquanto sistemas de libertação de fármacos.

Apesar do enorme esforço de investigação dedicado à nanotecnologia, o número de sistemas de libertação de fármacos à base de nanopartículas aprovados para uso humano ou na fase de estudos clínicos é ainda bastante reduzido.

Atualmente, um dos poucos produtos aprovados para uso humano à base de nanopartículas poliméricas de albumina complexada com paclitaxel é o Abraxane™, o qual é utilizado no tratamento do carcinoma da mama (Haley e Frenkel, 2008).

A principal limitação dos sistemas de libertação sob a forma de partículas reside, sobretudo, nos métodos de incorporação do fármaco os quais proporcionam, em geral, eficiências de incorporação baixas (Ta *et al.*, 2008). Por outro lado, em terapias que exijam que as partículas permaneçam maioritariamente concentradas no local de administração, como é o caso da libertação prolongada e localizada, as nanopartículas tendem a entrar rapidamente na corrente sanguínea e a dispersarem-se no organismo elevando, assim, o risco de toxicidade. Acresce ainda o facto de que as de diâmetro inferior a 10 nm são facilmente eliminadas pelos rins (Choi *et al.*, 2011). Além disso, para valores de pH fisiológico, as nanopartículas apresentam baixa estabilidade associada a fenómenos de agregação.

Estes problemas têm orientado a comunidade científica para o desenvolvimento de formulações injetáveis, capazes de gelificar *in situ*, em especial, os sistemas de base quitosano (Madan *et al.*, 2009; Ruel-Gariépy e Leroux, 2004).

2.6.3 Libertação de fármacos a partir de sistemas injetáveis formados *in situ*

Como anteriormente referido, os sistemas injetáveis formados *in situ* caracterizam-se por se apresentarem na forma de soluções líquidas à temperatura ambiente, tornando-se géis em condições fisiológicas (Yu e Ding, 2008).

A incorporação de moléculas bioativas ou células nestes sistemas é feita após a dissolução do polímero, que ocorre normalmente em água, por simples mistura na solução aquosa líquida, à temperatura ambiente.

A principal vantagem decorrente dos sistemas formados *in situ* relativamente aos sistemas de partículas reside no facto dos primeiros poderem ser administrados por via injetável, diretamente no local de ação terapêutica. A maioria destes sistemas tem sido muito investigada como SLC de fármacos citotóxicos no tratamento de tumores cancerígenos (Berrada *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008; Jauhari e Dash, 2006; Madan *et al.*, 2009; Ta *et al.*, 2008).

Apesar do quitosano ser um biopolímero com elevada aplicação no desenvolvimento de SLC, poucas são ainda as formulações constituídas por este polissacarídeo que possuem propriedades de se formar *in situ* e, por conseguinte, passíveis de administração por via injetável.

No entanto, uma das formulações com maior sucesso na área dos SLC formados *in situ* é a combinação do quitosano com um sal, o fosfato dissódico de glicerol (GP). Esta formulação, quitosano/GP, desenvolvida pela primeira vez por Chenite e seus colaboradores (Chenite *et al.*, 2000), possui um pH neutro, permanece líquida à temperatura ambiente e forma um gel à temperatura do corpo humano. Além disso, possui um carácter termorreversível, ou seja, o gel pode repetir a transição sol-gel e gel-sol sem qualquer limite no tempo de vida. Este sistema tem sido particularmente estudado como transportador de vários agentes citostáticos, tais como a doxorrubicina, a camptotecina e o paclitaxel (Berrada *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008; Ruel-Gariépy *et al.*, 2004).

Como é sabido, a eficácia destes fármacos em terapia do cancro é limitada devido à sua elevada toxicidade. No entanto, a utilização de um SLC formado *in situ*, administrado por injeção intratumoral, proporciona uma libertação controlada e progressiva daqueles citostáticos ao longo do tempo, minimizando a exposição de outros órgãos. A Figura 2.24 exemplifica a preparação de um sistema injetável de base quitosano, carregado com um citostático, para injeção intratumoral.

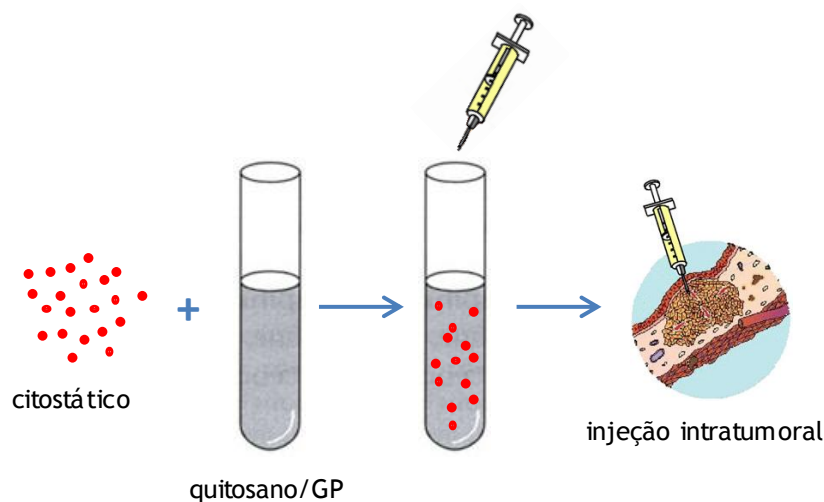


Figura 2.24 - Preparação de um SLC formado *in situ*, administrado via intratumoral. (adaptado de Ta *et al.*, 2008)

De realçar que o efeito dos citostáticos libertados em órgãos ou tecidos, como o coração e a pele, assim como o desempenho de sistemas desta natureza no tratamento de cancros metastáticos ainda não foram investigados.

Além disso, apesar de muitos dos sistemas injetáveis de quitosano apresentarem elevado potencial para aplicação em diferentes tipos de cancro, ainda não foram testados *in vivo* ou em ensaios pré-clínicos. Na verdade, de entre os sistemas de libertação controlada capazes de gelificar *in situ*, encontra-se em fase de desenvolvimento clínico uma formulação comercial, denominada OncoGel™, constituída por dois polímeros sintéticos, o poli(ácido láctico-co-glicólico) e o poli(etileno glicol) para libertação de paclitaxel no tratamento do cancro do esófago (Duvall *et al.*, 2009). Esta formulação, da família dos polímeros termorreversíveis, pode ser diretamente injetada no tumor e libertar continuamente o fármaco por um período de quatro a seis semanas, após o qual o gel é reabsorvido.

De realçar que o uso de formulações poliméricas formadas *in situ* não é apenas reduzido à libertação de citostáticos. Estudos mais recentes apontam para a possibilidade de usar SLC de base quitosano formados *in situ* para libertação sustentada de agentes biológicos antitumorais tais como plasmídeos, pequenos oligonucleotídeos, hormonas, anticorpos e agentes peptídicos (Gaspar *et al.*, 2011). O desafio reside no desenvolvimento de estratégias de libertação combinadas, que incluam

dois tipos diferentes de agentes antitumorais usando um só sistema polimérico, com vista a melhorar a eficiência do tratamento dos diferentes tipos de cancro.

Na Tabela 2.2 apresenta-se um resumo dos trabalhos publicados na literatura nos anos mais recentes sobre SLC de base quitosano, onde se inclui, naturalmente, os sistemas injetáveis formados *in situ*.

Os inúmeros trabalhos publicados demonstram inequivocamente a importância do quitosano e dos seus derivados no desenvolvimento de SLC de fármacos. Estes sistemas têm um interesse acrescido uma vez que a reformulação de fármacos sob a forma de SLC pode representar uma abordagem mais racional e menos dispendiosa do que a procura de novas moléculas. Além disso, a possibilidade de repatentear fármacos mais antigos, não só pela reformulação em micro/nano partículas mas também em sistemas injetáveis, é uma realidade a explorar.

Por último, é de referir que o estudo e a aplicação do quitosano e seus derivados no desenvolvimento de SLC está longe de ser considerado esgotado com esta breve revisão de conhecimentos.

Tabela 2.2 - Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura científica, relativos a sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos de base quitosano.

<i>estrutura do SLC</i>	<i>sistema polimérico</i>	<i>método de preparação</i>	<i>agente bioativo libertado</i>	<i>referências bibliográficas</i>
filme	quitosano/PAA,PHPMA,PVA, gelatina	formação de complexos	oxitetraciclina	Sokker <i>et al.</i> , 2009
	quitosano/polietilenoglicol	reticulação física com TPP	ciprofloxacina	Wang <i>et al.</i> , 2007
	quitosano/amido	reticulação química com glutaraldeído	ácido alfa-hidroxi	Viyoch <i>et al.</i> , 2005
	quitosano/amido	evaporação do solvente	curcumina	Boriwanwattanak <i>et al.</i> , 2008
	quitosano/gelatina	reticulação química com glutaraldeído	levamisol, cimetidina, e cloranfenicol	Yao <i>et al.</i> , 1995
	quitosano	reticulação química com glutaraldeído	ofloxacina	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2010
	quitosano	evaporação do solvente	propranolol ácido salicílico amicacina e daptomicina paclitaxel maleato de timolol hidroclorato de lidocaína	Rasool <i>et al.</i> , 2011 Michalak e Mucha, 2012 Noel <i>et al.</i> , 2008 Dhanikula e Panchagnula, 2004 Fulgêncio <i>et al.</i> , 2012 Thein-Han e Stevens, 2004
	quitosano	reticulação química com genipin e reticulação física com PVP	propranolol	Aldana <i>et al.</i> , 2012
sistema de partículas (microesferas/micropartículas)	quitosano/alginato	formação de PEC reforçada com reticulação química com genipin	indometacina	Mi <i>et al.</i> , 2002
	quitosano/sulfato de condroitina	reticulação química com glutaraldeído	5-fluorouracil	Huang <i>et al.</i> , 2010

Tabela 2.2 - Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura científica, relativos a sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos de base quitosano. (cont.)

<i>estrutura do SLC</i>	<i>sistema polimérico</i>	<i>método de preparação</i>	<i>agente bioativo libertado</i>	<i>referências bibliográficas</i>	
sistema de partículas (microesferas/micropartículas)	<i>N,O</i> -carboximetilquitosano/alginate	reticulação química com genipin	BSA	Chen <i>et al.</i> , 2004	
		reticulação química com glutaraldeído	BSA	Mi <i>et al.</i> , 2005	
		reticulação química com glutaraldeído	BSA	Mi <i>et al.</i> , 2005	
		reticulação física com iões Ca ²⁺	BSA	Lin <i>et al.</i> , 2005	
		quitosano/ <i>N,N</i> -dimetilacrilamida	reticulação química com glutaraldeído	clorotiazida	Babu <i>et al.</i> , 2008
		quitosano/PAA/atapulgita/alginate de sódio	copolimerização de enxerto e reticulação com iões Ca ²⁺	diclofenac sódico	Wang <i>et al.</i> , 2009
		quitosano	reticulação química com genipin	claritromicina, tramadol e heparina BSA	Harris <i>et al.</i> , 2010 Karnchanajindanun <i>et al.</i> , 2011
		quitosano	reticulação química com glutaraldeído	insulina aciclovir	Jain <i>et al.</i> , 2007 Genta <i>et al.</i> , 1997
		quitosano	reticulação física com TPP e PP	6-mercaptopurina	Mi <i>et al.</i> , 1999
		quitosano	reticulação física com citrato de sódio	diclofenac sódico	El-Leithy <i>et al.</i> , 2010
	quitosano	reticulação física com TPP	aciclovir gentamicina	Genta <i>et al.</i> , 1997 Phromsopa e Baimark, 2010	
	quitosano	<i>spray-drying</i>	cloro-hexidina	Giunchedi <i>et al.</i> , 2002	

Tabela 2.2 - Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura científica, relativos a sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos de base quitosano. (cont.)

<i>estrutura do SLC</i>	<i>sistema polimérico</i>	<i>método de preparação</i>	<i>agente bioativo libertado</i>	<i>referências bibliográficas</i>
sistema de partículas (microesferas/micropartículas)	quitosano	<i>spray-drying</i>	metoclopramida	Gavini <i>et al.</i> , 2008
	metil pirrolidona quitosano	<i>spray-drying</i>	metoclopramida	Gavini <i>et al.</i> , 2008
	quitosano/ácido fítico	reticulação física com TPP	insulina	Lee <i>et al.</i> , 2011
sistema de partículas (nanopartículas)	quitosano	reticulação física com TPP	leucovorin e 5-fluorouracil BSA ciclosporina A ácido ascórbico DNA insulina	Li <i>et al.</i> , 2011 Gan e Wang, 2007; Xu e Du, 2003 De Campos <i>et al.</i> , 2001 Jang e Lee, 2008 Gaspar <i>et al.</i> , 2011; Iqbal <i>et al.</i> , 2003 Azevedo <i>et al.</i> , 2011; Fernández-Urrusuno <i>et al.</i> , 1999; Makhlof <i>et al.</i> , 2011
	quitosano	reticulação química com glutaraldeído	conjugado dextrano-doxorrubicina	Mitra <i>et al.</i> , 2001
	quitosano/poli(ácido glutâmico)	reticulação física	amoxicilina	Chang <i>et al.</i> , 2010
	quitosano/alginato	reticulação física (formação de PEC)	nifedipina	Li <i>et al.</i> , 2008
	quitosano/alginato/Pluronic F127	reticulação física	curcumina	Das <i>et al.</i> , 2010
	quitosano/alginato/ciclodextrina	formação de complexo	insulina	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	quitosano/ciclodextrina	reticulação física com TPP	glutathione	Leva <i>et al.</i> , 2009
	quitosano	precipitação	gemcitabina	Arias <i>et al.</i> , 2011

Tabela 2.2 - Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura científica, relativos a sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos de base quitosano. (cont.)

<i>estrutura do SLC</i>	<i>sistema polimérico</i>	<i>método de preparação</i>	<i>agente bioativo libertado</i>	<i>referências bibliográficas</i>
matriz injetável formada <i>in situ</i>	azida/quitosano/lactose	irradiação UV	paclitaxel	Obara <i>et al.</i> , 2005
	quitosano/PEG	copolimerização de enxerto e reticulação química com genipin	BSA	Bhattarai <i>et al.</i> , 2005
	quitosano/PVA	reticulação física	insulina	Agrawal <i>et al.</i> , 2010
	quitosano	reticulação física com β -GP	paclitaxel camptotecina doxorubicina insulina ofloxacina	Ruel-Gariépy e Leroux, 2004 Berrada <i>et al.</i> , 2005 Han <i>et al.</i> , 2008 Kempe <i>et al.</i> , 2008 Honsy, 2009
	quitosano quaternizado	reticulação física com α - β -GP	cloridrato de doxorubicina	Wu <i>et al.</i> , 2006
	quitosano quaternizado/PEG	reticulação física com α - β -GP	insulina	Wu <i>et al.</i> , 2007
	quitosano/PNIPAAm	copolimerização de enxerto	cisplatina e carboplatina maleato de timolol	Fang <i>et al.</i> , 2008 Cao <i>et al.</i> , 2007
	quitosano/amido	reticulação física com β -GP	condrócitos	Ngoenkam <i>et al.</i> , 2010
	quitosano/Pluronic	copolimerização de enxerto	condrócitos	Park <i>et al.</i> , 2009
	quitosano/monooleato de glicerol	reticulação física	paclitaxel	Jauhari e Dash, 2006

PAA - poli(ácido acrílico); PEG - poli(etilenoglicol); PHPMA - poli(hidroxi-propil-metacrilato); PVA - poli(vinil álcool); TPP - tripolifosfato de sódio; PP - polifosfato; PVP - poli(N-vinil-2-pirrolidona); BSA - albumina de soro bovino; DNA - ácido desoxirribonucleico; GP - fosfato dissódico de glicerol; PNIPAAm - poli(N-isopropilacrilamida)

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, *100*, 5-28.
- Agrawal, A. K.; Gupta, P. N.; Khanna, A.; Sharma R. K.; Chandrabanshi, H. K.; Gupta, N.; Patil, U. K.; Yadav, S. K. Development and characterization of *in situ* gel system for nasal insulin delivery. *Pharmazie* **2010**, *65*, 188-93.
- Aiba, S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 225-8.
- Aldana, A. A.; González, A.; Strumia, M. C.; Martinelli, M. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics* **2012**, *134*, 317-24.
- Allan, G. G.; Altman, L. C.; Bensinger, R. E.; Ghosh, D. K.; Hirabayashi, Y.; Neogi, A. N.; Neogi, S. Biomedical applications of chitin and chitosan. In *Chitin, chitosan and related enzymes*. Zikakis, J. P., Ed., Academic Press, Inc., London, **1984**, 119-33.
- Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* **2009**, *3*, 203-30.
- Arias, J. L.; Reddy, L. H.; Couvreur, P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 97-104.
- Azevedo, J. R.; Sizilio, R. H.; Brito, M. B.; Costa, A. M. B.; Serafini, M. R.; Araújo, A. A. S.; Santos, M. R. V.; Lira, A. A. M.; Nunes, R. S. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2011**, *106*, 685-9.
- Babu, V. R.; Hosamani, K. M.; Aminabhavi, T. M. Preparation and in-vitro release of chlorothiazide novel pH-sensitive chitosan-N,N-dimethylacrylamide semi-interpenetrating network microspheres. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *71*, 208-17.
- Bansal, V.; Sharma, P. K.; Sharma, N.; Pal, O. P.; Malviya, R. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research* **2011**, *5*, 28-37.
- Bassil, M.; Davenas, J.; El Tahchi, M. Electrochemical properties and actuation mechanisms of polyacrylamide hydrogel for artificial muscle application. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2008**, *134*, 496-501.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004a**, *57*, 19-34.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004b**, *57*, 35-52.
- Berrada, M.; Serreqi, A.; Dabbarh, F.; Owusu, A.; Gupta, A.; Lehnert, S. A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2115-20.
- Bhardwaj, V.; Shukla, V.; Goyal, N.; Malviya, R.; Sharma, P. K. Formulation and evaluation of different concentration chitosan based periodontal film of ofloxacin. *Journal of Pharmacy Research* **2010**, *3*, 528-32.
- Bhattarai, N.; Ramay, H. R.; Gunn, J.; Matsen, F. A.; Zhang, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release* **2005**, *103*, 609-24.

- Boriwanwattanak, P.; Ingkaninan, K.; Khorana, N.; Viyoch, J. Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled release matrix. *International Journal of Cosmetic Science* **2008**, *30*, 205-18.
- Brannon-Peppas, L. Polymers in controlled drug delivery. *Medical Plastics and Biomaterials* **1997**, *4*, 34-44.
- Breen, A.; O'Brien, T.; Pandit, A. Fibrin as a delivery system for therapeutic drugs and biomolecules. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2009**, *15*, 201-14.
- Butler, M. F.; Ng, Y-F; Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2003**, *41*, 3941-53.
- Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, *61*, 1391-401.
- Cao Y.; Zhang, C.; Shen, W.; Cheng, Z.; Yu, L. L.; Ping, Q. Poly(*N*-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2007**, *120*, 186-94.
- Chambon, F.; Winter, H. H. Linear viscoelasticity at the gel point of crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry. *Journal of Rheology* **1987**, *31*, 683-97.
- Chandra, R.; Rustgi, R. Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science* **1998**, *23*, 1273-335.
- Chang, C-H.; Lin, Y-H.; Yeh, C-L.; Chen, Y-C.; Chiou, S-F.; Hsu, Y-M.; Chen, Y-S.; Wang, C-C. Nanoparticles incorporated in pH-sensitive hydrogels as amoxicillin delivery for eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 133-42.
- Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **2001**, *22*, 261-8.
- Chen, S-C; Wu, Y-C; Mi, F-L; Lin, Y-H; Yu, L-C; Sung, H-W A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96*, 285-300.
- Chenite, A.; Buschmann, M.; Wang, D.; Chaput, C.; Kandani, N. Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*, 39-47.
- Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2155-61.
- Cho, Y. W.; Jang, J.; Park, C. R.; Ko, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 609-14.
- Choi, C. H. J.; Zuckerman, J. E.; Webster, P.; Davis, M. E. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 6656-61.
- Correia, C. R.; Moreira-Teixeira, L. S.; Moroni, L.; Reis, R. L.; Van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Mano, J. F. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering: Part C* **2011**, *17*, 717-30.
- Dang, J. M.; Leong, K. W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 487-99.
- Das, R. K.; Kasoju, N.; Bora, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6*, 153-60.

- Dash, A. K.; Cudworth, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **1998**, *40*, 1-12.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 981-1014.
- De Campos, A. M.; Sánchez, A.; Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *224*, 159-68.
- des Rieux, A.; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y.-J.; Pr at, V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* **2006**, *116*, 1-27.
- Dhanikula, A. B.; Panchagnula, R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *The AAPS Journal* **2004**, *6*, 1-12.
- Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337-51.
- Dumitriu, S.; Vidal, P. F.; Chornet, E. Hydrogels based on polysaccharides. In *Polysaccharides in medicinal applications*, Dumitriu, S., Ed., Marcel Dekker, **1996**, 125-241.
- Duvall, G. A.; Tarabar, D.; Seidel, R. H.; Elstad, N. L.; Fowers, K. D. Phase 2: a dose-escalation study of OncoGel (ReGel/paclitaxel), a controlled-release formulation of paclitaxel, as adjunctive local therapy to external-beam radiation in patients with inoperable esophageal cancer. *Anti-Cancer Drugs* **2009**, *20*, 89-95.
- Edlund, U.; Albertsson, A. C. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery, In *Degradable Aliphatic Polyesters: Advances in Polymer Science* (vol.157), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, **2002**, 67-112.
- El-Leithy, E. S.; Shaker, D. S.; Ghorab, M. K.; Abdel-Rashid, R. S. Evaluation of mucoadhesive hydrogels loaded with diclofenac sodium-chitosan microspheres for rectal administration. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1695-702.
- El-hefian, E. A.; Yahaya, A. H. Rheological study of chitosan and its blends: An overview. *Maejo International Journal of Science and Technology* **2010**, *4*, 210-20.
- El-Kamel, . H.; Ashri, L. Y.; Alsarra, I. A. Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases. *AAPS PharmSciTech* **2007**, *8*, (article 75), E1-E11.
- Faikrua, A.; Jeenapongsa, R.; Sila-asna, M.; Viyoch, J. Properties of β -glycerol phosphate/collagen/chitosan blend scaffolds for application in skin tissue engineering. *ScienceAsia* **2009**, *35*, 247-54.
- Fang, J-Y; Chen, J-P; Leu, Y-L; Hu, J-W. The delivery of platinum drugs form thermosensitive hydrogels containing different ratios of chitosan. *Drug Delivery* **2008**, *15*, 235-43.
- Fedorovich, N. E.; Alblas, J.; DeWijn, J. R.; Hennink, W. E.; Verbout, A. J.; Dhert, W. J. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: State of the art and novel application in organ printing - a review. *Tissue Engineering* **2007**, *13*, 1905-25.
- Fern andez-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Remu an-L pez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **1999**, *16*, 1576-81.
- Ferreira, P.; Coelho, J. F. J.; dos Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I.; Gil, M. H. Thermal characterization of chitosan-grafted membranes to be used as wound dressings. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2006**, *25*, 233-51.

- Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C. Polímeros Biodegradáveis - Uma solução para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova* **2006**, *29*, 811-6.
- Franck, A. Rheology of thermosets. *TA Instruments* **2004**, AAN015, 1-14.
- Fulgêncio, G. D.; Viana, F. A.; Ribeiro, R. R.; Yoshida, M. I.; Faraco, A. G.; Cunha-Júnior, A. D. New mucoadhesive chitosan film for ophthalmic drug delivery of timolol maleate: in vivo evaluation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **2012**, *28*, 350-8.
- Gan, Q.; Wang, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier - Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *59*, 24-34.
- Gan, T.; Zhang, Y.; Guan, Y. In Situ Gelation of P(NIPAM-HEMA) microgel dispersion and its applications as injectable 3D cell scaffold. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1410-5.
- Gaspar, V. M.; Correia, I. J.; Sousa, A.; Silva, F.; Paquete, C. M.; Queiroz, J. A.; Sousa, F. Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. *Journal of Controlled Release* **2011**, *156*, 212-22.
- Gavini, E.; Rassu, G.; Muzzarelli, C.; Cossu, M.; Giunchedi, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *68*, 245-52.
- Genta, I.; Conti, B.; Perugini, P.; Pavanetto, F.; Spadaro, A.; Puglisi, G. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1997**, *49*, 737-42.
- Gil, M. H.; Ferreira, P. Polissacarídeos como biomateriais. *Química* **2006**, *100*, 72-4.
- Giunchedi, P.; Juliano, C.; Gavini, E.; Cossu, M.; Sorrenti, M. Formulation and *in vivo* evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2002**, *53*, 233-9.
- Gomes, M.; Azevedo, H.; Malafaya, P.; Silva, S.; Oliveira, J.; Silva, G.; Sousa, R.; Mano, J.; Reis, R. Chapter 6. Natural polymers in tissue engineering applications. In *Tissue engineering*. van Blitterswijk, C.; Thomsem, P.; Lindahl, A.; Hubbell, J.; Williams, D.; Cancedda, R.; de Bruijn, J.; Sohier, J., Eds., 1st ed., Elsevier, **2008**, 145-92.
- Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova* **2011**, *34*, 1215-23.
- Hafeti, A.; Amsden, B. Biodegradable injectable *in situ* forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2002**, *80*, 9-28.
- Haley, B.; Frenkel, E., Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* **2008**, *26*, 57-64.
- Han, H. D.; Song, C. K.; Park, Y. S.; Noh, K. H.; Kim, J. H.; Hwang, T.; Kim, T. W.; Shin, B. C. A chitosan hydrogel-based cancer drug delivery system exhibits synergistic antitumor effects by combining with a vaccinia viral vaccine. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *350*, 27-34.
- Harris, R.; Lecumberri, E.; Heras, A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: clarithromycin, tramadol and heparin. *Marine Drugs* **2010**, *8*, 1750-62.
- He, P.; Davis, S. S.; Illum, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *166*, 75-88.
- Helander, I. M.; Nurmiäho-Lassila, E. L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiol* **2001**, *71*, 235-44.

- Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 13-36.
- Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* **1989**, 10, 574-6.
- Hoemann, C. D.; Sun, J.; Legare, A.; McKee, M. D.; Buschmann, M. D. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* **2005**, 13, 318-29.
- Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 43, 3-12.
- Honsy K. M. Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin. *AAPS PharmaSciTech* **2009**, 10, 1336-42.
- Huang, L. Y.; Yang, M. C. Behaviors of controlled drug release of magnetic gelatin hydrogel coated stainless steel for drug-eluting-stents application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, 310, 2874-6.
- Huang, L.; Sui, W.; Wang, Y.; Jiao, Q. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80, 168-73.
- Huang, M.; Khor, E.; Lim, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21, 344-53.
- Hwang, J. K.; Shin, H. H. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal* **2000**, 12, 175-9.
- Hwang, K. T.; Kim, J. T.; Jung, S. T.; Cho, G. S.; Park, H. J. Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, 89, 3476-84.
- Ieva, E.; Trapani, A.; Cioffi, N.; Ditaranto, N.; Monopoli, A.; Sabbatini, L. Analytical characterization of chitosan nanoparticles for peptide drug delivery applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, 207-15.
- Iqbal, M.; Lin, W.; Jabbar-Gill, I.; Davis, S. S.; Steward, M. W.; Illum, L. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine* **2003**, 21, 1478-85.
- Jain, S. K.; Jain, N. K.; Gupta, Y.; Jain, A.; Jain, D.; Chaurasia, M. Mucoadhesive chitosan microspheres for non-invasive and improved nasal delivery of insulin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 69, 498-504.
- Jang, K-I; Lee, H. G. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 1936-41.
- Jauhari, S.; Dash, A. K. A mucoadhesive *in situ* gel delivery system for Paclitaxel. *AAPS PharmSciTech* **2006**, 7, E1-E6.
- Jeong, S. H.; Huh, K. M.; Park, K. Chapter 5. Hydrogel drug delivery systems. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G., Eds., Taylor & Francis, Boca Raton, **2006**, 49-62.
- Jin, J.; Song, M.; Hourston, D. J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 162-8.
- Job, N.; Panariello, F.; Crine, M.; Pirard, J-P; Léonard, A. Rheological determination of the sol-gel transition during the aqueous synthesis of resorcinol-formaldehyde resins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, 293, 224-8.

- Karnchanajindanun, J.; Srisa-ard, M.; Baimark, Y. Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85*, 674-80.
- Kempe, S.; Metz, H.; Bastrop, M.; Hvilsom, A.; Contri, R. V.; Mader, K. Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *68*, 26-33.
- Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *5*, 205-12.
- Khora, E.; Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2339-49.
- Khurma, J. R.; Rohindra, D. R.; Nand, A. V. Swelling and thermal characteristics of genipin crosslinked chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels. *Polymer Bulletin* **2005**, *54*, 195-204.
- Kim, I-Y.; Seo, S-J.; Moon, H-S.; Yoo, M-K.; Park, I-Y.; Kim, B-C.; Cho, C-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* **2008**, *26*, 1-21.
- Kim, S. K.; Rajapakse, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydrate Polymer* **2005**, *62*, 357-68.
- Kiyozumi, T.; Kanatani, Y.; Ishihara, M.; Saitoh, D.; Shimizu, J.; Yura, H.; Suzuki, S.; Okada, Y.; Kikuchi, M. The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. *Burns* **2007**, *33*, 642-8.
- Klokkevold, P. R.; Fukayama, H.; Sung, E. C.; Bertolami, C. N. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **1999**, *57*, 49-52.
- Kofuji, K.; Qian, C-J; Nishimura, M.; Sugiyama, I.; Murata, Y.; Kawashima, S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal* **2005**, *41*, 2784-91.
- Kurita, K.; Kaji, Y.; Mori, T. Nishiyama, Y. Enzymatic degradation of [beta]-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers* **2000**, *42*, 19-21.
- Lee, H.; Jeong, C.; Ghafoor, K.; Cho, S.; Park, J. Oral delivery of insulin using chitosan capsules cross-linking with phytic acid. *Bio-Medical Materials and Engineering* **2011**, *21*, 25-36.
- Lee, K. Y.; Yuk, S. H. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 669-97.
- Lehr, C. M.; Bouwstra, J. A.; Schacht, E. H.; Junginger, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *78*, 43-8.
- Lenz, R. W. Biodegradable polymers. In *Advances in Polymer Science: Biopolymers I* (vol.107), Peppas, N. A.; Langer, R. S., Eds., Springer-Verlag, Berlin, **1993**, 3-39.
- Leone, G.; Delfini, M.; Di Cocco, M. R.; Borioni, A.; Barbucci, R. The applicability of an amidated polysaccharide hydrogel as a cartilage substitute: structural and rheological characterization. *Carbohydrate Research* **2008**, *343*, 317-27.
- Li, P.; Dai, Y.-N.; Zhang, J.-P.; Wang, A.-Q.; Wei, Q. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science* **2008**, *4*, 221-8.
- Li, P.; Wang, Y.; Peng, Z.; She, F.; Kong, L. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85*, 698-704.

- Lin, C. C.; Anseth, K. S.; PEG Hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, 631-43.
- Lin, Y-H; Liang, H-F; Chung, C-K; Chen, M-C; Sung, H-W. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2105-13.
- Lin-Gibson, S.; Walls, H. J.; Kennedy, S. B.; Welsh, E. R. Reaction kinetics and gel properties of blocked diisocyanate crosslinked chitosan hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *54*, 193-9.
- Liu, T-Y; Lin, Y-L. Novel pH-sensitive chitosan-based hydrogel for encapsulating poorly water-soluble drugs. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 1423-9.
- Lopes da Silva, J. A.; Rao, M. A.; Fu, J-T. Chapter 5. Rheology of structure development and loss during gelation and melting. In *Phase/state transitions in foods*, Rao, M. A.; Hartel, R. W., Eds., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, **1998**, 111-57.
- Madan, M.; Bajaj, A.; Lewis, S.; Udupa, N.; Baig, J. A. *In situ* forming polymeric drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *71*, 242-51.
- Madbouly, S. A.; Otaigbe, J. U. Rheokinetics of thermal-induced gelation of waterborne polyurethane dispersions. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10178-84.
- Makhlof, A.; Tozuka, Y.; Takeuchi, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutics Sciences* **2011**, *42*, 445-51.
- Malkin, A. Ya. *Rheology Fundamentals*, ChemTec Publishing, Canada, **1994**.
- Mansur, H. S.; de S. Costa Jr., E.; Mansur, A. A. P.; Barbosa-Stancioli, E. F. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29*, 1574-83.
- Mengatto, L. N.; Helbling, I. M.; Luna, J. A. Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* **2012**, *6*, 156-70.
- Mezger, T. G. *The rheology handbook*. 2nd ed., Vincentz Network GmbH & Co. KG, Hannover, **2006**.
- Mi, F-L.; Liang, H-F; Wu, Y-C; Lin, Y-S; Yang, T-F; Sung, H-W. pH-sensitive behavior of two-component hydrogels composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* **2005**, *16*, 1333-45.
- Mi, F-L; Shyu, S-S; Wong, T-B; Jang, S-F; Lee, S-T; Lu, K-T. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, *74*, 1093-107.
- Mi, F-L; Sung, H-W; Shyu, S-S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 2804-14.
- Mi, F-L; Sung, H-W; Shyu, S-S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers* **2002**, *48*, 61-72.
- Michalak, I.; Mucha, M. The release of active substances from selected carbohydrate biopolymer membranes. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 2432-8.
- Mitra, S.; Gaur, U.; Ghosh, P. C.; Maitra, A. N. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release* **2001**, *74*, 317-23.

- Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 653-62.
- Moschou, E. A.; Madou, M. J.; Bachas, L. G.; Daunert, S. Voltage-switchable artificial muscles actuating at near neutral pH. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, *115*, 379-83.
- Mufamadi, M. S.; Pillay, V.; Choonara, Y. E.; Du Toit, L. C.; Modi, G.; Naidoo, D.; Ndesendo, V. M. K. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*, 1-19.
- Muzzarelli, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77*, 1-9.
- Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **2006**, *102*, 47-90.
- Narita, A.; Takahara, M.; Ogino, T.; Fukushima, S.; Kimura, Y.; Tabata, Y. Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *Knee* **2009**, *16*, 285-89.
- Neel, E. A. A.; Bozec, L.; Knowles, J. C.; Syed, O.; Mudera, V.; Day, R.; Hyun, J. K. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, *65*, 429-56.
- Ngoenkam, J.; Faikrua, A.; Yasothornsrikul, S.; Viyoch, J. Potential of an injectable chitosan/starch/ β -glycerol phosphate hydrogel for sustaining normal chondrocyte function. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *391*, 115-24.
- Noel, S. P.; Courtney, H.; Bumgardner, J. D.; Haggard, W. O. Chitosan films: A potential local drug delivery system for antibiotics. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2008**, *466*, 1377-82.
- Obara, K.; Ishihara, M.; Ozeki, Y.; Ishizuka, T.; Hayashi, T.; Nakamura, S.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsuib, T.; Hattorib, H.; Takase, B.; Ishihara, M.; Kikuchi, M.; Maehara, T. Controlled release of paclitaxel from photocrosslinked chitosan hydrogels and its subsequent effect on subcutaneous tumor growth in mice. *Journal of Controlled Release* **2005**, *110*, 79-89.
- Ohshima, Y.; Nishino, K.; Yonekura, Y.; Kishimoto, S.; Wakabayashi, S. Clinical application of chitin non-woven fabric as wound dressing. *European Journal of Plastic Surgery* **1987**, *10*, 66-9.
- Okamoto, Y.; Kawakami, K.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer* **2002**, *49*, 249-52.
- Okamoto, Y.; Minami, S.; Matsuhashi, A.; Sashiwa, H.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Tanigawa, T.; Tanaka, Y.; Tokura, S. Application of polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) to veterinary practice. *Journal of Veterinary Medical Science* **1993**, *55*, 743-7.
- Olsen, D.; Yang, C. L.; Bodo, M.; Chang, R.; Leigh, S.; Baez, J.; Carmichael, D.; Perala, M.; Hamalainen, E. R.; Jarvinen, M.; Polarek, J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1547-67.
- Ouwerx, C.; Velings, N.; Mestdagh, M. M.; Axelos, M. A. V. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* **1998**, *6*, 393-408.
- Park, K. M.; Lee, S. Y.; Young, Y. K.; Na, J. S.; Lee, M. C.; Park, K. D. Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 1956-65.
- Park, P. J.; Je, J. Y.; Jung, W. K.; Ahn, C. B.; Kim, S. K. Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology* **2004a**, *219*, 529-33.

- Park, P. J.; Je, J. Y.; Kim, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymer* **2004b**, *55*, 17-22.
- Patil, G. V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research* **2003**, *58*, 219-47.
- Pedro, A. S.; Cabral-Albuquerque, E.; Ferreira, D.; Sarmento, B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers* **2009**, *76*, 501-8.
- Peng, C.; Wang, Y.; Tang, Y. Synthesis of cross-linked chitosan-crownethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions. *Journal of Applied Polymer Science Symposium* **1998**, *70*, 501-6.
- Peng, L.; Cheng, X. R.; Wang, W. W.; Xu, D. X.; Wang, G. Preparation and evaluation of porous chitosan/collagen scaffolds for periodontal tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2006**, *21*, 207-20.
- Phromsopha, T.; Baimark, Y. Chitosan microparticles prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug delivery. *Biotechnology* **2010**, *9*, 61-6.
- Pramanik, N.; Mishra, D.; Banerjee, I.; Maiti, T. K.; Bhargava, P.; Pramanik, P. Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biomaterials* **2009**, *2009*, 1-8.
- Rao, S. B.; Sharma, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *34*, 21-8.
- Rasool, B. K. A.; Aziz, U. S.; Sarheed, O.; Rasool, A. A. A. Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Acta Pharmaceutica* **2011**, *61*, 271-82.
- Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *46*, 1-27.
- Ravi Kumar, M. N. V.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 6017-84.
- Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* **2008**, *57*, 397-430.
- Roldo, M.; Hornof, M.; Caliceti, P.; Bernkop-Schnurch, A. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57*, 115-21.
- Ruel-Gariépy, E.; Chenite, A.; Chaput, C.; Guirguis, S.; Leroux, J. C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *203*, 89-98.
- Ruel-Gariépy, E.; Leroux, J. C. *In situ*-forming hydrogels - review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 409-26.
- Ruszczak, Z.; Friess, W. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1679-98.
- Sailaja, A. K.; Amareshwar, P.; Chakravarty, P. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Research Journal of Pharmaceutical: Biological and Chemical Sciences* **2010**, *1*, 474-84.
- Santos, K. S. C. R.; Coelho, J. F. J.; Ferreira, P.; Pinto, I.; Lorenzetti, S. G.; Ferreira, E. I.; Higa, O. Z.; Gil, M. H. Synthesis and characterization of membranes obtained by graft

copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 310, 37-45.

Sashiwa, H.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Ogawa, R.; Tokura, S. Distribution of the acetamide group in partially deacetylated chitins. *Carbohydrate Polymers* **1991**, 16, 291-6.

Schiffman, J. D.; Schauer, C. L. Cross-linking chitosan nanofibers. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 594-601.

Schipper, N. G.; Varum, K. M.; Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharmaceutical Research* **1996**, 13, 1686-92.

Shigemasa, Y.; Saito, K.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International Journal of Biological Macromolecules* **1994**, 16, 43-9.

Shih, I.-L.; Shen, M.-H.; Van, Y.-T. Microbial synthesis of poly([epsilon]-lysine) and its various applications. *Bioresource Technology* **2006**, 97, 1148-59.

Shoichet, M. S. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* **2010**, 43, 581-91.

Shravani, D.; Lakshmi, P. K. Preparation, characterization and potential applications of thermosensitive polymers - a review. *Pharma science monitor: an international journal of pharmaceutical sciences* **2011**, 2, 48-71.

Shu, X. Z., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y., Prestwich, G. D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, 25, 1339-48.

Shu, X. Z.; Zhu, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 201, 51-58.

Silva, H. S. R. C.; dos Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova* **2006**, 29, 776-85.

Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2764-74.

Sinha, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 274, 1-33.

Sokker, H. H.; Abdel Ghaffar, A. M.; Gad, Y. H.; Aly, A. S. Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 75, 222-9.

Song, F.; Zhang L. Gelation modification of soy protein isolate by a naturally occurring cross-linking agent and its potential biomedical application. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, 48, 7077-83.

Sorbara, L.; Jones, L.; Williams-Lyn, D. Contact lens induced papillary conjunctivitis with silicone hydrogel lenses. *Contact Lens and Anterior Eye* **2009**, 32, 93-6.

Steffe, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. 2nd Ed., Freeman Press, USA, **1996**.

Suh, J. K.; Matthew, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* **2000**, 21, 2589-98.

Sun, K. H.; Sohn, Y. S.; Jeong, B. Thermogelling poly(ethylene oxide-b-propylene oxide-b-ethylene oxide) disulfide multiblock copolymer as a thiol-sensitive degradable polymer. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2871-7.

- Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. L., Tsai, C. C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* **1999**, 10, 63-78.
- Ta, H. T.; Dass, C. R.; Dunstan, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. *Journal of Controlled Release* **2008**, 126, 205-16.
- Thein-Han, W. W.; Stevens, W. F. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2004**, 30, 397-404.
- Tomihata, K.; Ikada, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* **1997**, 18, 567-75.
- Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1387-408.
- Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K-H; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* **2012**, 84, 377-410.
- Viyoch, J.; Sudedmark, T.; Srema, W.; Suwonkrua, W. Development of hydrogel patch for controlled release of alpha-hydroxy acid contained in tamarind fruit pulp extract. *International Journal of Cosmetic Science* **2005**, 27, 89-99.
- Wallace, D. G.; Rosenblatt, J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 1631-49.
- Wang, J. J.; Zeng, Z. W.; Xiao, R. Z.; Xie, T.; Zhou, G. L.; Zhan, X. R.; Wang, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 6, 765-74.
- Wang, L.; Stegemann, J. P. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with beta-glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, 31, 3976-85.
- Wang, Q.; Dong, Z.; Du, Y.; Kennedy, J. F. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 69, 336-43.
- Wang, Q.; Zhang, J.; Wang, A. Preparation and characterization of a novel pH-sensitive chitosan-g-poly(acrylic acid)/attapulgate/sodium alginate composite hydrogel bead for controlled release of diclofenac sodium. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 78, 731-7.
- Weng, L.; Chen, X.; Chen, W. Rheological characterization of *in situ* crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1109-15.
- Wichterle, O.; Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **1960**, 185, 117-8.
- Williams, S. F.; Martin, D. P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers: Polyesters III - Applications and commercial products* (vol.4). Doi, Y.; Steibüchel, A., Eds., Wiley-VCH, **2002**, 91-128.
- Winter, H. H.; Chambon, F. Analysis of linear viscoelasticity of crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology* **1986**, 30, 367-82.
- Winter, H. H.; Mours, M. Rheology of Polymers Near Liquid-Solid Transitions. *Advances in Polymer Science* **1997**, 134, 165-234.
- Wu, J.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 315, 1-11.

- Wu, J.; Wei, W.; Wang, L-Y; Su, Z-G; Ma, G-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2220-32.
- Xing, R.; Liu, S.; Guo, Z.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C.; Li, Z.; Li, P. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 1573-7.
- Xu, Y.; Du, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *250*, 215-26.
- Yang, J.; Tian, F.; Wang, Z.; Wang, Q.; Zeng, Y-J, Chen, S-Q. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2008**, *84*, 131-7.
- Yao, K. D.; Yin, Y. J.; Xu, M. X.; Wang, Y. F. Investigation of pH sensitive drug delivery system of chitosan/gelatin hybrid polymer network. *Polymer International* **1995**, *38*, 77-82.
- Yi, H.; Wu, L. Q.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2881-94.
- Young, S.; Wong, M.; Tabata, Y.; Mikos, A. G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release* **2005**, *109*, 256-74.
- Yu, L.; Dean, K.; Li, L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31*, 576-602.
- Yu, L.; Ding, J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1473-81.
- Zhang, H.; Neau, S. H. *In vitro* degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1653-8.
- Zhang, J.; Lan, C. Q.; Post, M.; Simard, B.; Deslandes Y.; Hsieh, T. H. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Cancer Genomics & Proteomics* **2006**, *3*, 147-58.
- Zhang, L.; Rakotondradany, F.; Myles, A. J.; Fenniri, H.; Webster, T. J. Arginine-glycine-aspartic acid modified rosette nanotube hydrogel composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1309-20.
- Zhang, N.; Li, J.; Jiang, W.; Ren, C.; Li, J.; Xin, J.; Li, K. Effective protection and controlled release of insulin by cationic β -cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *393*, 212-8.
- Zhou, X.; Zhang, X.; Yu, X.; Zha, X.; Fu, Q.; Liu, B.; Wang, X.; Chen, Y.; Chen, Y.; Shan, Y.; Jin, Y.; Wu, Y.; Liu, J.; Kong, W.; Shen, J. The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials* **2008**, *29*, 111-7.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

SUMÁRIO

Este capítulo inicia-se pela apresentação de um resumo da estratégia experimental adotada, à qual se segue a descrição dos materiais utilizados, bem como dos procedimentos de preparação dos vários tipos de hidrogéis de base quitosano. São igualmente descritas as metodologias utilizadas na execução experimental do trabalho, bem como na caracterização das matrizes obtidas, tendo em consideração que estas se destinam à área biomédica, concretamente à libertação de fármacos.

3.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	73
3.2	MATERIAIS	75
3.3	PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	77
3.4	MORFOLOGIA E ESTRUTURA	84
3.5	AVALIAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO	86
3.6	CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	88
3.7	CARACTERIZAÇÃO COM VISTA A APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	90
3.8	ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	94
3.9	ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	96
3.10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Com este trabalho pretende-se, como já foi referido nos Capítulos 1 e 2, preparar um sistema injetável, de base quitosano, capaz de ser produzido *in situ* (em condições fisiológicas de temperatura e pH), com vista a ser aplicado na área farmacêutica ou biomédica. Um resumo das principais etapas do trabalho a desenvolver é apresentado na Figura 3.1.

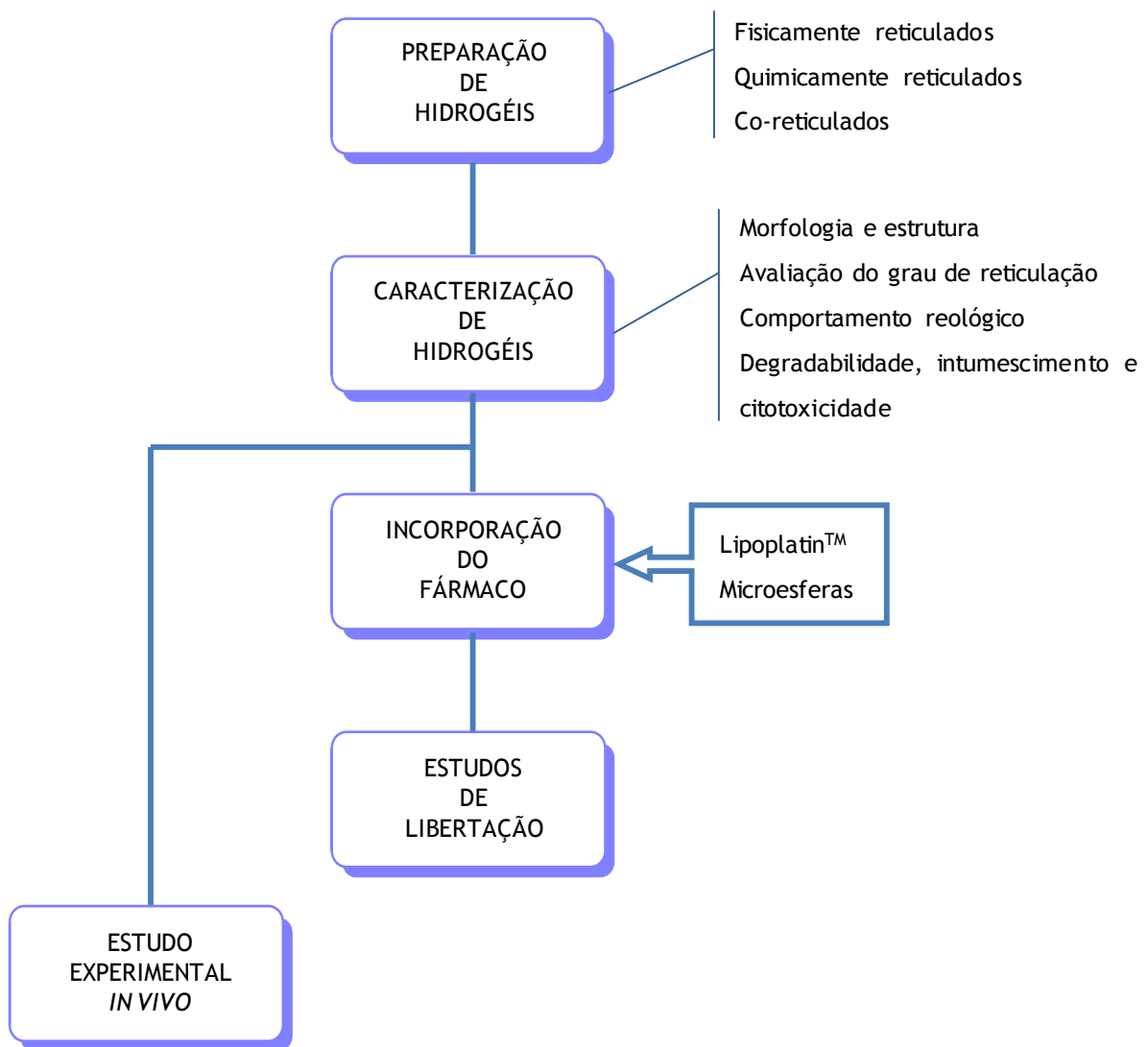


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas experimentais do desenvolvimento do trabalho.

Como se depreende do fluxograma, a primeira etapa consiste na preparação de vários tipos de hidrogéis de base quitosano: i) reticulados fisicamente; ii) reticulados quimicamente; e

iii) co-reticulados, ou seja, preparados a partir da combinação de um mecanismo de reticulação física e outro envolvendo reticulação química. Como se discutiu no Capítulo 2, os hidrogéis de quitosano reticulados ionicamente além de serem termossensíveis, são também termorreversíveis e exibem, em geral, fracas propriedades mecânicas. Em contrapartida, a reticulação química resultante do estabelecimento de ligações covalentes ao longo das cadeias poliméricas origina uma estabilidade permanente da rede. É neste quadro, e por forma a agregar as vantagens de ambos os tipos de reticulação, que surge a ideia de preparar hidrogéis de quitosano co-reticulados, isto é, reticulados iónica e covalentemente. Em princípio, estes hidrogéis conjugam, na mesma matriz, as vantagens de cada um dos tipos de reticulação. De notar que a utilização do reticulante físico tem simultaneamente o objetivo de neutralizar a solução de quitosano (requisito necessário para trabalhar em condições fisiológicas).

Os vários tipos de hidrogéis produzidos foram caracterizados a nível morfológico e estrutural através de microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*), abreviadamente SEM, microscopia eletrónica de varrimento ambiental (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), abreviadamente ESEM, porosimetria de intrusão de mercúrio e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), vulgarmente designada por FTIR. A quantificação da extensão da reação de reticulação, quer física, quer química, foi levada a cabo através do ensaio da ninidrina.

Uma vez que o comportamento dos sistemas injetáveis, formados *in situ*, é fortemente influenciado pelas suas propriedades reológicas, estas foram exaustivamente investigadas. Como, por outro lado, um sistema polimérico projetado para aplicações biomédicas deve obedecer a determinados requisitos, designadamente no que respeita à degradabilidade, capacidade de absorção de água e citotoxicidade, estas propriedades foram igualmente avaliadas.

De salientar que nem todos os sistemas foram totalmente caracterizados mas apenas os mais promissores, ou seja, os sistemas capazes de serem produzidos *in situ* e em condições fisiológicas de temperatura e de pH (ou seja, os hidrogéis reticulados fisicamente e os co-reticulados). Estes foram ainda investigados quanto ao seu potencial de utilização como sistemas de libertação de um fármaco antitumoral - a cisplatina. Com este objetivo, foi planeado um extenso conjunto de testes de libertação *in vitro*. Numa primeira fase incorporou-se o fármaco, por dissolução, na matriz polimérica e procedeu-se ao estudo da sua libertação. Seguidamente, e com o intuito de prolongar no tempo a libertação do fármaco, utilizaram-se duas metodologias alternativas: o encapsulamento do fármaco em lipossomas seguido da incorporação destes na matriz polimérica; e a imobilização do fármaco em microesferas, propositadamente preparadas para o efeito, as quais foram posteriormente dispersas na matriz. A cinética de libertação foi analisada para ambos os sistemas.

Por último, e dado que os hidrogéis desenvolvidos no presente trabalho se destinam a aplicações na área biomédica, foi realizado um estudo experimental *in vivo*, em modelo animal, que teve como principal motivação verificar a formação e a permanência do hidrogel no local de injeção e avaliar a intensidade da resposta inflamatória.

3.2 MATERIAIS

O quitosano (abreviadamente C), utilizado na preparação de todos os hidrogéis, com uma massa molecular de $\sim 2 \times 10^5$ Dalton e com um grau de desacetilação de 87% (calculado a partir da razão carbono/nitrogénio por análise elemental, num equipamento modelo EA1108 CHNS-O, Fissons Instruments) foi adquirido à Sigma-Aldrich, Portugal, na forma de pó. O polímero, cuja estrutura química se encontra representada na Figura 2.4 B, foi usado tal como apresentado na embalagem, não tendo sido alvo de qualquer tratamento ou purificação.

O sal fosfato dissódico de glicerol (abreviadamente GP) ($C_3H_7Na_2O_6P \cdot xH_2O$; FW=218,05), adquirido também à empresa Sigma-Aldrich, Portugal, foi usado não só para ajustar o valor do pH das soluções de quitosano, mas também como reticulante físico (iónico). A estrutura química do sal encontra-se representada na Figura 3.2.

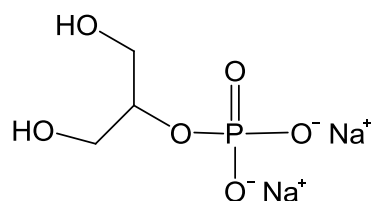


Figura 3.2 - Estrutura química do fosfato dissódico de glicerol.

O genipin (abreviadamente GE), cujo nome da IUPAC é metil-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclonona-4,8-dieno-5-carboxilato, usado como reticulante químico, foi fornecido pela Challenge Bioproducts Co., Taiwan, na forma de pó cristalino e com um grau de pureza analítico. Nos últimos anos o genipin, cuja estrutura química se encontra representada na Figura 2.10 C, tem sido muito investigado como agente reticulante para o quitosano (em alternativa ao glutaraldeído, um agente sintético comumente usado), graças à sua origem natural, baixa toxicidade (10000 vezes menos tóxico que o glutaraldeído) e elevada biocompatibilidade (Sung *et al.*, 1999). Uma outra vantagem que distingue o genipin dos demais agentes reticulantes para o quitosano é a sua elevada seletividade aos grupos amina primários (Chen *et al.*, 2005).

A cisplatina ou cis-diamino-dicloroplatina (II) (abreviadamente CDDP) ($Pt(NH_3)_2Cl_2$; FW=300,05), usada como modelo de fármaco nos estudos de libertação, foi adquirida à Sigma-Aldrich, Portugal, com um grau de pureza superior a 99,9%.

Este fármaco foi identificado como agente citotóxico por Rosenberg e seus colaboradores na década de 60 (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1967), teve a sua primeira aplicação clínica nos anos 70 e continua a ser a pedra-chave em tratamentos de quimioterapia moderna. A CDDP, aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico em 1978, é um dos fármacos

mais amplamente utilizados no tratamento de vários tumores sólidos, incluindo cancro de pulmão, colo do útero, testículos, cabeça e pescoço, bexiga e carcinoma de ovário (Canta *et al.*, 2011).

A CDDP é um complexo metálico inorgânico divalente e hidrossolúvel que tem na sua constituição platina (Figura 3.3).

O mecanismo de ação deste complexo baseia-se na sua ligação covalente ao DNA, interferindo nos processos de transcrição e replicação celular, o que causa apoptose e necrose celular, mas também nos processos de síntese proteica.

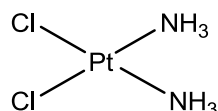


Figura 3.3 - Estrutura molecular da cisplatina.

Não obstante, a eficácia da CDDP é limitada por uma série de efeitos colaterais e mecanismos de resistência associados à sua administração. Alguns dos efeitos colaterais mais reportados na literatura são náuseas e vômitos, depressão da medula óssea, nefrotoxicidade e necrose (Canta *et al.*, 2011).

A LipoplatinTM, formulação lipossomal de cisplatina, em que a droga se encontra encapsulada em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja (SPC-3), colesterol, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e diestearoilfosfatidiletanolamina-metoxi-poli-etilenoglicol 2000 (mPEG₂₀₀₀-DSPE), é constituída por 8,9% de cisplatina e 91,1% de lípidos (w/w) (Canta *et al.*, 2011). Esta formulação foi gentilmente cedida pela Regulon AE, Atenas, Grécia e apresenta um certificado de análise cujos principais parâmetros se resumem na Tabela 3.1.

A LipoplatinTM, que atualmente se encontra em testes clínicos de fase III, foi desenvolvida com o intuito de reduzir a toxicidade sistémica da CDDP, direcioná-la para os sítios tumorais e aumentar a sua concentração no tecido alvo (Boulikas, 2009; Stathopoulos, 2010).

A solução salina tampão fosfato (PBS; pH = 7,4) foi preparada pela dissolução de um comprimido em 200 mL de água destilada. O produto foi fornecido, na forma de comprimidos, pela Sigma-Aldrich, Portugal.

A lisozima, obtida da clara de ovo de galinha (~40000 unidades/mg) e usada nos estudos de degradação enzimática das matrizes, foi adquirida à B.D.H. Laboratory Chemicals Division, England.

O meio de cultura DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High Glucose*), o soro fetal de bovino (FBS), os antibióticos estreptomomicina e penicilina (100 µg/mL e 100 unidades/mL, respetivamente), a solução de tripsina 0,25% e a rezasurina (composto conhecido comercialmente

por Alamar Blue®) usados nos ensaios de determinação da citotoxicidade dos materiais foram fornecidos pela Sigma Chemical (St. Louis, MO).

Tabela 3.1 - Parâmetros de análise da Lipoplatin™ (Batch 90.16) constantes no certificado de análise.

aparência da formulação (ausência de agregados)	satisfatório
pH da suspensão	6,90 (25 °C)
concentração de cisplatina (por espectroscopia de absorção atômica, com chama)	2,98 mg/mL
diâmetro médio	94,2 nm
distribuição de tamanhos (em massa)	50 - 11 nm (> 99,5%) > 50 nm (< 0,5%)
cor	opaca
osmolalidade	1520 mOsm/kg
potencial-zeta (água/5% dextrose, mV)	-55,8/-46,5
vestígios bacterianos	negativo
data de fabrico	Março de 2009
data de expiração (em condições de refrigeração)	Março de 2012

Todos os outros reagentes e solventes, usados no presente trabalho, foram de grau de pureza analítico (P.A.).

3.3 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Conforme referido (Secção 3.1), no âmbito deste trabalho, foram preparados vários tipos de hidrogéis de base quitosano:

- hidrogéis reticulados fisicamente, utilizando como reticulante o fosfato dissódico de glicerol (GP);
- hidrogéis reticulados quimicamente com diferentes concentrações de genipin (GE) (fundamentalmente utilizados como controlo em alguns estudos de caracterização);
- hidrogéis co-reticulados, ou seja, preparados a partir da combinação de um mecanismo de reticulação físico e outro químico, utilizando como reticulantes o GP e o GE, este último em diferentes concentrações.

Os hidrogéis fisicamente reticulados, usando o GP, foram, como já se disse (Capítulo 2), desenvolvidos pela primeira vez por Chenite e seus colaboradores (Chenite *et al.*, 2000), e apresentam como principais vantagens o facto de possuírem um pH neutro, de permanecerem líquidos à temperatura ambiente e formarem um gel à temperatura do corpo humano. Além disso,

têm um carácter termorreversível, ou seja, o gel pode repetir a transição sol-gel e gel-sol sem qualquer limite no tempo de vida. No entanto, estes hidrogéis exibem fracas propriedades mecânicas e são extremamente sensíveis a alterações do meio envolvente, tais como de temperatura, de pH e de força iónica, as quais podem provocar a reversibilidade das ligações e a consequente rotura da rede tridimensional.

A reticulação química, por sua vez, mercê da intensidade das ligações químicas (covalentes), dá origem a uma matriz mais estável. Como reticulante químico e para aplicações biomédicas utilizou-se o genipin. A principal desvantagem da reticulação entre o quitosano e o GE reside no facto de a reação ocorrer em ambiente ácido (recorde-se que o quitosano apenas é solúvel em soluções aquosas ácidas, para valores de pH inferiores a 6,2). Esta situação não se coaduna com um sistema injetável a ser produzido *in situ*, em condições fisiológicas.

No presente trabalho adotou-se uma nova estratégia: preparar hidrogéis de quitosano co-reticulados, ou seja, usando conjugadamente os reticulantes fosfato dissódico de glicerol e genipin, de modo a tirar partido do carácter neutro e termossensível da reticulação física e, simultaneamente, melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade da rede tridimensional, pela reticulação química. Estes géis foram, pela primeira vez, preparados e testados no âmbito deste trabalho, tanto quanto sabemos da literatura.

Em qualquer dos casos, foi preparada, em primeiro lugar, uma solução de quitosano, dissolvendo 2,0 g de polímero em 100 mL de solução aquosa de ácido acético (0,5%, v/v), a qual foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por um período de 24 horas para garantir a completa dissolução do polímero. Antes da sua utilização, a solução foi filtrada para remoção de material insolúvel. A solução possui, no final, um pH de 5,5.

Para a preparação dos géis reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol, adiante designados por C/GP, dissolveu-se uma determinada quantidade de GP em água destilada, sendo a solução resultante cuidadosamente adicionada à solução de quitosano, gota a gota, sob agitação magnética, por forma a obter no final uma solução de quitosano de concentração 1,5 g em 100 mL de solução com um pH de 7,4. Esta solução, que não é mais do que uma solução de quitosano neutralizada com GP, quando aquecida a 37 °C transforma-se num hidrogel, graças a um conjunto de interações favoráveis entre o sal e o polímero que levam à formação de uma rede tridimensional.

Os hidrogéis preparados a partir de um mecanismo de reticulação combinado (físico e químico) foram obtidos através da adição de genipin, em pó, à solução de quitosano previamente neutralizada com GP, como se descreveu acima, por forma a produzir misturas com concentrações de genipin de 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% (em massa). Estas misturas, quando aquecidas a 37 °C, originam hidrogéis físico/quimicamente co-reticulados, adiante designados por C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente, consoante a concentração de GE.

O mesmo procedimento foi seguido na preparação dos hidrogéis apenas reticulados quimicamente, com a diferença de que nestas matrizes a adição do reticulante químico (GE) foi feita à solução de quitosano não neutralizada (a pH 5,5). Estes hidrogéis são designados por C/GE5, C/GE10, C/GE15 e

C/GE20, de acordo com a concentração de GE usada: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% (em massa), respetivamente.

Todos os hidrogéis foram obtidos num molde de silicone, com poços cilíndricos de diâmetro de 15 mm e altura de 10 mm. O tempo de maturação variou de 2 a 24 horas, consoante o tipo de caracterização a que foram submetidos, e a temperatura de cura foi controlada a 37 °C. O tempo de duas horas corresponde ao tempo de maturação mínimo requerido para obter matrizes sólidas, estruturadas, capazes de suportar as condições experimentais de alguns ensaios de caracterização.

A Figura 3.4 apresenta um fluxograma das etapas de preparação e caracterização dos diferentes hidrogéis.

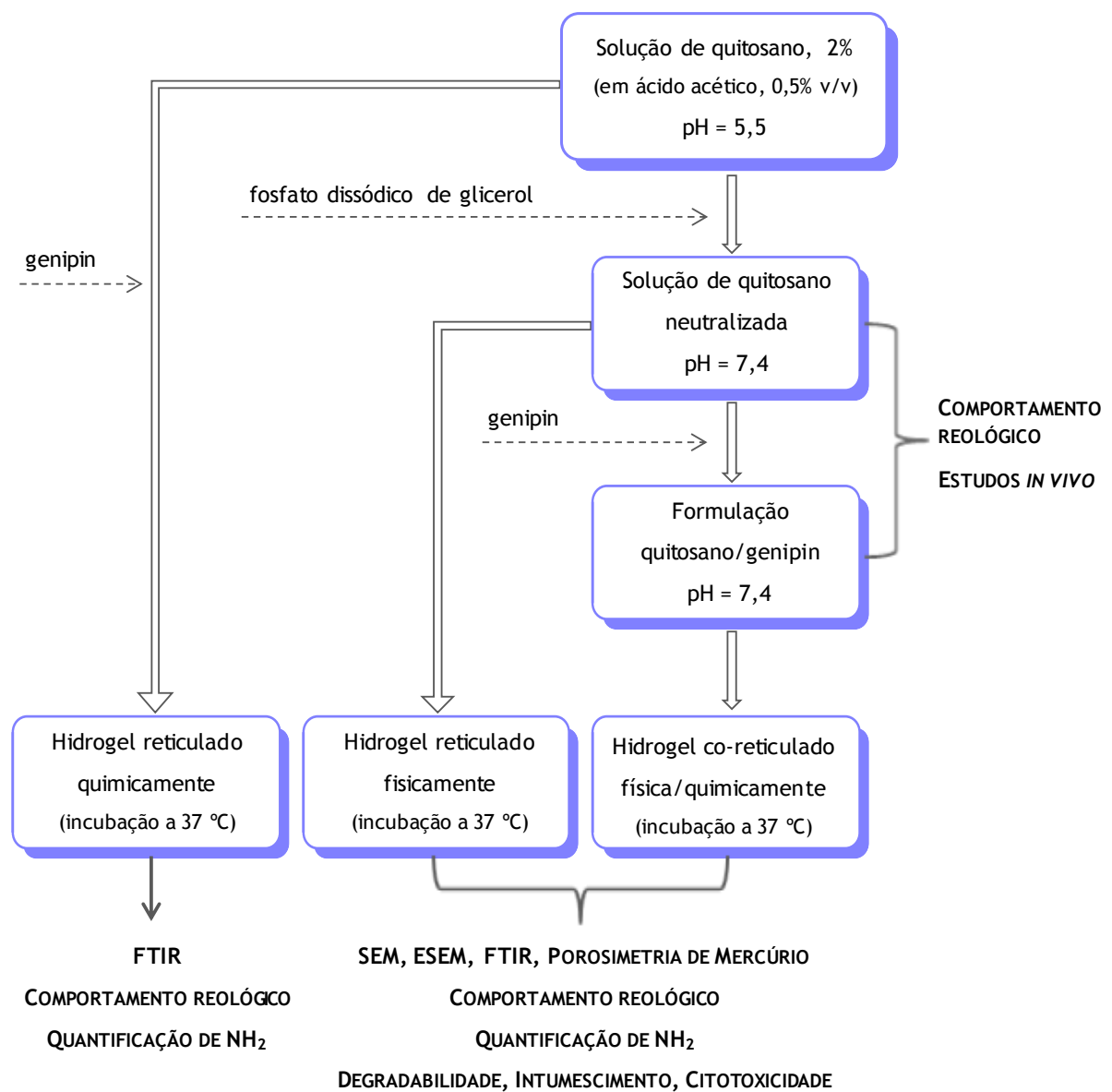


Figura 3.4 - Fluxograma das etapas de preparação e caracterização dos hidrogéis.

Preparação de microesferas

Os hidrogéis produzidos neste trabalho destinam-se fundamentalmente à libertação de fármacos, em particular de cisplatina. Como se detalha adiante, o fármaco é incorporado na matriz polimérica de diversas formas, designadamente através de microesferas, carregadas com cisplatina, propositadamente preparadas para o efeito. De modo a maximizar a compatibilidade da matriz injetável com a estrutura polimérica do material que as forma, foram usadas as mesmas formulações de base. Os parágrafos seguintes detalham a preparação dessas microesferas.

As microesferas de quitosano foram preparadas pelo método de emulsão água-em-óleo, seguido de reticulação química, usando genipin como agente reticulante.

O procedimento experimental adotado, salvo ligeiras modificações, encontra-se descrito na literatura por diferentes autores (Imsombut *et al.*, 2010; Jose *et al.*, 2012; Kawadkar e Chauhan, 2012; Wang *et al.*, 1996).

A fase dispersa, polimérica, corresponde à solução aquosa de quitosano em ácido acético (0,5%, v/v), enquanto a fase contínua, orgânica, corresponde a parafina líquida. Como agente surfactante foi utilizado o Span 80. Um volume de 3 mL de solução aquosa de quitosano foi adicionado, gota a gota, a 40 mL de parafina líquida (massa volúmica a 20 °C igual a 848,5 kg/m³ e viscosidade a 40 °C igual a 16,8 mm²/s) que continha 0,8 g de Span 80, sob agitação magnética, à temperatura ambiente. A emulsão água-em-óleo foi deixada estabilizar durante 30 minutos. De seguida adicionou-se, gota a gota, 0,5 mL de solução de genipin (em álcool, 70%) e colocou-se a emulsão na estufa, sob contínua agitação magnética, a 37 °C, uma vez que a reação de reticulação entre o quitosano e o genipin é favorecida a temperaturas mais elevadas (Chen *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). A reação foi deixada prosseguir por um período de 12 horas. A cada intervalo de tempo (3, 6 e 12 horas) foram retiradas amostras para determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos das microesferas. No final do ensaio as microesferas foram separadas da fase contínua por decantação, lavadas três vezes com hexano e secas à temperatura ambiente.

A Figura 3.5 ilustra o procedimento seguido na obtenção das microesferas de quitosano reticuladas com genipin.

Com o objetivo de avaliar o efeito de alguns parâmetros processuais na morfologia, no tamanho e na distribuição de tamanhos das microesferas, foram variados os seguintes fatores:

- concentração mássica do polímero, cujos limites foram 1% e 2%;
- razão mássica genipin/quitosano, que tomou os valores: 0,01, 0,03 e 0,06;
- velocidade de agitação, a qual variou entre 400 e 800 rpm;
- tempo de reticulação, que foi de 3, 6 e 12 horas.

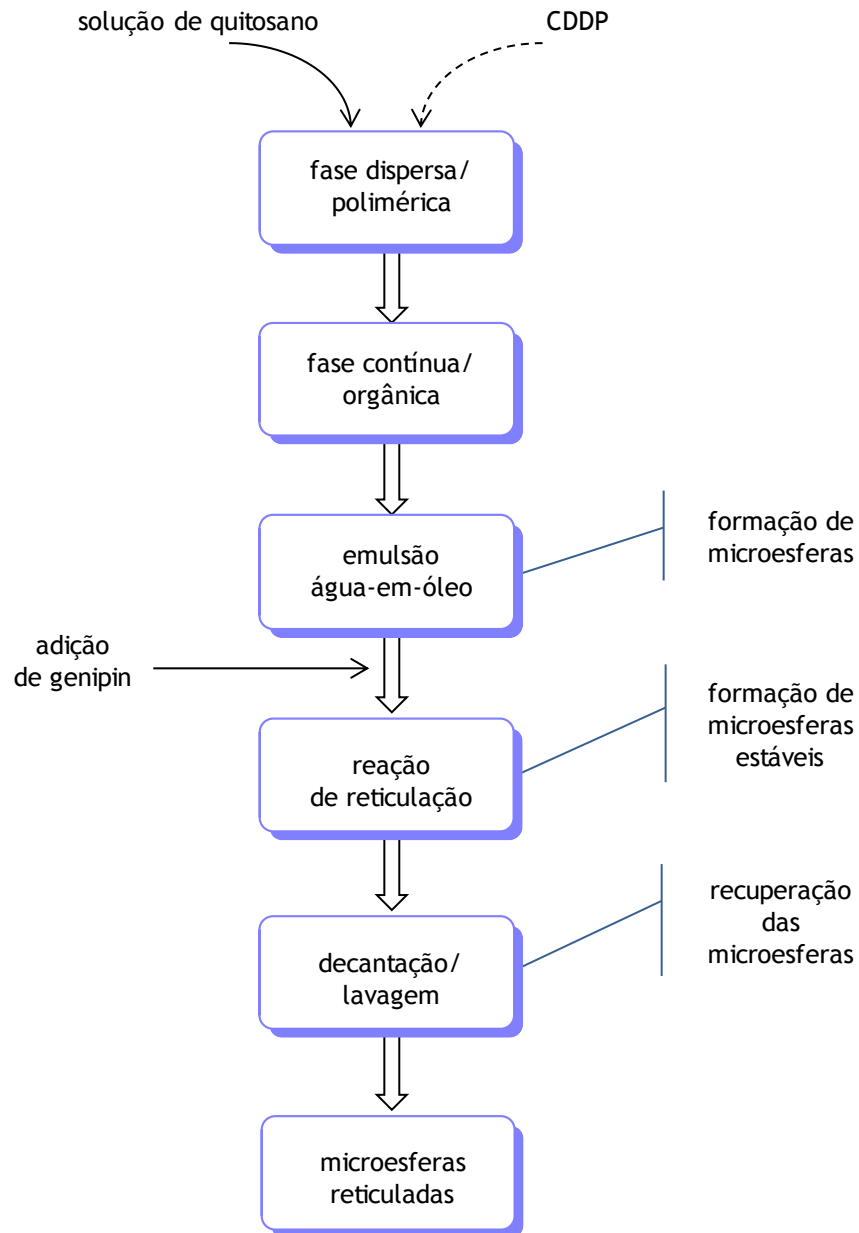


Figura 3.5 - Representação esquemática da produção de microesferas de quitosano reticuladas com genipin pelo método da emulsão água-em-óleo.

Na Tabela 3.2 encontram-se sumariadas as condições experimentais dos ensaios realizados para a obtenção de microesferas de quitosano reticuladas com genipin e a respetiva codificação.

A morfologia das microesferas produzidas foi analisada por microscopia ótica (microscópio OPTIKA B-350) e por SEM (Secção 3.4.1). Já o tamanho e distribuição de tamanhos foram determinados por uma técnica de dispersão laser (vulgo técnica de difração laser) num granulómetro Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK), com uma unidade de medição de pequenos volumes (Hydro 2000S), usando como dispersante parafina líquida.

Tabela 3.2 - Condições experimentais para a preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin e respetiva codificação.

<i>ensaio</i>	<i>concentração de quitosano (%)</i>	<i>razão mássica genipin/ quitosano</i>	<i>velocidade de agitação (rpm)</i>	<i>tempo de reticulação (h)</i>
1	1	0,01	800	3
2	1	0,01	800	6
3	1	0,01	800	12
4	1	0,03	800	3
5	1	0,03	800	6
6	1	0,03	800	12
7	1	0,06	800	3
8	1	0,06	800	6
9	1	0,06	800	12
10	1	0,03	400	3
11	1	0,03	400	6
12	1	0,03	400	12
13	1	0,06	400	3
14	1	0,06	400	6
15	1	0,06	400	12
16	2	0,01	800	3
17	2	0,01	800	6
18	2	0,01	800	12
19	2	0,03	800	3
20	2	0,03	800	6
21	2	0,03	800	12
22	2	0,06	800	3
23	2	0,06	800	6
24	2	0,06	800	12

As microesferas carregadas com cisplatina foram obtidas de acordo com a metodologia descrita, à exceção da dissolução do fármaco na solução aquosa de quitosano (numa concentração de 1 mg CDDP/mL), antes da sua adição à fase contínua/orgânica.

De salientar que, todas as manipulações que envolveram a CDDP foram realizadas ao abrigo da luz para evitar a eventual degradação do fármaco.

As microesferas usadas como SLC nos ensaios de libertação foram preparadas segundo as condições processuais correspondentes ao ensaio 24, ou seja, concentração da solução de quitosano de 2%, razão mássica genipin/quitosano de 0,06, velocidade de agitação de 800 rpm e tempo de reticulação de 12 horas.

A quantificação da CDDP imobilizada nas microesferas foi obtida através da técnica de espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), descrita adiante na Secção 3.8.1, após digestão ácida (com solução de HNO₃:HCl (1:3)) de uma determinada massa de microesferas secas. A eficiência de imobilização foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{eficiência de imobilização (\%)} = \frac{\text{massa de CDDP obtida por ICP} - \text{MS}}{\text{massa de CDDP carregada}} \times 100 \quad (3.1)$$

Incorporação do fármaco nos hidrogéis

Conforme mencionado, foram usadas diferentes abordagens para incorporar a cisplatina (CDDP) nas matrizes de quitosano reticuladas fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e nas matrizes co-reticuladas com diferentes concentrações de genipin (C/GP/GE?), em que o símbolo “?” corresponde genericamente à concentração de GE usada):

- a) incorporação da cisplatina diretamente, por dissolução do fármaco, na matriz polimérica;
- b) encapsulamento da cisplatina em lipossomas, utilizando uma solução lipossomal comercial de concentração 2,98 mg CDDP/mL, denominada LipoplatinTM, e posterior incorporação destes na matriz polimérica;
- c) imobilização da cisplatina em microesferas preparadas como anteriormente descrito, as quais são posteriormente dispersas na matriz polimérica.

A preparação dos hidrogéis carregados com CDDP, correspondente à estratégia a), foi feita pelo método de incorporação, ou seja, as soluções poliméricas foram preparadas sendo a cisplatina adicionada às soluções ainda líquidas (quer à solução de quitosano neutralizada com GP, quer às soluções de quitosano neutralizadas com GP, às quais foram adicionadas diferentes quantidades de genipin), logo após a adição e dissolução dos respetivos reticulantes. Foram testadas duas concentrações iniciais de CDDP nas matrizes: 0,6 mg/mL e 1 mg/mL. Esta última corresponde ao limite de solubilidade da CDDP em água, à temperatura ambiente (Hernigou, 2004).

Relativamente à preparação dos hidrogéis carregados com CDDP encapsulada em lipossomas, referente à estratégia b), o volume de solução lipossomal adicionado às soluções poliméricas foi de modo que a concentração de CDDP nas matrizes fosse igual a 0,6 mg/mL.

Por último, microesferas de quitosano reticuladas com genipin e carregadas com CDDP, correspondente à estratégia c), foram dispersas nas soluções poliméricas, numa concentração de 1,5% (w/w).

Após a adição do fármaco, as soluções poliméricas foram colocadas no molde de silicone e incubadas a 37 °C. O período de incubação foi de duas horas, à exceção das soluções de quitosano neutralizadas com GP em que o período de incubação foi de 24 horas. Este intervalo de tempo maior deve-se ao facto de estas amostras requererem mais tempo de maturação para se obterem matrizes sólidas, estruturadas, capazes de suportar as condições experimentais dos ensaios de libertação.

Os hidrogéis foram designados por C/GP/GE?/MAT, C/GP/GE?/LIP ou C/GP/GE?/MIC consoante se trate do fármaco adicionado à matriz co-reticulada, da formulação lipossomal ou das microesferas incorporados na solução polimérica.

3.4 MORFOLOGIA E ESTRUTURA

3.4.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*), abreviadamente SEM, é uma das técnicas de caracterização e análise microestrutural mais usadas na investigação de materiais. No caso vertente, permite, além da caracterização microestrutural da matriz, a observação da morfologia dos poros e, através de *software* de morfometria, a quantificação do seu tamanho e distribuição de tamanhos.

No SEM, a superfície da amostra a ser observada é irradiada com um feixe de elétrons que varre a área selecionada e, da interação entre o feixe e a amostra, é formada a imagem. No caso das imagens obtidas no presente trabalho, fundamentalmente topográficas, os elétrons secundários representam um papel crucial, dado que estes escapam de zonas junto à superfície da amostra, originando uma maior resolução da imagem que se deseja obter. A popularidade do SEM é, também, sustentada pela capacidade de obter imagens que sugerem tridimensionalidade, devido à grande profundidade de campo deste microscópio.

No entanto, os equipamentos convencionais possuem duas grandes desvantagens para a análise de hidrogéis: i) a câmara onde se coloca a amostra tem de ser mantida em alto vácuo e ii) a amostra tem de ser condutora, caso contrário é necessário proceder ao seu revestimento com um material condutor. No caso presente, a sujeição da amostra a alto vácuo pode alterar-lhe a estrutura. De modo a ultrapassar estes inconvenientes, recorreu-se também à microscopia eletrônica de varrimento ambiental (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), abreviadamente ESEM. Esta técnica permite que seja introduzido na câmara onde se coloca a amostra, uma pequena quantidade de gás, o que faz com que o equipamento possa operar a pressões até cerca de 30 mbar (embora a maior parte dos modelos de ESEM só permita trabalhar a pressões máximas de cerca de 1 mbar). Esta situação abre novas possibilidades, como sejam a visualização de amostras não condutoras, a observação de amostras hidratadas (se o gás introduzido na câmara for vapor de água) e a não destruição das mesmas, pois que os testes dispensam elaborados tratamentos prévios. De facto, a possibilidade de controlar o estado de hidratação da amostra tem permitido explorar uma vasta área de aplicações, tais como a análise de géis e emulsões.

Condições experimentais

A microestrutura dos hidrogéis de base quitosano, reticulados com diferentes concentrações de genipin, foi observada, numa primeira fase, com recurso ao SEM. Para tal, foi necessário proceder à liofilização das matrizes. Assim, as matrizes foram congeladas a -20 °C e depois liofilizadas num liofilizador, modelo Snijders Scientific type 2040, Tilburg, Holland, sob vácuo (0,50 mbar) a uma temperatura de -50 °C durante três dias, para garantir a sublimação de todo o solvente. As matrizes desidratadas foram, então, seccionadas, colocadas numa fita adesiva de grafite colada a um suporte

de metal e revestidas com ouro. As observações foram realizadas num microscópio eletrónico de varrimento (modelo JSM-5310, JEOL, Tokyo, Japan).

Observações adicionais da ultraestrutura das matrizes hidratadas foram realizadas com recurso a uma unidade de ESEM, de elevada resolução (ESEM, FEI Quanta 400 FEG), equipada com um espectrómetro de raios X (EDAX Genesis X4M). Os ensaios foram realizados no laboratório CEMUP, da Universidade do Porto, seguindo um protocolo que se encontra descrito na literatura para observação deste tipo de matrizes (Iliescu *et al.*, 2008).

3.4.2 Porosimetria de intrusão de mercúrio

A porosimetria de intrusão de mercúrio (*Mercury Intrusion Porosimetry*) é frequentemente usada, tal como o próprio nome sugere, para quantificar a porosidade bem como o tamanho e a distribuição de tamanhos de poros de amostras porosas. Baseia-se na propriedade do mercúrio não molhar a maioria dos materiais, sendo necessário aplicar uma dada pressão para o forçar a entrar nos poros da amostra. O conhecimento da relação entre a pressão e o diâmetro dos poros permite estimar as dimensões destes últimos. Como base de cálculo usa-se, normalmente, a equação de Washburn (Webb e Orr, 1997):

$$P = \frac{-4 \gamma \cos(\theta)}{D} \quad (3.2)$$

onde P é a pressão requerida para forçar o mercúrio a entrar num poro de diâmetro D , γ é a tensão superficial do mercúrio (485 dine/cm) e θ o ângulo de contacto entre o mercúrio e o material (130°).

Como se vê pela equação (3.2), a pressão aplicada é inversamente proporcional ao diâmetro do poros e assim, por aplicação de pressões sucessivamente mais elevadas, o mercúrio vai sendo intrudido em poros sucessivamente mais pequenos. Na técnica de intrusão de mercúrio, para cada valor de pressão aplicada, é registado o volume de mercúrio intrudido. Da curva resultante do volume cumulativo de mercúrio para sucessivos aumentos de pressão (curva de intrusão) pode extrair-se valiosa informação sobre a estrutura do material em estudo.

Condições experimentais

A porosidade e a distribuição de tamanhos de poros dos hidrogéis de base quitosano foi obtida num porosímetro de mercúrio AutoPore IV 9500, da Micromeritics, USA, numa gama de tamanhos compreendida entre 360 μm e 0,0055 μm a que corresponde uma gama de pressões de intrusão entre 0,5 psia e 33000 psia, respetivamente.

Importa sublinhar que a análise porosimétrica é sempre precedida de uma completa desgaseificação da amostra, pelo que esta deve encontrar-se previamente desidratada. No caso particular, os hidrogéis foram liofilizados seguindo o procedimento anteriormente descrito.

3.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), vulgarmente designada por FTIR, analisa a interação deste tipo de radiação com a matéria. Esta técnica é comumente utilizada na caracterização química de materiais, designadamente na deteção de alterações na estrutura química de materiais poliméricos, como é o caso vertente. De facto, a técnica de FTIR foi aqui utilizada para avaliar possíveis alterações na estrutura química das matrizes, resultantes das interações e reações envolvidas entre o quitosano e os agentes de reticulação usados, quer seja o reticulante iónico (fosfato dissódico de glicerol), quer seja o reticulante químico (genipin).

Condições experimentais

As matrizes foram previamente liofilizadas num liofilizador (Snijders Scientific type 2040, Tilburg, Holland), segundo o procedimento descrito acima. Após liofilização, os hidrogéis foram reduzidos a pó e misturados com KBr (numa proporção de 0,8 mg de amostra para 80 mg de KBr) para preparar pastilhas de 7 mm de diâmetro.

Os espectros de absorção de cada amostra (na zona de infravermelhos) foram obtidos num espectrofotómetro Jasco FTIR-4200 (Tokyo, Japan). Os espectros foram registados a 32 *scans* e a uma resolução de 4 cm^{-1} , numa gama de números de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Os espectros individuais de FTIR do quitosano bem assim como dos agentes de reticulação (GP e GE) foram também registados.

3.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO

A extensão das diferentes reações de reticulação dos hidrogéis preparados neste trabalho foi avaliada através do ensaio da ninidrina (Mi *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007). Este ensaio permite determinar a percentagem de grupos amina livres, presentes nos hidrogéis após a reação de reticulação, e tem sido utilizado por muitos autores na deteção de aminoácidos, bem como na deteção de peptídios e proteínas que apresentem esses grupos.

A ninidrina é um poderoso agente oxidante que reage com α -aminoácidos para valores de pH entre 4 e 8. Quando uma solução de aminoácidos é aquecida com um excesso de ninidrina, todos aqueles que possuem grupos amina livres produzem um composto intensamente corado, conhecido como púrpura de Ruhemann (Bottom *et al.*, 2010). A Figura 3.6 exemplifica a reação entre a ninidrina e

um aminoácido. Em condições apropriadas, a intensidade da cor produzida é proporcional à concentração das espécies presentes.

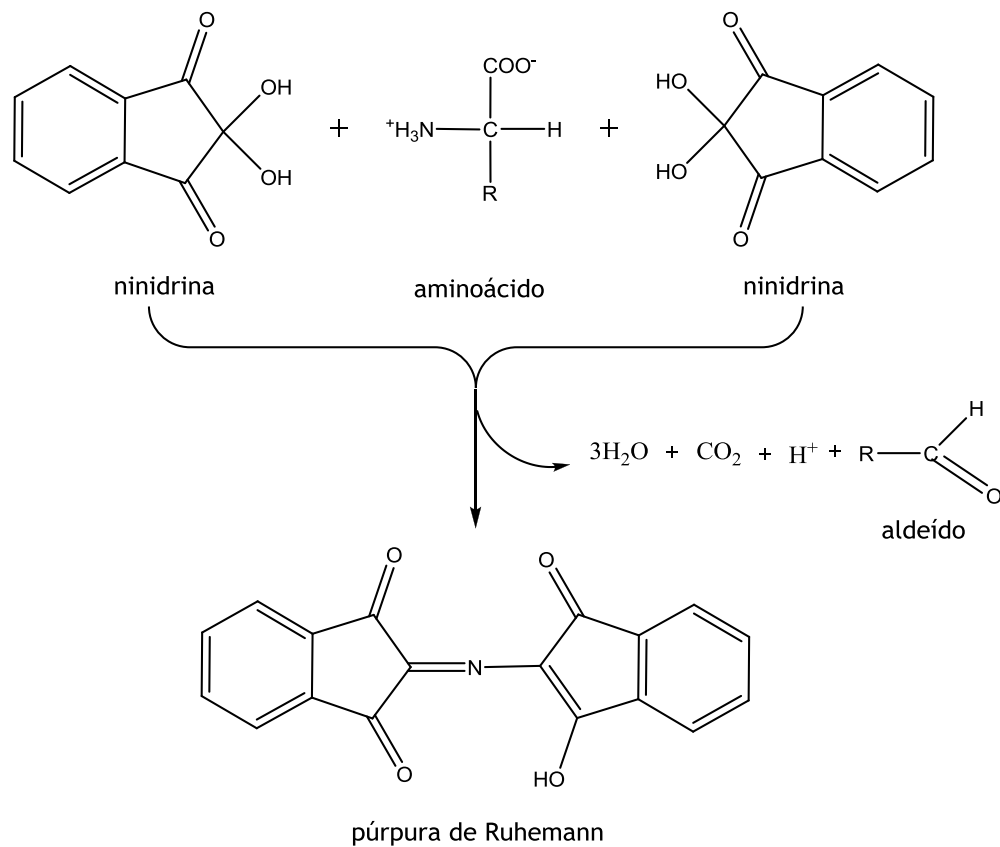


Figura 3.6 - Exemplificação da reação da ninidrina com espécies que contêm grupos amina livres. (adaptado de Bottom *et al.*, 2010)

O ensaio da ninidrina consiste no seguinte: cerca de 2 mg de amostra liofilizada são introduzidos num tubo de ensaio ao qual se adicionou 1 mL de solução de ninidrina recém preparada (Anexo A). O tubo foi aquecido num banho de água a 100 °C, durante 20 minutos. Depois de arrefecer adicionaram-se 5 mL de *i*-propanol a 50% v/v. De seguida, mediu-se a absorvância ótica da solução, por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/VIS), num espectrofotómetro MAPADA, UV-1800 (MAPADA Shanghai, China), a um comprimento de onda de 570 nm. Quando necessário, as soluções foram diluídas para uma concentração conveniente. Igual procedimento foi seguido para determinar os grupos amina no quitosano em pó (ensaio que serviu de controlo). A absorvância ótica da solução é proporcional ao número de grupos amina presentes na amostra, após reação com a solução de ninidrina.

Os valores absolutos foram calculados a partir de uma curva de calibração que relaciona a concentração de glicina com a absorvância, numa gama de concentrações compreendida entre

aproximadamente 5 e 0,8 $\mu\text{mol/mL}$ (Anexo A). O grau de reticulação do hidrogel (em percentagem) foi calculado de acordo com a equação (3.3):

$$\text{grau de reticulação (\%)} = \frac{(NHN)_{original} - (NHN)_{fixo}}{(NHN)_{original}} \times 100 \quad (3.3)$$

O termo (NHN) representa a fração molar dos grupos amina livres e os índices *original* e *fixo* correspondem à amostra de quitosano em pó (não reticulada) e às amostras de hidrogel reticuladas, respetivamente.

Para cada amostra foram realizados, pelo menos, quatro ensaios.

3.6 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

A caracterização reológica teve como finalidade estudar a viscoelasticidade dos hidrogéis preparados no presente trabalho, bem como avaliar o efeito do reticulante físico (GP), do reticulante químico (GE) e da combinação de ambos ao nível das propriedades reológicas.

Para tal, foram determinadas as propriedades reológicas das soluções de quitosano e dos diferentes géis, quer durante a sua formação, quer após maturação, utilizando testes oscilatórios em regime dinâmico (*vide* Secção 2.5). Adicionalmente foram realizados testes em escoamento estacionário com o intuito de determinar a viscosidade das soluções de quitosano a uma dada temperatura.

Os ensaios tiveram lugar num reómetro de tensão controlada (Bohlin C-VOR, Malvern Instruments), embora o controlo via *software* permita a opção de trabalho em regime de deformação controlada. Nos testes realizados em modo dinâmico, a amostra é submetida a uma tensão de corte, que varia sinusoidalmente com o tempo (equação (2.5)), aplicada através do sistema de medida superior, sendo o correspondente deslocamento angular, também com carácter sinusoidal, medido por um transdutor e convertido automaticamente em deformação pelo *software*.

A amostra a analisar é colocada entre o prato inferior fixo do reómetro e um sistema de medida superior (cone ou prato) móvel, cujo eixo é perpendicular ao plano do prato, tal como esquematizado na Figura 3.7. O sistema de medida utilizado foi o cone/prato (cone de aço inox com 40 mm de diâmetro e ângulo (α) de 4° , a uma distância de 150 μm do prato inferior), para as amostras na forma de solução. Para os géis após maturação a geometria utilizada foi a mesma, embora fosse utilizado um cone menor (20 mm de diâmetro e ângulo de 1°) e a distância entre o prato inferior do reómetro e o cone tivesse sido ajustada à altura das matrizes. O sistema cone/prato, comparativamente com o sistema de pratos paralelos, permite uma taxa de deformação mais uniforme em toda a amostra e menores valores de inércia.

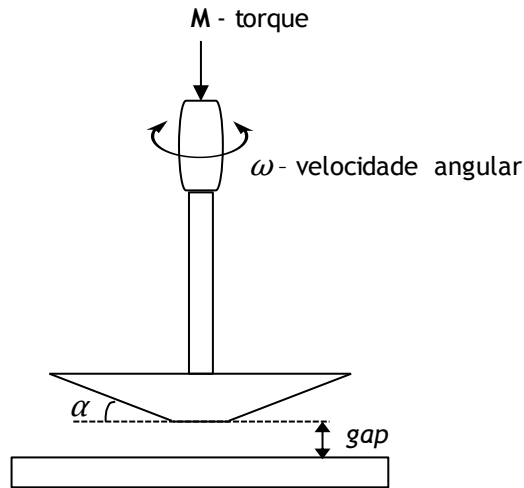


Figura 3.7 - Representação esquemática do sistema de medida (geometria cone/prato) utilizado na realização do trabalho.

Neste reómetro, e em geral nos equipamentos mais recentes, o sistema de medição do torque é muito preciso (Barnes e Bell, 2003), o que permite a aplicação de momentos de binário muito reduzidos e a monitorização de deslocamentos igualmente pequenos, garantindo a realização de ensaios a baixas taxas de deformação. Este facto, aliado à operação na região viscoelástica linear, garante que a estrutura dos materiais em estudo não seja alterada.

No reómetro utilizado, o controlo da temperatura é realizado pelo próprio instrumento, através de um sistema Peltier, ligado a um banho de circulação.

As amostras foram preparadas tal como descrito na Secção 3.3. Após a dissolução dos reticulantes, as soluções líquidas foram transferidas para o prato do reómetro (cerca de 2 mL), previamente aquecido à temperatura desejada (37 °C, exceto nos ensaios de varrimento em temperatura). O volume da amostra deve ser o necessário para que esta seja analisada exatamente na área delimitada pela geometria móvel. De forma a evitar problemas de evaporação um anel oco de aço, de cerca de 60 mm de diâmetro, cheio com água, foi colocado em torno da geometria, sendo todo o sistema de medição isolado com uma cobertura. Os dados começaram de imediato a ser registados.

Os parâmetros reológicos usados para comparar as propriedades viscoelásticas de todos os hidrogéis foram o módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G''), a tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) e a viscosidade complexa (η^*), definidos nas equações (2.7 a 2.9) e (2.11).

Foram efetuados testes de varrimento em tensão (que permitem avaliar a zona de viscoelasticidade linear), varrimento em temperatura, varrimento em tempo e varrimento em frequência. Como referido foram ainda obtidas curvas de viscosidade (ou curvas de escoamento).

As condições experimentais de cada um dos testes reológicos foram as seguintes:

- testes de varrimento em tensão (temperatura: 37 °C; frequência de oscilação: 1 Hz; tensão de corte: 0 - 1000 Pa);
- testes de varrimento em temperatura, designados correntemente como curvas de aquecimento/arrefecimento (rampa de aquecimento: 5 °C até 80 °C; rampa de arrefecimento: 80 °C até 5 °C; velocidade de aquecimento/arrefecimento: 2 °C/min; frequência de oscilação: 1 Hz; deformação: 0,01);
- testes de varrimento em tempo, muitas vezes designados por cinéticas de maturação (temperatura: 37 °C; frequência de oscilação: 1 Hz; tensão de corte: 1 Pa; tempo: 12 h);
- testes de varrimento em frequência, também designados por espectros mecânicos (temperatura: 37 °C; tensão de corte: 20 Pa; intervalo de frequências: 0,01 - 100 Hz);
- curvas de viscosidade (temperatura: 37 °C; velocidade de deformação: 0,1 - 1000 s⁻¹).

3.7 CARACTERIZAÇÃO COM VISTA A APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Dado que a aplicação final dos hidrogéis aqui desenvolvidos é fundamentalmente na área biomédica, importa caracterizá-los sob determinados aspetos, considerados os mais relevantes para este tipo de aplicações.

Efetivamente, a sua aplicação nesta área é fortemente influenciada não só pelo seu comportamento reológico, mas também por propriedades tais como a degradabilidade, a citotoxicidade e a capacidade de intumescimento, pelo que se procurou caracterizar as matrizes nestas vertentes. Os diferentes estudos realizados são descritos nas secções seguintes.

3.7.1 Estudos de degradação *in vitro*

Com os ensaios de degradação *in vitro* pretendeu-se estudar o comportamento de biodegradação das matrizes reticuladas, quer ionicamente (C/GP), quer iónica/covalentemente, com diferentes concentrações de genipin (C/GP/GE?). Para tal, usou-se um meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo, por forma a mimetizar os fenómenos que ocorrem quando estes materiais são colocados em contacto com os fluidos do corpo humano.

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a degradação dos hidrogéis consiste em analisar a perda de massa experimentada pelas amostras ao longo do tempo, quando submersas numa solução aquosa (Balakrishnan e Jayakrishnan, 2005; Ganji *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009).

Em recipientes individuais de 50 mL colocou-se aproximadamente 0,4 g de amostra de cada hidrogel e adicionaram-se 10 mL de PBS (pH = 7,4). Para simular as condições fisiológicas da degradação *in vivo*, foi adicionada lisozima numa concentração semelhante à encontrada no soro humano, 1,5 µg/mL (Brouwer *et al.*, 1984; Freier *et al.*, 2005). Os recipientes foram colocados numa

incubadora com agitação orbital (80 rpm), a 37 °C, durante um período de 28 dias. Para simular a contínua atividade enzimática, o meio foi renovado a cada dois dias. Para intervalos de tempo específicos, os hidrogéis foram retirados do meio, removida a água adsorvida à sua superfície com um papel absorvente, e subsequentemente pesados. A degradação foi expressa através da perda de massa (em percentagem), quantificada de acordo com a equação (3.4):

$$\text{perda de massa (\%)} = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100 \quad (3.4)$$

onde, W_i e W_t representam a massa de amostra de hidrogel no início do ensaio e a cada intervalo de tempo, t , respetivamente.

Além dos ensaios de degradação com atividade enzimática foram, também, realizados ensaios, nas mesmas condições, mas sem adição de lisozima. Estes últimos tiveram por objetivo determinar a perda de massa causada por fenómenos de dissolução e/ou desidratação das amostras e, portanto, não imputável à degradação enzimática.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e as respetivas manipulações foram realizadas numa câmara de fluxo laminar vertical.

3.7.2 Estudos de citotoxicidade

Depois de realizada a caracterização físico-química, morfológica e reológica dos hidrogéis, tornou-se imperioso avaliar eventuais efeitos biológicos adversos.

Com o controlo cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, foi necessário desenvolver e padronizar testes *in vitro* que pudessem averiguar a toxicidade dos biomateriais para uso em seres humanos, designadamente para uma potencial aplicação clínica. De acordo com a *International Standard Organization* (ISO) o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste a realizar para avaliar a resposta biológica de qualquer material para uso em seres humanos.

A norma ISO 10993-5 (ISO 10993-5, 2009) descreve vários testes *in vitro* para avaliar a toxicidade dos biomateriais, utilizando culturas de células. Estes testes consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se, posteriormente, as alterações celulares por diferentes mecanismos, como por exemplo, através da adição de corantes vitais ou através da inibição da formação de colónias celulares.

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade de um material é a viabilidade celular, tendo esta sido avaliada, no presente trabalho, através do ensaio colorimétrico de Alamar-Blue®. O método usa o poder redutor natural das células vivas para converter a resazurina (conhecida comercialmente por Alamar Blue, composto não-fluorescente e permeável às células) à respetiva molécula fluorescente, a resofurina. Assim, as células viáveis, ao converterem a resazurina a

resofurina, geram uma medida quantitativa da viabilidade e citotoxicidade, sendo a quantidade de fluorescência produzida proporcional ao número de células vivas presentes (Nakayama *et al.*, 1997).

Cultura de células

A linha celular TSA foi estabelecida a partir de um adenocarcinoma da mama, moderadamente diferenciado, que se desenvolveu espontaneamente num ratinho BALB/c múltiparo de 20 meses de idade (Nanni *et al.*, 1983).

As células TSA foram cultivadas em meio de cultura DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High Glucose*) suplementado com 10% de soro fetal de bovino, inativado pelo calor (30 minutos a 56 °C), 3,2 g/L de bicarbonato de sódio e os antibióticos estreptomicina e penicilina (100 µg/mL e 100 unidades/mL, respetivamente), em frascos de cultura com área de 75 cm², colocados numa incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada e com 5% de CO₂.

Estas células crescem em monocamada e, como tal, quando atingem aproximadamente 100% de confluência, habitualmente duas vezes por semana, são diluídas em meio de cultura, após terem sido destacadas dos frascos com uma solução de tripsina 0,25% preparada em tampão salino de fosfato. Para isso, após aspirado o meio de cultura, adicionam-se 2 mL da referida solução de tripsina e, seguidamente, 10 mL de meio cultura DMEM-HG à suspensão celular, a qual é, então, colocada num tubo de *Falcon*, procedendo-se a uma centrifugação a 180 g durante sete minutos, a 20 °C. O sedimento resultante foi ressuspensão em 10 mL de meio de cultura DMEM-HG, do qual se retirou 1 mL que se adicionou a 19 mL do mesmo meio contido em frasco.

Todo este procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar vertical em condições assépticas, de modo a evitar a contaminação da linha celular. Para isso o material utilizado foi adquirido estéril, ou previamente esterilizado por autoclavagem, e os meios de cultura DMEM-HG e de dissociação foram esterilizados por filtração através de filtros de poro inferior a 0,22 µm (Scheicher & Schuell).

Determinação da viabilidade celular

As células TSA foram preparadas 24 horas antes do início das experiências, de modo a que ao fim desse período se registasse uma confluência celular de aproximadamente 70%. Para isso, as células foram submetidas aos processos de lavagem anteriormente referidos, tendo sido, depois, ressuspensão o sedimento resultante num volume adequado de meio de cultura DMEM-HG, por forma a obter uma densidade de 50×10^3 células/mL. As células foram de seguida colocadas em placas *multiwell* (48 poços), 50×10^3 células/poço, e incubadas durante 24 horas nas condições acima referidas. A preparação das células foi efetuada em condições totalmente estéreis.

Os hidrogéis de base quitosano foram preparados de acordo com o descrito na Secção 3.3, usando soluções e materiais previamente esterilizados. A solução de quitosano foi esterilizada em autoclave

(121 °C, 15 minutos), o sal fosfato dissódico de glicerol foi dissolvido em água destilada e esterilizado por filtração (através de membrana de porosidade 0,20 µm) e o genipin foi esterilizado por exposição a radiação UV, durante duas horas. Os hidrogéis foram preparados numa câmara de fluxo laminar vertical em condições assépticas.

A citotoxicidade dos materiais foi avaliada através de um teste de extração de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 10993-5, 2009). Os géis foram imersos em meio de cultura DMEM-HG (numa razão de 1 mL de meio para 1,25 cm² de área superficial de gel (Ahmadi e De Bruijn, 2008)) e colocados numa incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada e com 5% de CO₂, durante 24 horas.

As células foram, então, incubadas com o meio de extração, durante 48 horas. Findo este período, substituiu-se o meio de cultura DMEM-HG dos poços da placa de transfecção por 0,3 mL de meio de cultura DMEM-HG contendo 10% (v/v) de corante Alamar Blue, tendo-se procedido a uma incubação a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada e com 5% de CO₂, durante 1 hora. Após esta incubação, retiraram-se 200 µL do sobrenadante de cada poço e transferiram-se para uma placa de 96 poços. De seguida, mediu-se a absorvância (*A*) a 570 e 600 nm num espectrofotómetro (SPECTRAmax PLUS 384, Molecular Devices, Union City, CA) e calculou-se a viabilidade celular, como uma percentagem das células de controlo (células não transfectadas), de acordo com a seguinte expressão (Faneca *et al.*, 2008):

$$viabilidade\ celular = \frac{(A_{570\ nm} - A_{600\ nm})_{células\ transfectadas}}{(A_{570\ nm} - A_{600\ nm})_{células\ controlo}} \times 100 \quad (3.5)$$

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o método de análise de variância (ANOVA) de fator único, seguido pelo teste de Tukey para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA). Os resultados são apresentados em termos de média \pm desvio padrão para $n = 6$.

3.7.3 Capacidade de intumescimento

Os hidrogéis de base quitosano (apenas os reticulados fisicamente e físico/quimicamente) foram submetidos a testes de absorção de água em equilíbrio. Para tal, as matrizes foram incubadas em PBS, num agitador orbital (80 rpm), a 37 °C, durante 24 h. Este tempo foi o necessário para que fosse atingido o estado de equilíbrio das matrizes. De seguida, as amostras foram retiradas do meio, foi removida a água adsorvida à sua superfície com papel absorvente e foram pesadas; este peso foi designado W_e . Depois, as mesmas amostras foram secas, através de um processo de liofilização (de acordo com o procedimento anteriormente descrito), e pesadas novamente, tendo este valor sido

designado por W_d . O conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis, em condições de equilíbrio (EWC), foi quantificado com base na equação (3.6):

$$EWC (\%) = \frac{W_e - W_d}{W_e} \times 100 \quad (3.6)$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.8 ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO *IN VITRO*

Nos estudos de libertação *in vitro* foram utilizados os hidrogéis fisicamente reticulados com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e os hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de genipin (C/GP/GE?), carregados com CDDP. Como referido anteriormente, a CDDP pode encontrar-se dissolvida diretamente na matriz polimérica, encapsulada em lipossomas ou imobilizada em microesferas de quitosano reticuladas com genipin.

Os testes de libertação foram realizados em recipientes individuais de 50 mL, onde foi introduzida a amostra de hidrogel e adicionados 20 mL de PBS (pH = 7,4). Em alguns casos, à solução salina de PBS foi adicionada lisozima, numa concentração semelhante à encontrada no soro humano, por forma a melhor mimetizar os fenómenos que ocorrem quando estes materiais são implantados no organismo. Os recipientes foram colocados numa incubadora com agitação orbital (80 rpm), a 37 °C, durante um período máximo de 30 dias.

A cada intervalo de tempo, retiraram-se alíquotas de 0,5 mL, que foram analisadas com vista à quantificação da CDDP. O volume de alíquota retirado foi repostado por volume equivalente de PBS fresco. De salientar que a metodologia seguida, usada por vários autores (Casolaro *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010), implica a perturbação do equilíbrio durante o ensaio de libertação.

A percentagem cumulativa de CDDP libertada foi calculada através da equação (3.7):

$$CDDP \text{ libertada } (\%) = \frac{V_s \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_0} \times 100 \quad (3.7)$$

onde V_s é o volume de alíquota (0,5 mL), V_0 é o volume inicial (20 mL), C a concentração de CDDP ($\mu\text{g/mL}$) e m_0 a massa inicial de CDDP na matriz de hidrogel (μg). De salientar que a equação (3.7) traduz a percentagem de CDDP libertada já corrigida, isto é, contempla a massa de CDDP em cada volume de alíquota retirado que, por conseguinte, não retorna ao sistema (primeiro termo do numerador da equação (3.7)).

No caso do meio contendo lisozima, este foi renovado a cada dois dias, para preservação da atividade enzimática.

Todos os ensaios foram realizados ao abrigo da luz para evitar a possível degradação da CDDP. Após os ensaios de libertação as matrizes de hidrogel foram submetidas a um processo de digestão ácida, com solução de HNO₃:HCl (1:3), com vista a quantificar a massa de CDDP retida na matriz e, portanto, não libertada (Canta *et al.*, 2011).

A quantificação da CDDP foi obtida por dois métodos analíticos: i) método colorimétrico com *o*-fenilenodiamina e ii) espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, abreviadamente ICP-MS). Estes métodos encontram-se sumariamente descritos na secção seguinte.

3.8.1 Métodos de quantificação da cisplatina

Método colorimétrico com *o*-fenilenodiamina

Como a cisplatina não absorve radiação ultravioleta ou visível, foi necessário recorrer a um método indireto de forma a quantificar este composto por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/VIS).

O procedimento experimental adotado, desenvolvido por Golla e Ayres (1973), baseia-se na reação entre a platina (II ou IV) e a *o*-fenilenodiamina (OPDA), a pH 6,5, cujos produtos são cromóforos, com absorção máxima para um comprimento de onda de 704 nm. A reação é lenta à temperatura ambiente mas para temperaturas elevadas, como por exemplo 100 °C, a reação termina dentro de 3-4 minutos.

No presente trabalho, a quantificação da cisplatina foi obtida da seguinte forma: um determinado volume de amostra de meio de libertação recolhido ao longo do tempo foi misturado com igual volume de solução de OPDA (1,2 mg/mL em *N,N*-dimetilformamida, DMF). O uso de DMF na preparação da solução de OPDA tem por objetivo evitar a precipitação do produto da reação da platina com a OPDA. De seguida, a mistura foi colocada num banho de água a 100 °C durante 10 minutos. Após arrefecimento, mediu-se a absorvância ótica das soluções, por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/VIS), num espectrofotómetro MAPADA, UV-1800 (MAPADA Shanghai, China), a um comprimento de onda de 704 nm. Sempre que necessário, as soluções foram diluídas para uma concentração conveniente. O comprimento de onda, para o qual a absorção de radiação é máxima, foi previamente confirmado (Anexo B).

A curva de calibração foi construída com soluções padrão de cisplatina. Na gama de concentrações investigada, entre 0,1 e 5 ppm (0,0001 e 0,005 mg/mL), o sistema mostrou seguir a lei de Beer (Anexo B).

Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS)

A espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS) é uma técnica analítica multi-elementar e isotópica relativamente recente (os primeiros equipamentos começaram a ser comercializados na década de oitenta).

O ICP-MS é um espectrómetro de massa acoplado a uma fonte de plasma, a qual funciona como um gerador de iões. O plasma do tipo indutivo é gerado por uma fonte de radiofrequência que cria campos eletromagnéticos. A amostra é introduzida no plasma sob a forma de aerossol. O aerossol é transportado para a zona aquecida, onde é rapidamente submetido à dessolvatação (remoção do solvente da amostra líquida), à volatilização para níveis moleculares e à dissociação em átomos, dos quais alguns são ionizados. No espectrómetro de massa os iões são separados e os elementos identificados de acordo com a sua razão massa/carga sendo a concentração do elemento proporcional ao número de iões (Patriarca *et al.*, 2002).

A grande vantagem da técnica de ICP-MS é poder minimizar interferências causadas pela matriz da amostra o que não acontece com o método da *o*-fenilenodiamina.

Condições experimentais

A determinação da concentração de cisplatina, na forma de platina (Pt), foi efetuada num espectrómetro ICP-MS Thermo X Series com um nebulizador Burgener (1 mL/min) e cones de níquel, existente no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro, segundo um método interno baseado na norma ISO 17294 (ISO 17294-1, 2004). A calibração foi efetuada com uma solução padrão 10 ppm (IV-ICPMS-71C).

3.9 ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

O estudo experimental *in vivo* teve por principal objetivo verificar a formação do hidrogel no local de injeção, bem como a sua permanência nesse local, e avaliar a intensidade da resposta inflamatória, através de análise histológica, em ratos da linhagem Wistar, após 7 e 30 dias de implantação do material. Para tal foram testadas duas formulações poliméricas: a solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP) e a formulação de quitosano neutralizada com GP e reticulada com 10% (w/w) de genipin (C/GP/GE10).

A amostra consistiu em quatro ratos Wistar machos, com nove semanas de vida, com cerca de 300 g de peso médio, provenientes de biotério (Laboratórios Charles River, Espanha).

Os animais foram aleatoriamente distribuídos por dois grupos experimentais, de acordo com o material implantado: Grupo I (formulação C/GP) e Grupo II (formulação C/GP/GE10), cada grupo com dois animais.

Os animais foram submetidos a anestesia geral com uma mistura de quetamina e clorpromazina (10 mL de quetamina 10 mg/mL (Ketalar®) e 2 mL de clorpromazina 50 mg/2mL (Largactil®)), por via intraperitoneal.

Para melhor identificação dos locais de implantação do material, procedeu-se a tricotomia da região dorsal. Em seguida desinfetou-se a zona a interencionar com solução de iodopovidona a 1%. Cada animal recebeu três injeções subcutâneas de 200 µL cada. O procedimento foi realizado com seringa equipada com agulha 25G. As formulações implantadas foram previamente preparadas, em condições estéreis conforme descrito na Secção 3.7.2.

As Figuras 3.8 e 3.9 mostram um dos animais utilizados no estudo após tricotomia manual da região dorsal e recebendo a injeção subcutânea, respetivamente.

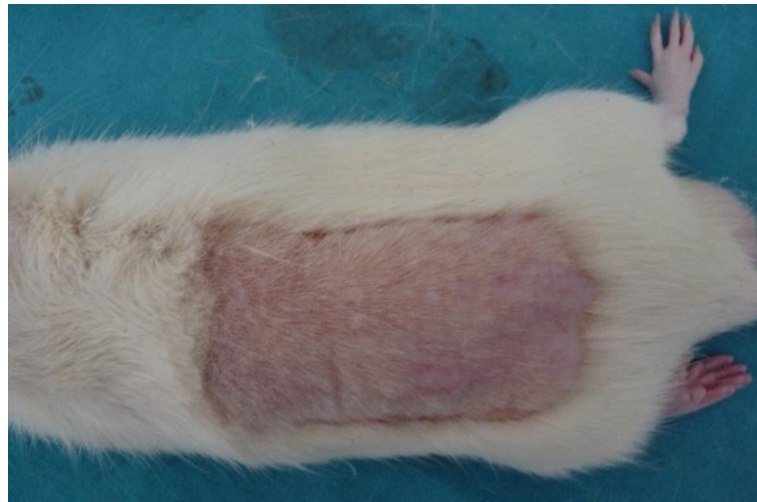


Figura 3.8 - Fotografia de um dos animais do estudo, após tricotomia dorsal.

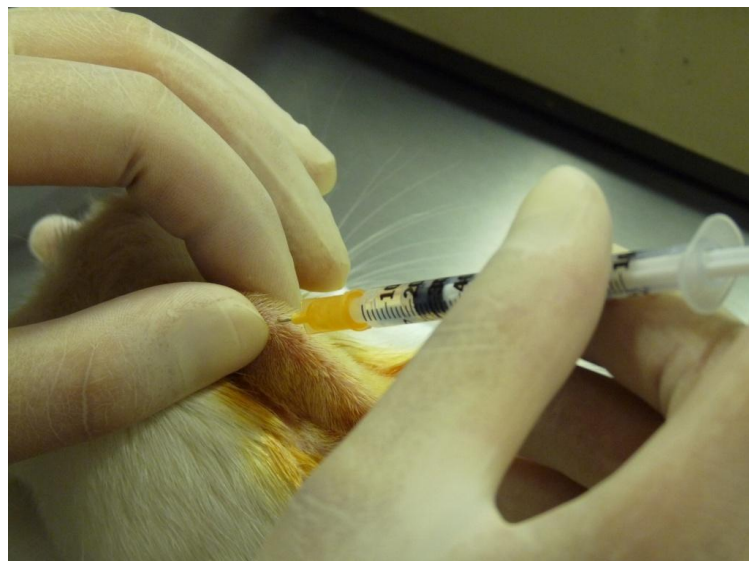


Figura 3.9 - Fotografia de um dos animais do estudo recebendo a injeção subcutânea.

Durante o período de ensaio, os animais foram alojados em gaiolas individuais, higienizadas de acordo com os procedimentos do laboratório, colocadas em sala devidamente programada em termos de temperatura, humidade, circulação de ar, pressão e ciclos de luz/escuridão. Foi fornecida água e ração apropriada *ad libitum*.

A eutanásia foi executada num animal de cada grupo após 7 e 30 dias, respeitando os protocolos éticos (sobredosagem anestésica). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com a portaria nº 1005/92 de 23/10/1992.

Após a eutanásia os animais foram observados e analisados quanto à apresentação de sinais de infeção (nos locais de injeção) procedendo-se de imediato à colheita das porções do tecido que contêm o hidrogel e, de seguida, à sua fixação em 4% de solução de formalina, durante 24 horas. Posteriormente os tecidos foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados no micrótopo (Shandon Finesse 325®) e obtidos cortes com 5 µm de espessura. As lâminas preparadas foram submetidas a coloração segundo a técnica hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada com recurso a um microscópio de diagnóstico (Nikon Eclipse E200®). Foi avaliado não só o leito de implantação mas também o tecido peri-implantar.

3.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi, R.; De Bruijn, J. D. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *86*, 824-32.
- Balakrishnan, B.; Jayakrishnan, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable *in situ* forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3941-51.
- Barnes, H. A.; Bell, D. Controlled-stress rotational rheometry: An historical review. *Korea-Australia Rheology Journal* **2003**, *15*, 187-96.
- Bottom, C. B.; Hanna, S. S.; Siehr, D. J. Mechanism of the ninhydrin reaction. *Biochemical Education* **2010**, *6*, 4-5.
- Boulikas, T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2009**, *18*, 1197-218.
- Brouwer, J.; van Leeuwen-Herberts, T.; Otting-van de Ruit, M. Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta* **1984**, *142*, 21-30.
- Canta, A.; Chiorazzi, A.; Carozzi, V.; Meregalli, C.; Oggioni, N.; Sala, B.; Crippa, L.; Avezza, F.; Forestieri, D.; Rotella, G.; Zucchetti, M.; Cavaletti, G. *In vivo* comparative study of the cytotoxicity of a liposomal formulation of cisplatin (lipoplatin™). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2011**, *68*, 1001-8.
- Casolaro, M.; Cini, R.; Del Bello, B.; Ferrali, M.; Maellaro, E. Cisplatin/hydrogel complex in cancer therapy. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 944-9.

- Chen, H.; Ouyang, W.; Lawuyi, B.; Martoni, C.; Prakash, S. Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *75A*, 917-27.
- Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2155-61.
- Faneca, H.; Faustino, A.; Pedroso de Lima, M. C. Synergistic anti-tumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by alumin-associated cationic liposomes. *Journal of Controlled Release* **2008**, *126*, 175-84.
- Fang, J. Y.; Hsu, S. H.; Leu, Y. L.; Hu, J. W. Delivery of cisplatin from pluronic copolymer systems: liposome inclusion and alginate coupling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2009**, *20*, 1031-47.
- Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by *N*-acetylation. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5872-8.
- Ganji, F.; Abdekhodaie, M. J.; A. Ramazani, S. A. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2007**, *42*, 47-53.
- Golla, E. D.; Ayres, G. H. Spectrophotometric determination of platinum with *o*-phenylenediamine. *Talanta* **1973**, *20*, 199-210.
- Hernigou, P. Chapter 10. Cement with antimetabolites. In *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*. Poitout, D. G., Ed., Springer-Verlag, London, **2004**, 111-5.
- Hwang, T. L.; Lee, W. R.; Hua, S. C.; Fang, J. Y. Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* intratumor drug accumulation against melanomas. *Journal of Dermatological Science* **2007**, *46*, 11-20.
- Iliescu, M.; Hoemann, C. D.; Shive, M. S.; Chenite, A.; Buschmann, M. D. Ultrastructure of hybrid chitosan-glycerol phosphate blood clots by environmental scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* **2008**, *71*, 236-47.
- Imsombut, T.; Srisuwan Y.; Srihanam P.; Baimark, Y. Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology* **2010**, *203*, 603-8.
- ISO 10993-5 (International Standard). *Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. **2009**.
- ISO 17294-1 (International Standard). *Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Part 1. General guidelines*. **2004**.
- Jin, R.; Moreira Teixeira, L. S.; Dijkstra, P. J.; Karperien, M.; van Blitterswijk, C. A. Zhong, Z. Y. ; Feijen, J. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2544-51.
- Jose, S.; Fanguero, J. F.; Smitha, J.; Cinu, T. A.; Chacko, A. J.; Premaletha, K.; Souto, E.B. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and *in vivo* testing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *92*, 175-9.
- Kawadkar, J.; Chauhan, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, *81*, 563-72.

- Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Peng, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43, 1985-2000.
- Nakayama, G. R.; Caton, M. C.; Nova, M. P.; Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods* **1997**, 204, 205-8.
- Nanni, P.; De Giovanni, C.; Lollini, P. L.; Nicoletti, G.; Prodi, G. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* **1983**, 1, 373-80.
- Patriarca M.; Rossi, B.; Menditto, A. Chapter 1. Use of atomic spectrometry (ICP-MS) in the clinical laboratory. In *Advances in atomic spectroscopy* (vol.7), Sneddon, J., Ed., Elsevier Science B. V., Netherlands, **2002**, 1-51.
- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**, 205, 698-9.
- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Grimley, E. B.; Thomson, A. J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, 242, 1347-52.
- Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2764-74.
- Sneddon J.; Butcher D. J. Chapter 7. Application of graphite furnace atomic absorption spectrometry in biological and clinical samples. In *Advances in atomic spectroscopy* (vol.7), Sneddon, J., Ed., Elsevier Science B. V., Netherlands, **2002**, 361-404.
- Stathopoulos, G. P. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anti-Cancer Drugs* **2010**, 21, 732-6.
- Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. L.; Tsai, C. C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* **1999**, 10, 63-78.
- Wang, Y. M.; Sato, H.; Adachi, I.; Horikoshi, I. Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, 85, 1204-10.
- Webb, P.A.; Orr, C. Analytical methods in fine particle technology. Micromeritics Instrument Corporation, USA, **1997**.
- Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.; Bumgardner, J. D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 68, 561-7.
- Zhu, W.; Li, Y.; Liu, L.; Chen, Y.; Wang, C.; Xi, F. Supramolecular hydrogels from cisplatin-loaded block copolymer nanoparticles and α -cyclodextrins with a stepwise delivery property. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3086-92.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DOS HIDROGÉIS DE QITOSANO

SUMÁRIO

Depois de preparados os vários tipos de hidrogéis de base quitosano, procedeu-se à sua caracterização morfológica e estrutural recorrendo às técnicas de microscopia eletrónica de varrimento, abreviadamente SEM, microscopia eletrónica de varrimento ambiental, abreviadamente ESEM, porosimetria de intrusão de mercúrio e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, vulgarmente designada por FTIR. Adicionalmente, o grau de reticulação foi avaliado a partir do ensaio da ninidrina, o qual permite a quantificação dos grupos amina livres.

Através de SEM foi possível observar a microestrutura das matrizes liofilizadas, enquanto a unidade de ESEM permitiu a análise da ultraestrutura no estado hidratado. A porosimetria de mercúrio possibilitou a determinação do tamanho e distribuição de tamanhos de poros, bem assim como da porosidade total das matrizes. A caracterização química, realizada por recurso a FTIR, permitiu avaliar a natureza das interações que ocorrem entre o polímero e os agentes de reticulação e que resultam na formação do hidrogel.

4.1	INTRODUÇÃO.....	103
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
	4.2.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HIDROGÉIS	104
	4.2.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO	109
4.3	CONCLUSÕES	119
4.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos relativos à caracterização morfológica e estrutural dos hidrogéis desenvolvidos no presente trabalho, sendo que parte deles já se encontram publicados em revista da especialidade (Moura *et al.*, 2011).

Tendo como objetivo principal desenvolver um sistema injetável de base quitosano, capaz de ser produzido *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH, foram preparados, tal como se descreveu detalhadamente no capítulo anterior (Secção 3.3), vários tipos de hidrogéis: hidrogéis reticulados fisicamente (ou ionicamente) utilizando fosfato dissódico de glicerol (GP); hidrogéis reticulados quimicamente (ou covalentemente) usando genipin (GE); e hidrogéis co-reticulados física e quimicamente, utilizando ambos os reticulantes (GP e GE). De salientar, contudo, que as condições de preparação dos hidrogéis reticulados apenas com genipin não são compatíveis com os objetivos propostos (pois não cumprem as condições fisiológicas), pelo que estas matrizes apenas foram usadas como materiais de controlo, em alguns estudos de caracterização.

Dado que as propriedades das matrizes dependem decisivamente da composição química, a caracterização destas, tão exaustiva quanto possível, é da maior relevância.

A caracterização morfológica e estrutural dos hidrogéis obtidos foi realizada com recurso às técnicas de SEM, ESEM, porosimetria de intrusão de mercúrio e FTIR. Em todos os ensaios foram usadas matrizes previamente liofilizadas, à exceção da técnica de ESEM que possibilita a análise morfológica dos hidrogéis em ambiente húmido.

Enquanto que com as técnicas de SEM e de ESEM se pretendeu evidenciar a microestrutura dos hidrogéis e avaliar eventuais alterações a nível morfológico, com a porosimetria de intrusão de mercúrio o objetivo foi quantificar tanto o tamanho dos poros como a porosidade global das redes produzidas.

A espectroscopia de FTIR foi aqui utilizada para avaliar possíveis alterações na estrutura química dos hidrogéis, resultantes das interações e reações envolvidas entre o quitosano e os agentes de reticulação usados, quer seja o reticulante iónico (GP), quer seja o reticulante covalente (GE), ou ambos, quando usados em simultâneo.

A combinação de FTIR com o chamado “ensaio da ninidrina” permitiu explorar, com mais profundidade, as várias interações entre o quitosano e os agentes de reticulação.

Os resultados referentes ao estudo da caracterização dos hidrogéis são apresentados e discutidos na Secção 4.2. Esta secção encontra-se dividida em duas subsecções: a Secção 4.2.1 que inclui as observações relativas à análise morfológica; e a Secção 4.2.2 que apresenta a caracterização química e que culmina com a proposta de um esquema de reticulação para as redes de quitosano.

Na Secção 4.3 são resumidas as principais conclusões apresentadas ao longo deste capítulo.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Caracterização morfológica dos hidrogéis

A Figura 4.1 ilustra o aspecto macroscópico dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (denominados C/GP) e dos hidrogéis co-reticulados com 0,10% w/w de genipin (designados C/GP/GE10), após maturação em estufa a 37 °C por um período de 12 horas. Como se pode observar, o hidrogel C/GP (Figura 4.1 A) apresenta um aspecto homogêneo, denotando flexibilidade e cor branca. Em contrapartida, o hidrogel C/GP/GE10 (Figura 4.1 B) exibe uma textura porosa, irregular e uma coloração verde-azulada, característica da ocorrência de reação entre os grupos amina do quitosano e o agente químico de reticulação. De notar, todavia, que ambos os hidrogéis se encontram no estado hidratado.

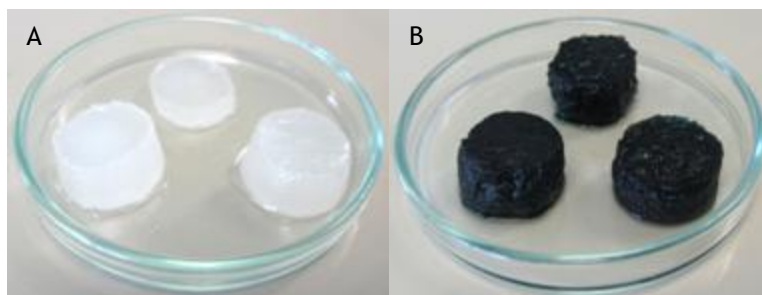


Figura 4.1 - Imagens macroscópicas de: (A) hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogéis de quitosano co-reticulados com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10), em ambos os casos obtidos após maturação em estufa a 37 °C por um período de 12 horas.

A Tabela 4.1 sumariza os efeitos do tempo de reticulação (até 24 horas) no aspecto físico dos hidrogéis de base quitosano co-reticulados, com diferentes concentrações de genipin (incluindo 0 %), uma vez que este parâmetro é da maior relevância.

Conforme indicado nesta tabela, o intervalo de tempo correspondente ao tempo de maturação mínimo (considerado como o tempo requerido para obter matrizes sólidas, no estado de gel, minimamente capazes de suportar as condições experimentais dos ensaios de caracterização) é de 12 horas no caso dos hidrogéis reticulados fisicamente (C/GP), reduzindo-se para duas horas (ou menos), no caso das soluções poliméricas co-reticuladas.

De salientar que o gel ionicamente reticulado mantém a cor branca, enquanto as matrizes co-reticuladas adquirem uma cor verde-azulada, cuja intensidade aumenta, quer com o aumento do tempo de reticulação, quer com a concentração do agente químico. A coloração resulta da

polimerização induzida pelo radical oxigénio do genipin, que ocorre assim que o seu composto heterocíclico se liga ao grupo amina do quitosano na presença de ar (Silva *et al.*, 2008).

Tabela 4.1 - Efeito do tempo reticulação no aspeto físico dos hidrogéis de base quitosano reticulados com diferentes percentagens mássicas de genipin: 0,0% (C/GP), 0,05% (C/GP/GE5), 0,10% (C/GP/GE10), 0,15% (C/GP/GE15) e 0,20% (C/GP/GE20).

hidrogel	tempo de reticulação (h)				
	0	1	2	12	24
C/GP	solução branca	viscoso, branco	viscoso, branco	gel, branco	gel (forte), branco, sinérese
C/GP/GE5	solução amarelada	viscoso, amarelado	gel (frágil), verde-azulado	gel (frágil), verde-azulado	gel (forte), verde-azulado, sinérese
C/GP/GE10	solução amarelada	viscoso, amarelado	gel (frágil), verde-azulado	gel (forte), verde-azulado, sinérese	gel (forte), verde-azulado
C/GP/GE15	solução amarelada	muito viscoso, amarelado	gel (frágil), verde-azulado	gel (forte), verde-azulado, sinérese	gel (forte), verde-azulado
C/GP/GE20	solução amarelada	gel (frágil), ligeiramente verde-azulado	gel (frágil), verde-azulado	gel (forte), verde-azulado, sinérese	gel (forte), verde-azulado

Outro fenómeno que pôde ser observado durante o período de maturação dos hidrogéis (também assinalado na Tabela 4.1) foi a ocorrência de sinérese, ou seja, a exclusão espontânea de água através da superfície das matrizes em repouso.

Dado que os hidrogéis desenvolvidos no presente trabalho se destinam a aplicações na área farmacêutica ou biomédica, o conhecimento da porosidade e do tamanho e distribuição de tamanhos de poros, bem como a sua interligação é essencial para poder prever a interação das matrizes com o meio fisiológico, designadamente a absorção de líquidos fisiológicos, o crescimento celular e o mecanismo de libertação de fármacos.

Conforme referido, para avaliar a morfologia interna dos hidrogéis de quitosano, recorreu-se ao SEM, ESEM, bem como à porosimetria de intrusão de mercúrio.

A Figura 4.2 mostra imagens, obtidas por SEM, da estrutura interna dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e dos hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de genipin (C/GP/GE?). Estas imagens foram obtidas após remoção da água das matrizes por liofilização (Secção 3.4.1).

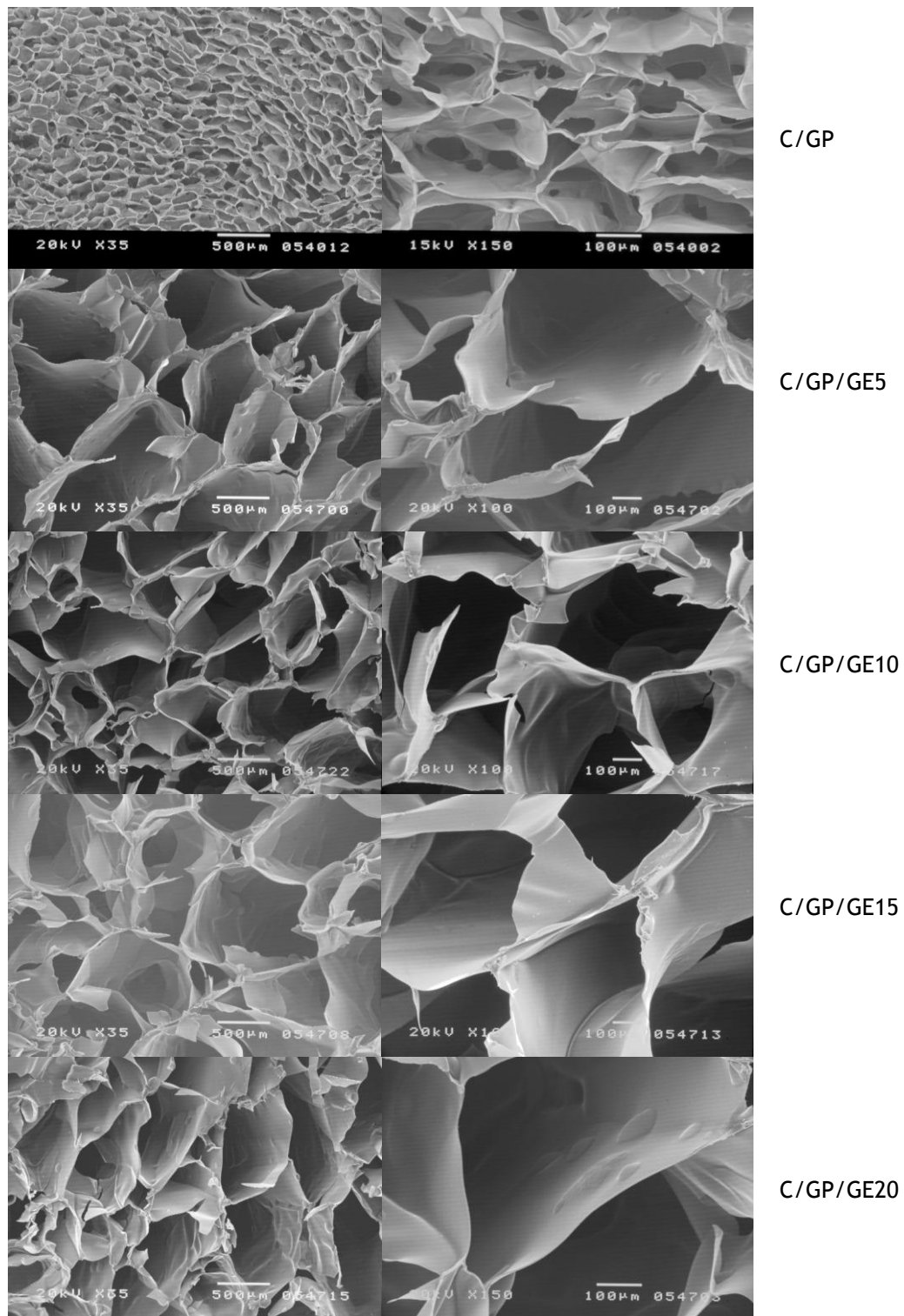


Figura 4.2 - Imagens (com duas ampliações diferentes) da estrutura interna dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e dos hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respectivamente), obtidas por SEM, após remoção da água por liofilização. O período de maturação dos hidrogéis foi de 12 horas.

Como se pode observar, todos os hidrogéis apresentam uma estrutura interna altamente porosa, com poros relativamente grandes (da ordem das dezenas/centenas de micron), muito provavelmente devido à baixa concentração de polímero usada (1,5 g de quitosano em 100 mL de solução). Contudo, as diferenças mais óbvias residem no tamanho dos poros da matriz reticulada fisicamente, C/GP, em relação ao observado nas matrizes co-reticuladas. De facto, as matrizes co-reticuladas exibem poros de tamanho muito superior (diâmetros na ordem de algumas centenas de micron) aos da matriz reticulada fisicamente (diâmetros na ordem de algumas dezenas de micron). Além de poros menores, a matriz sem genipin apresenta uma estrutura mais intrincada e menos uniforme, com poros interligados, enquanto a morfologia das matrizes co-reticuladas é ordenada e constituída por canais paralelos orientados longitudinalmente, de secção reta poligonal, predominantemente hexagonal. Na Figura 4.2 pode, ainda, verificar-se que as matrizes co-reticuladas exibem poros de tamanho e morfologia muito semelhante em toda a gama de concentrações do reticulante químico (de 0,05% a 0,20%, w/w).

Este aumento do tamanho dos poros nas matrizes co-reticuladas, bem como a conservação do seu tamanho com o incremento do teor de genipin, é, de algum modo, inesperado. De facto, é vulgar que um aumento na concentração do reticulante resulte num material com poros de menor diâmetro (Chen *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010). Embora no caso vertente ambas as matrizes sejam reticuladas, seria de esperar que a presença dos dois reticulantes (iónico e covalente) resultasse num tamanho de poro menor relativamente à utilização de um só reticulante (iónico), o que não aconteceu. Esta disparidade, também já observada por outros autores em *scaffolds* porosos de base quitosano-colagénio reticulados com genipin (Bi *et al.*, 2011; Gorczyca *et al.*, 2014), poderia ser atribuída, pelo menos em parte, à formação de uma rede mais estável na presença de um reticulante covalente que pode reduzir a retração das matrizes durante o processo de liofilização (Zhu *et al.*, 2012).

Com o intuito de avaliar até que ponto os processos de congelação e liofilização das amostras afetam a microestrutura final das matrizes, recorreu-se à técnica de ESEM que obvia a necessidade de desidratação das amostras. Esta técnica permite obter imagens, com elevada resolução, de matrizes contendo elevados teores de humidade. As correspondentes imagens (para a matriz reticulada fisicamente, C/GP, e co-reticulada com 0,10% de genipin, C/GP/GE10) são apresentadas na Figura 4.3. Estas imagens confirmam que as matrizes co-reticuladas com genipin exibem tamanhos de poros substancialmente maiores que os da matriz preparada sem recurso ao reticulante químico. Além disso, estas imagens mostram também que o tamanho dos poros obtido em amostras desidratadas (por SEM) é bastante próximo do obtido em amostras hidratadas (por ESEM).

Quanto à orientação longitudinal dos poros das matrizes co-reticuladas, esta poderá dever-se ao molde cilíndrico usado para a preparação dos hidrogéis, que eventualmente condiciona a orientação dos cristais de gelo durante a congelação (Gorczyca *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2010).

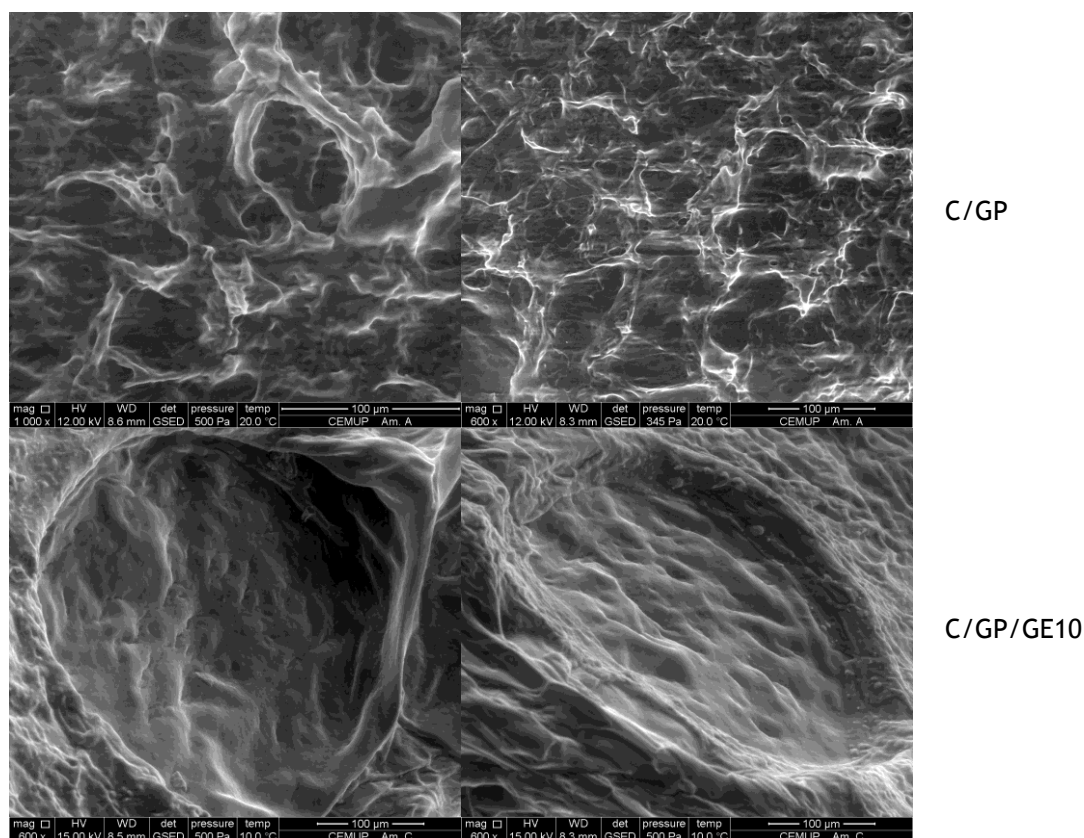


Figura 4.3 - Imagens obtidas por ESEM, em condições hidratadas do hidrogel de quitosano reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e do hidrogel co-reticulado com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10).

Por último, as alterações observadas nas imagens obtidas por SEM (Figura 4.2) foram quantificadas, em termos das distribuições de tamanhos de poros e da porosidade, através da técnica de porosimetria de intrusão de mercúrio. Esta técnica é frequentemente usada para determinar este tipo de parâmetros em amostras porosas desidratadas, tendo sido, mais recentemente, também aplicada à caracterização de hidrogéis (Bi *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2006; Karageorgiou e Kaplan, 2005; Temtem *et al.*, 2012).

A Figura 4.4 apresenta as curvas diferenciais do volume de mercúrio intrudido nos poros da matriz reticulada fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e das matrizes co-reticuladas com diferentes concentrações de genipin, após liofilização. Estes resultados confirmam os obtidos nas imagens da Figura 4.2: a curva respeitante ao hidrogel C/GP exhibe um pico estreito, centrado em torno dos 60 µm, enquanto que as curvas correspondentes aos hidrogéis co-reticulados estão deslocadas no sentido dos poros maiores (moda de aproximadamente 200 µm) e apresentam uma distribuição de tamanhos mais alargada.

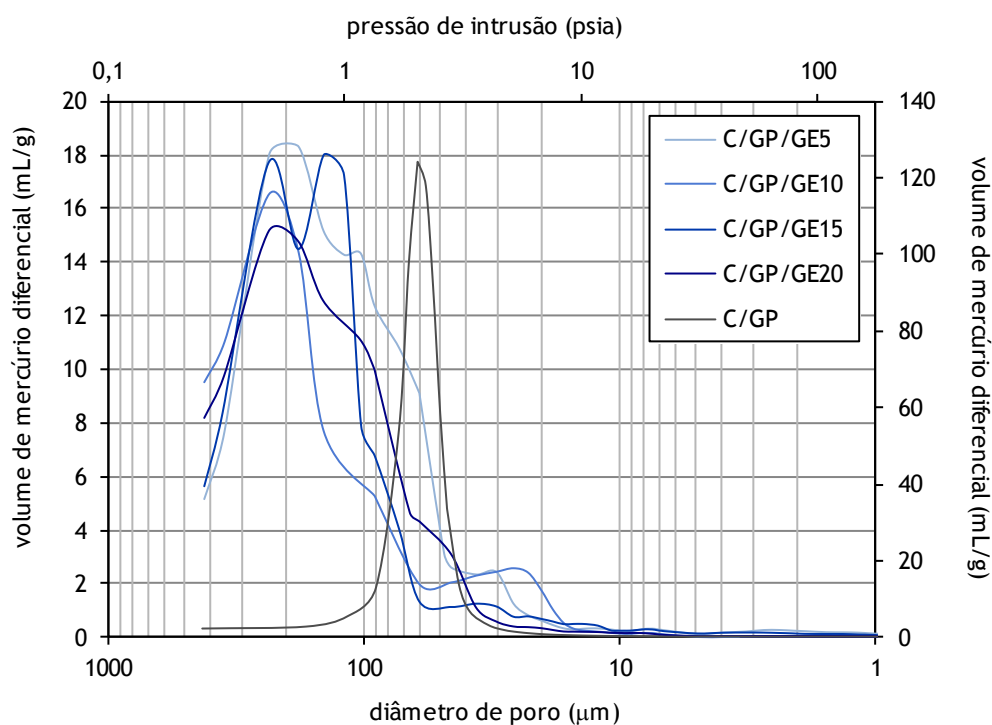


Figura 4.4 - Curvas de distribuição de tamanhos de poros obtidas para as matrizes liofilizadas cujas imagens são ilustradas na Figura 4.2 (matriz de quitosano-fosfato dissódico de glicerol, C/GP, e matrizes co-reticuladas com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w, C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respectivamente). (O volume de mercúrio referente à amostra C/GP é lido no eixo YY da direita; os restantes no eixo YY da esquerda.)

Contudo, é preciso salientar que as curvas referentes aos hidrogéis co-reticulados estão claramente truncadas na zona dos maiores tamanhos, ou seja, superiores a 400 μm . Este é o limite superior de detecção desta técnica e, quando a amostra possui poros maiores, como é o caso vertente, os valores calculados para a porosidade global poderão estar subestimados. De qualquer modo, os valores determinados para a porosidade total foram sempre superiores a 90% para todas as amostras, confirmando que a estrutura polimérica dos vários tipos de hidrogéis de quitosano é muito porosa, o que será benéfico para a difusão de substâncias no seu interior.

4.2.2 Avaliação do grau de reticulação

A nível molecular a estrutura química dos hidrogéis co-reticulados torna-se mais complexa comparativamente à dos hidrogéis reticulados apenas ionicamente ou apenas covalentemente, uma vez que envolve um grande número de grupos funcionais ativos como resultado da ocorrência, na mesma rede, de interações físicas e reação química. Além disso, muitas vezes, o espectro de FTIR apresenta forte sobreposição de bandas características de grupos funcionais distintos o que dificulta, ainda mais, a sua interpretação. Assim, para melhor compreender e interpretar os

espectros de FTIR dos hidrogéis co-reticulados, optou-se por analisar, em primeiro lugar, os espectros individuais do quitosano e dos agentes de reticulação e só depois os espectros resultantes das interações e/ou reações entre o polímero e os reticulantes.

Os espectros de absorção para cada amostra foram obtidos a partir de pastilhas preparadas misturando a amostra, previamente reduzida a pó, com KBr, num espectrofotómetro Jasco FTIR-4200 (Tokyo, Japan). No caso dos hidrogéis, estes foram antecipadamente liofilizados (liofilizador, Snijders Scientific type 2040, Tilburg, Holland).

Na Figura 4.5 encontra-se representado o espectro de FTIR do quitosano (cuja estrutura molecular se encontra representada na Figura 2.4 B), com as bandas mais relevantes assinaladas.

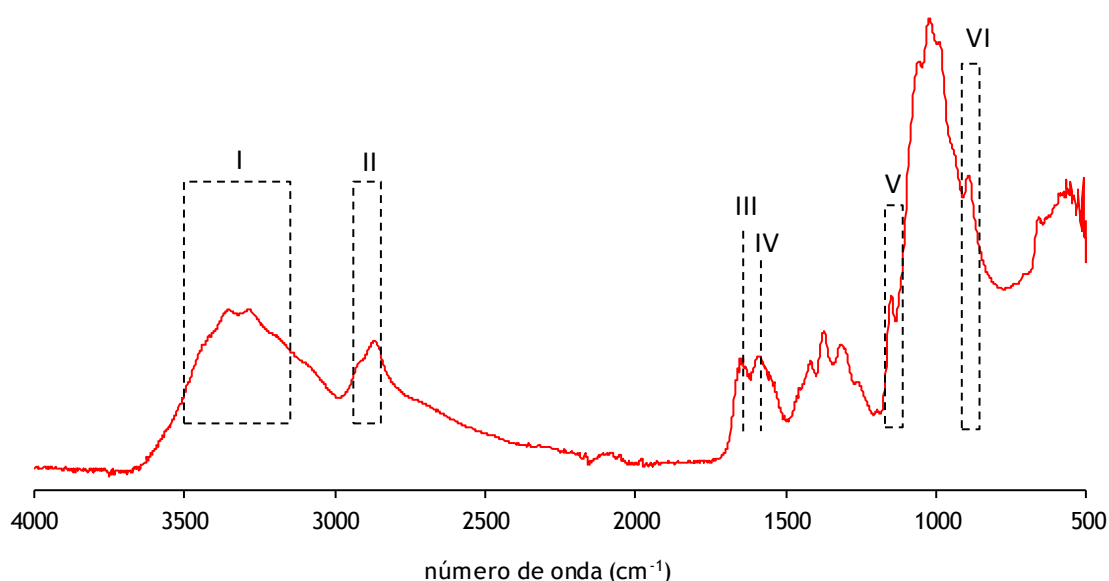


Figura 4.5 - Espectro de FTIR do quitosano com um grau de desacetilação de 87%.

Neste espectro, a absorção na região $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (I) resulta da sobreposição de vibrações dos grupos amina $\nu(\text{N}-\text{H})$ e hidroxilo $\nu(\text{O}-\text{H})$ e o pico centrado em 2868 cm^{-1} (II) é atribuído à vibração de alongamento da ligação $\text{C}-\text{H}$ dos grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$. A absorção a 1645 cm^{-1} (III) é atribuída à vibração de alongamento do grupo carbonilo dos grupos amida (amida I), presentes nas unidades acetiladas do quitosano enquanto a absorção a 1586 cm^{-1} (IV) é o resultado da sobreposição de duas vibrações: a vibração do grupo amida (designada por amida II) e a vibração de deformação da ligação $\text{N}-\text{H}$ das aminas primárias presentes nas unidades desacetiladas. Os modos vibracionais associados à ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ da estrutura sacarídea do quitosano $\nu(-\text{O}-)$, em 1153 cm^{-1} (V) e 893 cm^{-1} (VI), podem, também, ser detetados no espectro da Figura 4.5. A atribuição das bandas no espectro de FTIR do quitosano encontra-se dentro da gama

de valores indicados na literatura (Bispo *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2004).

Como se disse, para melhor compreender o mecanismo de reticulação entre o quitosano e os agentes de reticulação procedeu-se, também, à aquisição individual de espectros de FTIR destes últimos. Assim, nas Figuras 4.6 e 4.7 encontram-se representados os espectros do genipin (reticulante químico) e do fosfato dissódico de glicerol (reticulante físico), respetivamente, com as bandas mais relevantes assinaladas. As estruturas moleculares, quer do genipin quer, do fosfato dissódico de glicerol, encontram-se nas Figuras 2.10 C e 3.2, respetivamente.

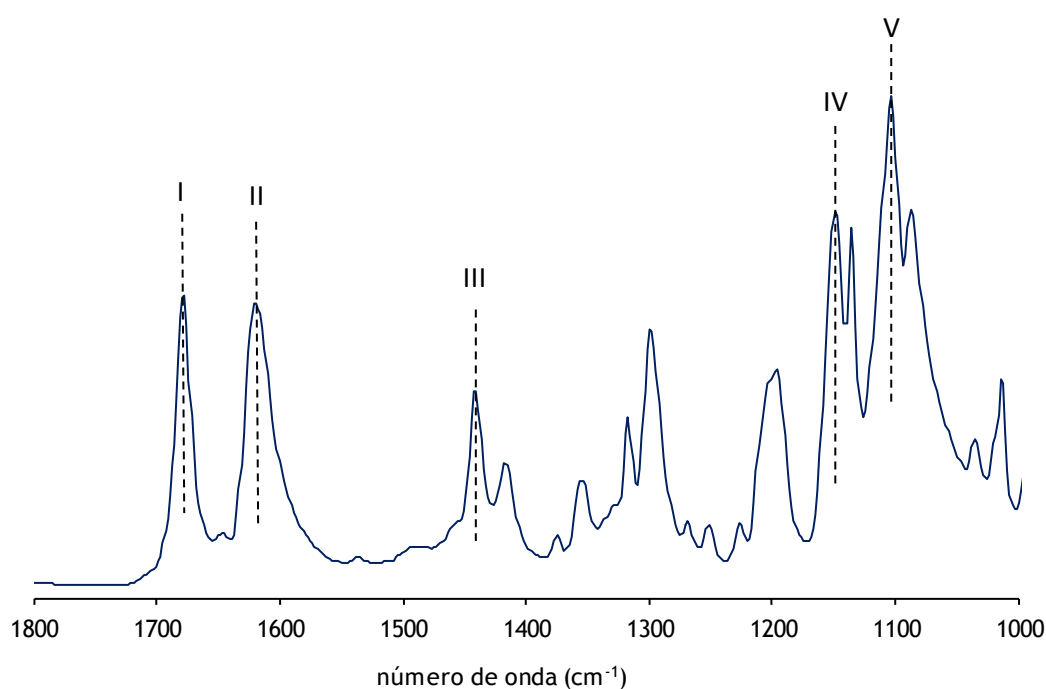


Figura 4.6 - Espectro de FTIR do genipin.

Dos múltiplos picos de absorção exibidos no espectro do genipin (Figura 4.6) destacam-se os mais relevantes, estabelecidos de acordo com a literatura (Bispo *et al.*, 2010; Butler *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2000; Mi *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). Assim, o pico de absorção a 1680 cm^{-1} (I) é atribuído à vibração de alongamento da ligação $\text{C}=\text{O}$ nos grupos carboxílicos esterificados com o grupo metilo, enquanto a absorção a 1621 cm^{-1} (II) está associada à vibração de alongamento do alceno da ciclo-olefina $\nu(\text{C}=\text{C})$ da molécula de genipin. O pico de absorção a 1443 cm^{-1} (III) corresponde às vibrações do anel e as absorções a 1150 cm^{-1} (IV) e 1103 cm^{-1} (V) estão associadas à vibração do grupo $\nu(\text{C}-\text{O})$ no éter cíclico da estrutura.

Relativamente ao espectro de FTIR do fosfato dissódico de glicerol (Figura 4.7) além da banda de extensa largura, compreendida entre $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (I), associada à vibração de alongamento dos grupos O – H presentes no glicerol, destaca-se também uma forte absorção na região $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ (II). De acordo com a literatura, a absorção nesta região está relacionada com a presença de funcionalidades fosfato, nomeadamente com a vibração das ligações P = O e P – O (Amaral *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 1999b; Mi *et al.*, 1999c; Mi *et al.*, 1999a). Ainda de acordo com a literatura, o pico a 970 cm^{-1} (III) é atribuído à vibração de alongamento da ligação P – OH.

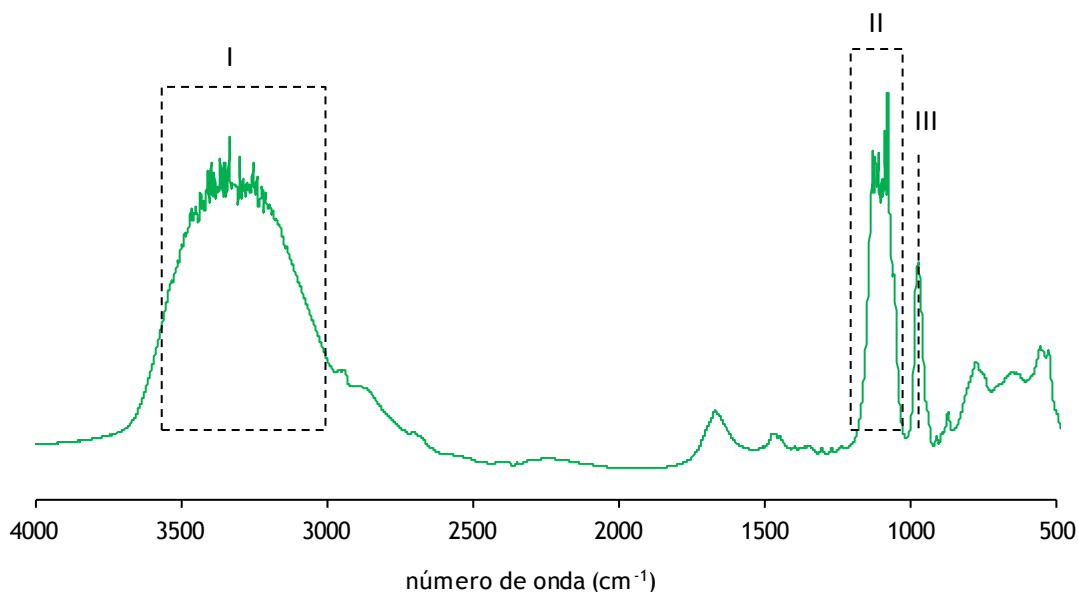


Figura 4.7 - Espectro de FTIR do fosfato dissódico de glicerol.

A deteção das bandas mencionadas tem sido usada por vários autores para monitorizar as interações moleculares entre o quitosano e vários sais de fosfato, nomeadamente o tripolifosfato de sódio e, ainda, entre o quitosano e o ácido polifosfórico (Amaral *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2012; Mi *et al.*, 1999b; Mi *et al.*, 1999c; Mi *et al.*, 1999a; Mi *et al.*, 2003). No caso particular do presente estudo, as bandas referidas foram usadas (algumas delas após ligeiros ajustes) para caraterizar a interação entre o quitosano e o fosfato dissódico de glicerol, que leva à formação de uma rede tridimensional.

Quando à solução de quitosano (que exhibe um valor de pH de 5,5) é adicionado fosfato dissódico de glicerol (GP) ou genipin (GE) ocorrem, naturalmente, alterações conformacionais em consequência do rearranjo estrutural das cadeias do polímero, resultantes de interações entre o quitosano e os respetivos reticulantes. A natureza destas interações, que em ambos os casos conduzem à formação de um hidrogel, foi investigada, como já se disse, através da técnica de espectroscopia de FTIR, estando os respetivos espectros apresentados na Figura 4.8. Para melhor compreender e interpretar estes espectros achou-se conveniente incluir, na mesma figura, os espectros individuais, quer do

polímero, quer dos reticulantes, todavia foi apenas incluído o espectro do GP pois o de GE (ilustrado na Figura 4.6) tornava a figura demasiado confusa.

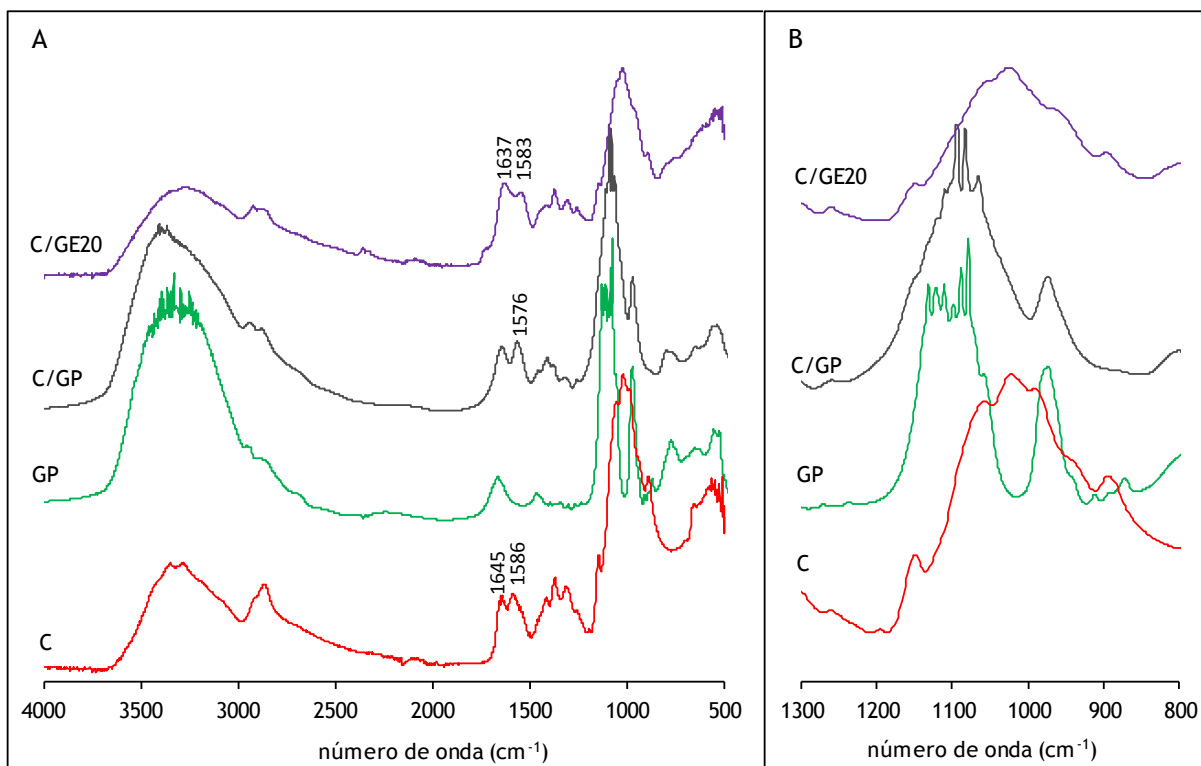


Figura 4.8 - Espectros de FTIR: (A) do quitosano (C), do fosfato dissódico de glicerol (GP), do hidrogel de quitosano reticulado com GP (C/GP) e do hidrogel de quitosano reticulado com 0,20% w/w de genipin (C/GE20); e (B) ampliação da região dos espectros entre 1300 e 800 cm^{-1} .

Apesar do espectro do hidrogel C/GP (associado à neutralização da solução de quitosano com GP) mostrar as bandas características, tanto do polímero como do reticulante iónico, isto não significa que a estrutura do hidrogel corresponda meramente à simples presença dos seus constituintes (C e GP). De facto, quando se amplia a região dos espectros compreendida entre 1300 e 800 cm^{-1} (Figura 4.8 B), torna-se aparente que as diferenças observadas, nomeadamente na região do espectro associada à presença de funcionalidades fosfato (1200-1050 cm^{-1}) e particularmente na região acima dos 1100 cm^{-1} , são, provavelmente, o resultado das interações iónicas entre os grupos amina protonados do quitosano (NH_3^+) e os grupos fosfato, carregados negativamente ($\text{P} - \text{O}^-$), do GP. Mais, o desvio observado no espectro do hidrogel C/GP relativamente ao pico característico das aminas protonadas no espectro do quitosano, de 1586 cm^{-1} para 1576 cm^{-1} , comprova a presença das referidas interações.

Corroborando esta suposição, outros autores mostraram igualmente, através de espectroscopia de FTIR, que a interação entre o GP e o quitosano é uma interação puramente física (Faikrua *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2007).

A reação entre o quitosano e o genipin (sem adição de fosfato dissódico de glicerol e, portanto, em ambiente ácido) pode ser avaliada pela comparação dos espectros de FTIR do polímero antes e após a reação com o reticulante químico (espectros C e C/GE20, respetivamente), ilustrados na Figura 4.8 A. Mesmo sem o aparecimento de novos picos no espectro C/GE20, as alterações estruturais causadas pela reticulação do quitosano com genipin podem ser reveladas pelos desvios das bandas correspondentes à amida I (de 1645 cm^{-1} para 1637 cm^{-1}) e à amida II (de 1586 cm^{-1} para 1583 cm^{-1}) no hidrogel reticulado quimicamente.

Por outro lado, a intensidade de absorção do sinal a 1586 cm^{-1} diminuiu no espectro do hidrogel C/GE20, o que pode corroborar a reação dos grupos amina do quitosano com a molécula de genipin. De sublinhar que foi com base neste tipo de informação que Butler e seus colaboradores (Butler *et al.*, 2003) estabeleceram um mecanismo para a reação química de reticulação entre o quitosano e o genipin (Figura 2.11).

O efeito simultâneo da interação iónica e da ligação covalente na mesma rede tridimensional foi, também, investigado por espectroscopia de FTIR, analisando os hidrogéis de quitosano co-reticulados, utilizando como reticulantes o GP e o GE, este último em diferentes concentrações. Estes espectros de FTIR encontram-se representados na Figura 4.9 A, na qual foi também incluído o espectro referente ao hidrogel reticulado fisicamente, sem genipin (C/GP), para comparação.

No que respeita ao efeito da concentração de genipin, não se observam alterações significativas nas curvas dos hidrogéis co-reticulados com concentrações de GE entre 0,05 e 0,20%, w/w. Todavia, a ocorrência de reticulação química é evidenciada pela diminuição da intensidade de absorção do pico a 1572 cm^{-1} relativamente ao pico do espectro do hidrogel C/GP a 1576 cm^{-1} .

Por outro lado, e como ilustrado na ampliação da região dos espectros compreendida entre 1300 e 800 cm^{-1} (Figura 4.9 B), os sinais das funcionalidades fosfato aparecem menos resolvidos nos espectros dos hidrogéis co-reticulados quando comparados com a resolução obtida no espectro do hidrogel C/GP. Este facto sugere que, em virtude da reticulação química, ocorrem mudanças estruturais na rede que afetam as ligações P – O e N – H.

Por último, não será demais sublinhar que a interpretação dos espectros de FTIR é por vezes problemática, especialmente quando existe um grande número de grupos funcionais ativos e quando ocorrem bandas vibracionais que se sobrepõem, como é o caso vertente. Acresce ainda o facto de, muitas vezes, não haver consenso na atribuição dessas bandas.

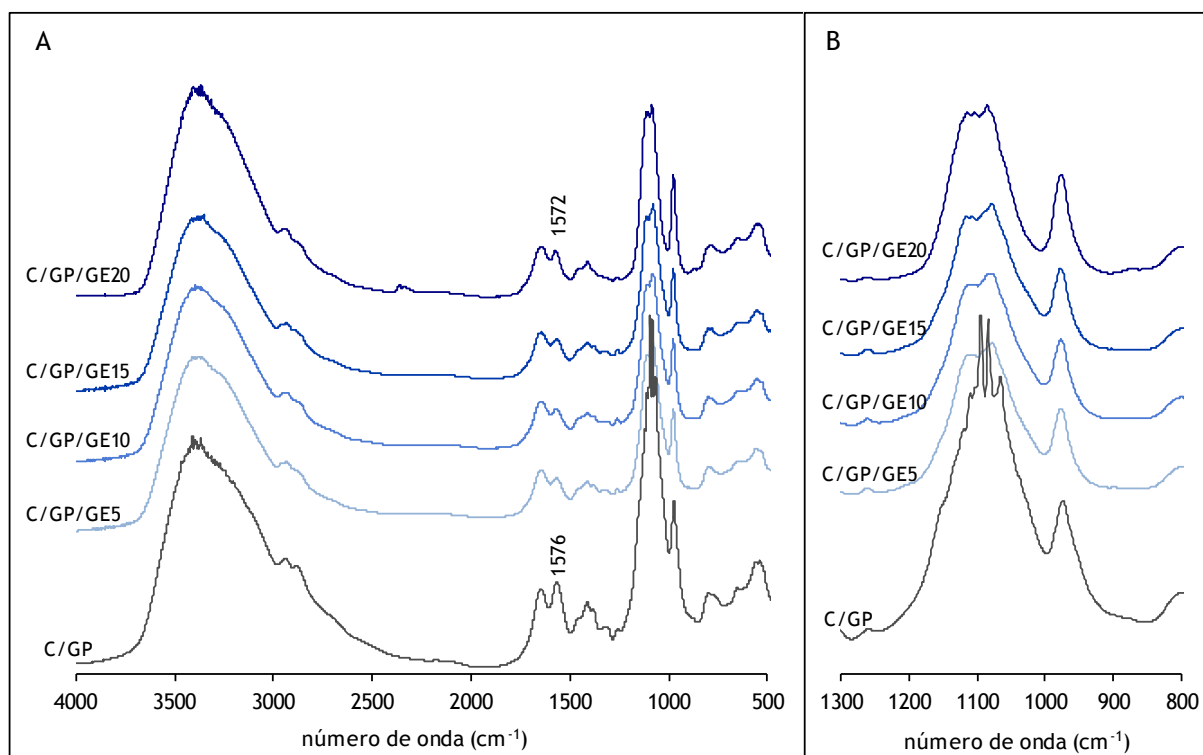


Figura 4.9 - Espectros de FTIR: (A) do hidrogel de quitosano reticulado com fosfato dissódico de glicerol, GP, (C/GP) e de hidrogéis de quitosano co-reticulados com GP e genipin (GE), este último em diferentes concentrações: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente); e (B) ampliação da região dos espectros entre 1300 e 800 cm^{-1} .

Ensaio da ninidrina

Por forma a investigar com mais detalhe as várias interações entre o quitosano e os agentes de reticulação usados procedeu-se à realização de ensaios adicionais, concretamente ao ensaio da ninidrina (Secção 3.5). Este ensaio permite determinar a percentagem de grupos amina livres, presentes nos hidrogéis após a reação de reticulação. Para garantir a completa reação de reticulação, os hidrogéis foram analisados após um período de maturação de 24 horas.

O gráfico de barras da Figura 4.10 mostra a quantidade de grupos amina livres, em termos de concentração de glicina (μmol de glicina/mg de amostra), nos hidrogéis de quitosano co-reticulados com diferentes concentrações de GE (incluindo 0%, C/GP). A linha a tracejado, incluída na figura (equivalente a $2,47 \mu\text{mol}$ de glicina/mg de amostra), representa a quantidade de grupos amina livres correspondente à amostra de quitosano tal qual, isto é, não sujeita a qualquer tipo de reticulação.

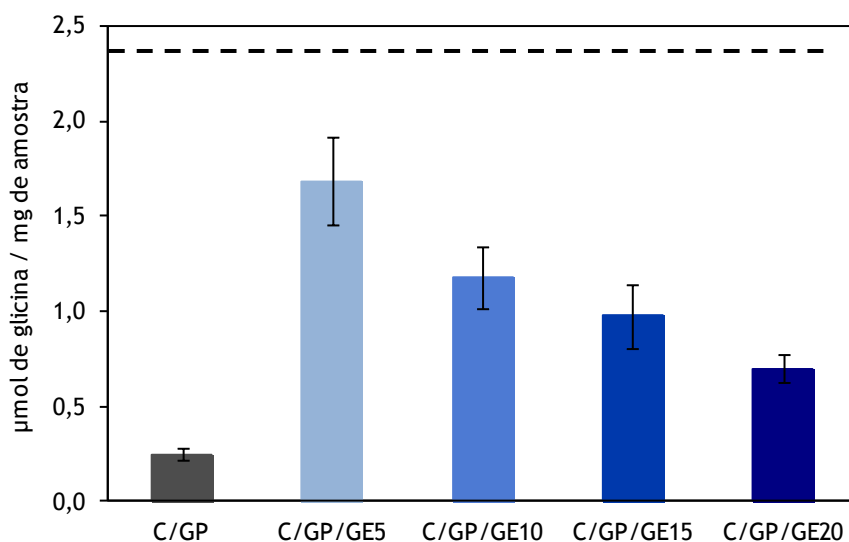


Figura 4.10 - Efeito da concentração de genipin na quantidade de grupos amina livres, em termos de concentração de glicina (μmol de glicina/ mg de amostra) nos hidrogéis reticulados fisicamente com fosfato dissódico de glicerol, GP, (C/GP) e nos hidrogéis co-reticulados com GP e diferentes concentrações de genipin (GE): 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente). A linha a tracejado corresponde ao quitosano original, em pó.

Estes resultados revelam, surpreendentemente, que o hidrogel reticulado fisicamente (C/GP) contém muito menor quantidade de grupos amina livres (aproximadamente $0,25 \mu\text{mol}/\text{mg}$) que os hidrogéis co-reticulados.

A adição de genipin aumenta drasticamente a quantidade de grupos amina livres (hidrogel C/GP/GE5). De facto, a exposição de grupos amina poderá ser explicada atendendo a que a adição de GE tende a perturbar o mecanismo de interação iónica, indiciando, mesmo, que a reticulação química é o processo dominante. De notar que alterações igualmente drásticas decorrentes da presença do reticulante químico foram também verificadas a nível morfológico (Figura 4.2).

Por outro lado, a perda de mobilidade das cadeias de quitosano, em virtude da presença de ligações covalentes, poderá limitar a possibilidade de ocorrência de sítios ótimos para o estabelecimento das interações iónicas.

Na Figura 4.10 deteta-se ainda que à medida que a concentração de genipin aumenta, a quantidade de grupos amina livres diminui, tal como era expectável.

Como se disse, foram também investigados os efeitos da reticulação química (pura) dos hidrogéis. Para tal foi preparado um conjunto de formulações, desta vez sem a prévia neutralização da solução de quitosano com GP (nestas formulações prevalece um valor de pH de 5,5), usando as mesmas concentrações de genipin. Estas amostras foram igualmente submetidas ao ensaio da ninidrina. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.11, conjuntamente com os dos

correspondentes géis co-reticulados, em termos de percentagem do grau de reticulação *versus* concentração mássica de genipin. Como era expectável o grau de reticulação aumenta com a concentração mássica do reticulante químico em ambos os conjuntos de amostras.

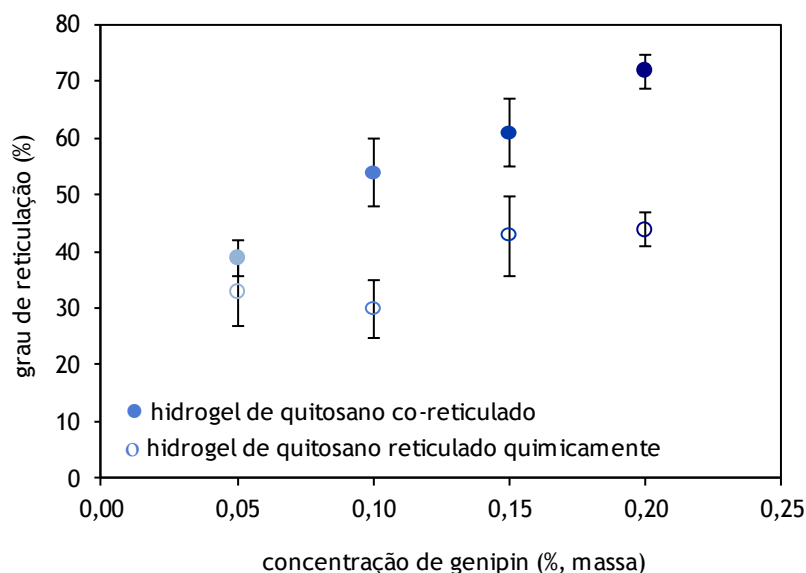


Figura 4.11 - Grau de reticulação (calculado a partir da equação 3.3) obtido para os hidrogéis de quitosano reticulados com genipin, com (símbolos fechados) e sem (símbolos abertos) a adição de fosfato dissódico de glicerol, ou seja, co-reticulado e reticulado quimicamente, respetivamente.

De forma complementar, estes resultados mostram que o grau de reticulação dos hidrogéis reticulados quimicamente é sempre menor que o dos hidrogéis co-reticulados. Este facto pode estar relacionado não somente com os efeitos de ambos os tipos de ligações (iónicas e covalentes) ocorrerem nos hidrogéis co-reticulados, mas também com o efeito do pH (que na matriz reticulada quimicamente é de 5,5). Com efeito, e de acordo com a literatura (Mi *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2005), a reação de reticulação associada ao quitosano usando o tripolifosfato e o genipin é altamente dependente do pH, atingindo valores máximos do grau de reticulação para condições de pH neutras. Todavia, e como já foi referido, os hidrogéis reticulados quimicamente são de uso limitado, sobretudo quando se pretende preparar um sistema capaz de ser formado *in situ* e em condições fisiológicas de temperatura e de pH, como é o caso deste trabalho. Por esta razão, estes hidrogéis apenas serão utilizados como controlo em alguns estudos de caracterização.

Das Figuras 4.10 e 4.11 é ainda evidente que a concentração de genipin pode ser usada para modular a extensão da reação de reticulação dos hidrogéis de quitosano e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas/reológicas das redes produzidas, como se verá no capítulo seguinte.

Por último, e com base nos resultados apresentados e discutidos nesta secção, procurou estabelecer-se um esquema de reticulação para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente

com GP (cujas redes são produzidas por interações iônicas) e para os hidrogéis co-reticulados com GP e GE (cujas redes são produzidas simultaneamente por interações iônicas e ligações covalentes), ilustrado na Figura 4.12.

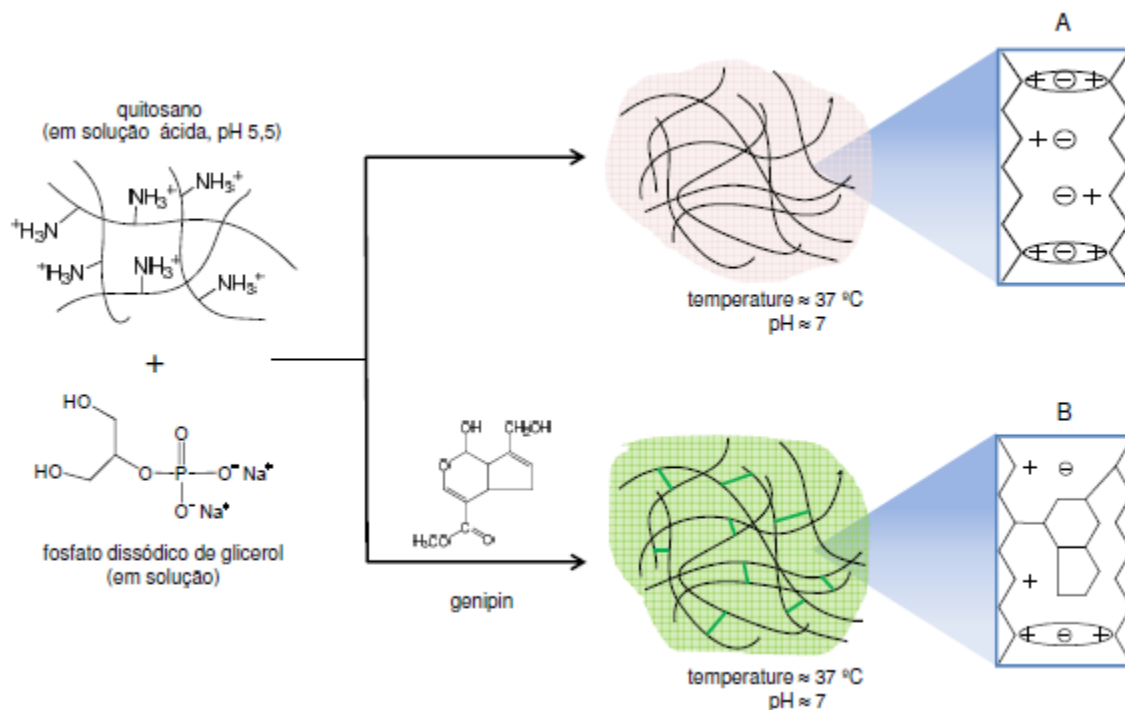


Figura 4.12 - Esquema proposto para a reticulação dos hidrogéis de quitosano produzidos em condições fisiológicas (de temperatura e de pH) via (A) reticulação física (iônica) e (B) co-reticulação (iônica e covalente).

Convém, no entanto, relembrar, em primeiro lugar, que a preparação dos hidrogéis de quitosano pressupõe a solubilização do quitosano que, como se sabe, apenas é solúvel em soluções aquosas ácidas (no presente caso, foi usada uma solução aquosa de ácido acético de concentração 0,5% v/v, e pH de 2,5). Nestas condições ocorre a protonação dos grupos amina livres (NH_2) do quitosano, ou seja, estes adquirem carga positiva formando íons NH_3^+ (ilustrado na Figura 4.12, lado esquerdo) e, como consequência, verifica-se um aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias do polímero, que assim se mantêm dispersas na solução aquosa do ácido. Além disso, a solubilização do quitosano motiva um aumento do valor do pH da solução para 5,5.

Quando à solução de quitosano se adiciona a solução aquosa de fosfato dissódico de glicerol, gota a gota e lentamente, ocorre a neutralização dos grupos amina, carregados positivamente, pelos grupos fosfato do sal, carregados negativamente (Figura 4.12 A). A interação iônica verificada entre estes dois grupos leva a que as cadeias do polímero se tornem mais próximas umas das outras e assim diminua a repulsão eletrostática.

A adição do reticulante químico (genipin) à solução de quitosano, previamente neutralizada com fosfato dissódico de glicerol, adiciona à interação iônica a ligação covalente entre o polímero e o reticulante e consequentemente reforça a estrutura da rede (Figura 4.12 B).

Além disso, a presença do sal possui, a nível da estrutura da rede, um efeito adicional: quando a temperatura é aumentada para 37 °C verifica-se o aparecimento de outras interações, tais como ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas e forças de atração de van der Waals (Sharma *et al.*, 2007), que resultam na gelificação da solução de quitosano-fosfato dissódico de glicerol.

A ocorrência na mesma rede de reticulação física e de reticulação química do quitosano pode ser relevante para modular as propriedades finais dos géis bem como as cinéticas de gelificação, como se verá no capítulo seguinte.

4.3 CONCLUSÕES

A primeira conclusão a retirar dos resultados apresentados neste capítulo mostra que a metodologia desenvolvida no presente trabalho, com vista à preparação de um hidrogel de quitosano co-reticulado, isto é, que combina um mecanismo de reticulação iônica e outro covalente, conduz à formação de um gel, por observação a olho nu, ao fim de duas horas de reticulação à temperatura de 37 °C. Contudo, o tempo necessário para a obtenção de matrizes no estado de gel revelou ser dependente da concentração do reticulante químico.

Em termos macroscópicos a grande diferença entre um hidrogel de quitosano reticulado fisicamente com GP e um hidrogel de quitosano co-reticulado com GP e GE, reside na coloração. Enquanto o primeiro possui cor branca, o segundo possui cor verde-azulada em resultado da reação química de reticulação entre os grupos amina do quitosano e a molécula de genipin, sendo a coloração usada como indicador da ocorrência da reação química.

Relativamente à microestrutura interna, examinada por SEM, ESEM e porosimetria de intrusão de mercúrio, os hidrogéis apresentam diferenças significativas, quer a nível morfológico, quer a nível do tamanho e distribuição de tamanhos dos poros. Enquanto o hidrogel reticulado fisicamente apresenta uma estrutura intrincada com poros interligados com uma distribuição de tamanhos apertada, cuja moda se situa em aproximadamente 60 µm, os hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de genipin (0,05% a 0,20%, w/w) exibem uma estrutura porosa constituída por canais paralelos orientados longitudinalmente com distribuições de tamanhos alargadas, com uma moda situada em aproximadamente 200 µm.

As análises de FTIR mostram que a nível molecular, a estrutura química dos hidrogéis co-reticulados é mais complexa que a dos hidrogéis reticulados apenas ionicamente ou apenas covalentemente, uma vez que envolve um grande número de grupos funcionais ativos como resultado da ocorrência, na mesma rede, de interações físicas e reação química.

Com efeito, os espectros confirmam a presença de interações entre o quitosano (C) e o reticulante iônico (GP) nas matrizes C/GP, de ligações covalentes entre o quitosano e o reticulante químico (GE) nas redes C/GE e de interações iônicas e ligações covalentes entre o quitosano e os reticulantes (iônico e covalente) nas redes C/GP/GE?.

Por último, e em relação à concentração de genipin, verifica-se não ser esta variável muito relevante nos parâmetros testados. Contudo, a presença do reticulante químico, mesmo que na concentração mais baixa, numa rede co-reticulada leva a alterações muito significativas, não só a nível morfológico (tamanho e distribuições de tamanhos de poros) como também a nível estrutural, nomeadamente porque provoca o aumento da exposição de grupos amina livres do polímero relativamente à matriz reticulada fisicamente.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, I. F.; Granja, P. L.; Barbosa, M. A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* **2005**, *16*, 1575-93.
- Bi, L.; Cao, Z.; Hu, Y.; Song, Y.; Yu, L.; Yang, B.; Mu, J.; Huang, Z.; Han, Y. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2011**, *22*, 51-62.
- Bispo, V. M.; Mansur, A. A.; Barbosa-Stancioli, E. F.; Mansur, H. S. Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2010**, *6*, 166-75.
- Butler, M. F.; Ng, Y-F; Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2003**, *41*, 3941-53.
- Chen, H.; Ouyang, W.; Lawuyi, B.; Martoni, C.; Prakash, S. Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *75A*, 917-27.
- Chen, K-Y; Liao, W-J; Kuo, S-M; Tsai, F-J; Chen, Y-S; Huang, C-Y; Yao, C-H. Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1642-9.
- Chen, S-C; Wu, Y-C; Mi, F-L; Lin, Y-H; Yu, L-C; Sung, H-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96*, 285-300.
- Faikrua, A.; Jeenapongsa, R.; Sila-asna, M.; Viyoch, J. Properties of β -glycerol phosphate/collagen/chitosan blend scaffolds for application in skin tissue engineering. *ScienceAsia* **2009**, *35*, 247-54.
- Ferreira, L.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H.; Ramos, M. A. Structural analysis of dextran-based hydrogels obtained chemoenzymatically. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **2006**, *77B*, 55-64.
- Gorczyca, G.; Tylingo, R.; Szweda, P.; Augustin, E.; Sadowska, M.; Milewski, S. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *102*, 901-11.

- Hu, L.; Wang, C-A; Huang, Y.; Sun, C.; Lu, S.; Hu, Z. Control of pore channelsize during freeze casting of porous YSZ ceramics with unidirectionally alignedchannels using different freezing temperatures. *Journal of the European Ceramic Society* **2010**, 30, 3389-96.
- Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, 26, 5474-91.
- Martins, A. F.; de Oliveira, D. M.; Pereira, A. G. B.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin International. *Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 51, 1127-33.
- Mi, F. L.; Sung, H-W; Shyu, S-S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38, 2804-14.
- Mi, F-L.; Shyu, S-S; Kuan, C-Y; Lee, S-T; Lu, K-T; Jang, S-F. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. *Journal of Applied Polymer Science* **1999b**, 74, 1868-79.
- Mi, F-L.; Shyu, S-S; Lee, S-T; Wong, T-B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* **1999c**, 37, 1551-64.
- Mi, F-L.; Shyu, S-S; Wong, T-B; Jang, S-F ; Lee, S-T; Lu, K-T. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *Journal of Applied Polymer Science* **1999a**, 74, 1093-107.
- Mi, F-L; Shyu, S-S; Peng, C-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43, 1985-2000.
- Mi, F-L; Sung, H-W; Shyu, S-S; Su, C-C; Peng, C-K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer* **2003**, 44, 6521-30.
- Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3275-84.
- Sharma, G.; Italia, J. L.; Sonaje, K.; Tikoo, K.; Kumar, M. N. V. R. Biodegradable *in situ* gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Controlled Release* **2007**, 118, 27-37.
- Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2764-74.
- Temtem, M.; Barroso, T.; Casimiro, T.; Mano, J. F.; Aguiar-Ricardo, A. Dual stimuli responsive poly(N-isopropylacrylamide) coated chitosan scaffolds for controlled release prepared from a non residue technology. *Journal of Supercritical Fluids* **2012**, 66, 398- 404.
- Tian, F.; Liu, Yu; Hu, K.; Zhao, B. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 57, 31-7.
- Yan, L-P; Wang, Y-J; Ren, L.; Wu, G.; Caridade, S. G.; Fan, J-B; Wang, L-Y; Ji, P-H; Oliveira, J. M.; Oliveira, J. T.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, 95,465-75.

Zhu, J.; Xiong, Y.; Zeng, C.; Qiag, N.; Quan, D.; Wan, J. Elastic chitosan conduits with multiple channels and well defined microstructure. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 51, 105-12.

CAPÍTULO 5

ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE QUITOSANO

SUMÁRIO

A caracterização reológica dos hidrogéis de base quitosano foi realizada com a finalidade de estudar o seu comportamento viscoelástico. Avaliaram-se os efeitos do pH do meio e do tipo e concentração de reticulante: i) no comportamento em escoamento das respetivas soluções; ii) no processo de gelificação; e iii) nos géis após maturação. Foram também estudados os efeitos reológicos em relação a variáveis como a temperatura e o tempo.

Os resultados mostram que é possível modular as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis em condições fisiológicas de pH e de temperatura, através da adição de genipin. Além disso, algumas das formulações desenvolvidas exibem potencial para serem administradas por via injetável e produzidas *in situ*.

5.1	INTRODUÇÃO.....	125
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
	5.2.1 COMPORTAMENTO VISCOZO DAS SOLUÇÕES DE QUITOSANO	125
	5.2.2 COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO DOS HIDROGÉIS DE QUITOSANO	132
5.3	CONCLUSÕES	150
5.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

5.1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo do estudo do comportamento reológico dos hidrogéis de quitosano foi o de avaliar a possibilidade dos sistemas poliméricos preparados no presente trabalho serem administrados por via injetável e produzidos *in situ*, ou seja, à temperatura de 37 °C e a pH próximo de 7.

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes à caracterização reológica das soluções de quitosano e dos diferentes géis, quer durante a sua formação, quer após maturação. Foram investigados os efeitos do pH, do uso de um reticulante físico (fosfato dissódico de glicerol, GP), do uso de um reticulante químico (genipin, GE) em diferentes concentrações, e da combinação de ambos. Parte destes resultados já se encontram publicados em revistas da especialidade (Moura *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2008).

Como se disse na Secção 3.6, foram realizados dois tipos de testes reológicos: testes em escoamento estacionário e testes dinâmicos (oscilatórios).

Nos testes em escoamento estacionário, vulgarmente utilizados para determinar o comportamento viscoso de um sistema a uma dada temperatura, fez-se variar a velocidade de deformação, registando-se a tensão de corte. Na Secção 5.2.1 são apresentadas as curvas de viscosidade para diferentes condições, nomeadamente de concentração de polímero, de pH (variado através da adição de GP, que funciona simultaneamente como reticulante físico) e de concentração de reticulante químico (GE).

Os resultados dos testes dinâmicos, apresentados na Secção 5.2.2, tiveram por objetivo caracterizar o processo de gelificação e determinar as respetivas propriedades viscoelásticas dos géis. Para tal foram efetuados varrimentos nas escalas de temperatura, tempo, tensão de corte e frequência. Foi também investigado o efeito da temperatura na formação do gel, bem como a evolução das propriedades viscoelásticas durante a sua formação, quer na vizinhança do ponto de gelificação (até 15 min), quer num domínio temporal mais alargado (12 horas). Por último, avaliou-se o comportamento viscoelástico dos géis após 12 horas de maturação.

Na Secção 5.3 encontram-se descritas as principais conclusões.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Comportamento viscoso das soluções de quitosano

Os perfis de viscosidade das soluções de quitosano foram obtidos através de testes realizados à temperatura de 37 °C, usando uma programação em rampa de valores de velocidade de deformação numa gama compreendida entre 0,1 e 1000 s⁻¹. O tempo necessário para atingir a velocidade de

deformação mais elevada foi de 300 s. O instrumento de medida utilizado (um reómetro Bohlin C-VOR, Malvern Instruments, descrito na Secção 3.6) mede a tensão de corte e calcula a viscosidade do fluido, podendo fornecer os resultados de dois modos distintos: i) relação entre a viscosidade e a velocidade de deformação, designada por curva de viscosidade, ou, ii) relação entre a tensão de corte e a velocidade de deformação (curva de escoamento).

Em primeiro lugar foi estudado o comportamento viscoso das soluções puras de quitosano (isto é, não neutralizadas com GP) para diferentes concentrações de polímero (1,5 e 2,0%). Embora este comportamento tenha sido anteriormente investigado por outros autores (Hwang e Shin, 2000; Rinaudo *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006), o seu estudo em condições experimentais semelhantes às utilizadas para as restantes soluções de quitosano, designadamente em presença dos agentes reticulantes (GP e GE), revela-se essencial para uma melhor compreensão do comportamento destas últimas.

De seguida, foi estudado o efeito do pH (tomando como referência os valores de 5,5 e 7,4) das soluções de quitosano (através da adição de GP) e o efeito da concentração de GE (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w) na viscosidade dos sistemas.

Efeito da concentração de quitosano

A Figura 5.1 mostra a variação da viscosidade aparente (η) com a velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$), à temperatura de 37 °C, de duas soluções de quitosano (C) não neutralizadas, ou seja, sem a adição de GP, com diferentes concentrações (1,5 e 2,0%, w/w). Ambas as soluções possuem um valor de pH de 5,5.

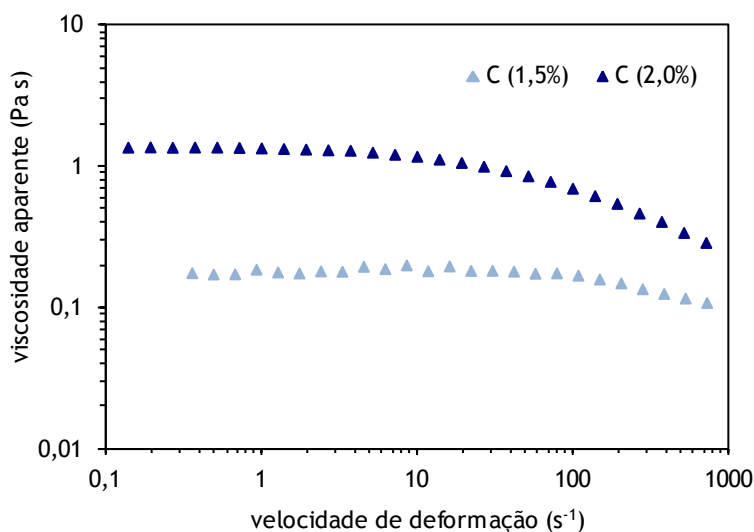


Figura 5.1 - Influência da concentração de polímero (1,5% e 2,0%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) não neutralizadas (pH = 5,5), à temperatura de 37 °C.

Como se pode verificar, para as concentrações e condições experimentais usadas, as curvas de viscosidade apresentam duas regiões distintas: uma em que a viscosidade é independente da velocidade de deformação, observada para valores de velocidade de deformação baixos ($< 10 \text{ s}^{-1}$ para a solução de quitosano mais concentrada e $< 100 \text{ s}^{-1}$ para a solução de quitosano menos concentrada); e outra para valores mais elevados da velocidade de deformação, em que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de deformação.

Conclui-se assim que a viscosidade das soluções de quitosano testadas, quando medida numa larga gama de velocidades de deformação, exhibe um comportamento misto, isto é, Newtoniano a baixas velocidades de deformação e Não Newtoniano a elevadas velocidades de deformação. Este comportamento está de acordo com o observado por outros autores (Hwang e Shin, 2000) para soluções de quitosano, com a mesma concentração de polímero, mas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo, geralmente, explicado com base na “teoria dos emaranhados” (*molecular entanglement theory*) (Graessley, 1965; Graessley, 1974). Esta teoria assume que as interações intermoleculares presentes em soluções de polissacarídeos de concentração superior à crítica são, tipicamente, emaranhados físicos não específicos. Assim, para baixas velocidades de deformação, a destruição de alguns emaranhados é compensada com a formação de novos emaranhados entre as diferentes cadeias poliméricas vizinhas. À medida que a velocidade de deformação aumenta, o número de emaranhados destruídos é superior aos formados, originando uma diminuição da viscosidade aparente.

Da Figura 5.1, constata-se também que o carácter reofluidificante da solução é mais acentuado para a solução de quitosano de concentração mais elevada. Esta situação pode ser explicada pelo movimento mais limitado das cadeias poliméricas, devido ao maior número de emaranhados, o que se traduz em mais tempo para formar novos agregados para substituir aqueles que foram destruídos pela deformação imposta. Deste modo, a velocidade de deformação para a qual o comportamento Newtoniano desaparece desloca-se para valores progressivamente mais baixos com o aumento da concentração de quitosano.

Da figura é possível, ainda, observar uma significativa dependência da viscosidade aparente das soluções de quitosano da concentração de polímero. Como era expectável, para a mesma velocidade de deformação, um maior número de entidades monoméricas conduz à intensificação das interações intermoleculares e, conseqüentemente, ao aumento da viscosidade aparente.

Efeito da variação do pH da solução de quitosano através da adição de fosfato dissódico de glicerol

Como o quitosano é apenas solúvel em soluções aquosas ácidas ($\text{pH} < 6,2$), é necessário neutralizar as soluções resultantes de modo a simular as condições fisiológicas de pH. Para tal usou-se um sal de fosfato (o fosfato dissódico de glicerol, GP) que, para além de elevar o pH da solução de quitosano, através da neutralização dos grupos amina pelos grupos fosfato, funciona como

reticulante físico, graças a um conjunto de interações favoráveis com o quitosano que levam à formação de um gel (Chenite *et al.*, 2000; Chenite *et al.*, 2001).

A influência da adição de GP às soluções aquosas de quitosano (C) está patente no gráfico da Figura 5.2. Esta figura mostra as curvas de viscosidade, à temperatura de 37 °C, para duas soluções de quitosano de concentração 2,0%, w/w: i) uma neutralizada através da adição de GP, de pH = 7,4 e ii) outra obtida sem adição de reticulante, de pH = 5,5.

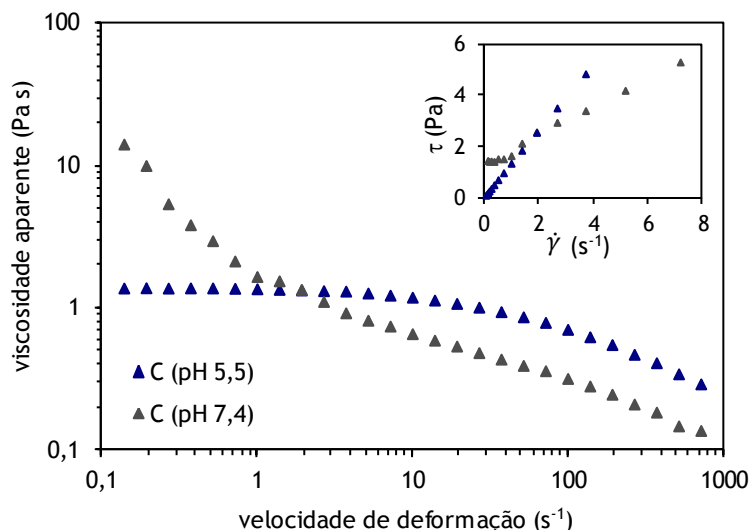


Figura 5.2 - Influência da adição de fosfato dissódico de glicerol na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) de concentração 2,0%, w/w, à temperatura de 37 °C. O gráfico interior mostra as curvas de escoamento de ambas as soluções, para baixos valores de velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$). τ , representa a tensão de corte.

Da Figura 5.2 ressalta de imediato que o comportamento em escoamento das soluções aquosas de quitosano, de igual concentração, depende fortemente da presença de GP. As soluções de quitosano, à temperatura de 37 °C e em meio ácido (isto é, na ausência de GP), apresentam um comportamento misto (Newtoniano seguido de Não Newtoniano) como ilustrado na Figura 5.1. Quando neutralizadas com GP, isto é, para valores de pH de 7,4, verifica-se que o comportamento Newtoniano desaparece, e elas exibem um comportamento claramente reofluidificante. Além disso, a curva de viscosidade sugere a existência de uma tensão de cedência. Este tipo de comportamento, em que a viscosidade aumenta significativamente com a diminuição da velocidade de deformação para valores baixos desta, deve ser analisado com alguma prudência, uma vez que pode surgir como consequência da perda de sensibilidade do instrumento de medida, ou devido a efeitos de inércia (Silva, 1994). No entanto, comparando as duas curvas de viscosidade da Figura 5.2 verifica-se que a tensão de cedência não é observada na solução de quitosano ácida, logo não será consequência de eventuais artefactos devidos às condições experimentais.

A existência de uma tensão de cedência para a solução de quitosano neutralizada com GP, evidenciada através da curva de escoamento representada no gráfico interior da Figura 5.2, poderá estar relacionada com as forças de ligação no seio da estrutura, uma vez que a neutralização dos grupos amina do quitosano resulta na formação de um precipitado hidratado, tipo gel, para valores de pH superiores a 6,2. Por outro lado, é preciso ter em conta que a combinação do quitosano com o GP beneficia, ainda, de um conjunto de interações favoráveis à formação de um gel para temperaturas próximas de 37 °C, nomeadamente ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Chenite *et al.*, 2000; Chenite *et al.*, 2001).

Efeito da adição de genipin às soluções de quitosano

Neste ponto pretende analisar-se o impacto da adição do reticulante químico (GE) às soluções de quitosano em duas situações distintas: i) soluções não neutralizadas e ii) soluções previamente neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP).

A influência da adição de GE às soluções puras de quitosano não neutralizadas, isto é, na ausência de GP, está ilustrada na Figura 5.3. A figura em causa mostra as curvas de viscosidade obtidas à temperatura de 37 °C para soluções (puras) de quitosano, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE (0,05 e 0,10%, w/w).

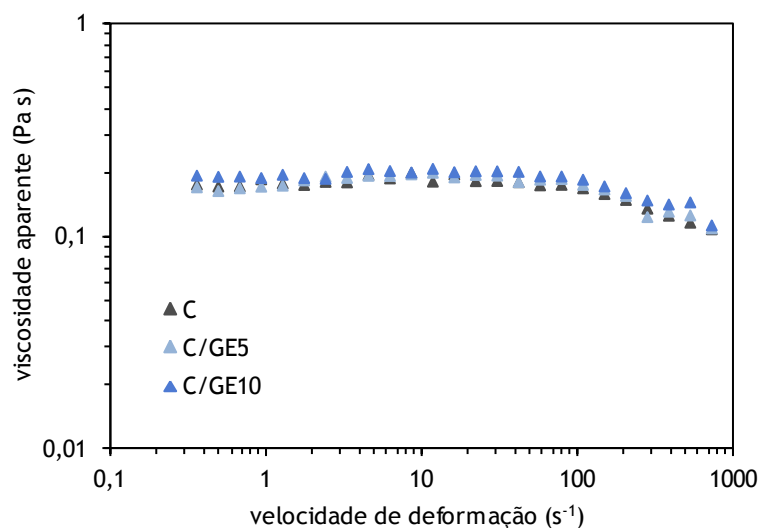


Figura 5.3 - Influência da concentração de genipin, GE (0,05 e 0,10%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 1,5% não neutralizadas, à temperatura de 37 °C.

Como se pode constatar, não se observam alterações significativas nas propriedades de escoamento das várias soluções (as curvas são praticamente sobreponíveis), o que pode ser devido ao facto de o quitosano ser um polissacarídeo catiónico, o que leva a que se mantenha em solução para valores de

pH inferiores a 6,2. Assim, apesar da adição do reticulante químico (GE) à solução de quitosano, é provável que o intervalo de tempo em que decorre o ensaio, cerca de cinco minutos, seja demasiado curto para o aparecimento de pontos de reticulação intermoleculares em quantidade suficiente para se estabelecer uma rede e, como tal, para alterar significativamente a viscosidade do sistema relativamente à da solução de quitosano pura.

De realçar, ainda, que se mantém um ligeiro comportamento reofluidificante, para valores elevados de velocidade de deformação ($> 100 \text{ s}^{-1}$), em todas as curvas apresentadas na Figura 5.3.

No que diz respeito ao segundo caso, isto é, à adição de GE às soluções de quitosano, previamente neutralizadas com GP, a Figura 5.4 mostra as curvas de viscosidade, para as mesmas concentrações de GE usadas na Figura 5.3, ou seja, 0,05 e 0,10%, w/w. Tal como se observou na Figura 5.3, também aqui se deteta um comportamento semelhante para todas as curvas, só que, neste caso, reofluidificante. Todavia, para a mesma velocidade de deformação, observam-se valores da viscosidade aparente ligeiramente superiores na presença do reticulante químico. Não obstante, para as duas concentrações de GE analisadas, não se verificam diferenças significativas nas curvas de viscosidade.

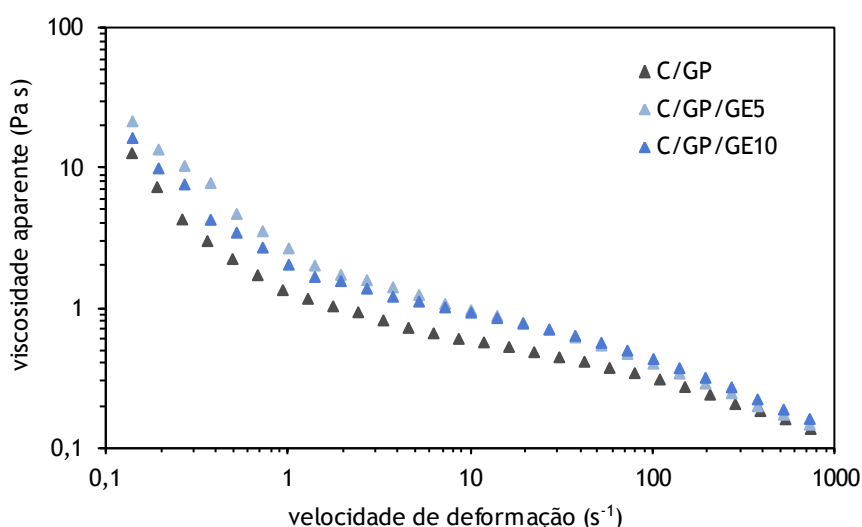


Figura 5.4 - Influência da concentração de genipin, GE (0,05 e 0,10%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C.

O impacto da adição de GE é mais visível quando se comparam as curvas de viscosidade para toda a gama de concentrações estudada (*vide* Figura 5.5). Como era de esperar, para a mesma velocidade de deformação, os valores da viscosidade aparente aumentam à medida que a concentração de GE aumenta. De facto, para uma mesma concentração de polímero, o aumento da concentração do

reticulante químico, fomenta a intensificação do número de pontos de reticulação intermoleculares das cadeias de quitosano, o que se traduz num conseqüente aumento da viscosidade.

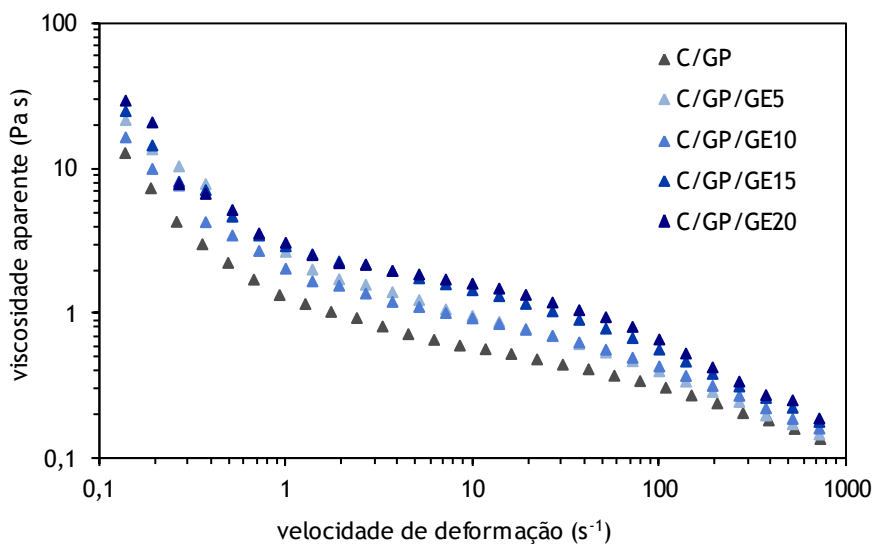


Figura 5.5 - Influência da concentração de genipin, GE, (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w) na curva de viscosidade, para soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C.

As curvas de escoamento (tensão de corte vs velocidade de deformação) das soluções de quitosano, correspondentes às soluções usadas na Figura 5.5 para ilustrar o impacto da adição de GE, são apresentadas na Figura 5.6.

Da análise das curvas tensão de corte *versus* velocidade de deformação realça-se um comportamento Não Newtoniano (reofluidificante) de todos os sistemas estudados. No entanto, e de acordo com o observado anteriormente, a ampliação gráfica na zona da origem parece revelar uma ligeira tensão de cedência, a qual tende a aumentar com o aumento da concentração de GE.

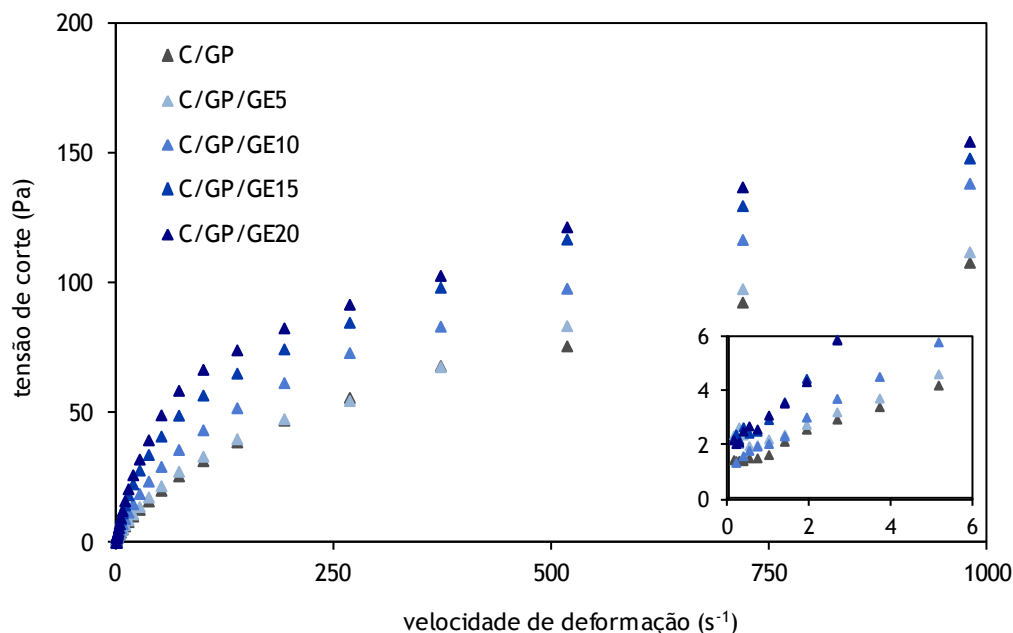


Figura 5.6 - Influência da concentração de genipin, GE (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w) na curva de escoamento, para as soluções de quitosano (C) a 2,0%, w/w, neutralizadas com fosfato dissódico de glicerol (GP), à temperatura de 37 °C. O gráfico interior mostra uma ampliação da zona próxima da origem dos eixos.

5.2.2 Comportamento viscoelástico dos hidrogéis de quitosano

Por forma a caracterizar o comportamento viscoelástico dos vários géis de quitosano, quer durante a sua formação, quer após maturação, foram realizados testes oscilatórios em regime dinâmico, detalhadamente descritos no capítulo Materiais e Métodos (Secção 3.6). Estes testes foram sempre precedidos de testes preliminares de varrimento da tensão de corte por forma a determinar o limite da região viscoelástica linear (LVR) dos sistemas em estudo.

Os parâmetros reológicos usados para comparar as propriedades viscoelásticas de todos os hidrogéis foram o módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G''), a tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) e a viscosidade complexa (η^*), definidos nas equações (2.7 a 2.9) e (2.11) e as variáveis foram o efeito da temperatura e do tempo na formação do gel e o comportamento viscoelástico dos géis após maturação.

Efeito da temperatura na formação do gel

As soluções de quitosano puras e neutralizadas com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de reticulante químico (GE), foram submetidas a testes de varrimento em temperatura. Nestes testes os valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram obtidos numa

gama de temperaturas que variou entre 5 e 80 °C, à razão de 2 °C/min, a uma frequência de oscilação fixa de 1 Hz e a baixa taxa de deformação (0,01). A termorreversibilidade dos géis foi investigada pela diminuição da temperatura de novo até 5 °C, usando o mesmo declive para a rampa de arrefecimento (2 °C/min).

As medições iniciaram-se pelas soluções de quitosano neutralizadas com GP (C/GP), estando os resultados (curvas de aquecimento e arrefecimento) expressos na Figura 5.7 em termos da dependência do módulo elástico (G') com a temperatura. O aumento substancial dos valores de G' por volta dos 55 °C é atribuível ao processo de gelificação, ou seja, o início da gelificação do sistema ocorrerá para valores na vizinhança desta temperatura (temperatura de gelificação). Por outro lado, apesar de as curvas apresentarem histerese, o facto dos valores de G' serem aproximadamente iguais no início do aquecimento e no final do arrefecimento indica que a formulação C/GP exhibe um carácter termorreversível, ou seja, o gel pode repetir a transição sol-gel e gel-sol sem alterações de comportamento significativas. De facto, conforme discutido no Capítulo 2, os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (ionicamente) com GP formam redes temporárias que exibem fracas propriedades mecânicas e termossensibilidade. O mecanismo de gelificação neste tipo de redes está relacionado com a neutralização dos grupos amina do polímero com os grupos fosfato do GP e, conseqüentemente, com o aumento das interações hidrofóbicas e de pontes de hidrogénio entre as cadeias do polímero para temperaturas elevadas (Chenite *et al.*, 2000).

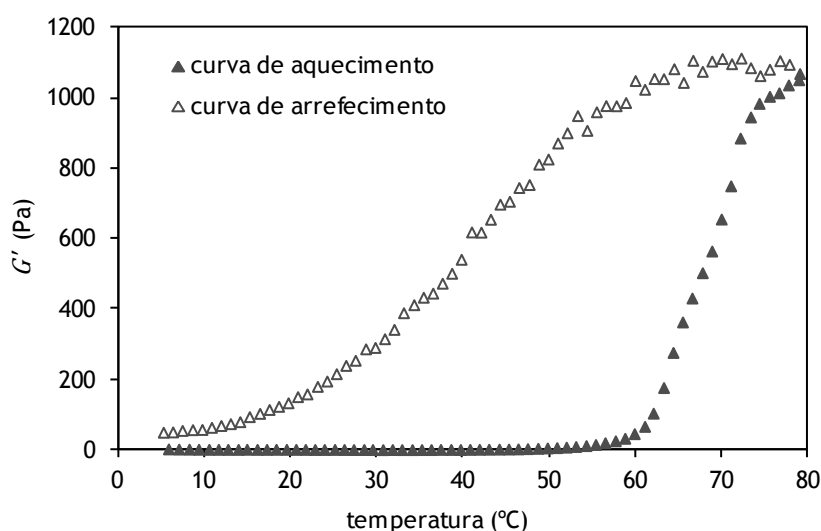


Figura 5.7 - Evolução do módulo elástico (G') de uma solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP) sob aquecimento e arrefecimento controlados de 2 °C/min e à frequência de 1 Hz.

De sublinhar, todavia, que o carácter termorreversível apenas foi exibido pelas formulações de quitosano neutralizadas com GP sem adição de GE. Com efeito, a Figura 5.8 mostra, a título de

exemplo, as curvas de aquecimento e arrefecimento para a solução de quitosano neutralizada com GP à qual foi adicionado 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15). Este comportamento era expectável, pois estas soluções produzem redes permanentes, mercê da intensidade das ligações químicas (covalentes) entre o polímero e o reticulante, não manifestando, por isso, termorreversibilidade.

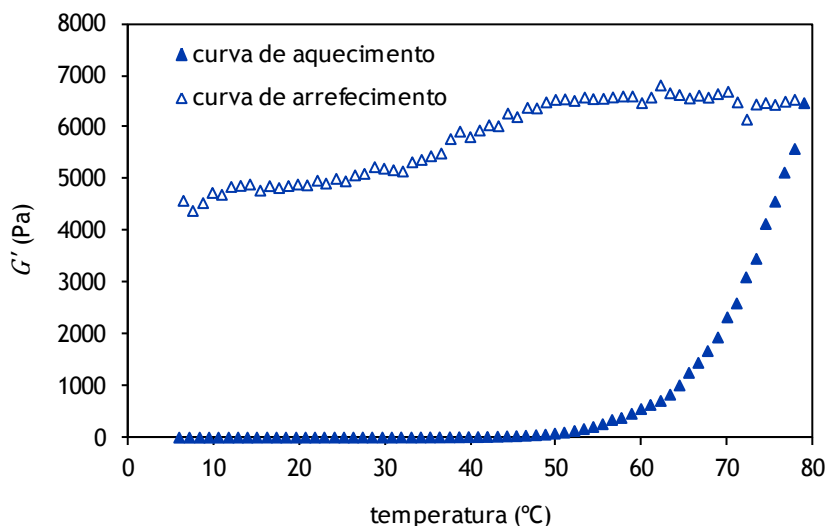


Figura 5.8 - Evolução do módulo elástico (G') de uma solução de quitosano neutralizada com GP à qual foi adicionado 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15) sob aquecimento e arrefecimento controlados de 2 °C/min e à frequência de 1 Hz.

De seguida avaliou-se a influência do reticulante químico (GE) e da combinação de reticulantes (GP e GE) na temperatura para a qual ocorre a transição sol-gel, isto é, na temperatura de gelificação. De salientar que nestes testes foram utilizadas soluções de quitosano não neutralizadas e neutralizadas com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE (entre 0,05 e 0,20%, w/w).

As Figuras 5.9 e 5.10 mostram a evolução dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') com a temperatura para as referidas soluções, respetivamente. Como se pode observar, os sistemas co-reticulados, com GP e GE (Figura 5.10), apresentam propriedades gelificantes significativas quando comparados com os sistemas reticulados apenas quimicamente (Figura 5.9), particularmente para temperaturas mais elevadas. De facto, nos primeiros, a evolução dos módulos viscoelásticos com a temperatura apresenta um comportamento típico de polímeros gelificantes, ocorrendo o aumento acentuado de G' face a G'' a partir da temperatura de gelificação. A subsequente evolução dos módulos viscoelásticos corresponde ao progressivo fortalecimento da rede tridimensional, resultando num pronunciado aumento de G' e num menos significativo de G'' .

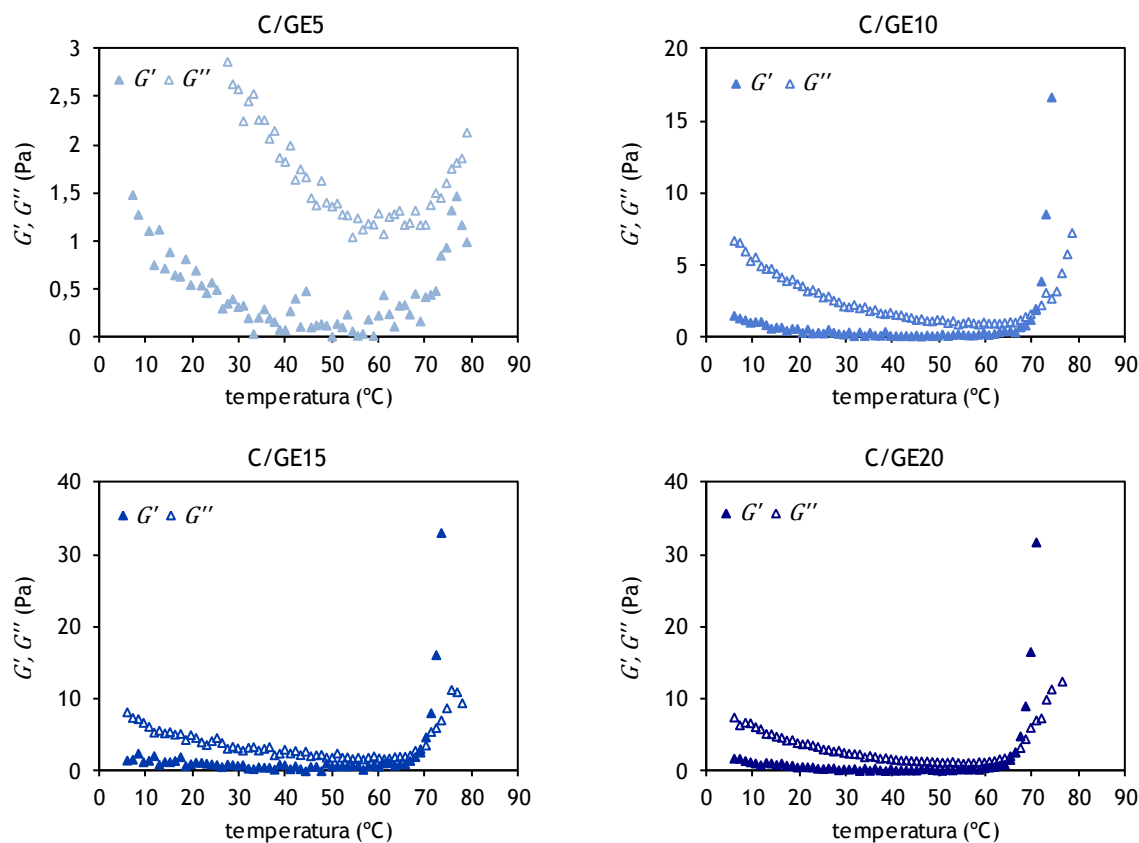


Figura 5.9 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com o aquecimento controlado (2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano **não neutralizadas**, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GE5, C/GE10, C/GE15 e C/GE20, respetivamente).

Como se definiu anteriormente, a temperatura de transição sol-gel (conhecida por temperatura de gelificação) corresponde à temperatura para a qual G' iguala G'' , isto é, a temperatura a partir da qual o carácter elástico predomina relativamente ao carácter viscoso.

Para os sistemas representados na Figura 5.10, estes valores não são facilmente determináveis a partir das curvas, pelo que se optou por incluir também um pequeno gráfico que representa uma ampliação da zona onde ocorre a interseção dos módulos, com o intuito particular de auxiliar na determinação da temperatura de gelificação. Os valores das temperaturas de gelificação dos vários géis testados estão resumidos na Tabela 5.1, quer para os géis produzidos com GE apenas (C/GE?), quer para os géis reticulados simultaneamente com GP e GE (C/GP/GE?).

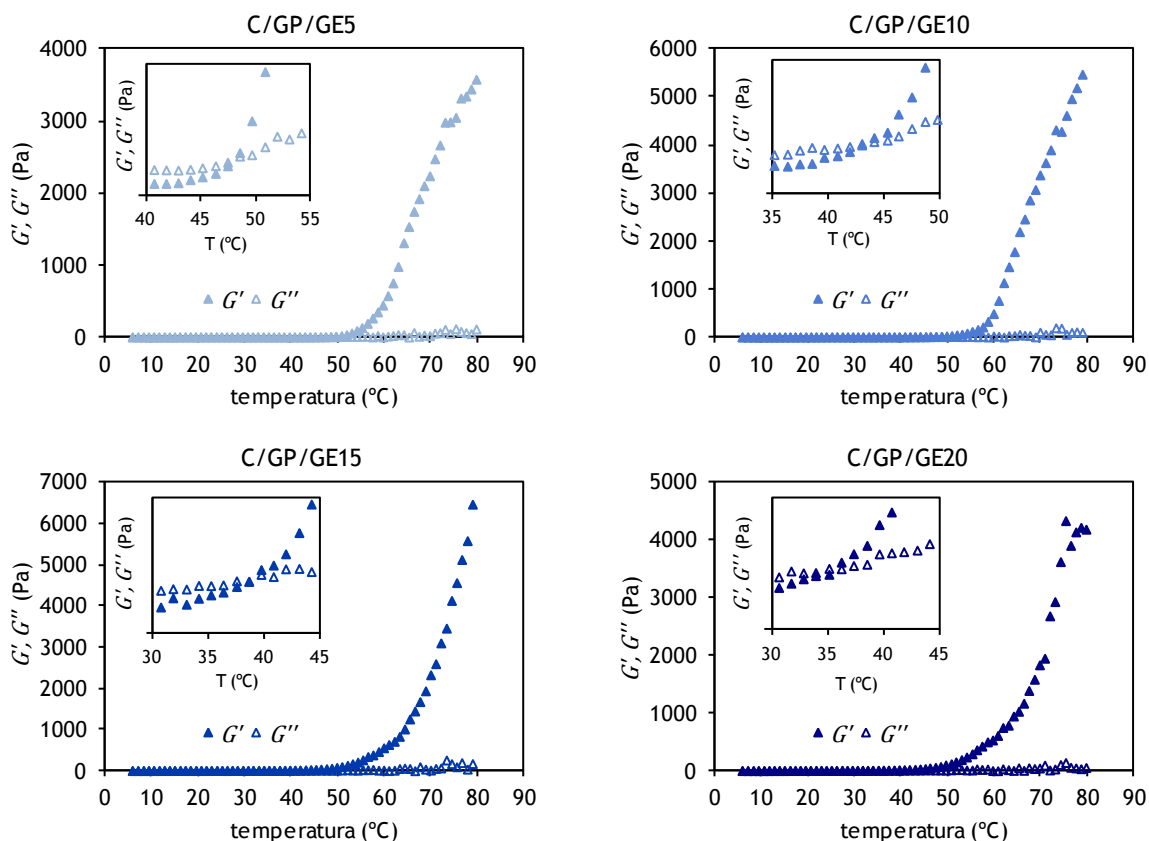


Figura 5.10 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com o aquecimento controlado (2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano **neutralizadas** com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente). As representações interiores mostram uma ampliação da zona do gráfico para a qual ocorre a interseção dos módulos.

De salientar que nas condições experimentais em que se realizaram os testes de varrimento de temperatura, as soluções de quitosano não neutralizada, sem genipin, e com a mais baixa concentração de genipin (C e C/GE5, respetivamente) não formam gel, tal como assinalado na Tabela 5.1. Contudo, o facto mais evidente destes resultados é que a temperatura de transição sol-gel diminui com o aumento da concentração de reticulante químico, sendo este decréscimo muito mais acentuado na presença de GP (coluna da direita) do que nos géis não neutralizados. Mais, as temperaturas de transição das soluções destes últimos são superiores a 60 $^{\circ}\text{C}$, logo afastadas das condições fisiológicas pretendidas. Ainda, é possível verificar que a adição de GE em concentrações próximas de 0,15%, w/w às soluções contendo GP conduz à transformação da solução num gel para temperaturas próximas de 37 $^{\circ}\text{C}$, o que configura esta formulação como potencialmente utilizável em condições fisiológicas. As fotografias apresentadas na Figura 5.11 documentam esta situação. Esta característica é, obviamente, de extrema relevância quando se

pretende, como no contexto deste trabalho, que os hidrogéis preparados tenham aplicação na área biomédica.

Tabela 5.1 - Influência da concentração de genipin na temperatura de transição sol-gel para as formulações de quitosano não neutralizadas e previamente neutralizadas com GP.

<i>genipin</i> (%, w/w)	<i>temperatura de transição sol-gel</i> ¹ (°C)	
	<i>solução de quitosano, não neutralizada</i>	<i>solução de quitosano neutralizada com GP</i>
----	não forma gel (C)	48,0 (C/GP)
0,05	não forma gel (C/GE5)	45,7 (C/GP/GE5)
0,10	70,5 (C/GE10)	43,3 (C/GP/GE10)
0,15	69,3 (C/GE15)	38,6 (C/GP/GE15)
0,20	66,2 (C/GE20)	35,6 (C/GP/GE20)

¹ valores obtidos com base na igualdade dos módulos viscoelásticos.

Contudo, é de sublinhar que as temperaturas apresentadas na Tabela 5.1 são apenas aproximações já que o critério subjacente ao seu cálculo ($G' = G''$), conforme discutido na Secção 2.5.4, não é considerado o mais adequado. Por forma a melhorar a exatidão da determinação do ponto de gel foi levado a cabo um estudo mais rigoroso, como adiante se refere.

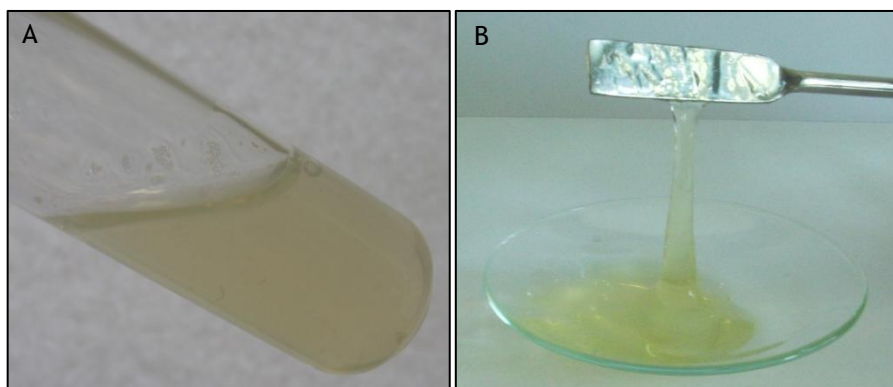


Figura 5.11 - Fotografias de uma solução de quitosano neutralizada com GP, à qual foi adicionado 0,15%, w/w de GE, à temperatura ambiente (A) e do correspondente gel, obtido após aquecimento da solução a 37 °C (B).

Por último, e ainda sob o quadro da análise do comportamento reológico das soluções no domínio da temperatura, a Figura 5.12 compara a evolução do módulo elástico (G') com esta variável para todas as formulações de quitosano neutralizadas com GP (com diferentes concentrações de GE, incluindo 0% (C/GP)). Os resultados confirmam que o reticulante químico (GE) tem um efeito considerável no processo de gelificação. De facto a presença de GE intensifica o processo de gelificação das soluções de quitosano neutralizadas com GP, traduzindo-se num aumento significativo dos valores de G' e na redução das temperaturas de gelificação, comparativamente aos valores obtidos para os sistemas sem adição de GE (C/GP). Contudo, para as concentrações mais elevadas (0,15 e 0,20% de GE) as curvas começam a aproximar-se.

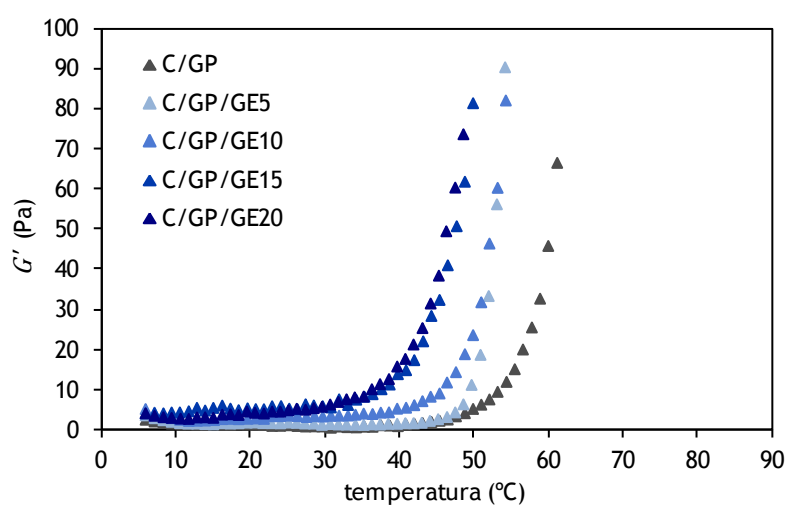


Figura 5.12 - Evolução do módulo elástico (G') com o aquecimento controlado (2 °C/min), a uma frequência de 1 Hz, para as soluções de quitosano neutralizadas com GP, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de GE.

Com base nas observações retiradas dos testes de varrimento em temperatura e tendo em consideração a aplicação dos hidrogéis *in vivo*, os testes reológicos subsequentes apenas foram realizados em condições fisiológicas de temperatura (37 °C) e de pH, isto é, para as soluções de quitosano neutralizadas com GP (pH = 7,4).

Efeito do tempo na formação do gel

Por forma a avaliar o processo de gelificação ao longo do tempo, as diferentes soluções de quitosano (previamente neutralizadas com GP e com diferentes concentrações de reticulante químico (GE)) foram submetidas a testes de varrimento em tempo. Nestes testes os valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G''), da tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) e da viscosidade complexa

(η^*) foram determinados para tempos na vizinhança da transição sol-gel (até 15 min), à temperatura de 37 °C, a uma frequência de oscilação fixa de 1 Hz e a uma tensão de corte de 1 Pa. O baixo valor desta tensão de corte permite garantir que as deformações produzidas são suficientemente pequenas para não interferirem no mecanismo de gelificação e maturação do gel.

De salientar que o conhecimento da evolução das propriedades viscoelásticas durante a formação do gel, particularmente o tempo de gelificação, é da maior relevância quando se pretende projetar um sistema injetável produzido *in situ*. Tal como se discutiu na Secção 2.5.4, este parâmetro pode ser obtido através de vários critérios, designadamente o critério que se baseia na igualdade de G' e G'' (para uma dada frequência de oscilação) e o critério proposto por Winter e Chambon (Chambon e Winter, 1987).

O critério da igualdade dos módulos é comumente aplicado, embora não seja necessariamente o mais rigoroso. Assim, e a fim de calcular o tempo de gelificação com base na igualdade dos módulos elástico e viscoso, construíram-se os gráficos da Figura 5.13 que mostram a evolução de G' , G'' e $\tan(\delta)$, referente a soluções de quitosano previamente reticuladas, com diferentes teores de GE (incluindo 0%). De referir que não foi possível obter a evolução destas propriedades para o sistema contendo a maior concentração de GE (C/GP/GE20) porque este apresentou valores da tangente de dissipação, $\tan(\delta)$, menores que a unidade ($G' > G''$) desde os instantes iniciais da aquisição de dados reológicos, significando que o carácter elástico da amostra prevalece logo após a dissolução do agente reticulante químico.

Dos gráficos da Figura 5.13 conclui-se que tanto os módulos viscoelásticos, G' e G'' , como a tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) apresentam, para todas as soluções, uma variação bem definida na vizinhança do ponto de gelificação. Constata-se que ocorre um aumento gradual dos módulos e um decréscimo gradual da tangente ao longo do tempo. Além disso, até ao ponto de gelificação, G'' é superior a G' e os valores da $\tan(\delta)$ são, naturalmente, superiores a um, denotando o carácter predominantemente viscoso dos géis. Depois de alcançado este ponto, G' torna-se superior a G'' , logo a $\tan(\delta)$ será inferior a um, prevalecendo o carácter elástico.

A Figura 5.13 revela, ainda, que o tempo necessário para atingir a igualdade dos módulos viscoelásticos (tempo de gelificação) decresce à medida que a concentração do reticulante químico aumenta (de facto, o tempo de gelificação é reduzido de aproximadamente oito minutos para o sistema reticulado fisicamente (C/GP) para aproximadamente dois minutos para o sistema C/GP/GE15). Além disso, os resultados indicam que a presença de GE influencia significativamente o processo de gelificação, traduzindo-se em valores de módulos viscoelásticos superiores aos valores obtidos para o sistema reticulado fisicamente (sem adição de GE).

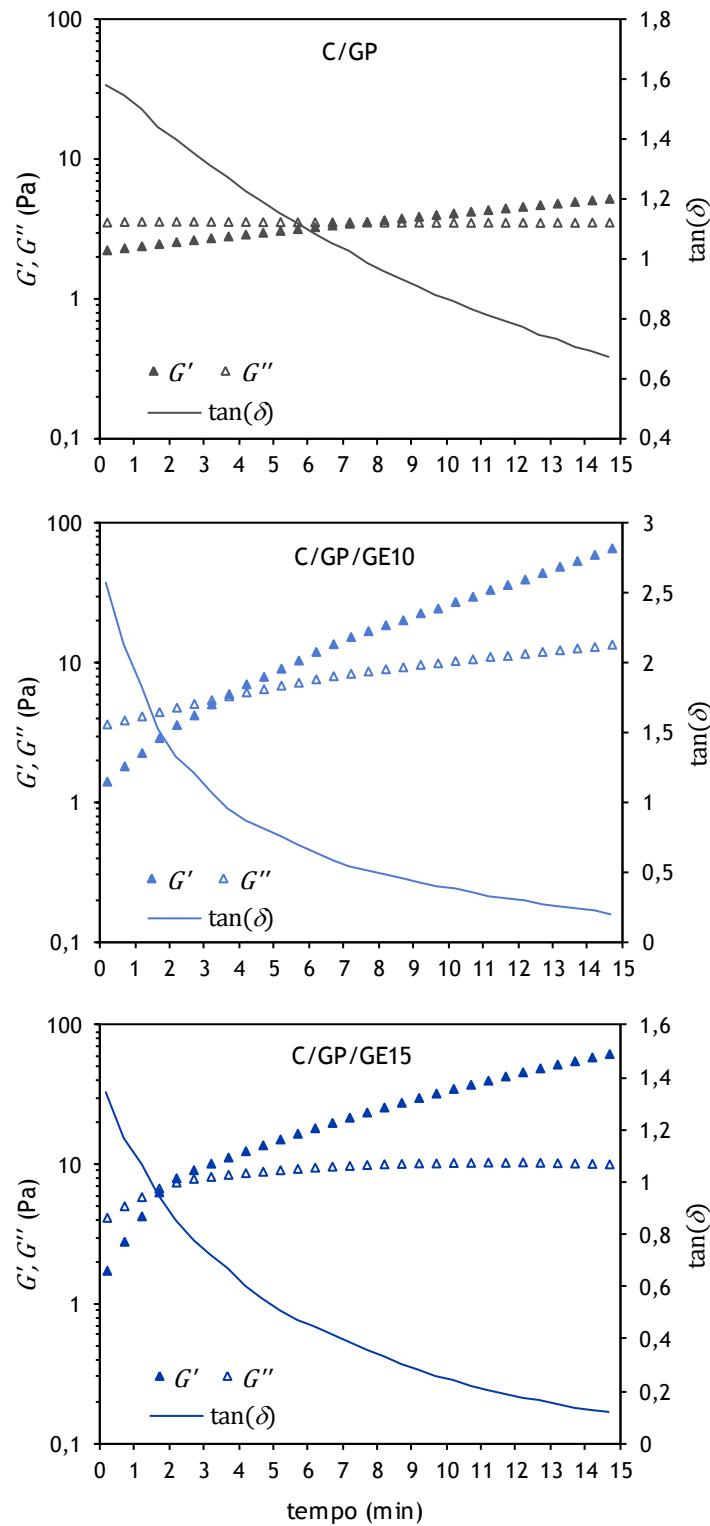


Figura 5.13 - Evolução dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') e da tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) na vizinhança da transição sol-gel, a uma frequência de 1 Hz, para a solução de quitosano neutralizada com GP apenas (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15).

Tal como se referiu anteriormente, nem sempre o critério baseado na igualdade de G' e G'' é rigoroso, pois este ponto pode não ser independente da frequência de oscilação. Assim, seguiu-se também o critério proposto por Winter e Chambon (Capítulo 2, Secção 2.5.4) para determinar com maior exatidão o instante correspondente à transição sol-gel. Este critério considera que, no ponto de gelificação, a tangente de dissipação, dada por $\tan(\delta) = \tan(n\pi/2)$ (equação (2.14)), é independente da frequência de oscilação (Chambon e Winter, 1987), sendo n designado por expoente de relaxação e restrito a valores compreendidos entre 0 e 1. O valor de $n = 0$ corresponde ao comportamento limite de um sólido elástico puro (sólido de Hooke), enquanto o valor de $n = 1$ corresponde ao comportamento de um fluido viscoso puro (fluido Newtoniano).

Assim, os mesmos sistemas apresentados na Figura 5.13 foram submetidos a testes de varrimento em tempo, para várias frequências de oscilação (1, 2,5, 5 e 10 Hz), identificando-se o tempo de gelificação como o instante para o qual os valores da $\tan(\delta)$ convergem.

A representação da tangente de dissipação na vizinhança da transição sol-gel, obtida para as diferentes frequências, está expressa na Figura 5.14. Os gráficos desta figura confirmam que os valores da $\tan(\delta)$ são independentes da frequência no ponto de gelificação para os três sistemas estudados, e que o tempo para atingir este ponto decresce com a concentração de GE. Por outro lado, após o ponto de gelificação, verifica-se uma diminuição mais gradual dos valores de $\tan(\delta)$ com o tempo. Este facto está relacionado com a taxa de aumento dos valores de G' ($\Delta G'/\Delta t$) ser maior do que a correspondente para G'' ($\Delta G''/\Delta t$), em resultado da formação de um gel elástico depois do ponto de gelificação.

Na Tabela 5.2 apresentam-se os valores dos tempos de gelificação obtidos através dos critérios da igualdade dos módulos e de Winter e Chambon, bem como dos expoentes de relaxação, para os sistemas estudados.

Como esperado, os valores apresentados na Tabela 5.2 confirmam a drástica redução do tempo de gelificação com a adição de GE, naturalmente em resultado da formação de uma rede mais reticulada e, por conseguinte, mais elástica. Além disso, os tempos de gelificação obtidos através do critério de Winter e Chambon são concordantes com aqueles que resultam da igualdade dos módulos viscoelásticos (Figura 5.13).

De sublinhar, ainda, que os valores obtidos para o expoente de relaxação no ponto de gelificação estão de acordo com os valores previstos pela teoria da percolação para sistemas envolvendo variação de fase ($n \cong 2/3$) (Scanlan e Winter, 1991; Winter e Mours, 1997).

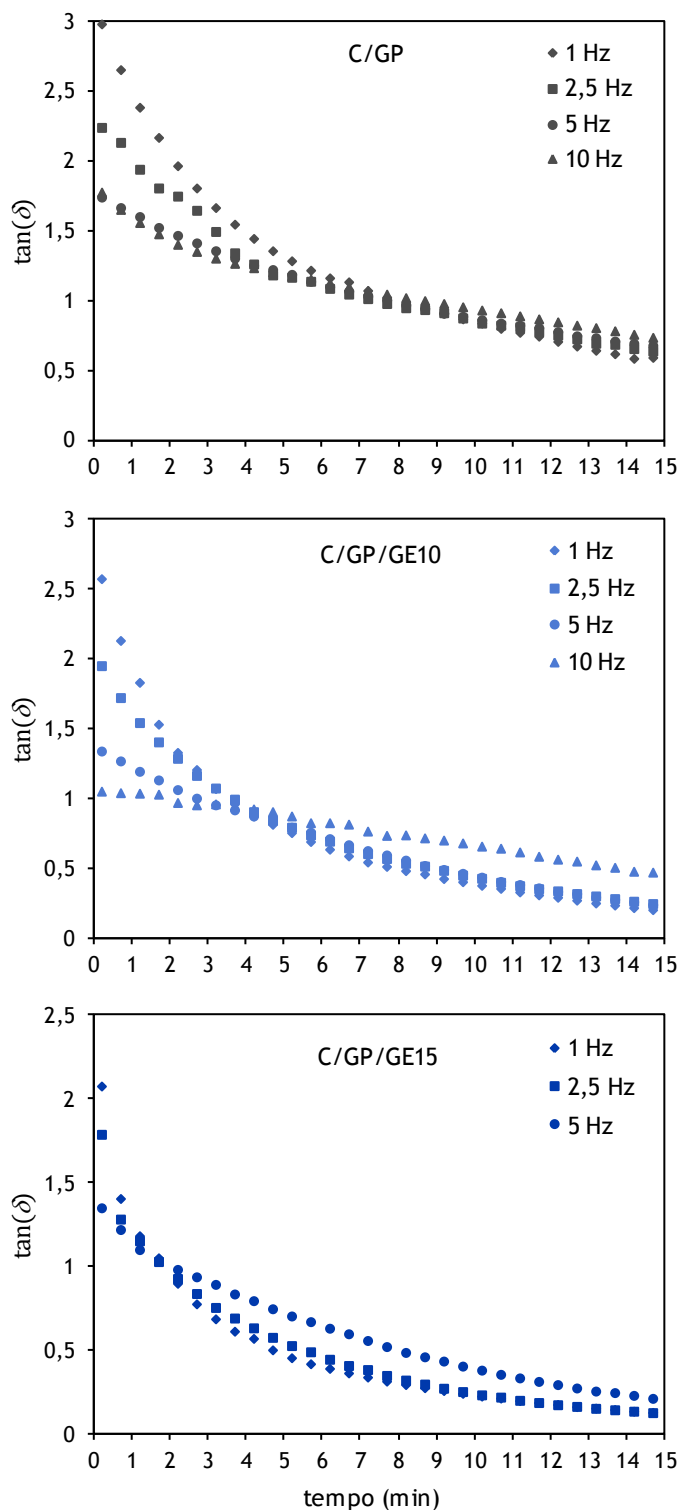


Figura 5.14 - Evolução da tangente de dissipação ($\tan(\delta)$) na vizinhança da transição sol-gel, para diferentes frequências de oscilação (1, 2,5, 5 e 10 Hz), para a solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15).

Tabela 5.2 - Influência da concentração do reticulante químico (GE) no tempo de gelificação (obtido pelo critério da igualdade dos módulos (critério I) e pelo critério proposto por Winter e Chambon (critério II)) e no expoente de relaxação (n) para diferentes soluções de quitosano.

hidrogel	tempo de gelificação (min)		expoente de relaxação ³ (n)
	critério I ¹	critério II ²	
C/GP	7,53	8,19	0,63
C/GP/GE10	3,50	3,68	0,61
C/GP/GE15	1,90	1,68	0,66

¹ determinado com base no critério da igualdade dos módulos viscoelásticos.

² determinado como sendo o tempo para o qual a $\tan(\delta)$ é independente da frequência de oscilação (critério de Winter e Chambon).

³ calculado a partir da equação $\tan(\delta) = \tan(n \pi/2)$ (equação (2.14)).

Por último, a evolução da viscosidade complexa (equação 2.11), na vizinhança da transição sol-gel, para os três sistemas testados, encontra-se representada na Figura 5.15.

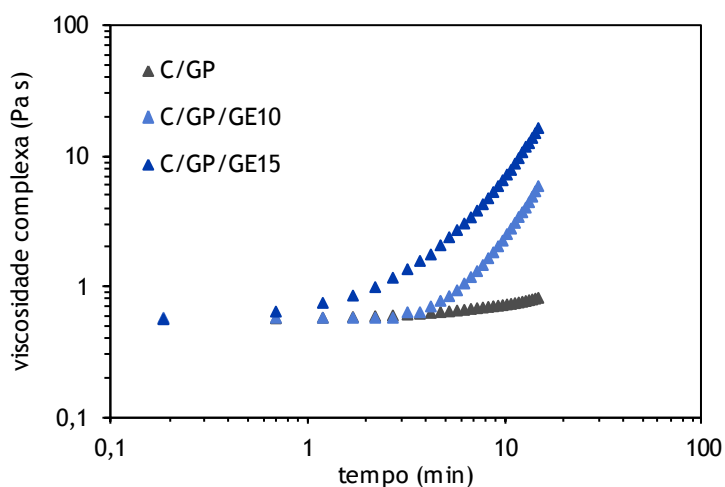


Figura 5.15 - Evolução da viscosidade complexa na vizinhança da transição sol-gel, à temperatura de 37 °C e frequência de 1 Hz, para a solução de quitosano neutralizada com GP (C/GP), para a solução de quitosano co-reticulada com 0,10%, w/w de GE (C/GP/GE10) e para a solução de quitosano co-reticulada com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15).

A Figura 5.15 mostra claramente que a viscosidade complexa, que traduz a resistência total ao fluxo, aumenta subitamente no ponto de gelificação em virtude das propriedades elásticas dominarem. Por outro lado, o aumento da concentração de reticulante químico intensifica o número

de pontos de reticulação intermoleculares das cadeias de quitosano e, conseqüentemente, o aumento da viscosidade complexa ocorre para tempos menores.

Como as figuras anteriores se remetem apenas a tempos próximos da transição sol-gel, e por forma a investigar o mecanismo de gelificação num espectro temporal mais alargado, foram medidas as propriedades viscoelásticas das soluções de quitosano, previamente neutralizadas com GP, até 12 horas. A Figura 5.16 mostra o resultado do teste de varrimento em tempo (cinética de maturação) para as amostras sem reticulante químico (C/GP) e com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15).

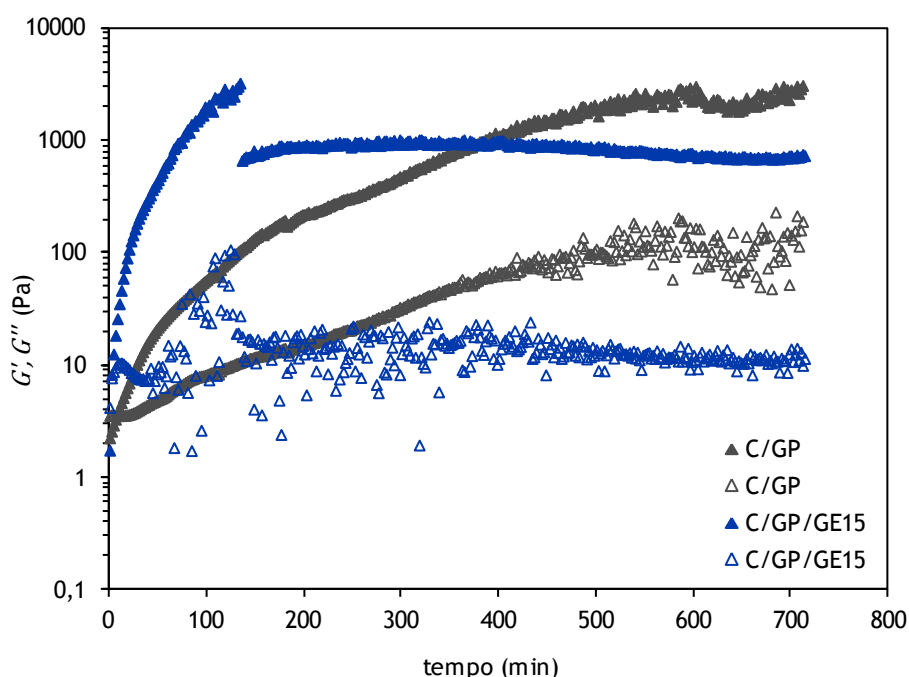


Figura 5.16 - Cinética de maturação para duas soluções de quitosano neutralizadas com GP: sem adição de reticulante químico (C/GP) e com 0,15%, w/w de GE (C/GP/GE15), a 37 °C, à frequência de 1 Hz e tensão de corte de 1 Pa. Os símbolos a cheio representam G' e os símbolos abertos representam G'' .

Os perfis de maturação dos dois sistemas revelam, desde logo, uma descontinuidade na evolução do módulo elástico (G'). Esta descontinuidade ocorre mais precocemente (aos $\cong 120$ min) e é mais acentuada para o sistema co-reticulado (C/GP/GE15) do que para o sistema reticulado apenas fisicamente (C/GP), para o qual ela ocorre próximo de 600 min. Este comportamento foi verificado, também, para os outros sistemas co-reticulados (Anexo C) sendo que o tempo para o qual se verifica esta situação é tanto maior quanto menor for a concentração de GE.

Perfis semelhantes, obtidos com um instrumento de medida análogo (reómetro de tensão controlada), foram encontrados na literatura para sistemas aquosos de derivados de quitosano e para organogéis produzidos a partir de poli(etilenoglicol) e de dibenzilideno sorbitol (Johnson *et al.*, 2004; Wilder *et al.*, 2003). A súbita redução do módulo elástico é explicada pelos autores com base na ocorrência de sinérese. Este fenómeno, tipicamente observado em géis de polissacarídeo, incluindo alguns sistemas de base quitosano (Vachoud *et al.*, 2000), ocorre durante o processo de maturação do gel e está relacionado com o arranjo da estrutura tridimensional, nomeadamente com a natureza dos poros e a dinâmica de formação das cadeias, e pode levar à exclusão de parte da água da matriz. Este processo de exsudação pôde ser experimentalmente observado durante o período de maturação dos hidrogéis, aquando da sua preparação. Por ser simultâneo ao processo de gelificação, este fenómeno condiciona fortemente as propriedades reológicas dos géis. Assim, quando ocorre durante um teste reológico oscilatório, em que é usado um sistema de medida cone/prato, vai afetar as medições experimentais, na medida em que há uma redução da área de contacto entre o gel e o cone, causando uma deformação local da rede, com diminuição súbita dos valores de G' . Por esta razão, para os sistemas estudados, não foi possível alcançar um valor de equilíbrio de G' , indicativo do completo processo de gelificação.

Na Figura 5.16 observa-se ainda que o comportamento do módulo elástico é caracterizado por uma subida rápida na primeira/segunda hora, seguida de uma evolução mais lenta. Este comportamento é geralmente encontrado em processos de gelificação de outros biopolímeros (Clark e Ross-Murphy, 1987). O rápido crescimento inicial dos valores de G' resulta da elevada taxa de estruturação do gel, enquanto a sua posterior atenuação está associada a uma fase de reorganização da rede molecular envolvendo uma variação ligeira, mas contínua, do número e/ou extensão das zonas de reticulação, com a conseqüente diminuição do comprimento das cadeias elasticamente ativas. Segundo a literatura, apenas para redes reticuladas covalentemente é possível atingir um valor de equilíbrio de G' ; para géis reticulados fisicamente, assiste-se a um contínuo aumento da reorganização da rede no estado gel (Montembault *et al.*, 2005).

Por fim, é de sublinhar o efeito da presença de GE, o qual origina valores de G' superiores aos do sistema reticulado apenas fisicamente.

A variação aleatória dos valores de G'' na Figura 5.16 deve-se ao facto dos valores do ângulo de fase (δ) se encontrarem próximos do limite de sensibilidade do transdutor do reómetro.

De referir, por último, que, como o teste de varrimento em frequência é normalmente realizado após o teste de varrimento em tempo, o varrimento em frequência ficou inviabilizado, devido às condições da amostra associadas à descontinuidade do módulo elástico, tendo-se optado por um procedimento alternativo para efetuar este varrimento, como se descreve em seguida.

Comportamento viscoelástico dos géis após maturação

Por forma a realizar os testes de varrimento em frequência para obtenção dos espectros mecânicos, prepararam-se hidrogéis reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE, os quais foram sujeitos a um período de maturação de 12 horas a 37 °C. Estas amostras foram previamente sujeitas a um teste de varrimento em tensão, para determinar o limite da região viscoelástica linear (LVR), o qual permitiu selecionar a tensão a aplicar nos testes subsequentes (varrimento em frequência).

A Figura 5.17 ilustra o conjunto de curvas resultante dos testes de varrimento em tensão, numa gama de 1 a 1000 Pa, aplicados a cada uma das amostras.

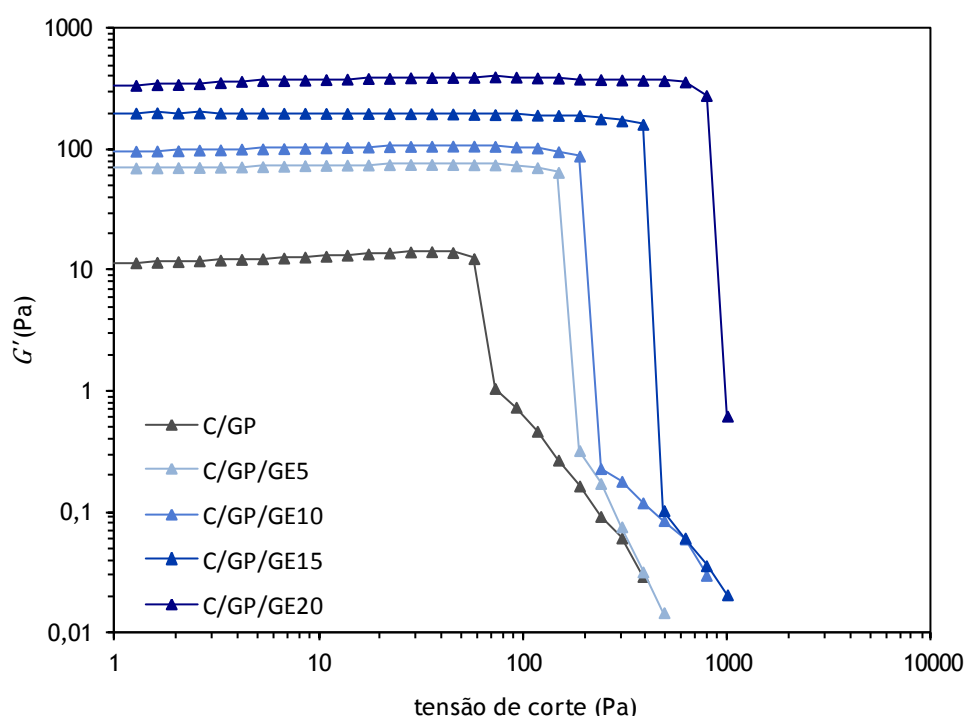


Figura 5.17 - Evolução do módulo elástico (G') em função da tensão de corte aplicada, a uma frequência de 1 Hz e à temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após **12 horas de maturação**, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente).

Comum a todas as curvas é uma região linear em que os valores de G' são praticamente independentes da tensão aplicada (LVR), a partir da qual se verifica uma diminuição drástica. Ou seja, nas condições experimentais usadas, os hidrogéis são deformados até ao ponto em que as ligações internas entre as moléculas são destruídas e grande parte da energia do sistema é

irreversivelmente perdida e, a partir desse ponto, os valores de G' passam a depender do valor da tensão aplicada.

Por outro lado, a Figura 5.17 mostra que a extensão da LVR aumenta com a concentração de GE, ou seja, a destruição da rede tridimensional ocorre para valores de tensão de corte mais elevados ($\cong 40$ Pa para os hidrogéis reticulados fisicamente com GP (C/GP) e $\cong 600$ Pa para os hidrogéis co-reticulados com 0,20%, w/w de GE (C/GP/GE20)). Significa isto que quanto maior for a concentração de GE maior será a organização interna da rede e maior a capacidade dos hidrogéis resistirem a tensões elevadas sem que ocorra a destruição da rede. Os hidrogéis tornam-se, conforme expectável, mais elásticos com a adição de GE.

Por último, e tendo em consideração o objetivo final de um teste de varrimento em tensão, foi escolhido o valor de tensão de corte de 20 Pa a aplicar, sobre todos os hidrogéis, nos testes de varrimento em frequência. Estes testes são, provavelmente, os testes oscilatórios mais comuns quando se pretende estudar o comportamento viscoelástico de géis maturados.

No caso vertente, os géis de quitosano obtidos após 12 horas de maturação a 37 °C foram submetidos a um varrimento de frequências numa gama compreendida entre 0,01 e 100 Hz, à temperatura de 37 °C, em que a tensão aplicada foi de 20 Pa. Na Figura 5.18 representam-se os espectros mecânicos obtidos para os diferentes géis de quitosano.

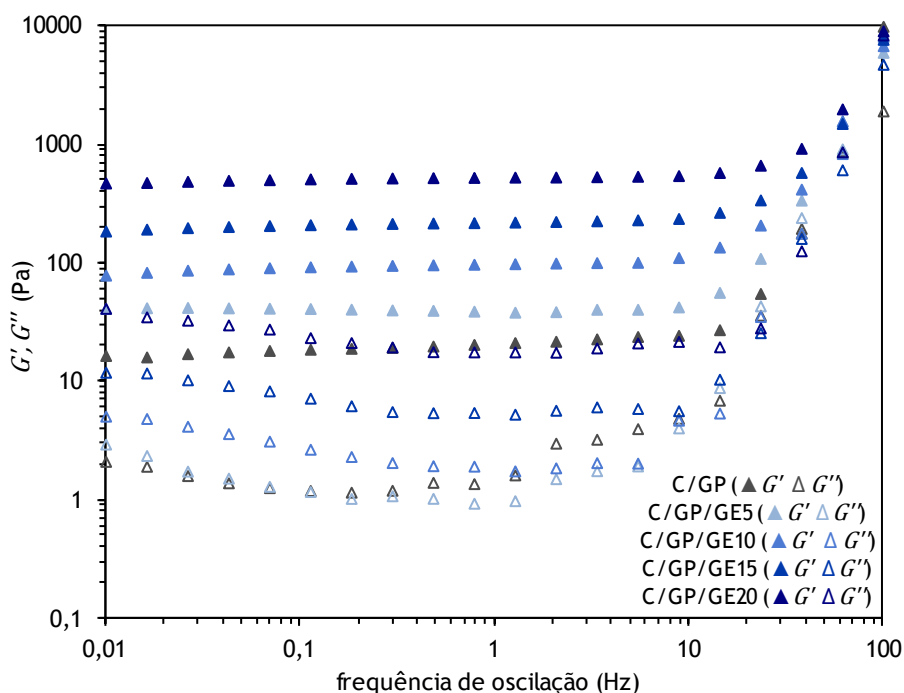


Figura 5.18 - Evolução do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') em função da frequência de oscilação, para uma tensão de corte de 20 Pa e temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após **12 horas de maturação**, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente).

O que ressalta desde logo em todas as curvas ($G'(\omega)$ e $G''(\omega)$) é a existência de duas regiões específicas: uma até 10 - 20 Hz onde a dependência dos valores de G' da frequência de oscilação é pequena (ou nula) e os valores de G'' diminuem até um mínimo, para depois aumentarem; e outra, acima daquele valor, onde a dependência dos valores dos módulos viscoelásticos da frequência é acentuada. No entanto, o comportamento elástico dos sistemas estudados é sempre dominante.

Para frequências de oscilação elevadas (> 10 - 20 Hz,) os valores, quer de G' , quer de G'' , são muito dependentes da frequência, verificando-se um aumento mais acentuado de G'' do que de G' , que se pode atribuir à relaxação das cadeias e a mecanismos de dissipação de calor (Barnes *et al.*, 1993). Os módulos viscoelásticos chegam mesmo a cruzar-se para valores elevados de frequência (100 Hz).

Todavia, os espectros mecânicos apresentados na Figura 5.18 revelam comportamentos típicos de redes tridimensionais que correspondem a géis verdadeiros (Bayarri *et al.*, 2004).

Ainda relativamente ao estudo da viscoelasticidade dos hidrogéis maturados, apresentam-se na Figura 5.19 as curvas da viscosidade complexa em função da frequência de oscilação para todos os sistemas estudados. Como se pode verificar, a viscosidade complexa diminui linearmente com o aumento da frequência, sendo que para a mesma frequência a viscosidade complexa aumenta com a concentração do agente de reticulação químico. Como já se disse, um maior grau de reticulação induz um reforço das propriedades mecânicas do sistema e consequentemente da viscosidade.

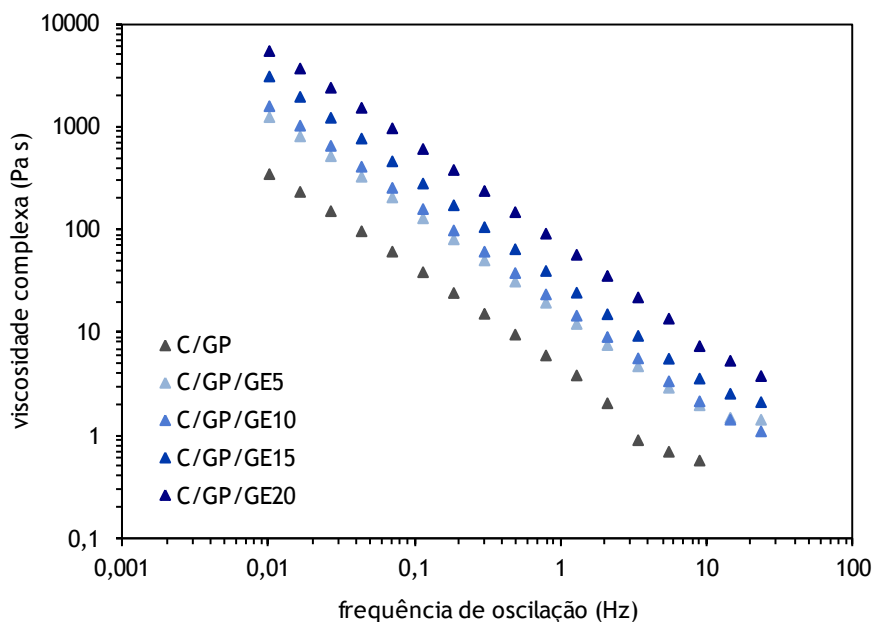


Figura 5.19 - Evolução da viscosidade complexa em função da frequência de oscilação, para uma tensão de corte de 20 Pa e temperatura de 37 °C, para hidrogéis de quitosano, obtidos após 12 horas de maturação, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente).

As curvas experimentais representadas na Figura 5.19 podem ser ajustadas a uma função potência do tipo:

$$\eta^* = A \omega^{-B} \quad (5.1)$$

cujos valores dos parâmetros A e B , respetivos intervalos de confiança e coeficientes de correlação do modelo na forma logaritmizada (R^2) se encontram na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Valores dos parâmetros A e B da equação (5.1) para hidrogéis de quitosano, obtidos após **12 horas de maturação**, reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente) e correspondentes valores do coeficiente de correlação (R^2). Os intervalos dos parâmetros A e B foram calculados com um nível de confiança de 95%.

<i>hidrogel</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>R</i> ²
C/GP	4,34 ×/: 1,09	0,985 ± 0,036	0,9962
C/GP/GE5	16,98 ×/: 1,08	0,928 ± 0,032	0,9961
C/GP/GE10	19,26 ×/: 1,03	0,966 ± 0,014	0,9993
C/GP/GE15	33,71 ×/: 1,06	0,979 ± 0,023	0,9982
C/GP/GE20	72,58 ×/: 1,03	0,964 ± 0,013	0,9994

Os valores apresentados na Tabela 5.3 mostram que o parâmetro A aumenta com a concentração do reticulante químico (GE) e os valores do expoente B são próximos da unidade, indicando que todos os hidrogéis exibem um comportamento característico de sistemas estruturados, em que G' é muito superior a G'' para uma gama alargada de frequências (*vide* Secção 2.5.5). Nestes casos a viscosidade complexa pode ser aproximada a G'/ω (Bayarri *et al.*, 2004; Diez-Sales *et al.*, 2007). Os valores do coeficiente de correlação permitem, ainda, concluir que o modelo empírico representado pela equação (5.1) ajusta satisfatoriamente os valores da viscosidade complexa, obtidos experimentalmente, numa gama alargada de frequências de oscilação.

Por último, dos resultados apresentados pode constatar-se, mais uma vez, que a concentração de GE afeta, significativamente, o comportamento e as propriedades viscoelásticas dos géis de quitosano, promovendo o desenvolvimento de géis mais elásticos, o que permite pensar que a sua inclusão pode ser usada para modular os géis a obter.

5.3 CONCLUSÕES

Do estudo do comportamento viscoso das soluções aquosas de quitosano à temperatura de 37 °C, ficou demonstrado que este é fortemente influenciado pela concentração de polímero, pelo valor do pH da solução e pela presença do agente químico de reticulação (genipin).

Assim, a viscosidade aparente das soluções aquosas de quitosano de concentração 1,5 e 2,0%, w/w (a pH = 5,5) quando medida numa larga gama de velocidades de deformação (0,1 a 1000 s⁻¹) exhibe um comportamento misto. Isto é, denota características de líquido Newtoniano para valores de velocidade de deformação baixos (viscosidade independente da velocidade de deformação) mas, simultaneamente, apresenta características de líquido Não Newtoniano para valores mais elevados da velocidade de deformação (viscosidade a diminuir com o aumento da velocidade de deformação). Além disso, para a mesma velocidade de deformação a viscosidade aparente é maior para a solução polimérica de concentração mais elevada e o carácter reofluidificante é também mais acentuado.

Neste estudo, a neutralização das soluções aquosas de quitosano (com valor de pH de 5,5) para valores próximos dos fisiológicos é feita através da adição de fosfato dissódico de glicerol (GP). Os resultados mostram que o comportamento em escoamento das soluções aquosas de quitosano, neutralizadas com GP, para valores de pH de 7,4 e temperatura de 37 °C, é claramente reofluidificante – a viscosidade aumenta significativamente com a diminuição da velocidade de deformação, para baixos valores desta. Ou seja, o comportamento Newtoniano exibido pelas soluções de quitosano com pH de 5,5 desaparece.

A adição de reticulante químico (numa gama de concentrações que variou entre 0,05 e 0,20%, w/w) às soluções aquosas de quitosano ocorreu para duas situações distintas: i) soluções poliméricas não neutralizadas (pH = 5,5) e ii) soluções previamente neutralizadas com GP (pH = 7,4). Em ambos os casos, a adição de genipin não provocou alterações significativas nas propriedades de escoamento das várias soluções. De facto, observou-se que as soluções a pH 5,5, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de genipin, continuam a apresentar um comportamento misto e as respetivas soluções a pH de 7,4 apresentam um comportamento reofluidificante em que, para a mesma velocidade de deformação, os valores da viscosidade aparente aumentam com a concentração de genipin.

Os resultados obtidos permitem assim concluir que, por alteração da concentração de quitosano, por modificação do pH da solução através da adição de um sal (GP) e pela presença de um reticulante químico, é possível modificar o comportamento reológico do quitosano no estado sol.

A caracterização do comportamento reológico dos vários géis de quitosano, quer durante a sua formação, quer após maturação, foi feita com base na medição das propriedades viscoelásticas. Para tal, foram efetuados varrimentos nas escalas de temperatura, tempo, tensão de corte e frequência.

Uma vez que qualquer sistema injetável para formação *in situ* apresenta um mecanismo de transição sol-gel, os testes não isotérmicos (varrimentos em temperatura) são particularmente úteis para obter informação, não só da temperatura para a qual ocorre a transformação da solução em gel, como também da termorreversibilidade dos sistemas em estudo. Assim, a temperatura de transição sol-gel para o sistema co-reticulado (isto é, que combina um mecanismo de reticulação física com GP e outro de reticulação química com GE) ocorre para uma gama de temperaturas entre 45,7 e 35,6 °C, dependendo da concentração de genipin usada, sendo que a temperatura de transição diminui com o aumento da concentração de GE. Estas temperaturas são bastante inferiores às temperaturas de transição sol-gel obtidas, quer para o sistema reticulado fisicamente (com GP), quer para os sistemas reticulados quimicamente (com diferentes concentrações de GE, mas sem adição de GP). Estes testes mostram, ainda, que as formulações de quitosano neutralizadas com GP apresentam um carácter termorreversível, ou seja, o gel pode repetir a transição sol-gel e gel-sol, ao contrário das soluções de quitosano neutralizadas com GP às quais foram adicionadas diferentes quantidades de reticulante químico.

Os testes de varrimento em tempo permitiram avaliar o processo de gelificação das diferentes soluções de quitosano (previamente neutralizadas com GP e com diferentes concentrações de GE) ao longo do tempo, em condições semelhantes às fisiológicas (temperatura de 37 °C e pH de 7,4). O conhecimento da evolução das propriedades viscoelásticas durante a formação do gel, particularmente a determinação do tempo de gelificação, é da maior relevância quando se pretende projetar um sistema injetável produzido *in situ*. No presente trabalho, o tempo de gelificação foi determinado a partir de dois critérios: um baseado na igualdade dos módulos viscoelásticos (para uma dada frequência) e outro definido como o tempo para o qual a $\tan(\delta)$ é independente da frequência (critério de Winter e Chambon). Os tempos de gelificação obtidos por ambos os critérios mostraram-se concordantes (aproximadamente oito minutos para o sistema reticulado fisicamente (C/GP) e aproximadamente dois minutos para o sistema C/GP/GE15) tendo-se verificado que os valores da $\tan(\delta)$ são efetivamente independentes da frequência de oscilação no ponto de gelificação. Além disso, o tempo de gelificação pode ser modulado pela variação da concentração de genipin e, deste modo, pode ser ajustado ao desenho de sistemas injetáveis produzidos *in situ*. As cinéticas de maturação (do sistema reticulado fisicamente com GP e do sistema co-reticulado com 0,15%, w/w de GE), obtidas num largo espectro temporal, apresentam um comportamento qualitativamente idêntico ao descrito na literatura para a maioria de biopolímeros (Clark e Ross-Murphy, 1987). Ou seja, até ao ponto de gelificação, os perfis de maturação são caracterizados por um crescimento rápido dos valores de G' , que resulta da elevada taxa de estruturação do gel (ainda que os valores de G'' sejam superiores a G') denotando um carácter predominantemente viscoso do gel. Depois de alcançado o ponto de gelificação, o sistema evolui para uma estrutura tipicamente elástica, em que G' se torna superior a G'' e os valores daquele são atenuados em resultado da reorganização da rede molecular.

Em suma, os resultados apresentados mostram que a adição de GE a uma solução de quitosano neutralizada com GP modifica o processo de gelificação, designadamente o tempo de gelificação e

as propriedades viscoelásticas das soluções, refletindo-se conseqüentemente nas propriedades morfológicas e estruturais dos géis formados, analisadas no Capítulo 4. A extensão destas alterações depende da concentração de GE.

O comportamento viscoelástico dos hidrogéis maturados (após 12 horas de maturação a 37 °C) foi avaliado pela obtenção dos respetivos espectros mecânicos (representação de G' , G'' e η^* versus frequência de oscilação) em condições em que a tensão de corte aplicada nas amostras não afetasse a estrutura dos materiais a analisar. O comportamento exibido por todos os hidrogéis é típico de sistemas poliméricos estruturados, ou seja, de géis verdadeiros: G' é muito superior a G'' , ambos os módulos são essencialmente independentes da frequência de oscilação e a viscosidade complexa diminui linearmente com o aumento da frequência para uma gama alargada de valores (0,01 - 100 Hz). Além disso, os resultados mostram que o aumento da concentração de genipin induz um reforço das propriedades mecânicas do sistema co-reticulado.

Por último, é importante referir que a gama de concentrações de reticulante químico testada (0,05% a 0,20%, w/w) é suficiente para obter redes tridimensionais à temperatura de 37 °C, a partir de soluções aquosas de quitosano diluídas (1,5%, w/w) previamente neutralizadas com GP. Por outro lado, estas concentrações garantem a realização de todos os procedimentos de manipulação que precedem a análise reológica, nomeadamente os que requerem a dissolução dos reagentes, e apontam para um domínio inicial do módulo viscoso. A única exceção foi a matriz obtida com base na maior concentração de genipin (0,20%, w/w) que, logo após a dissolução do agente reticulante, revelou um carácter predominantemente elástico.

Dos resultados apresentados neste capítulo pode pois concluir-se que os hidrogéis co-reticulados (isto é, que combinam um mecanismo de reticulação física e outro de reticulação química) preparados pela primeira vez no âmbito deste trabalho possuem um conjunto de particularidades que os torna muito atrativos para aplicações biomédicas. Entre elas destacam-se a capacidade de poderem ser administrados por via injetável (já que são líquidos à temperatura ambiente) e o facto de produzirem estruturas sólidas *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH. Estas estruturas são hidrogéis altamente porosos (como se viu no Capítulo 4) e apresentam propriedades viscoelásticas melhoradas relativamente aos hidrogéis reticulados fisicamente. Acresce ainda o facto de o sistema ser baseado em produtos naturais, de elevada disponibilidade e baixo custo, e ser preparado, à temperatura ambiente, através de um procedimento simples, sem recurso a solventes orgânicos ou outros aditivos.

5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K. *An introduction to rheology*. 3rd ed., Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands, 1993.

Bayarri, S.; Durán, L.; Costell, E. Influence of sweeteners on the viscoelasticity of hydrocolloids gelled systems. *Food Hydrocolloids* 2004, 18, 611-9.

- Chambon, F.; Winter, H. H. Linear viscoelasticity at the gel point of crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry. *Journal of Rheology* **1987**, *31*, 683-697.
- Chenite, A.; Buschmann, M.; Wang, D.; Chaput, C.; Kandani, N. Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*, 39-47.
- Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2155-61.
- Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science* **1987**, *83*, 57-192.
- Diez-Sales, O.; Dolz, M.; Hernández, M. J.; Casanovas, A.; Herraez, M. Rheological characterization of chitosan matrices: influence of biopolymer concentration. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *105*, 2121-8.
- Graessley, W. W. Molecular entanglement theory of flow behavior in amorphous polymers. *Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 2696-703.
- Graessley, W. W. The entanglement concept in polymer rheology. *Advances in Polymer Science* **1974**, *16*, 1-179.
- Hwang J. K.; Shin, H. H. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal* **2000**, *12*, 175-9.
- Johnson, S. B.; Dustan, D. E.; Franks, G. V. A novel thermally-activated crosslinking agent for chitosan in aqueous solution: a rheological investigation. *Colloid and Polymer Science* **2004**, *282*, 602-12.
- Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1633-43.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3823-9.
- Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheology of chitosan and genipin solutions. *Materials Science Forum* **2008**, Vols. 587-588, 27-31.
- Rinaudo, M.; Auzely, R.; Vallin, C.; Mullagaliev, I. Specific interactions in modified chitosan systems. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2396-407.
- Scanlan, J. C.; Winter, H. H. Composition dependence of the viscoelasticity of end-linking poly(dimethylsiloxane) at the gel point. *Macromolecules* **1991**, *24*, 47-54.
- Silva, J. A. L. Rheological characterization of pectin and pectin-galactomannan dispersions and gels. Tese de Doutoramento **1994**, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
- Torres, M. A.; Beppu, M. M.; Santana, C. C.; Arruda, E. J. Viscous and viscoelastic properties of chitosan solutions and gels. *Brazilian Journal of Food Technology* **2006**, *9*, 101-8.
- Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A. Physicochemical behaviour of chitin gels. *Carbohydrate Research* **2000**, *326*, 295-304.
- Wilder, E. A.; Hall, C. K.; Khan, S. A.; Spontak, R. J. Effects of composition and matrix polarity on network development in organogels of poly(ethylene glycol) and dibenzylidene sorbitol. *Langmuir* **2003**, *19*, 6004-13.
- Winter, H. H.; Mours, M. Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *Advances in Polymer Science* **1997**, *134*, 165-234.

CAPÍTULO 6

CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS COM VISTA A APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

SUMÁRIO

A caracterização dos hidrogéis de quitosano incidiu, também, sobre alguns aspetos relacionados com a sua aplicabilidade na área biomédica, designadamente em estudos de degradação *in vitro*, de determinação do potencial citotóxico e de avaliação da capacidade de intumescimento das várias matrizes.

Os resultados mostram que os hidrogéis, reticulados ionicamente e os co-reticulados iónica/covalentemente, são degradáveis *in vitro*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH, e apresentam elevada capacidade de intumescimento, sendo possível modular estas propriedades através da adição de genipin. Além disso, os hidrogéis avaliados não apresentam toxicidade celular, independentemente da concentração de reticulante químico testada.

6.1	INTRODUÇÃO.....	157
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
	6.2.1 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	158
	6.2.2 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE	164
	6.2.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO.....	166
6.3	CONCLUSÕES	167
6.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168

6.1 INTRODUÇÃO

A caracterização dos hidrogéis desenvolvidos, nomeadamente a nível de degradação *in vitro*, de citotoxicidade e de capacidade de intumescimento, constitui uma questão de extrema importância na perspetiva da sua aplicação na área farmacêutica ou biomédica, como é o caso vertente. Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes a estas variáveis, sendo que parte deles já se encontram publicados em revista da especialidade (Moura *et al.*, 2011).

No capítulo anterior concluiu-se que os géis reticulados apenas quimicamente não obedeciam às condições fisiológicas requeridas, pelo que os testes aqui apresentados apenas dizem respeito a matrizes de quitosano: i) reticuladas fisicamente com GP (C/GP) e ii) co-reticuladas com diferentes concentrações de GE, entre 0,05 e 0,20% w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20).

Embora seja consensualmente aceite pela comunidade científica que os hidrogéis de quitosano, reticulados fisicamente com GP, são biodegradáveis e apresentam ausência de citotoxicidade (Ahmadi e De Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2000; Ganji *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2004; Molinaro *et al.*, 2002), o mesmo não se verifica com os hidrogéis co-reticulados. De facto, tanto quanto é do nosso conhecimento, são inexistentes estudos de degradabilidade e citotoxicidade de géis que combinem aquele polímero com os dois reticulantes aqui usados (GP e GE).

Como já referido no Capítulo 2, a biodegradabilidade e a ausência de citotoxicidade são dois requisitos fundamentais a considerar na utilização de hidrogéis como biomateriais. No presente trabalho estas propriedades foram avaliadas através de testes *in vitro*. Embora seja impossível simular completamente o comportamento do sistema *in vivo* através destes testes, eles constituem, todavia, uma parte importante da caracterização de materiais para uso em seres humanos.

Assim, se em algumas aplicações a degradação pode ser indesejável, devendo o implante permanecer no corpo durante um longo período de tempo, outras vezes, pretende-se que a degradação seja temporária. Neste último caso, é desejável que o material introduzido no organismo seja eliminado depois de cumprido o seu papel, sem necessidade de recurso a intervenção cirúrgica para a sua remoção.

Os polímeros biodegradáveis degradam-se *in vivo* em fragmentos menores, que podem ser absorvidos ou excretados pelo organismo. Essa degradação ocorre como resultado tanto da atuação de entidades biológicas (como sejam, células, microrganismos e enzimas), como do ataque de espécies iónicas, radicais livres ou água. De um modo geral, os polímeros de origem natural são passíveis de degradação *in vivo* por hidrólise ou ação enzimática. Todavia, a avaliação dos produtos libertados por degradação é também de crucial importância, sendo necessário assegurar que estes produtos não sejam tóxicos para o organismo e sejam elimináveis através de qualquer um dos sistemas orgânicos de excreção. Complementarmente verifica-se que em estudos de libertação controlada de fármacos, uma das aplicações propostas para os hidrogéis aqui desenvolvidos, é

essencial conhecer o perfil de degradação e, sobretudo, se este acompanha minimamente a libertação do fármaco (ou seja, se a taxa de degradação é compatível com a taxa de libertação do fármaco), caso contrário, o hidrogel não tem viabilidade funcional.

Quanto à citotoxicidade de biomateriais para uso em seres humanos, esta será aqui avaliada, como já se disse, recorrendo igualmente a testes *in vitro*. Embora cientes que estes resultados não podem ser extrapolados para a situação clínica, os testes *in vivo* são onerosos, demorados, difíceis de controlar, sendo escassas as instituições em Portugal habilitadas para o efeito. Além disso, a utilização de animais coloca problemas éticos e está atualmente sob grande discussão pública. Assim, optou-se pelos testes em culturas celulares que são mais simples, rápidos e económicos, e permitem testar um grande número de materiais utilizando as mesmas linhas celulares e sob as mesmas condições. Além disso, assumem-se como testes fiáveis e facilmente reprodutíveis, uma vez que utilizam um meio de cultura com composição *standard*, decorrem em ambiente de incubação definido e em condições de trabalho estéreis (Rogerio *et al.*, 2003).

Por último, é sabido que a quantidade de água retida dentro da estrutura de um hidrogel, além de condicionar o seu comportamento físico, também contribui para melhorar a sua biocompatibilidade. A capacidade de absorção de água é altamente dependente do grau de reticulação. De um modo geral, quando maior for o grau de reticulação, ou seja, o número de ligações entre o agente reticulante e as cadeias poliméricas, mais rígida será a estrutura e, conseqüentemente, menor o grau de intumescimento (Peppas *et al.*, 2000). É vulgarmente aceite que a estrutura química do polímero pode também influenciar a capacidade de intumescimento do hidrogel, pois polímeros com mais grupos funcionais hidrofílicos, tais como hidroxílicos e carboxílicos, absorvem maior quantidade de fluido.

A apresentação e discussão dos resultados obtidos referentes à caracterização dos hidrogéis de quitosano, quer reticulados ionicamente, quer co-reticulados iónica/covalentemente, é feita na Secção 6.2. Esta secção encontra-se dividida em três subsecções: a Secção 6.2.1 que inclui os resultados relativos aos estudos de degradação *in vitro*; a Secção 6.2.2 relativa à avaliação da citotoxicidade, testada em células de cultura; e a Secção 6.2.3 que reúne os resultados referentes à capacidade de intumescimento dos hidrogéis. Na Secção 6.3 são descritas as principais conclusões obtidas ao longo deste capítulo.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Estudos de degradação *in vitro*

A degradação *in vitro* dos hidrogéis de base quitosano foi estudada através da perda de massa experimentada pelas matrizes, ao longo do tempo, quando submersas numa solução aquosa.

Foram realizados dois tipos de ensaio de degradação *in vitro*. Em primeiro lugar, foi investigada a degradação dos hidrogéis em presença da enzima responsável pela degradação do quitosano, a

lisozima (uma enzima ubíqua, presente nos tecidos, órgãos e fluidos corporais dos mamíferos), em concentrações idênticas às encontradas no corpo humano. Estes estudos de degradação em meio fisiológico simulado são importantes como primeira abordagem dos mecanismos que ocorrem *in vivo*, permitindo seriar materiais com propriedades mais apropriadas às aplicações específicas pretendidas.

De seguida, foram realizados ensaios, nas mesmas condições dos anteriores, mas sem a adição de lisozima. Estes últimos tiveram por objetivo determinar a perda de massa causada apenas por fenómenos de dissolução e/ou desidratação das amostras e, portanto, não imputável à degradação enzimática.

A Figura 6.1 mostra a perda de massa (calculada a partir da equação (3.4)) experimentada pelos hidrogéis de quitosano, em condições fisiológicas simuladas de degradação *in vivo* (PBS com 1,5 μg de lisozima/mL) em função do tempo (4 semanas) e do tipo de reticulação da matriz.

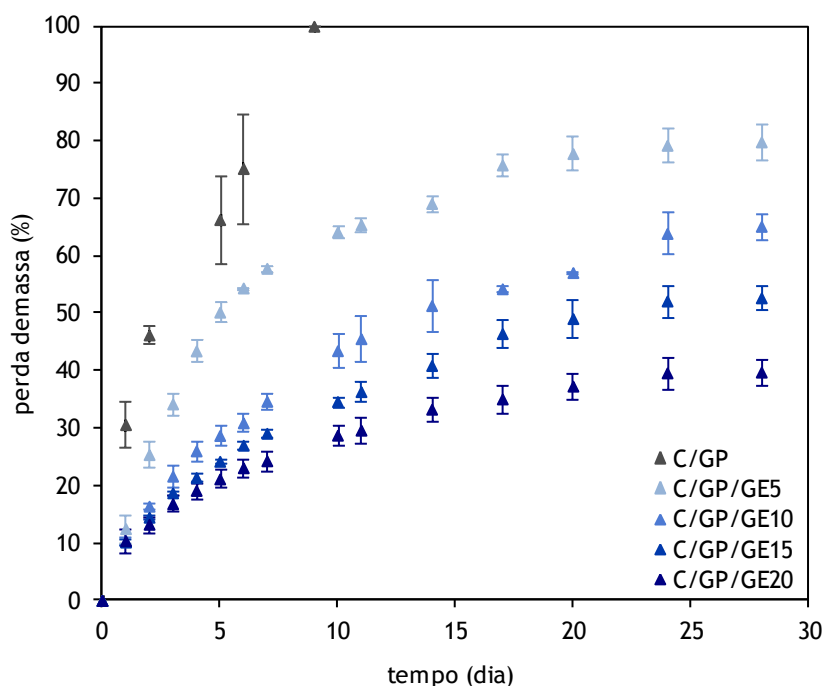


Figura 6.1 - Efeito da concentração de GE nos perfis de degradação *in vitro* dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20), num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (PBS com 1,5 μg de lisozima/mL) a 37 °C. A perda de massa foi calculada através da equação: $\text{perda de massa (\%)} = (W_i - W_t)/W_i \times 100$ (equação (3.4)), onde W_i e W_t representam a massa de amostra de hidrogel no início do ensaio e a cada intervalo de tempo, t , respetivamente. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras a incerteza definida como \pm desvio padrão.

A primeira conclusão que se pode retirar da Figura 6.1 é que a concentração de GE tem um forte impacto nos perfis de degradação dos hidrogéis. A matriz que exhibe maior percentagem de perda de massa, logo maior taxa de degradação, é a que corresponde ao hidrogel reticulado fisicamente com GP (C/GP) e, portanto, sem genipin, acabando esta por se desintegrar completamente ao fim de nove dias. De facto, os hidrogéis co-reticulados exibem taxas de degradação menores, comparativamente à do hidrogel físico, sendo estas tanto menores quanto maior for a concentração do reticulante químico (GE).

Este comportamento poderá ser explicado com base no mecanismo de degradação enzimática do quitosano. Vários trabalhos encontrados na literatura (Mi *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2003) dão conta que o polímero é metabolizado pela lisozima via quebra das ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) gerando, no final do processo, dois açúcares: a *N*-acetilglicosamina e a glicosamina, totalmente solúveis. Ora, uma rede tridimensional em que coexistem ligações físicas (iónicas) e ligações químicas (covalentes), como é o caso da dos hidrogéis co-reticulados, será muito mais impenetrável (e mais difícil de romper) do que a resultante de ligações exclusivamente físicas. A natureza destas interações foi anteriormente observada por espectroscopia de FTIR (Secção 4.2.2). Por outro lado, a maior rigidez da estrutura também restringe a mobilidade das cadeias impedindo o acesso da enzima ao local de ataque (Berger *et al.*, 2004).

Da Figura 6.1 pode, ainda, verificar-se que a taxa de perda de massa experimentada pelas matrizes é maior nos primeiros 10 dias do ensaio sendo que, após 28 dias, as matrizes co-reticuladas com a menor e a maior concentração de GE perderam 80% e 40% da sua massa inicial, respetivamente.

Por forma a avaliar a importância da perda de massa causada por fenómenos de dissolução e/ou desidratação das matrizes face à degradação enzimática, foi investigada a degradação dos hidrogéis quando imersos em PBS, sem lisozima. A Figura 6.2 compara os perfis de degradação *in vitro* obtidos em PBS (sem lisozima) e em ambiente fisiológico simulado (com lisozima) para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com a menor e maior concentração de GE (C/GP/GE5 e C/GP/GE20, respetivamente). Estes perfis evidenciam bem o papel relevante da lisozima na degradação dos hidrogéis de quitosano, papel esse que se atenua para a maior concentração de GE.

Por último, é possível concluir, ainda, que a perda de massa exibida pelos hidrogéis resulta de duas contribuições: de fenómenos associados à desidratação e/ou dissolução da matriz e de degradação enzimática. Convém, todavia, salientar que, quando implantados *in vivo*, estes sistemas poliméricos podem ser degradados e reabsorvidos mais rapidamente em consequência de outros fatores que contribuem também para a degradação, como sejam, a concentração local de enzimas disponíveis para a hidrólise enzimática, a presença de radicais livres, a atividade de fagocitose das células, entre outros. Deste modo é previsível que, quando implantados no organismo, a reabsorção dos hidrogéis co-reticulados seja completa com o tempo.

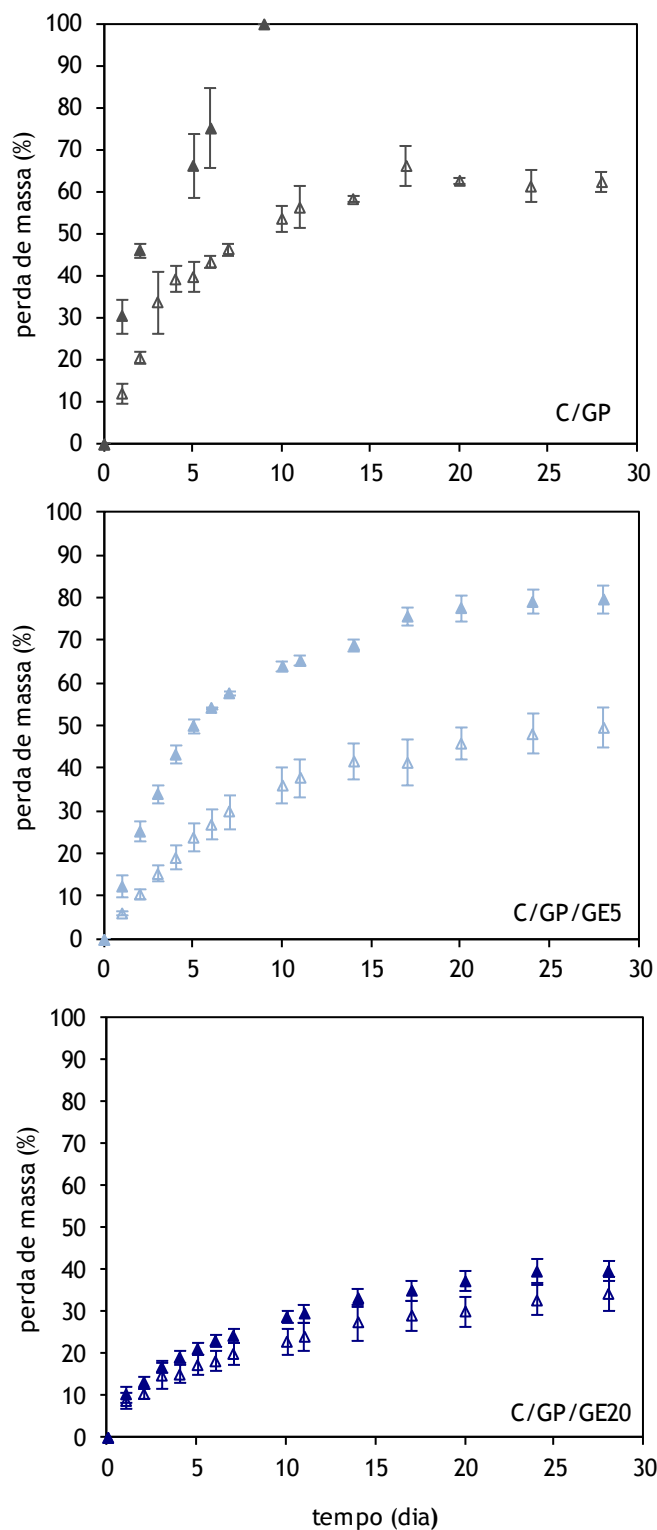


Figura 6.2 - Comparação dos perfis de degradação *in vitro* em PBS (símbolos abertos) e em PBS com 1,5 µg de lisozima/mL (símbolos fechados) a 37 °C, dos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com 0,05 e 0,20 % w/w de GE (C/GP/GE5 C/GP/GE20, respetivamente). Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras a incerteza definida como \pm desvio padrão.

De acordo com a literatura (Edlund e Albertsson, 2002; Ginde e Gupta, 1987; Woodruff e Hutmacher, 2010) a reabsorção de polímeros biodegradáveis implantados *in vivo* ocorre segundo dois mecanismos: i) degradação via superfície e ii) degradação em massa. O esquema representado na Figura 6.3 ilustra os mecanismos em causa.

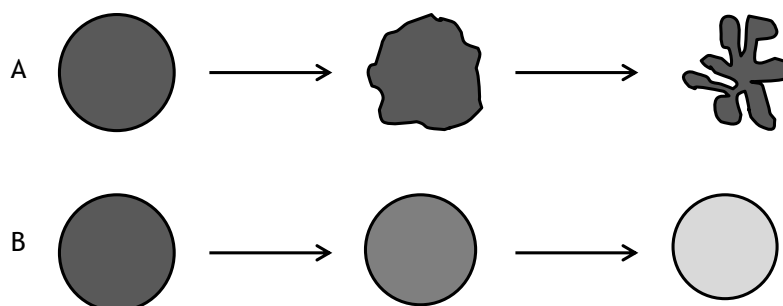


Figura 6.3 - Mecanismos de degradação de uma matriz polimérica: (A) degradação via superfície e (B) degradação em massa. (adaptado de Edlund e Albertsson, 2002)

A degradação via superfície envolve a clivagem hidrolítica de cadeias apenas na superfície da estrutura polimérica e ocorre quando a taxa de cisão das cadeias, à qual está associada a produção de oligómeros e monómeros que difundem para os espaços envolventes, é mais rápida que a taxa de intrusão de água para o interior da estrutura polimérica. Esta cinética degradativa resulta na perda de volume da estrutura ao longo do tempo (ou seja, torna-se cada vez mais fina ou pequena) sem alteração do peso molecular do bloco interno do polímero, que normalmente se vai mantendo inalterado ao longo do período degradativo (Figura 6.3 A). Em contrapartida, na degradação em massa, a cisão hidrolítica aleatória das cadeias leva à redução do peso molecular de toda a estrutura. As moléculas de água difundem para o interior da estrutura polimérica e hidrolisam as cadeias, permitindo, dessa forma, a difusão para o exterior de oligómeros e monómeros. Este tipo de degradação caracteriza-se pela perda de material em todo o volume da matriz (exterior e interiormente) e, por isso, a diminuição das suas propriedades mecânicas está diretamente relacionada com a taxa de degradação (Figura 6.3 B).

Com o objetivo de averiguar eventuais alterações na estrutura química das matrizes durante o processo de degradação *in vitro*, no final do ensaio foi selecionado um hidrogel de quitosano co-reticulado (C/GP/GE15), o qual foi liofilizado, reduzido a pó e misturado com KBr, sendo registado o respetivo espectro FTIR. A Figura 6.4 compara os espectros FTIR obtidos para esta matriz de quitosano co-reticulada, antes do ensaio e após 28 dias de degradação, em condições fisiológicas simuladas de degradação *in vivo*. Como se pode constatar os espectros são idênticos, com todos os picos característicos da matriz a surgirem no espectro após 28 dias de degradação, pese embora o facto de a matriz conservar apenas aproximadamente 50% da sua massa inicial. Estes resultados indiciam que a degradação dos hidrogéis de quitosano co-reticulados ocorre, essencialmente, via superfície.

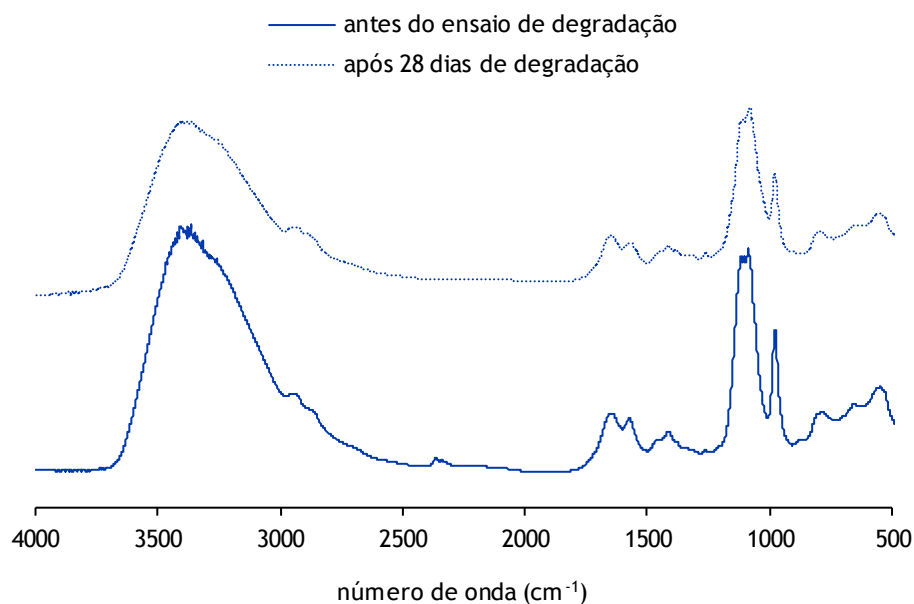


Figura 6.4 - Espectro FTIR de uma amostra de hidrogel de quitosano co-reticulado (C/GP/GE15) antes do ensaio de degradação e após 28 dias de degradação, num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (em PBS com 1,5 μg de lisozima/mL).

A imagem macroscópica do hidrogel, antes e após o ensaio de degradação, apresentada na Figura 6.5 poderá confirmar esta hipótese. Isto é, da observação da figura não é evidente a existência de degradação no seio do hidrogel (Figura 6.5 B) durante o período em que decorreu o ensaio.

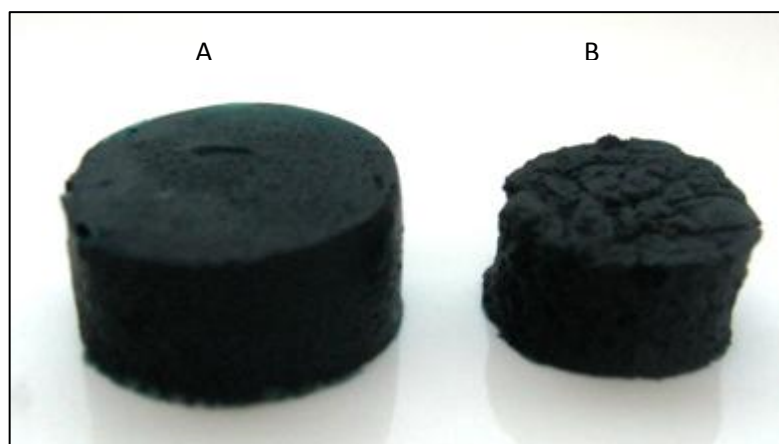


Figura 6.5 - Imagem do hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,15% w/w de GE (C/GP/GE15): (A) antes do ensaio de degradação e (B) após 28 dias de degradação, num meio que simula os mecanismos desencadeados no organismo (PBS com 1,5 μg de lisozima/mL).

Os resultados aqui apresentados indiciam que os hidrogéis de quitosano poderão ser degradados por mecanismos distintos: os reticulados fisicamente com GP por degradação em massa e os co-reticulados com GP e GE por degradação em superfície.

Na verdade, nos hidrogéis reticulados apenas com GP a difusão da água (em presença da lisozima) para o interior da estrutura resultou na hidrólise simultânea de toda a matriz, com perda de material em todo o volume da amostra e redução das propriedades mecânicas, que culminou com a desintegração completa da estrutura ao fim de nove dias. Por sua vez, nas matrizes co-reticuladas a cinética degradativa resultou na perda de material a partir da superfície do hidrogel, sem que houvesse alteração a nível da estrutura química da amostra remanescente, como mostrado nos espectros da Figura 6.4.

6.2.2 Estudos de citotoxicidade

Com o objetivo de atender à norma ISO 10993-5 (ISO 10993-5, 2009) que recomenda a realização de ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material, foi selecionado um teste por contacto indireto - o teste de extração - para avaliar o potencial citotóxico das matrizes de quitosano.

O teste, descrito na Secção 3.7.2, consiste em colocar as células em contacto com o meio no qual os hidrogéis estiveram submersos por um dado período de tempo. Este tipo de teste permite estudar os efeitos da libertação de componentes do material num sistema celular. No presente caso, os materiais utilizados foram os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de GE (C/GP/GE?) e o sistema celular foi a linha TSA (Figura 6.6), estabelecida a partir de um adenocarcinoma da mama, moderadamente diferenciado, que se desenvolveu espontaneamente num ratinho BALB/c múltiparo de 20 meses de idade (Nanni *et al.*, 1983).

Conforme representado na Figura 6.7, a capacidade dos hidrogéis de base quitosano para promover a viabilidade e proliferação celular mostrou que as matrizes avaliadas apresentaram comportamento comparável entre a amostra reticulada fisicamente com GP (C/GP) e as amostras co-reticuladas com diferentes concentrações de GE (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20). Contudo, as matrizes com maior concentração de GE indiciam valores mais elevados de viabilidade celular embora estes não sejam estatisticamente significativos para um nível de significância de $p < 0,05$.

Por último, pode concluir-se que o ensaio citotóxico, levado a cabo através do uso de extratos provenientes dos hidrogéis avaliados, apresentou ausência de toxicidade celular, podendo inferir-se que todas as matrizes produzidas, incluindo todas as co-reticuladas com GE, se mostraram promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

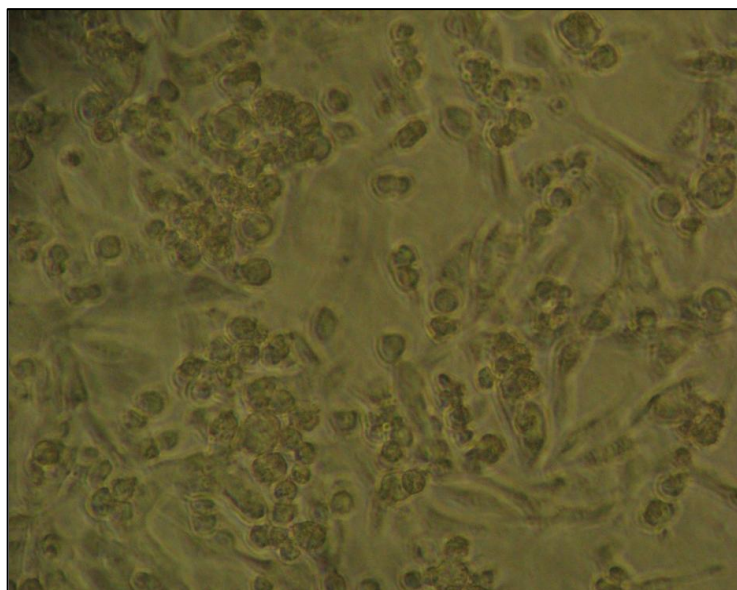


Figura 6.6 - Células TSA cultivadas em meio de cultura DMEM-HG, em monocamada, apresentando uma confluência celular de aproximadamente 70%, disponíveis para serem incubadas com os extratos provenientes das matrizes de hidrogel.

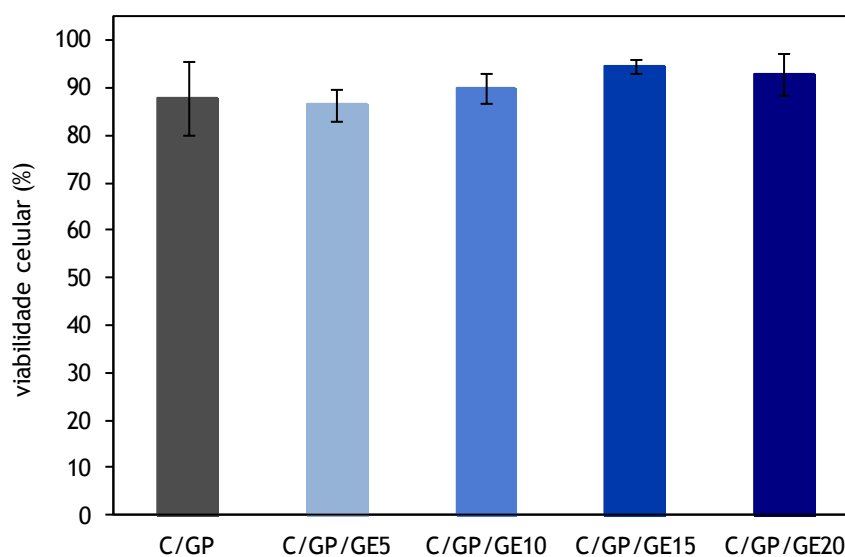


Figura 6.7 - Efeito da concentração de GE na viabilidade de células TSA. Os resultados são expressos em termos de percentagem de células de controlo, ou seja, células não tratadas com o meio de extração (valores médios \pm desvio padrão; $n = 6$). (A análise estatística foi realizada utilizando o método de análise de variância (ANOVA) de fator único, seguido pelo teste de Tukey para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA).)

6.2.3 Avaliação da capacidade de intumescimento

A capacidade de intumescimento das várias amostras de hidrogéis foi avaliada através de testes de absorção de água, descritos na Secção 3.7.3. Para tal, as matrizes foram incubadas em PBS até ser atingido o estado de equilíbrio. O conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis, em condições de equilíbrio (*EWC*), foi quantificado com base na equação (3.6).

A Figura 6.8 mostra o efeito da concentração de GE no conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis, em condições de equilíbrio.

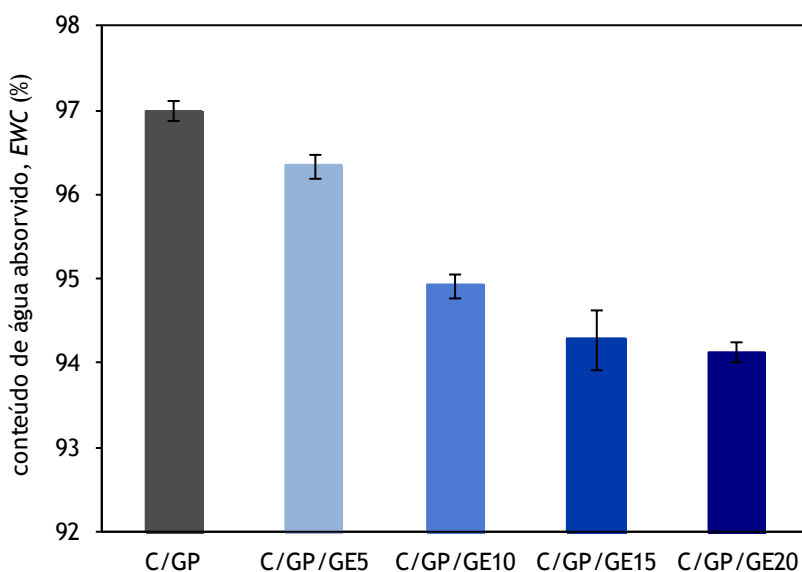


Figura 6.8 - Efeito da concentração de genipin no conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis reticulado fisicamente (C/GP) e co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w (C/GP/GE5, C/GP/GE10, C/GP/GE15 e C/GP/GE20, respetivamente), em condições de equilíbrio (*EWC*) a 37 °C. Para cada hidrogel foram realizados três ensaios; as barras representam o desvio padrão associado. O conteúdo de água absorvido, em condições de equilíbrio (*EWC*), foi calculado através da equação: $EWC (\%) = (W_e - W_d)/W_e \times 100$ (equação (3.6)), onde W_e e W_d representam a massa de hidrogel após atingido o estado de equilíbrio e após liofilização, respetivamente.

Estes resultados revelam, como era expectável, uma forte influência da concentração de GE no conteúdo de água absorvido pelos hidrogéis co-reticulados. Estes resultados, em concordância com a Figura 4.10 (Secção 4.2.2), mostram que com o aumento da concentração de GE (e, portanto, do grau de reticulação) ocorre uma diminuição do conteúdo de água absorvido. De facto, a intensificação de ligações químicas/covalentes fixa e reduz a mobilidade das cadeias poliméricas, dificultando o estabelecimento de interações fortes entre os grupos hidrofílicos existentes na rede e

as moléculas de água, o que se traduz numa menor capacidade de intumescimento. Ainda assim, todos os hidrogéis exibem elevados valores de *EWC* (> 90%). Estes valores são comparáveis a outros encontrados na literatura para hidrogéis que se destinam a aplicações biomédicas (Mi *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2000; Snyders *et al.*, 2007).

Contudo, verifica-se, surpreendentemente, que o maior valor de *EWC* corresponde à matriz reticulada fisicamente com GP. Este facto colide com os resultados exibidos na Figura 4.10 (Secção 4.2.2) que revelou que esta matriz possui a menor quantidade de grupos amina livres e, portanto, o maior grau de reticulação. Esta aparente contradição pode ser explicada se atendermos ao facto de a reticulação iónica não ser suficientemente forte para reduzir a mobilidade das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, evitar a expansão da rede quando esta se encontra em contacto com o solvente. Esta observação é compatível com as fracas propriedades mecânicas exibidas por este gel, nomeadamente o tempo de gelificação mais longo e o baixo valor do módulo elástico, conforme constatado no Capítulo 5.

Não será demais realçar que estes resultados abrem excelentes expectativas para a aplicação destes sistemas *in vivo*, já que um dos fatores que estimula a biocompatibilidade dos hidrogéis é a elevada capacidade de absorção de água, além, naturalmente, da sua semelhança físico-química com a matriz extracelular.

Todavia, deve salientar-se que os testes de caracterização *in vitro*, realizados neste trabalho com o objetivo de avaliar o potencial dos hidrogéis em aplicações na área farmacêutica ou biomédica, representam apenas uma parte do estudo de biocompatibilidade. Os hidrogéis classificados como biocompatíveis *in vitro* serão, de seguida, testados *in vivo*, em modelo animal.

6.3 CONCLUSÕES

Os estudos de degradação mostram que os hidrogéis de quitosano co-reticulados com diferentes concentrações de genipin degradam em presença da enzima lisozima, sendo que a taxa de degradação é inversamente proporcional à concentração de reticulante químico usada. Após 28 dias, as matrizes co-reticuladas com a menor (0,05% w/w) e a maior (0,20% w/w) concentração de GE perderam 80% e 40% da sua massa inicial, respetivamente. Adicionalmente, a técnica de espectroscopia de FTIR demonstrou que o processo degradativo ocorreu sem alteração significativa da estrutura química das matrizes. A matriz reticulada fisicamente com GP, sem genipin, apresentou a maior taxa de degradação na presença da enzima, acabando por desintegrar-se ao fim de nove dias em virtude das interações que produzem esta rede serem puramente iónicas (físicas). Os resultados mostram ainda que os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (com GP) e os co-reticulados (com GP e GE) poderão ser degradados por mecanismos distintos: degradação em massa e degradação via superfície, respetivamente.

O potencial citotóxico das matrizes de quitosano foi avaliado através do uso de extratos provenientes dos hidrogéis, utilizando a linha celular TSA. Todos os hidrogéis apresentam ausência

de toxicidade celular, podendo inferir-se que todas as matrizes produzidas, incluindo todas as co-reticuladas com GE, se mostram promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

No caso particular de um hidrogel, a sua semelhança física com os tecidos vivos, nomeadamente a sua consistência macia e elástica, deve-se em parte ao elevado conteúdo de água que possui. Além disso, o teor de água representa um dos requisitos básicos do material para ser considerado biocompatível. Neste trabalho, verificou-se que a capacidade de absorção de água dos hidrogéis de quitosano co-reticulados com diferentes concentrações de genipin variou numa relação inversa com a concentração de reticulante químico. Este comportamento, semelhante ao descrito na literatura para materiais poliméricos reticulados, está diretamente relacionado com o grau de reticulação do sistema, sendo muitas vezes a determinação da capacidade de absorção de água usada como uma medida indireta para avaliar o grau de reticulação. Atendendo a que a reação entre o quitosano e a molécula de genipin ocorre através dos grupos amina (grupos bastante hidrofílicos), um maior grau de reticulação resulta numa menor disponibilidade de grupos hidrofílicos para interagir com a água. Além disso, quanto mais reticulado for o sistema mais reduzida é a mobilidade das cadeias dificultando a entrada de solvente e o intumescimento do hidrogel. Todavia, o hidrogel reticulado fisicamente é o que apresenta um maior conteúdo de água, tendo-se concluído que a reticulação iónica não é suficientemente forte para reduzir a mobilidade das cadeias poliméricas e evitar a expansão da rede quando esta se encontra em contacto com o solvente.

O facto de o quitosano ser facilmente metabolizado, *in vivo*, pela lisozima, resultando no final do processo dois açúcares: a *N*-acetilglicosamina e a glicosamina, totalmente absorvíveis pelo organismo, explica a biodegradabilidade do polímero. Esta característica, associada à ausência de toxicidade e à elevada capacidade de absorção de água, faz do quitosano um polímero biocompatível. Os resultados apresentados neste capítulo demonstram que estas características do quitosano não se perdem com a formação de hidrogéis co-reticulados com GP e GE. Adicionalmente, e dependendo da concentração de reticulante químico, as cinéticas de degradação e a capacidade de intumescimento dos hidrogéis co-reticulados podem ser facilmente moduladas.

Em suma, os resultados aqui apresentados mostram que os hidrogéis de quitosano co-reticulados com GE possuem elevado potencial para uso como sistemas injetáveis produzidos *in situ*.

6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadi, R.; De Bruijn, J. D. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *86*, 824-32.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57*, 19-34.

Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2155-61.

- Edlund, U.; Albertsson, A. C. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery, *In Degradable Aliphatic Polyesters: Advances in Polymer Science* (vol.157), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, **2002**, 67-112.
- Ganji, F.; Abdekhodaie, M. J.; Ramazani, A. S. A. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2007**, *42*, 47-53.
- Ginde, R. M.; Gupta, R. K. In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers. *Journal of Applied Polymer Science* **1987**, *33*, 2411-29.
- Han, H. D.; Nam, D. E.; Seo, D. H.; Kim, T. W.; Shin, B. C. Preparation and biodegradation of thermosensitive chitosan hydrogel as a function of pH and temperature. *Macromolecular Research* **2004**, *12*, 507-11.
- ISO 10993-5 (International Standard). *Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. **2009**.
- Mi, F-L; Shyu, S-S; Peng, C-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2005**, *43*, 1985-2000.
- Mi, F-L; Sung, H-W; Shyu, S-S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 2804-14.
- Mi, F-L; Sung, H-W; Shyu, S-S; Su, C-C; Peng, C-K Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer* **2003**, *44*, 6521-30.
- Molinaro, G.; Leroux, J. C.; Damas, J.; Adam, A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an *in vivo* experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2717-22.
- Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. *In situ* forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-crosslinking. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3275-84.
- Nanni, P.; De Giovanni, C.; Lollini, P. L.; Nicoletti, G.; Prodi, G. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* **1983**, *1*, 373-80.
- Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W. Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, 27-46.
- Rogero, S. O.; Lugão, A. B.; Ikeda, T. I.; Cruz, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* **2003**, *6*, 317-20.
- Snyders, R.; Shingel, K. I.; Zabeida, O.; Roberge, C.; Faure, M-P; Martinu, L.; Klemberg-Sapieha, J. E. Mechanical and microstructural properties of hybrid poly(ethylene glycol)-soy protein hydrogels for wound dressing applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *83A*, 88-97.
- Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 1217-56.

Capítulo 7

ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DE CISPLATINA

SUMÁRIO

De forma a investigar o desempenho dos hidrogéis enquanto sistemas injetáveis para transporte e liberação de compostos bioativos, um fármaco, a cisplatina (CDDP), foi incorporado nos hidrogéis, aquando da sua preparação. Foram utilizadas diferentes abordagens para incorporar a cisplatina nas matrizes de quitosano: i) incorporação por dissolução na matriz; ii) encapsulamento em lipossomas, seguido da incorporação destes na matriz; e iii) imobilização em microesferas, as quais foram posteriormente dispersas na matriz.

Os resultados mostram que as diferentes formas de incorporação do fármaco na matriz conduzem a perfis de liberação de CDDP distintos que poderão ser ajustados consoante o objetivo pretendido.

7.1	INTRODUÇÃO.....	173
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
	7.2.1 LIBERTAÇÃO DE CISPLATINA A PARTIR DA MATRIZ POLIMÉRICA.....	174
	7.2.2 LIBERTAÇÃO DE CISPLATINA A PARTIR DE LIPOSSOMAS DISPERSOS NA MATRIZ POLIMÉRICA.....	182
	7.2.3 LIBERTAÇÃO DE CISPLATINA A PARTIR DE MICROESFERAS DISPERSAS NA MATRIZ POLIMÉRICA	185
	7.2.4 COMPARAÇÃO DOS VÁRIOS MÉTODOS DE INCORPORAÇÃO DE CISPLATINA NOS HIDROGÉIS.....	198
7.3	CONCLUSÕES	201
7.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	202

7.1 INTRODUÇÃO

Os resultados apresentados nos capítulos precedentes demonstraram que os hidrogéis aqui desenvolvidos, nomeadamente os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP e os que combinam um mecanismo de reticulação física e química (com GP e GE), são passíveis de serem produzidos *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH. Estas matrizes foram convenientemente caracterizadas no que respeita à morfologia, estrutura química, propriedades reológicas e alguns aspetos relacionados com o seu potencial de aplicação na área biomédica.

No presente capítulo pretende-se investigar os vários tipos de hidrogéis de base quitosano quanto ao seu potencial de utilização como veículos de transporte/libertação de um fármaco antitumoral, a cisplatina.

Tal como abordado na Secção 3.2, sendo a cisplatina um fármaco com elevada eficácia no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, a introdução do sistema de transporte, que também pode libertar a droga, no local onde a sua ação é necessária, não só reduz a exposição sistémica e os mecanismos de resistência desencadeados pelo organismo, como também aumenta a concentração da mesma junto das células tumorais e, conseqüentemente, o espectro de atividade citotóxica.

Foi neste contexto que se considerou utilizar os hidrogéis aqui desenvolvidos como uma nova estratégia para o transporte/libertação da cisplatina. Com este objetivo, foi planeado um extenso conjunto de testes de libertação *in vitro*.

Numa primeira abordagem, incorporou-se o fármaco, na sua forma livre, diretamente na matriz polimérica, por dissolução. Embora este método represente um caminho fácil de incorporação do agente bioativo no hidrogel, a libertação das moléculas não ocorre, geralmente, de uma forma sustentada (Bhattarai *et al.*, 2010). Seguidamente, e com o intuito de prolongar no tempo a libertação do agente terapêutico (por exemplo, para aplicações que exigem uma libertação sustentada ao longo de várias semanas), procedeu-se à incorporação no hidrogel de sistemas de libertação independentes, à base de partículas, designadamente lipossomas e microesferas, contendo o fármaco pré-encapsulado.

Os hidrogéis resultantes foram, então, submetidos a testes de libertação de cisplatina. Para tal, as matrizes foram postas em contacto com uma solução salina tampão fosfato (PBS; pH = 7,4) em recipientes individuais, numa incubadora com agitação orbital, a 37 °C. Em alguns casos, adicionou-se à solução salina de PBS, lisozima, numa concentração semelhante à encontrada no soro humano, correspondente a 1,5 µg/mL (Brouwer *et al.*, 1984; Freier *et al.*, 2005), por forma a melhor mimetizar os fenómenos que ocorrem quando estes materiais são introduzidos no organismo. Os testes foram conduzidos por um período máximo de 30 dias. Em instantes de tempo previamente definidos retiraram-se alíquotas (cujo volume foi repostado por igual volume de PBS fresco, sendo esta adição contabilizada de acordo com a equação 3.7) que foram posteriormente analisadas com vista

à quantificação da CDDP libertada. No caso do meio contendo lisozima, este foi totalmente renovado a cada dois dias, para manutenção da atividade enzimática (Freier *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2001). Por último, após os testes de libertação, procedeu-se à digestão ácida das matrizes, com solução aquosa de HNO₃:HCl (1:3), para determinação da massa de cisplatina retida nas mesmas e, portanto, não libertada (ver Secção 3.8).

Tal como em capítulos anteriores, também parte dos resultados aqui apresentados se encontra já publicada em revista da especialidade (Moura *et al.*, 2013).

A apresentação e discussão dos resultados referentes aos estudos de libertação de cisplatina é feita de seguida, na Secção 7.2. Esta secção encontra-se dividida em três subsecções: Secção 7.2.1, que inclui os resultados relativos à libertação do fármaco a partir da matriz, em PBS e em meio que simula as condições *in vivo*; Secção 7.2.2, que apresenta os resultados relativos à libertação do fármaco a partir de lipossomas dispersos na matriz; Secção 7.2.3, que reporta os resultados da libertação do fármaco imobilizado em microesferas, as quais, por sua vez, foram dispersas na matriz; e Secção 7.2.4, que compara os vários modos de incorporação do fármaco na matriz relativamente ao impacto nos perfis de libertação de cisplatina. Na penúltima subsecção (Secção 7.2.3) inclui-se, também, um estudo do efeito de alguns parâmetros do processo de produção das microesferas na sua morfologia e distribuição de tamanhos. Por último, na Secção 7.3 são apresentadas as principais conclusões deste estudo.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1 Libertação de cisplatina a partir da matriz polimérica

Conforme mencionado acima e detalhado na Secção 3.3, foram usadas diferentes abordagens para incorporar a cisplatina (CDDP) nas matrizes de quitosano reticuladas fisicamente e nas matrizes co-reticuladas, iniciando-se pela simples incorporação do fármaco, por dissolução, na matriz polimérica (designada pela sigla MAT).

Assim, a CDDP foi incorporada nos hidrogéis durante a sua preparação, ou seja, foi adicionada às soluções poliméricas ainda líquidas, logo após a adição e dissolução dos respetivos reticulantes (GP ou GP e GE). A ideia subjacente é aprisionar o fármaco na estrutura tridimensional do hidrogel à medida que este se forma. Todavia, não se pode excluir a possibilidade de a CDDP interagir com os constituintes das soluções.

A concentração inicial de CDDP usada nos hidrogéis foi de 0,6 mg/mL. Este valor foi selecionado tendo em consideração trabalhos realizados anteriormente por outros autores com sistemas poliméricos semelhantes (Chen *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2008). Os hidrogéis foram designados por C/GP/MAT e C/GP/GE?/MAT, consoante se trate do hidrogel de quitosano reticulado com GP ou co-reticulado com diferentes concentrações de GE, respetivamente. O símbolo "?" corresponde à

concentração de GE usada (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%, em massa). A sigla MAT pretende indicar que a incorporação da cisplatina foi na matriz.

Depois de obtidos os hidrogéis, procedeu-se ao estudo de libertação, em PBS e em PBS com lisozima, e à monitorização da CDDP libertada ao longo do tempo.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos analíticos para determinar a concentração de CDDP em diferentes tipos de matrizes, nomeadamente em fluidos biológicos e tecidos humanos. Esses métodos permitem detetar com rigor concentrações muito baixas do composto, da ordem de ppb (Bosch *et al.*, 2008). A estratégia mais comum de determinação da concentração de CDDP consiste na medição do conteúdo de platina total na matriz. Porém, a escolha do método mais adequado, no presente caso, foi baseada, não só na concentração de cisplatina na amostra mas, também, na disponibilidade do equipamento e no custo das análises.

Assim, a quantificação da CDDP libertada pelos hidrogéis começou por fazer-se através de um método indireto – o método colorimétrico com *o*-fenilenodiamina (descrito na Secção 3.8.1). Uma vez que a CDDP não absorve radiação na região do ultravioleta-visível, este método consiste em efetuar uma reação de derivatização da platina com a *o*-fenilenodiamina (OPDA), da qual resulta um produto cromóforo, com absorção máxima para um comprimento de onda de 704 nm (Golla e Ayres, 1973). A quantidade de CDDP foi calculada com base numa curva de calibração construída com uma solução padrão do fármaco, numa gama de concentrações compreendida entre 0,1 e 5 ppm, ou seja, 0,0001 e 0,005 mg/mL (Anexo B). Os resultados reportados a seguir foram obtidos com este método.

Estudos de libertação em PBS

A percentagem cumulativa de fármaco libertada a partir de matrizes reticuladas fisicamente e co-reticuladas com diferentes concentrações de GE (em que o fármaco foi diretamente incorporado), ao longo do tempo, em PBS a 37 °C, encontra-se representada na Figura 7.1.

Dos perfis mostrados ressalta, desde logo, a tendência semelhante exibida por todos os hidrogéis: uma libertação inicial rápida de CDDP, atingindo o máximo ao fim de um período de cerca de três horas, após o qual não é observada qualquer libertação adicional significativa.

A libertação não controlada e rápida de uma percentagem significativa de fármaco nos instantes seguintes ao hidrogel ter sido mergulhado no meio de libertação é designada por *burst release*. Este fenómeno é frequentemente observado em hidrogéis formados, quer por polímeros hidrofílicos, quer hidrofóbicos, e foi também verificado, por outros autores, em estudos de libertação de CDDP a partir de hidrogéis termosensíveis compostos por ácido hialurónico e gelatina (Chen *et al.*, 2011), ácido hialurónico e Pluronic F-127 (Hsu *et al.*, 2009) e PNIPAAm e quitosano (Fang *et al.*, 2008).

O outro aspeto que sobressai das curvas apresentadas na Figura 7.1 prende-se com as diferenças entre os perfis correspondentes aos hidrogéis co-reticulados e a curva correspondente ao hidrogel reticulado fisicamente, esta última situada bastante abaixo das primeiras. De facto, a percentagem cumulativa de CDDP libertada pela amostra C/GP/MAT tende para os 20% enquanto a das matrizes

co-reticuladas com diferentes concentrações de GE tende para valores de cerca de 60%. Conclui-se, portanto, que, em qualquer dos casos, a libertação do fármaco foi incompleta. Nesta mesma figura é, ainda, evidente que o aumento da concentração de GE não afeta significativamente os perfis de libertação.

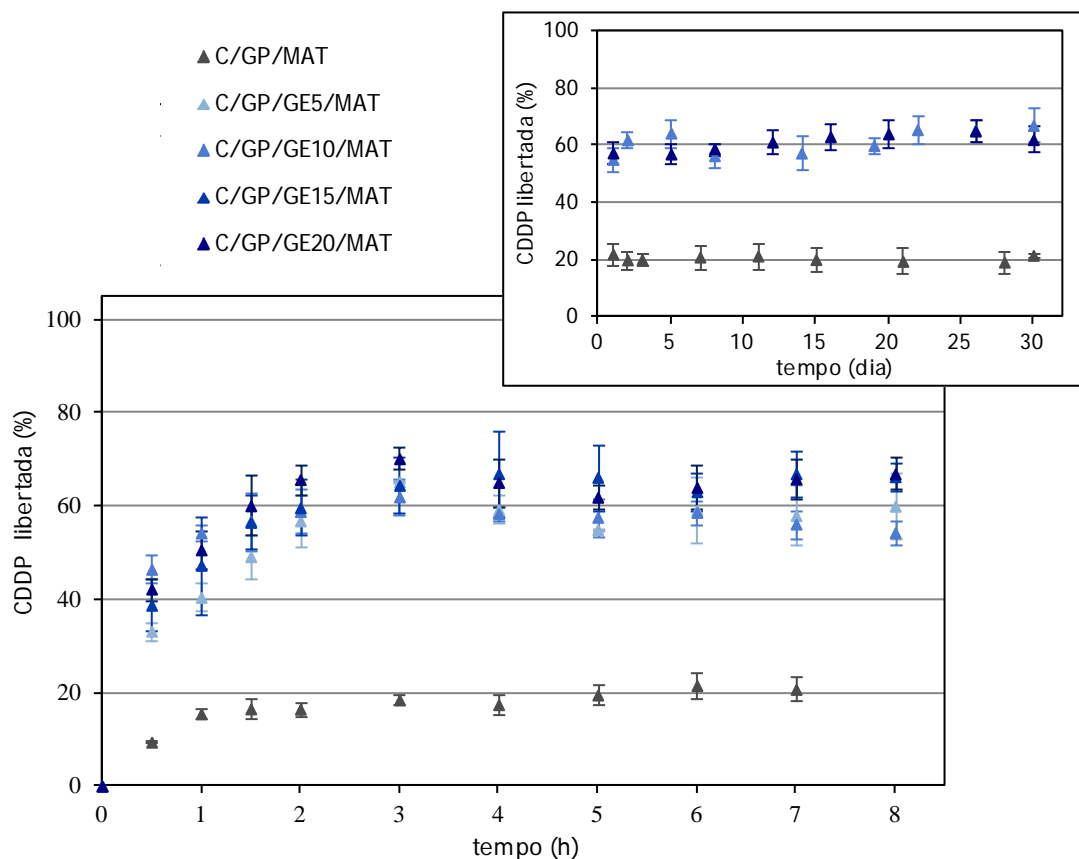


Figura 7.1 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% w/w (C/GP/GE5/MAT, C/GP/GE10/MAT, C/GP/GE15/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente), obtidos pelo método colorimétrico com OPDA. Perfis de libertação para um longo período (30 dias) são exibidos, no gráfico superior. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras \pm o desvio padrão.

O facto de matrizes co-reticuladas com GE libertarem uma maior percentagem de CDDP parece contraditório, uma vez que uma rede reticulada física/quimicamente é, aparentemente, mais forte que uma rede reticulada apenas fisicamente. Uma possível explicação para este paradoxo pode estar na perda de mobilidade das cadeias de quitosano nos hidrogéis co-reticulados com GE, devido à presença de ligações covalentes. De facto, estas podem reduzir a interação do fármaco com o polímero e consequentemente resultar, não só numa libertação inicial mais rápida, mas também

numa maior percentagem de CDDP libertada (cerca de 60% para matrizes co-reticuladas *versus* 20% para matrizes reticuladas fisicamente) (Fang *et al.*, 2008; Konishi *et al.*, 2005).

Por outro lado, a estrutura morfológica interna dos hidrogéis, nomeadamente o tamanho dos poros e a sua interligação, também pode influenciar a libertação de CDDP (Chen *et al.*, 2011). Tal como mostram as imagens obtidas por SEM (Figura 4.2), embora todos os hidrogéis exibam estruturas altamente porosas, as matrizes ionicamente reticuladas mostram uma estrutura, aparentemente, mais intrincada, com poros de menor tamanho que podem dificultar a difusão das moléculas do fármaco. Ainda assim, não será a dimensão dos poros da matriz a determinar a libertação de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular, como é o caso da CDDP.

Quanto à libertação incompleta do fármaco imobilizado nas matrizes, este fenómeno poderá estar relacionado com o processo de incorporação da CDDP nos hidrogéis. Uma vez que o fármaco é incorporado durante a preparação da matriz polimérica, não será de excluir a interação entre o agente terapêutico e o polímero, o que poderá resultar na imobilização permanente do fármaco. Esta situação foi tentada esclarecer por espectroscopia de FTIR. Todavia, a técnica não permitiu detetar alterações na estrutura química das matrizes, provavelmente devido à reduzida concentração de CDDP usada.

A digestão ácida das matrizes, após os testes de libertação, confirmou, para todos os hidrogéis, a quantidade de CDDP remanescente nas matrizes e, portanto, não libertada.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração inicial de CDDP nas matrizes nos perfis de libertação a partir de hidrogéis, foi testada uma outra concentração inicial, neste caso a correspondente ao limite de solubilidade do fármaco em água, à temperatura ambiente, 1,0 mg/mL (Hernigou, 2004).

Os perfis apresentados na Figura 7.2 mostram o efeito da concentração inicial de CDDP (0,6 e 1,0 mg/mL) na percentagem cumulativa de CDDP libertada para um hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10/MAT).

Como se pode ver na Figura 7.2, os perfis obtidos demonstram que a percentagem cumulativa de CDDP libertada não depende significativamente da concentração inicial do fármaco, para a gama de concentrações testadas. Resultados semelhantes foram reportados na literatura para a libertação de CDDP a partir de nanopartículas compostas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e monometóxi poli(etilenoglicol) (PLGA-mPEG), com diferentes concentrações de fármaco encapsulado (Avgoustakis *et al.*, 2002).

O método colorimétrico com a *o*-fenilenodiamina revelou-se extremamente moroso devido à necessidade de efetuar uma reação de derivatização para deteção da platina por espectrofotometria de UV/visível. Além disso, neste método, os resultados podem ser afetados por interferências causadas pela matriz da amostra, uma vez que o ensaio de controlo (“ensaio em branco”) poderá não traduzir rigorosamente os efeitos de uma matriz mais complexa. Este facto torna-se particularmente relevante nos estudos subsequentes, nomeadamente nos testes de

libertação em que o meio é constituído por PBS com lisozima e nos testes de libertação de CDDP a partir de lipossomas.

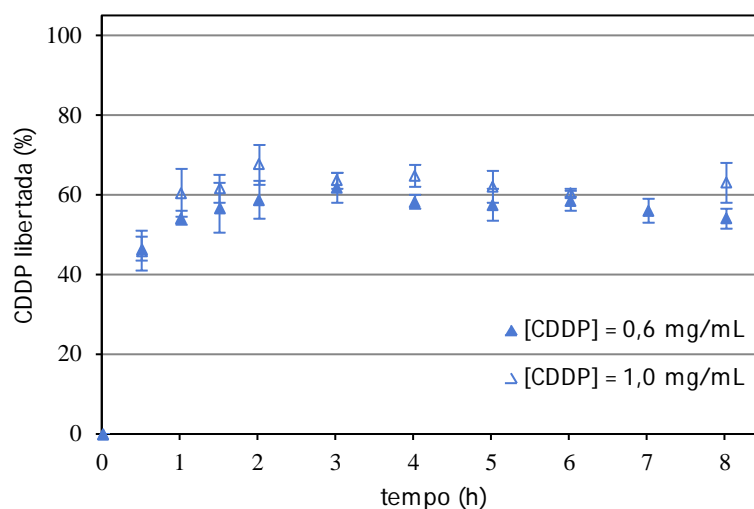


Figura 7.2 - Efeito da concentração inicial de CDDP (0,6 e 1,0 mg/mL) na percentagem cumulativa libertada para um hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10/MAT), em PBS a 37 °C. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) e as barras \pm o desvio padrão.

Assim, de modo a ultrapassar os inconvenientes e incertezas do método colorimétrico, optou-se por desenvolver um procedimento analítico mais expedito para determinação direta da CDDP, na forma de platina, utilizando a técnica de espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS). Neste caso, o pré-tratamento da amostra consiste apenas na simples diluição desta com uma solução aquosa de HCl (2%, v/v). As análises foram realizadas no Laboratório Central de Análises (LCA) da Universidade de Aveiro.

No entanto, por forma a comparar os valores obtidos pelos dois métodos procedeu-se à determinação da concentração de CDDP (em termos de platina) numa solução aquosa de concentração conhecida (0,100 mg/mL), designada por “solução de controlo”, através de ambas as técnicas referidas. Adicionalmente, analisou-se a solução lipossomal (Lipoplatin™) que se irá utilizar nos estudos de libertação a partir de lipossomas imobilizados, a fim de confirmar a concentração de CDDP presente nos lipossomas, fornecida no certificado de análise do fornecedor (2,98 mg/mL, valor obtido por espectrometria de absorção atómica com chama (Tabela 3.1)). Os resultados expressos em termos de concentração de platina (Pt) e de CDDP encontram-se sumariados na Tabela 7.1.

Os resultados indicam que a diferença dos valores de concentração de CDDP obtida pelo método colorimétrico e pela técnica de ICP-MS, não excedem os 10% relativamente aos valores teóricos.

Esta discrepância poderá decorrer da técnica analítica em questão e/ou de erros experimentais inerentes à preparação das soluções, designadamente à necessidade de diluir a solução de controlo e a suspensão lipossomal, respetivamente 500× e 50000×.

Tabela 7.1 - Comparação dos valores da concentração de Pt (ppb) e de CDDP (mg/mL) obtidos por diferentes processos: método colorimétrico com *o*-fenilenodiamina e ICP-MS - espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo, para a solução de controlo diluída 500× e para a solução lipossomal (Lipoplatin™) diluída 50000×.

	método colorimétrico			ICP-MS	
	[CDDP] teórica (mg/mL)	[Pt] (ppb)	[CDDP] (mg/mL)	[Pt] (ppb)	[CDDP] (mg/mL)
solução de controlo	0,100	122	$9,38 \times 10^{-2}$	118	$9,08 \times 10^{-2}$
Lipoplatin™	2,98 ¹	–	–	34,9	2,68

¹ valor constante no certificado de análise do fornecedor, obtido por espectroscopia de absorção atómica, com chama (Tabela 3.1).

Todavia, pelas razões anteriormente apontadas, e que se prendem sobretudo com eventuais interferências causadas pela matriz da amostra, os resultados apresentados daqui em diante foram todos obtidos com a técnica de ICP-MS.

Estudos de libertação em PBS com lisozima

Como se disse, foram também realizados testes de libertação *in vitro* em condições mais próximas das condições fisiológicas que ocorreriam se os hidrogéis fossem implantados *in vivo*, ou seja, em presença da enzima lisozima. Recorde-se que esta enzima é responsável pela degradação do quitosano e encontra-se presente nos tecidos, órgãos e fluidos corporais dos mamíferos (Mi *et al.*, 2002).

A Figura 7.3 mostra a percentagem cumulativa de fármaco libertada pelos hidrogéis reticulados fisicamente e co-reticulados, com a mínima e a máxima concentração de GE, ao longo do tempo, em PBS contendo lisozima. De notar que a escala temporal do gráfico principal se encontra em “dia” (e não em “hora”) porque, neste caso, o perfil é muito mais lento.

Os perfis exibidos na figura revelam que, em condições *in vivo* simuladas, ou seja, num meio de PBS contendo lisozima, a libertação de CDDP a partir de matrizes de quitosano co-reticuladas ocorre com um *burst release* inicial (de cerca de 60%), no entanto, a libertação é contínua e prolongada por um período de 28 dias. De facto, o perfil de libertação atinge o patamar para um período superior a 20 dias. Além disso, os perfis apontam para uma libertação quase total do fármaco

incorporado nas matrizes ao fim de quatro semanas (cerca de 91% para o hidrogel C/GP/GE5/MAT e 78% para o hidrogel C/GP/GE20/MAT).

Relativamente à matriz reticulada fisicamente (C/GP/MAT), verifica-se que o perfil de libertação é, após o primeiro dia, aproximadamente linear, com um declive de 4% de CDDP libertada/dia, desintegrando-se após 20 dias de imersão.

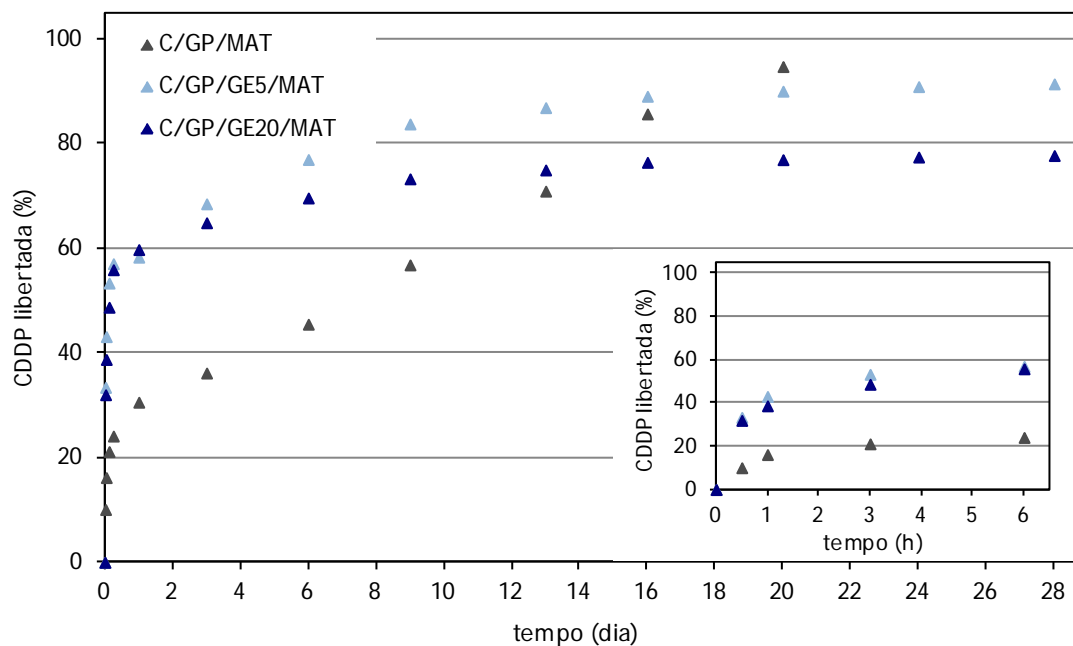


Figura 7.3 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de libertação de CDDP, em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulado fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com 0,05 e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente). Perfis de libertação para um curto período (6 h) são exibidos, no gráfico interior, para os mesmos hidrogéis.

A comparação dos perfis de libertação a partir das mesmas matrizes quando estas se encontram imersas em PBS e em PBS contendo lisozima é ilustrada na Figura 7.4, a qual engloba as curvas das Figuras 7.1 e 7.3. De realçar que, quando se usou o meio com lisozima, foi necessário substituí-lo a cada dois dias, de modo a manter a atividade da enzima constante durante o período experimental (Freier *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2001). Deste modo, as condições experimentais em que decorrem ambos os testes não são exatamente as mesmas.

Nas curvas da Figura 7.4 é evidente o impacto da presença de lisozima na libertação de CDDP a partir das matrizes de quitosano, quer reticuladas fisicamente com GP, quer co-reticuladas com GE. Este impacto é notoriamente mais relevante nas primeiras.

Contudo, e em todos os casos, as diferenças só são relevantes após o primeiro dia.

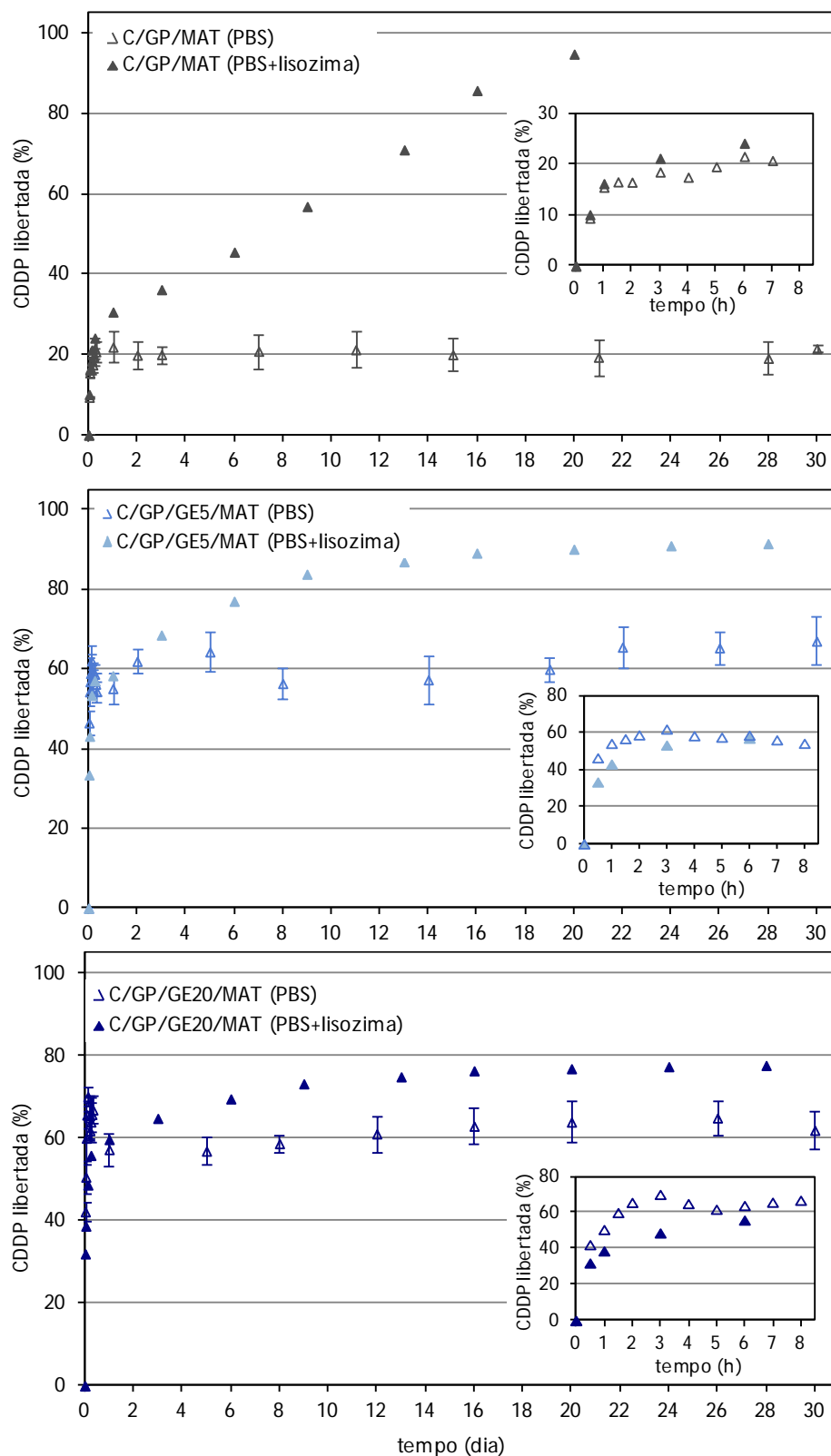


Figura 7.4 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS e em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente (C/GP/MAT) e co-reticulados com 0,05 % e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE20/MAT, respetivamente). Perfis de libertação para um curto período (8 h) são exibidos nos correspondentes gráficos interiores.

Esta situação está seguramente relacionada com o facto de, nas primeiras horas, a libertação do fármaco ser inteiramente controlada por processos difusionais, ou seja, apenas o gradiente de concentração é a *driving force* para o transporte das moléculas de CDDP da matriz para o meio circundante. Isto porque o período de tempo é demasiado curto para que a degradação do polímero pela lisozima tenha um papel significativo na libertação do fármaco. Contudo, a partir daí, a libertação do fármaco parece ser controlada pela degradação enzimática do polímero, ou seja, os fenómenos degradativos da matriz na presença da enzima começam a ser relevantes (*vide* Figura 6.1) e, conseqüentemente, aceleram a velocidade de libertação da CDDP. A corroborar esta análise encontram-se estudos na literatura, que referem que a libertação de drogas e fatores de crescimento a partir de hidrogéis de quitosano injetáveis é controlada, no início, pela difusão e, só mais tarde, pela degradação do hidrogel (Bhattarai *et al.*, 2010; Naderi-Meshkin *et al.*, 2014; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

Por forma a investigar o desempenho dos hidrogéis de base quitosano enquanto sistemas de transporte e libertação de compostos bioativos foi, como já se disse, utilizada, também, uma solução lipossomal contendo CDDP, que foi incorporada nos hidrogéis aquando da sua preparação. Os resultados são apresentados e discutidos de seguida.

7.2.2 Libertação de cisplatina a partir de lipossomas dispersos na matriz polimérica

A utilização de lipossomas contendo CDDP constituiu uma outra alternativa de incorporar o fármaco nos hidrogéis de quitosano reticulados ionicamente com GP e co-reticulados com diferentes concentrações de GE.

Assim, para os testes, foi utilizada uma solução lipossomal comercial de concentração 2,98 mg CDDP/mL e diâmetro vesicular médio de 94,2 nm, denominada Lipoplatin™. Embora a Lipoplatin™ tenha sido desenvolvida com a finalidade de reduzir a toxicidade sistémica da CDDP e direcioná-la para os sítios tumorais através de injeção intravenosa (Boulikas, 2004), a formulação lipossomal foi aqui usada como uma nova estratégia para desenhar um sistema de transporte capaz de prolongar o tempo de libertação da CDDP a partir de matrizes termossensíveis de base quitosano.

Um volume de solução lipossomal foi adicionado às soluções poliméricas ainda líquidas para que os lipossomas contendo CDDP pudessem ficar retidos na rede tridimensional durante a formação dos hidrogéis. O volume de solução adicionado foi tal que a concentração de CDDP nos hidrogéis fosse igual a 0,6 mg/mL (ou seja, a mesma concentração de fármaco usada nos estudos anteriores, Secção 7.2.1). Os hidrogéis assim preparados foram designados pela sigla LIP (C/GP/LIP e C/GP/GE?/LIP, consoante se trate do hidrogel de quitosano reticulado com GP ou co-reticulado com diferentes concentrações de GE, respectivamente).

O perfil de libertação de CDDP obtido a partir do hidrogel de quitosano reticulado fisicamente, cuja CDDP se encontra encapsulada em lipossomas (C/GP/LIP) está patente na Figura 7.5. Para efeitos

de comparação, exibe-se, na mesma figura, o perfil obtido a partir do mesmo hidrogel carregado com CDDP na matriz (C/GP/MAT). Adicionalmente, apresenta-se na Figura 7.5 o perfil de libertação obtido diretamente a partir da formulação lipossomal (Lipoplatin™), na ausência da matriz polimérica.

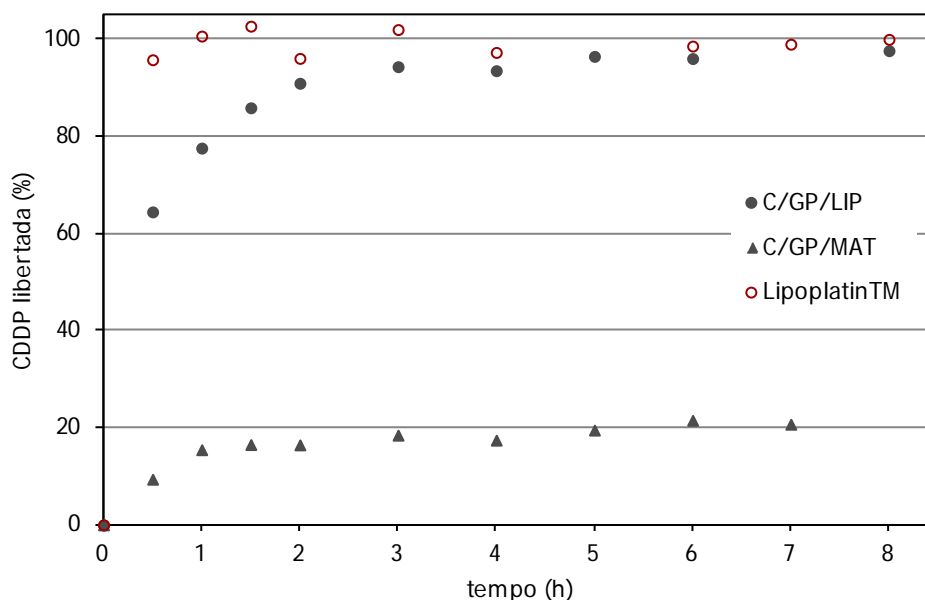


Figura 7.5 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, a partir de hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente nos quais a CDDP foi encapsulada em lipossomas (C/GP/LIP) e incorporada diretamente na matriz polimérica (C/GP/MAT). Na figura encontra-se também representado o perfil de libertação para a suspensão lipossomal, Lipoplatin™.

Da observação da Figura 7.5 ressalta, em primeiro lugar, a libertação praticamente completa de CDDP exibida pelo hidrogel C/GP/LIP, o que não acontece com o hidrogel C/GP/MAT (que liberta aproximadamente 20 % da CDDP incorporada).

A libertação completa da CDDP na amostra C/GP/LIP está muito provavelmente relacionada com o facto de o fármaco se encontrar encapsulado nos lipossomas. Assim, os lipossomas podem funcionar como uma barreira adicional de proteção para o fármaco, aquando da sua incorporação na solução polimérica, evitando a interação da CDDP com o polímero, que, como se discutiu anteriormente (Secção 7.2.1), poderá resultar na imobilização permanente do fármaco na matriz polimérica, impedindo a sua libertação completa. Contudo a tendência de ambos os perfis é para uma libertação que acontece nas primeiras quatro horas.

Quanto ao perfil exibido pela solução lipossomal, Lipoplatin™, convém esclarecer que em termos experimentais, este perfil foi obtido através de um teste *in vitro* que consistiu em adicionar um determinado volume de suspensão lipossomal (250 µL) ao meio de libertação (PBS; pH = 7,4). As

condições experimentais do teste de libertação foram as mesmas que as utilizadas nos testes anteriores efetuados com as matrizes poliméricas (Secção 3.8). As alíquotas retiradas a cada instante de tempo foram centrifugadas numa ultracentrifuga (60000 rpm; 20 min; 4 °C), o sobrenadante separado e analisado por ICP-MS, com vista à quantificação da CDDP libertada (equação 3.7).

O perfil obtido é distinto do encontrado para o hidrogel cujos lipossomas foram dispersos na matriz (C/GP/LIP), sendo muito mais rápido como seria de esperar, porquanto a matriz polimérica funciona como uma resistência adicional.

Quanto aos perfis de libertação de CDDP obtidos a partir de hidrogéis co-reticulados (C/GP/GE10/LIP e C/GP/GE20/LIP) carregados com lipossomas contendo o fármaco em estudo, estes encontram-se representados na Figura 7.6. Na mesma figura foram também incluídos os perfis obtidos a partir dos mesmos hidrogéis carregados com CDDP dispersa na matriz polimérica (C/GP/GE10/MAT e C/GP/GE20/MAT), para efeitos comparativos.

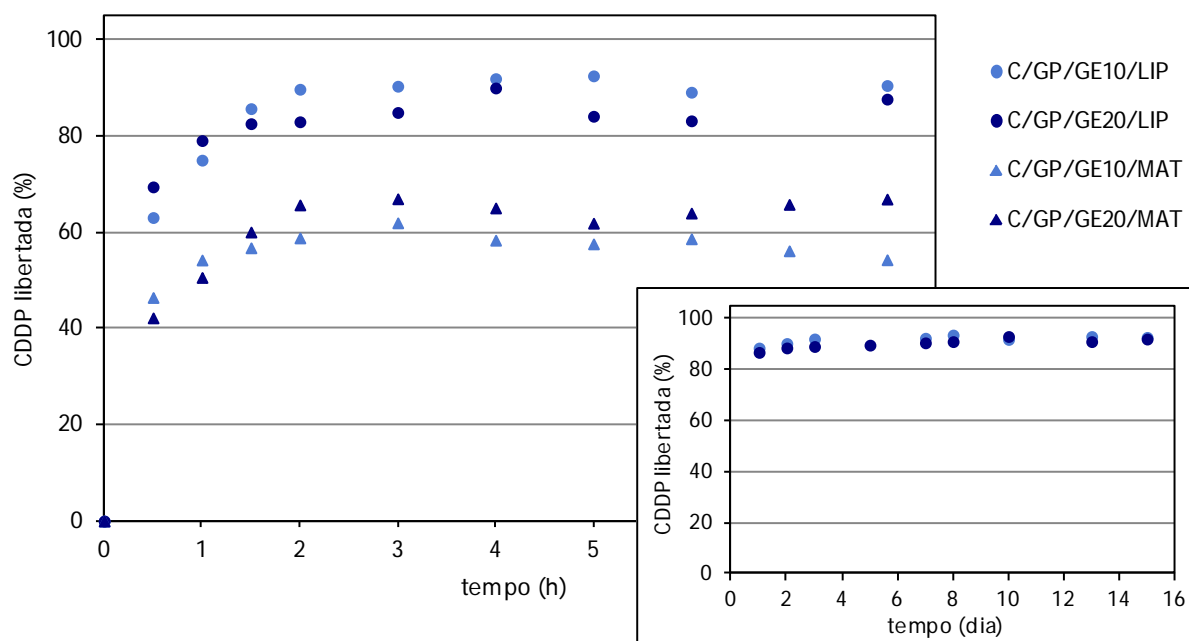


Figura 7.6 - Efeito do tipo de incorporação do fármaco (encapsulado em lipossomas ou disperso na matriz) nos perfis de libertação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano co-reticulados com 0,10 e 0,20% w/w de genipin, cuja CDDP se encontra encapsulada em lipossomas (C/GP/GE10/LIP e C/GP/GE20/LIP, respetivamente) ou dispersa na matriz polimérica (C/GP/GE10/MAT e C/GP/GE20/MAT). Perfis de libertação para um longo período (15 dias) são exibidos, no gráfico inferior.

A semelhança do perfil de libertação de CDDP a partir do hidrogel reticulado fisicamente (Figura 7.5), também para os perfis obtidos a partir dos hidrogéis co-reticulados (C/GP/GE10/LIP e C/GP/GE20/LIP) o encapsulamento da CDDP nos lipossomas parece determinante para alcançar uma libertação quase completa do fármaco. De facto, como ilustra a Figura 7.6, quando o fármaco está encapsulado nos lipossomas (curvas C/GP/GE?/LIP), alcançam-se percentagens de libertação de cerca de 90%, em contraste com os valores de 60% para que tendem os perfis com o fármaco simplesmente disperso na matriz (curvas C/GP/GE?/MAT). Uma vez mais, o efeito da concentração de GE é pouco significativo.

De salientar que, após a realização dos testes *in vitro*, a concentração remanescente de CDDP nas amostras de hidrogel foi cerca de 6% para os hidrogéis co-reticulados com GE (C/GP/GE10/LIP e C/GP/GE20/LIP) e vestigial para o hidrogel reticulado fisicamente com GP (C/GP/LIP).

Finalmente, com o propósito de averiguar se nos estudos de libertação de CDDP encapsulada nos lipossomas é o fármaco ou os lipossomas que se difundem através da matriz para o meio circundante, realizou-se também um ensaio de determinação da concentração de fósforo no meio de libertação, pelo método colorimétrico de Fiske-Subbarow (Fiske and Subbarow, 1925). Note-se que a presença de fósforo é indicativa da presença de lipossomas no meio. Para tal, foi usado soro fisiológico como meio de libertação, justamente para descartar a presença do elemento fósforo da solução salina tampão fosfato (PBS). Os valores elevados da concentração de fosfolípidos no meio indicam que serão os lipossomas a serem difundidos através da matriz polimérica. Todavia, este assunto carece de uma investigação mais aprofundada no futuro.

Com base nos estudos de libertação *in vitro* realizados com lipossomas carregados com CDDP, apresentados nesta secção, pode concluir-se que, apesar da libertação de CDDP ser completa, os perfis ainda continuam a revelar-se bastante rápidos nos instantes iniciais (atingindo o máximo em cerca de três horas). Assim, achou-se dispensável proceder a testes adicionais em meio de PBS e lisozima. Dado que se continua em busca de uma forma de integração do fármaco na matriz que origine uma libertação contínua e que se estenda por um período mais alargado, testou-se uma outra alternativa, designadamente a incorporação da CDDP em microesferas de quitosano.

7.2.3 Libertação de cisplatina a partir de microesferas dispersas na matriz polimérica

Uma outra proposta para o melhoramento da libertação de CDDP a partir dos hidrogéis de base quitosano desenvolvidos neste trabalho, consistiu na utilização de um sistema um pouco mais complexo, em que a CDDP foi previamente imobilizada em microesferas, propositadamente preparadas para o efeito, as quais foram posteriormente inseridas na matriz polimérica.

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão água-em-óleo, seguido de reticulação química, conforme descrito na Secção 3.3. Foram usadas as mesmas formulações de base, ou seja, o polímero quitosano e o reticulante genipin, de modo a maximizar a compatibilidade da matriz

polimérica injetável com a estrutura do material que forma as microesferas. Variaram-se alguns parâmetros do processo, nomeadamente a concentração da solução polimérica, a razão genipin/quitosano, a velocidade de agitação e o tempo de reticulação (*vide* Tabela 3.2).

Esta secção tem início, precisamente, pela apresentação de um estudo resumido do efeito desses parâmetros na morfologia e na distribuição de tamanhos das microesferas de quitosano reticuladas com genipin.

7.2.3.1 Caracterização morfológica e granulométrica das microesferas

As microesferas produzidas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia ótica (Figura 7.7) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM) (Figura 7.8). As imagens foram obtidas após separação das microesferas da fase contínua (parafina líquida) por decantação, lavagem com hexano e secagem à temperatura ambiente.

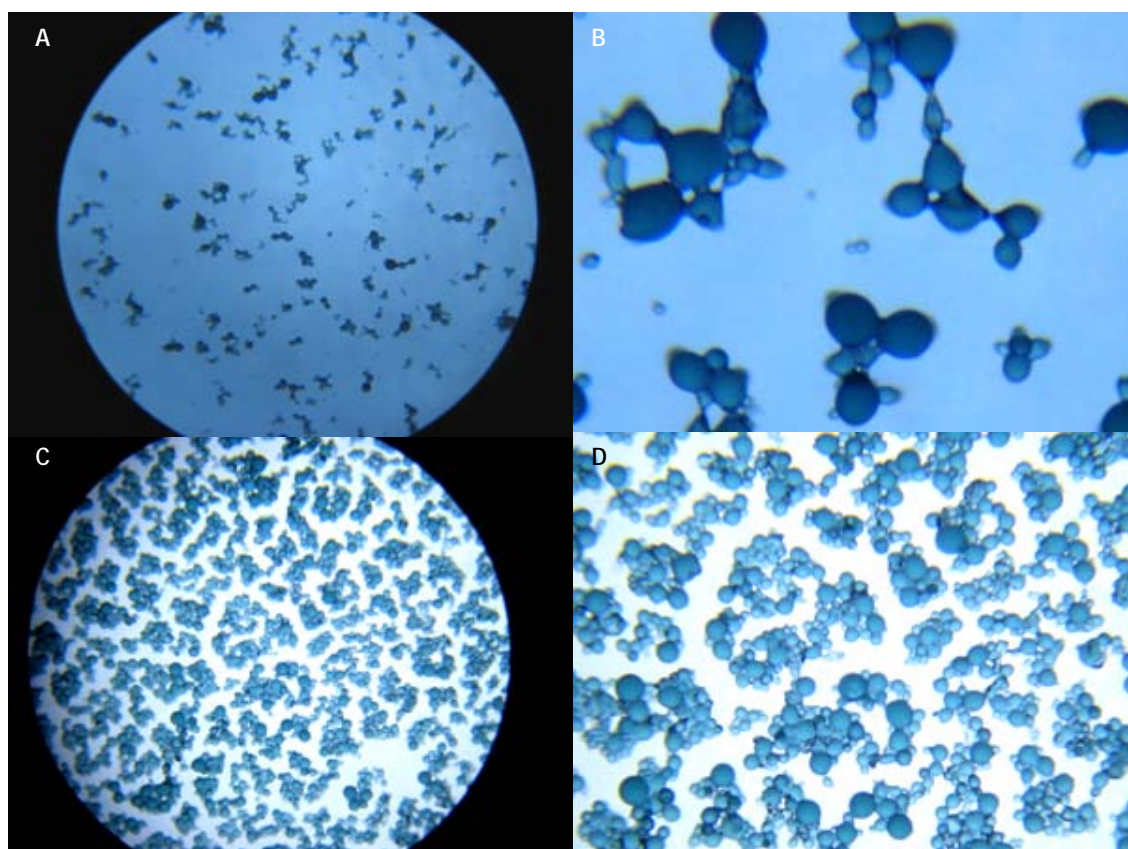


Figura 7.7 - Imagens das microesferas de quitosano reticuladas com genipin obtidas por microscopia ótica (A e B) após três horas de reação e (C e D) após 12 horas de reação.

A observação das imagens da Figura 7.7 mostra microesferas de cor verde-azulada, resultado da reação de reticulação entre os grupos amina do quitosano e a molécula de genipin, com tendência para a aglomeração, muito provavelmente pelo facto de estas se encontrarem secas. A intensidade da cor aumentou, quer com o tempo de reticulação, quer com a razão mássica genipin/quitosano, como seria expectável.

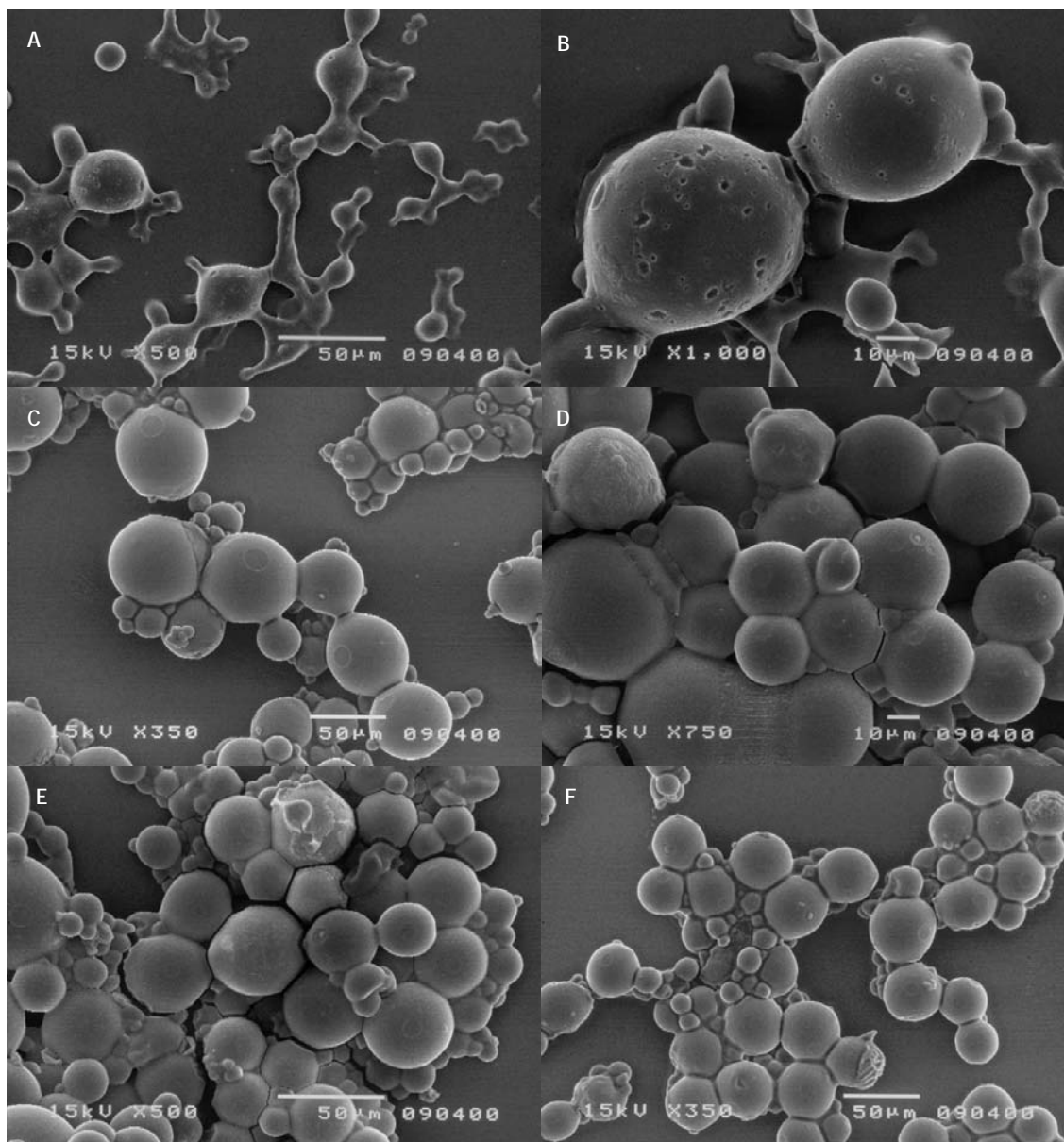


Figura 7.8 - Imagens obtidas por SEM das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (A e B) após três horas de reação; (C e D) após seis horas de reação; e (E e F) após 12 horas de reação.

Durante o processo de produção, a observação ao microscópio ótico da emulsão, mostrou que as microesferas formadas apresentavam, aparentemente, uma forma dispersa e esférica. Contudo, após o processo de lavagem e secagem, as microesferas tendem a aglomerar e a perder a forma se

não se encontrarem efetivamente reticuladas, como é o caso de microesferas obtidas após três horas de reação de reticulação, cujas imagens se encontram na Figura 7.7 A e B e na Figura 7.8 A e B. Para tempos de reticulação superiores, as microesferas de quitosano reticuladas com genipin apresentam geometria esférica (Figura 7.8 C a F), estrutura densa e superfície ligeiramente rugosa, como se pode observar pelas imagens de SEM apresentadas na Figura 7.9.

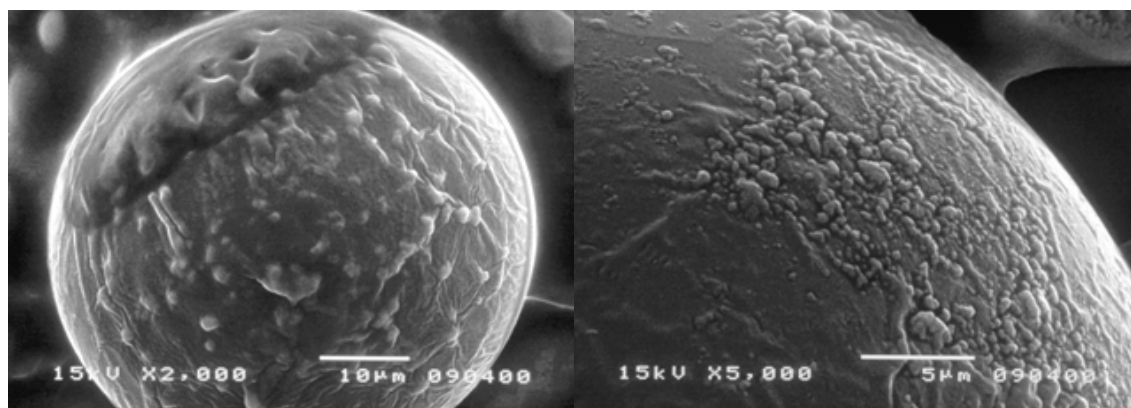


Figura 7.9 - Imagens obtidas por SEM da superfície das microesferas de quitosano reticuladas com genipin, após 12 horas de reação.

Das imagens apresentadas (Figuras 7.7 e 7.8) pode, ainda, concluir-se que as microesferas possuem tamanhos bastante diferentes, apontando, desde logo, para distribuições alargadas e/ou multimodais.

Caracterização granulométrica

A Tabela 7.2 resume, para cada ensaio de preparação de microesferas, as condições experimentais, o diâmetro médio, expresso pelo D_{50} (mediana da distribuição), e os diâmetros D_{10} e D_{90} , obtidos por difração *laser*, e, ainda, a polidispersividade dada pelo índice *span* $((D_{90} - D_{10})/D_{50})$. De notar que um valor elevado do índice *span* indica uma elevada polidispersividade da amostra.

A análise da Tabela 7.2 permite concluir que, de um modo geral, o valor da mediana das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (que varia entre 7 e 88 μm) aumenta com o aumento da concentração mássica de polímero e com a diminuição, quer da razão mássica genipin/quitosano, quer da velocidade de agitação. Quanto ao efeito do tempo de reticulação, verifica-se uma significativa redução dos valores de D_{50} entre as três e as seis horas de reação, o que leva a concluir que as microesferas, após três horas de reação, ainda não adquiriram estabilidade dimensional. Os valores baixos de *span* indicam que as distribuições de tamanhos são relativamente apertadas. Tendências semelhantes, observadas para a produção de microesferas

com o mesmo sistema, foram descritas na literatura (Imsombut *et al.*, 2010; Kawadkar e Chauhan, 2012; Wang *et al.*, 1996).

Tabela 7.2 - Condições experimentais (concentração mássica de quitosano, razão mássica genipin/quitosano, velocidade de agitação e tempo de reticulação) para cada um dos ensaios de preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin e respetivos valores do diâmetro médio (D_{50}), dos diâmetros D_{10} e D_{90} e da polidispersividade (índice *span*), obtidos por difração laser.

ensaio	concentração de quitosano (% w/w)	razão genipin/quitosano	velocidade de agitação (rpm)	tempo de reticulação (h)	D_{50}^1 (μm)	D_{10}^1 (μm)	D_{90}^1 (μm)	<i>span</i> ²
1	1	0,01	800	3	16,2	2,4	47,0	2,75
2	1	0,01	800	6	8,7	1,4	29,2	3,20
3	1	0,01	800	12	8,5	1,1	12,1	1,29
4	1	0,03	800	3	32,5	9,0	59,9	1,57
5	1	0,03	800	6	15,9	3,1	38,3	2,22
6	1	0,03	800	12	18,2	3,4	36,2	1,80
7	1	0,06	800	3	23,6	2,3	50,1	2,03
8	1	0,06	800	6	8,5	1,4	18,8	2,05
9	1	0,06	800	12	7,0	1,2	12,7	1,64
10	1	0,03	400	3	17,5	3,6	30,6	1,54
11	1	0,03	400	6	19,4	3,8	36,0	1,66
12	1	0,03	400	12	19,1	3,1	37,8	1,82
13	1	0,06	400	3	13,6	2,6	24,8	1,63
14	1	0,06	400	6	13,8	2,6	26,0	1,69
15	1	0,06	400	12	13,4	2,7	29,0	1,97
16	2	0,01	800	3	85,0	10,6	357	4,08
17	2	0,01	800	6	85,4	21,8	169	1,72
18	2	0,01	800	12	88,4	24,4	168	1,62
19	2	0,03	800	3	37,0	4,0	110	2,90
20	2	0,03	800	6	30,6	11,2	80,3	2,26
21	2	0,03	800	12	26,2	7,3	61,9	2,08
22	2	0,06	800	3	21,4	1,7	64,7	2,94
23	2	0,06	800	6	16,7	2,0	44,7	2,56
24	2	0,06	800	12	17,1	2,1	41,0	2,28

¹ D_{10} , D_{50} e D_{90} correspondem, respetivamente, aos diâmetros para os quais 10, 50 e 90% das microesferas têm dimensões inferiores ou iguais àquele valor, para uma distribuição cumulativa *undersize*.

² $span = (D_{90} - D_{10})/D_{50}$

Todavia a análise da dimensão das microesferas apenas com base no D_{50} poderá ser demasiado redutora, pelo que, de seguida são apresentadas as distribuições granulométricas e é discutido, com mais detalhe, o efeito de cada um dos parâmetros processuais, mantendo os demais constantes.

Efeito da concentração de polímero

O efeito da concentração de quitosano na distribuição de tamanhos das microesferas (curvas cumulativa e de frequência) está representado na Figura 7.10 (A e B) para as duas concentrações mássicas de polímero testadas: 1% (ensaio 9) e 2% (ensaio 24).

Tal como observado na Tabela 7.2, também as curvas de distribuição de tamanhos mostram que o aumento da concentração de quitosano conduz a um aumento do tamanho das microesferas. Durante a preparação da emulsão, se a concentração polimérica é elevada, o conteúdo de quitosano em cada gotícula formada é grande o que implica que o tamanho das microesferas aumente. Além disso, associada à variação de concentração estão alterações simultâneas na tensão superficial e na viscosidade da solução polimérica que também podem contribuir para variações do tamanho das microesferas produzidas. O aumento da concentração de quitosano e, por sua vez, da viscosidade da solução leva à emulsificação incompleta e, conseqüentemente, à formação de gotículas maiores que vão dar origem a microesferas de maiores dimensões (Kawadkar e Chauhan, 2012).

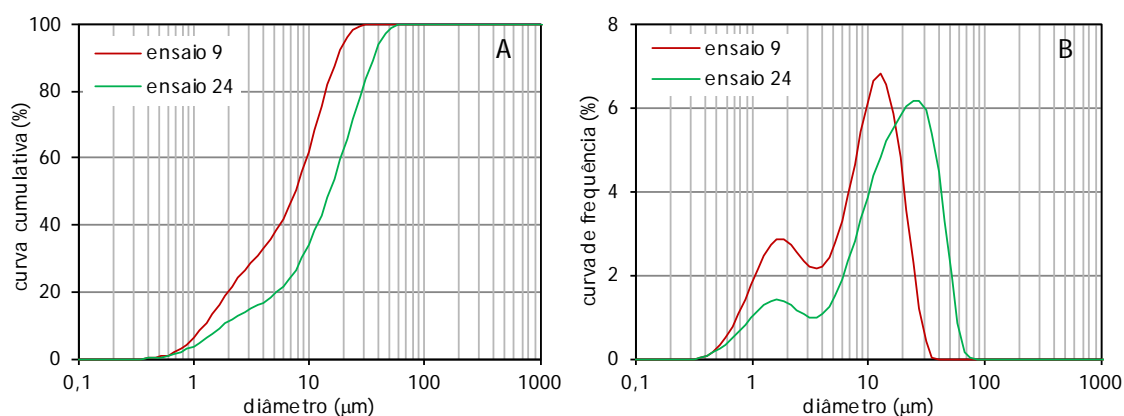


Figura 7.10 - Efeito da concentração de polímero: 1% (ensaio 9) e 2% (ensaio 24) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: razão mássica genipin/quitosano = 0,06, velocidade de agitação = 800 rpm e tempo de reticulação = 12 h).

Adicionalmente, e de acordo com as imagens das microesferas (Figuras 7.7 e 7.8), as curvas de distribuição de frequência apresentadas na Figura 7.10 B são, claramente, bimodais.

Efeito da razão mássica genipin/quitosano

Depois de obtida a emulsão da solução de quitosano em parafina líquida segue-se a adição, gota a gota, da solução de reticulante (solução de genipin), originando a reticulação das microesferas de quitosano a partir da superfície. Como se viu pela Tabela 7.2 e agora pelas distribuições (curvas

cumulativa e de frequência) apresentadas na Figura 7.11 (A e B) para três diferentes razões de genipin/quitosano: 0,01, 0,03 e 0,06 (ensaios 18, 21 e 24, respetivamente), a diminuição da razão mássica genipin/quitosano provoca um aumento do tamanho das microesferas. Este facto pode ser explicado pela agregação ou coalescência das gotículas da emulsão nos instantes iniciais como resultado de uma superfície pouco reticulada devido à baixa concentração de genipin (Kawadkar e Chauhan, 2012).

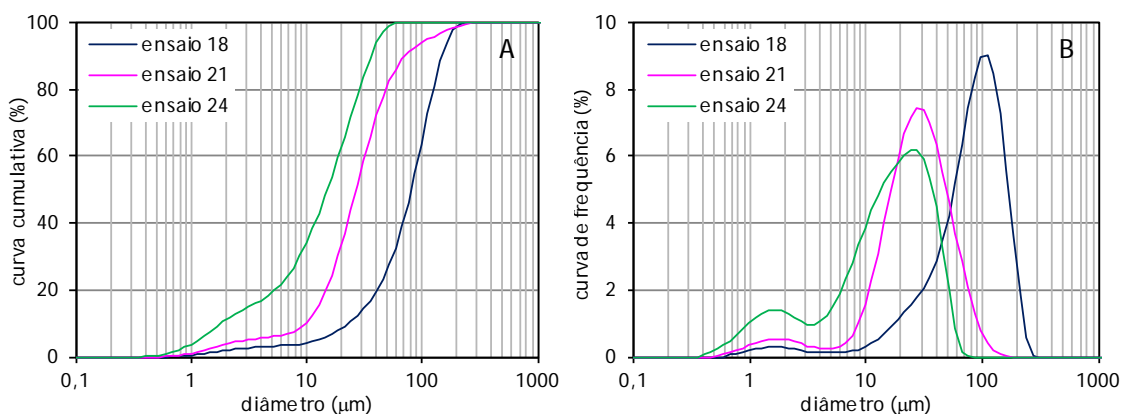


Figura 7.11 - Efeito da razão mássica genipin/quitosano: 0,01 (ensaio 18), 0,03 (ensaio 21) e 0,06 (ensaio 24) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: concentração de quitosano = 2%, velocidade de agitação = 800 rpm e tempo de reticulação = 12 h).

Efeito da velocidade de agitação

O efeito da velocidade de agitação nas curvas de distribuição de tamanhos (cumulativa e de frequência) das microesferas está representado na Figura 7.12 (A e B) para as duas velocidades de agitação testadas: 800 rpm (ensaio 9) e 400 rpm (ensaio 15). O aumento da velocidade de agitação melhora a dispersão das gotículas da emulsão e, conseqüentemente, previne a agregação e a coalescência (Imsombut *et al.*, 2010). Como resultado, verifica-se uma diminuição da dimensão das microesferas para velocidades de agitação superiores.

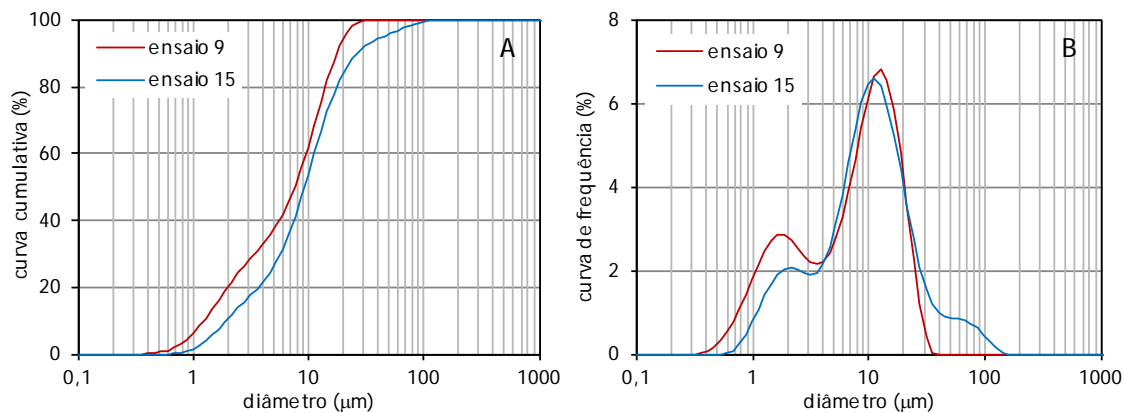


Figura 7.12 - Efeito da velocidade de agitação: 800 rpm (ensaio 9) e 400 rpm (ensaio 15) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: concentração de quitosano = 1%, razão mássica genipin/quitosano = 0,06 e tempo de reticulação = 12 h).

Efeito do tempo de reticulação

O tempo de reticulação é um parâmetro determinante na obtenção de microesferas de quitosano reticuladas com genipin. O efeito deste parâmetro nas curvas de distribuição de tamanhos (cumulativa e de frequência) das microesferas é exibido na Figura 7.13 (A e B) para 3 h (ensaio 7), 6 h (ensaio 8) e 12 h (ensaio 9) de reticulação. A análise da figura mostra que nas primeiras seis horas as curvas de distribuição (quer a cumulativa, quer a de frequência) evoluem no sentido dos tamanhos menores. A partir deste período as distribuições parecem manter-se sensivelmente inalteradas. Esta tendência foi observada, praticamente, para todos os ensaios constantes da Tabela 7.2, ou seja, nas primeiras seis horas de reação assiste-se a uma significativa redução da dimensão das microesferas, enquanto que após este período o tamanho é praticamente invariável.

O mecanismo que permite obter microesferas pelo método de emulsão água-em-óleo, seguido de reticulação química, está associado à difusão do solvente das gotículas da emulsão para a fase contínua (ou seja, a fase dispersa é enriquecida no polímero até que as gotículas solidificam e se tornam microesferas) e à reticulação das camadas superficiais em direção ao centro. A ocorrência em simultâneo destes dois fenómenos leva a uma redução do tamanho das microesferas ao longo do tempo, até se atingir a estabilidade dimensional.

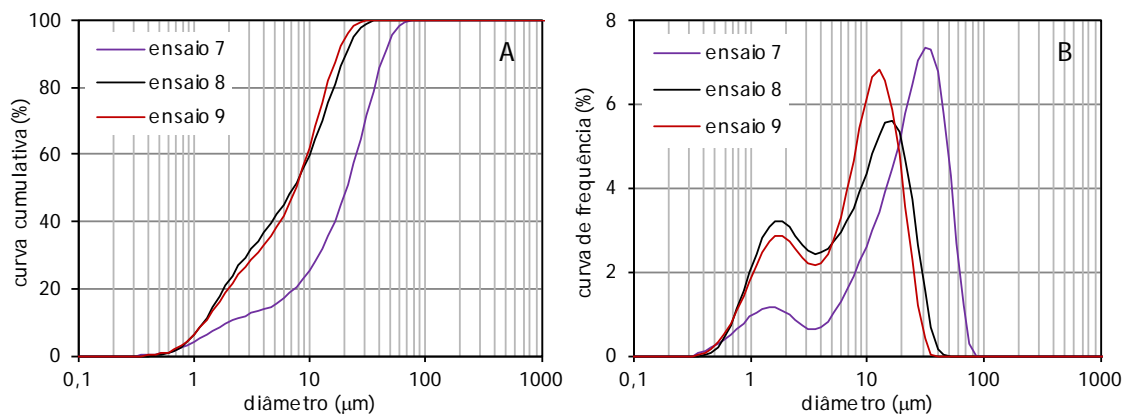


Figura 7.13 - Efeito do tempo de reticulação: 3 h (ensaio 7), 6 h (ensaio 8) e 12 h (ensaio 9) nas curvas de distribuição (A) cumulativa e (B) de frequência das microesferas de quitosano reticuladas com genipin (as restantes condições experimentais mantêm-se constantes: concentração de quitosano = 1%, razão mássica genipin/quitosano = 0,06 e velocidade de agitação = 800 rpm).

De realçar que todos os ensaios efetuados exibiram distribuições de tamanhos bimodais o que pode ser vantajoso quando se pretende utilizar as microesferas como veículo de transporte e libertação de fármacos (Bansal *et al.*, 2011; Kawadkar e Chauhan, 2012).

Depois de avaliar e melhor compreender a influência de alguns parâmetros referentes ao método de produção, como sejam a concentração de polímero, a razão genipin/quitosano, a velocidade de agitação e o tempo de reticulação, sobre a forma e o tamanho das microesferas de quitosano formadas, seguiu-se a imobilização do fármaco nas mesmas.

7.2.3.2 Imobilização de CDDP em microesferas

No presente trabalho, a seleção das condições experimentais a utilizar nos ensaios de preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin, contendo CDDP, teve por base dois parâmetros fundamentais: o tamanho das microesferas obtidas e a concentração, quer de polímero, quer de reticulante, usada na produção das mesmas.

Enquanto o tamanho das microesferas pode afetar a distribuição da droga na matriz polimérica, a sua libertação e condicionar a injetabilidade (idealmente, para aplicações injetáveis, as micropartículas devem possuir um diâmetro inferior a 125 μm (Jain, 2000)), a concentração, quer de polímero, quer de reticulante, pode afetar a eficiência de imobilização. Estudos relatam que em microesferas de menor dimensão, a droga se encontra mais uniformemente distribuída, no entanto a libertação do fármaco ocorre mais rapidamente quanto menor o percurso difusional (Bansal *et al.*, 2011). Por outro lado, quanto maior for a concentração de polímero e de reticulante, maior a percentagem de fármaco imobilizado (Akbuga e Bergisadi, 1999; Kim e Pack, 2006; Wang *et al.*,

1996). A maior concentração de genipin contribui para acelerar o processo de reticulação das microesferas e, conseqüentemente, dificultar a migração da droga para a fase externa promovendo a sua imobilização na matriz.

Face ao exposto, as condições experimentais correspondentes ao ensaio 24 da Tabela 7.2, e que se sintetizam:

- concentração de quitosano = 2%
- razão genipin/quitosano = 0,06
- velocidade de agitação = 800 rpm
- tempo de reticulação = 12 h,

são as que melhor otimizam os aspetos referidos e, como tal, as escolhidas para a preparação de microesferas contendo CDDP. As curvas de distribuição cumulativa e de frequência das microesferas obtidas nestas condições (ensaio 24) encontram-se representadas nas Figuras 7.10 e 7.11.

As microesferas carregadas com cisplatina foram obtidas de acordo com a metodologia descrita na Secção 3.3. Uma vez que a CDDP é um fármaco hidrossolúvel, pôde ser misturada na própria solução aquosa de quitosano, formando uma mistura homogénea (fase dispersa) que foi de seguida emulsionada na fase contínua, que contém o surfactante, sob agitação magnética e posteriormente reticulada com genipin. As microesferas assim obtidas foram, então, separadas da fase contínua por decantação, lavadas com hexano e secas à temperatura ambiente.

Para determinar a eficiência de imobilização, bem como a concentração de CDDP nas microesferas, procedeu-se à digestão ácida de uma determinada massa de microesferas secas e à posterior quantificação do fármaco na solução remanescente através de ICP-MS.

Como é sabido, a eficiência de imobilização de fármacos no interior de microesferas poliméricas preparadas através do método de emulsão, seguido de reticulação química, depende das características físico-químicas do fármaco, do polímero e do reticulante, bem como das condições experimentais utilizadas no processo de formulação, o tipo e volume dos solventes das fases dispersa e contínua da emulsão, as proporções reticulante/polímero e fármaco/polímero, o tipo e concentração do estabilizante, entre outras. De um modo geral, as eficiências de imobilização de fármacos em sistemas à base de partículas (microesferas e microcápsulas) são baixas (Ta *et al.*, 2008).

O valor médio obtido para a eficiência de imobilização da CDDP nas microesferas de quitosano, em percentagem, foi de $53,27 \pm 3,66$ ($n = 3$), calculado de acordo com a equação (3.1). Este valor indica que uma quantidade significativa de fármaco foi perdida para o meio durante a formulação das microesferas pelo método de emulsão água-em-óleo e/ou durante o processo de lavagem das mesmas. Todavia, resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Akbuga e Bergisadi, 1999 Wang *et al.*, 1996) aquando da preparação de microesferas de quitosano reticuladas com glutaraldeído.

A percentagem (w/w) de CDDP imobilizada nas microesferas de quitosano foi de $1,93 \pm 0,01$ ($n = 3$). Apesar de baixo, este valor é superior aos encontrados por outros autores para a imobilização de CDDP em nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e monometóxi poli(etilenoglicol), PLGA-mPEG, (0,54 a 0,98% w/w, consoante a composição do copolímero) (Avgoustakis *et al.*, 2002). A utilização do método de dupla emulsão (água-óleo-água), devido ao facto de o copolímero de PLGA-mPEG não ser solúvel em meio aquoso (ao contrário do quitosano e da CDDP), poderá estar na base destes resultados.

De referir que os valores obtidos, quer para a eficiência de imobilização, quer para o conteúdo de CDDP nas microesferas de quitosano, dizem apenas respeito às condições experimentais aplicadas na sua preparação (ensaio 24, Tabela 7.2). De facto, neste trabalho, não foi estudada a influência dos parâmetros processuais, designadamente concentração mássica de quitosano, razão mássica genipin/quitosano, velocidade de agitação e tempo de reticulação, naquelas variáveis.

7.2.3.3 Perfis de libertação

Tal como no caso dos lipossomas, também as microesferas de quitosano carregadas com CDDP foram incorporadas nos hidrogéis aquando da sua preparação, ou seja, foram adicionadas às soluções poliméricas ainda líquidas, logo após a adição e dissolução do(s) reticulante(s). A percentagem de microesferas incorporada nas soluções foi cerca de 1,5% w/w. Neste caso os hidrogéis foram genericamente designados pela sigla MIC (C/GP/MIC e C/GP/GE?/MIC, consoante se trate do hidrogel de quitosano reticulado com GP ou co-reticulado com diferentes concentrações de GE, respetivamente. O símbolo "?" corresponde à concentração de GE usada (no presente caso 0,05 ou 0,20%, w/w).

Ainda, de forma análoga aos hidrogéis cujo fármaco se encontra disperso na matriz, para estes hidrogéis, o estudo de libertação de CDDP foi conduzido em meio de PBS e em meio de PBS contendo lisozima.

Estudos de libertação em PBS

A percentagem cumulativa de CDDP libertada a partir de microesferas (MIC) dispersas nos hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP e co-reticulados com diferentes concentrações de GE (designadamente a mínima e a máxima) ao longo do tempo, em PBS a 37 °C, encontra-se representada na Figura 7.14.

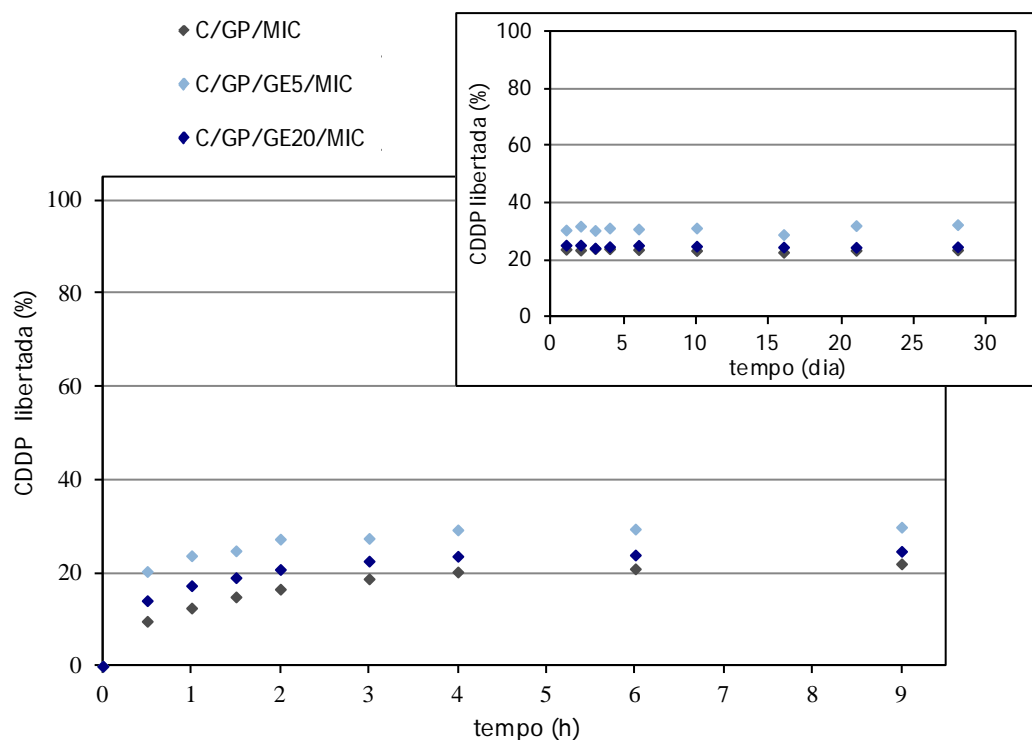


Figura 7.14 - Efeito do tipo de reticulação nos perfis de liberação de CDDP, em PBS a 37 °C, para os hidrogéis de quitosano, reticulados fisicamente (C/GP/MIC) e co-reticulados com 0,05 e 0,20% w/w, de genipin (C/GP/GE5/MIC e C/GP/GE20/MIC, respectivamente). Para os mesmos hidrogéis são também exibidos, no gráfico superior, os perfis de liberação para um longo período (28 dias).

Esta figura mostra que os perfis de liberação são semelhantes para todas as amostras: a CDDP liberta-se rapidamente de todos os hidrogéis (sendo atingido o valor máximo ao fim de aproximadamente seis horas de ensaio). Esta semelhança poderá indicar que a difusão do fármaco é controlada pela microesfera, oferecendo o hidrogel, onde esta se encontra inserida, pouca resistência à liberação. Além disso, a curva correspondente ao hidrogel reticulado fisicamente é inferior às demais, tendendo para um valor limite de aproximadamente 20% (tal como verificado para a amostra C/GP/MAT (Figura 7.1)). Os perfis relativos às amostras co-reticuladas apresentam valores ligeiramente superiores (tendendo para os 30% de liberação), exibindo os valores mais elevados o que corresponde à amostra que contém a menor concentração de genipin (C/GP/GE5/MIC).

Estudos de liberação em PBS com lisozima

O impacto da presença de lisozima nos perfis de liberação de CDDP foi avaliado unicamente para o hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,05% w/w de genipin, carregado com microesferas (C/GP/GE5/MIC). A Figura 7.15 compara os perfis de liberação a partir desta matriz quando imersa

em meios de libertação distintos: PBS e PBS contendo lisozima. Na mesma figura, é ainda incluída uma curva que corresponde à libertação cumulativa de CDDP a partir de um hidrogel cujo fármaco se encontra simultaneamente disperso na matriz, na sua forma livre, e immobilizado em microesferas (C/GP/GE5/MAT/MIC), que se discute mais adiante.

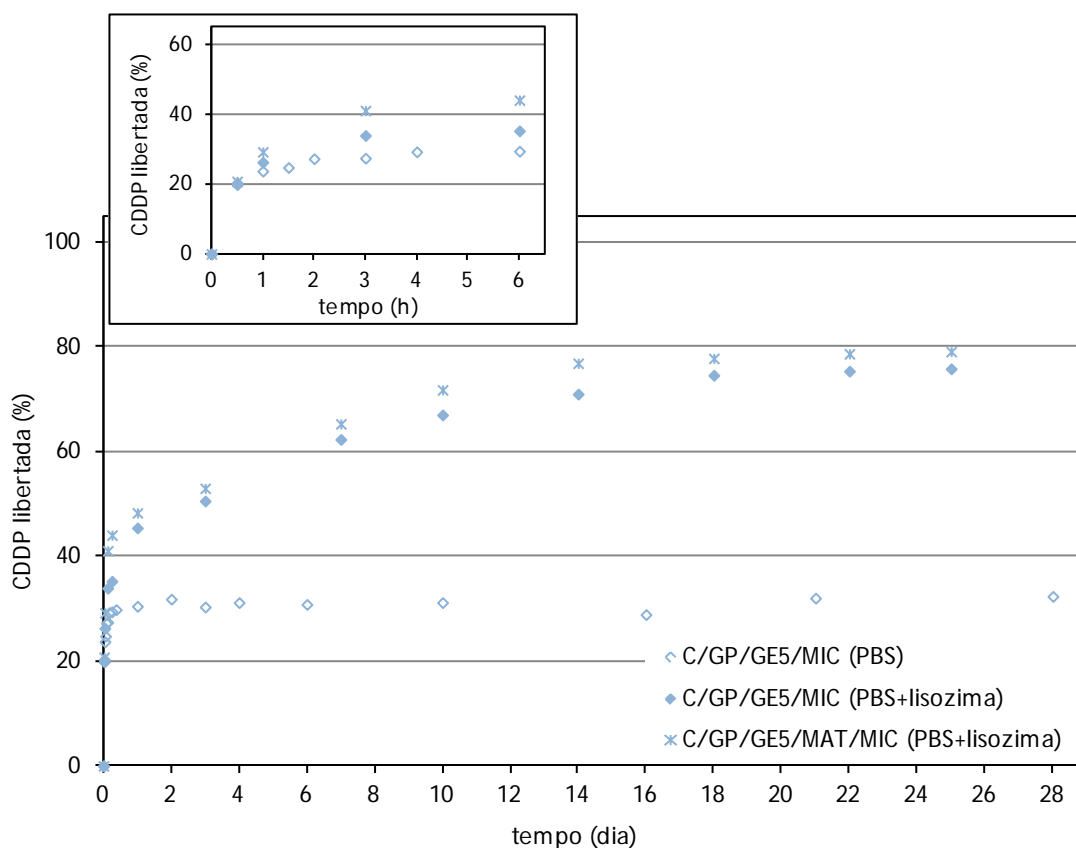


Figura 7.15 - Comparação dos perfis de libertação de CDDP, em PBS e em PBS com lisozima a 37 °C, para o hidrogel de quitosano co-reticulado com 0,05% w/w de genipin, ao qual se adicionaram microesferas carregadas com CDDP (C/GP/GE5/MIC). Perfil de libertação a partir do mesmo hidrogel mas com CDDP dispersa na matriz (C/GP/GE5/MAT/MIC) é também incluído no gráfico. Para os mesmos hidrogéis são ainda exibidos, no gráfico superior, os perfis de libertação para um curto período (6 h).

Relativamente à presença da enzima no meio de libertação (comparar C/GP/GE5/MIC (PBS) e C/GP/GE5/MIC (PBS+lisozima)), verifica-se, mais uma vez, que esta tem um forte impacto na curva da percentagem de CDDP libertada, sobretudo, após o primeiro dia de teste. De facto, é a partir desta altura que os efeitos degradativos da matriz começam a ser significativos (*vide* Figura 6.1), como de resto já adiantado. Mais, o perfil em PBS tende para um valor de 30% de CDDP libertada, atingido ao fim de um dia, enquanto a curva de libertação em PBS e lisozima tende para os 80%, atingidos ao fim de 20 dias.

Comparando agora os perfis C/GP/GE5/MIC e C/GP/GE5/MAT/MIC, ambos imersos em PBS com lisozima, e apesar de o primeiro só conter fármaco nas microesferas e o segundo conter, além disso, fármaco também disperso na matriz, constata-se que os perfis são muito semelhantes.

Todavia, é de realçar que a quantidade cumulativa de CDDP libertada expressa nos gráficos foi calculada em termos relativos (percentagem relativa à inicial), logo a amostra que contém a cisplatina nas duas formas (C/GP/GE5/MAT/MIC) liberta, naturalmente, uma maior quantidade de CDDP em termos absolutos. Este modelo de sistema de transporte e libertação de CDDP poderá trazer vantagens quando se pretende aumentar a concentração do fármaco no local de ação.

7.2.4 Comparação dos vários métodos de incorporação de cisplatina nos hidrogéis

Dado que ao longo do presente capítulo foi investigada a libertação de CDDP a partir de hidrogéis de quitosano (reticulados fisicamente e co-reticulados), cujo fármaco foi incorporado de diversos modos (disperso na matriz (MAT), pré-encapsulado em lipossomas (LIP) e imobilizado em microesferas (MIC)), o que envolveu a análise de múltiplos e variados gráficos, julgou-se pertinente incluir uma secção dedicada à sua comparação.

Para facilitar a análise, os perfis de libertação obtidos irão ser agrupados em dois grupos: os que se referem aos estudos de libertação em PBS e os que correspondem aos estudos de libertação do fármaco em PBS e lisozima.

Estudos de libertação em PBS

A Figura 7.16 compara os perfis de libertação de CDDP de hidrogéis reticulados fisicamente (Figura 7.16 A) e co-reticulados (Figura 7.16 B) em PBS.

Da Figura 7.16 A pode concluir-se que a CDDP se liberta mais rapidamente quando pré-encapsulada em lipossomas (curva C/GP/LIP) do que quando se encontra dispersa na matriz (C/GP/MAT) ou imobilizada em microesferas (C/GP/MIC), atingindo a libertação completa ao fim de seis horas. Por outro lado, comparando as curvas C/GP/MAT e C/GP/MIC, elas são praticamente coincidentes, tendendo para os 20% de libertação, também ao fim de seis horas. Tal como já se adiantou, quando a CDDP é incorporada diretamente na matriz aquando da sua preparação, pode ocorrer a imobilização permanente desta na matriz polimérica, impedindo assim a sua libertação, o que não sucede se a CDDP estiver encapsulada nos lipossomas. A semelhança de comportamento em ambas as situações corrobora esta análise já que as microesferas foram produzidas com a mesma formulação polimérica.

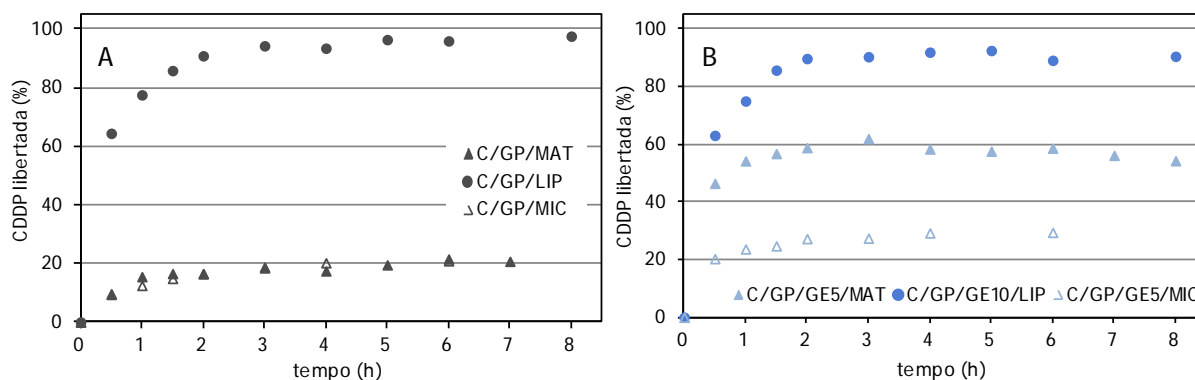


Figura 7.16 - Efeito do modo de incorporação de CDDP: dispersa na matriz (MAT), pré-encapsulada em lipossomas (LIP) e imobilizada em microesferas (MIC) nos perfis de liberação obtidos, em PBS a 37 °C, para hidrogéis: (A) reticulados fisicamente (C/GP) e (B) co-reticulados (C/GP/GE?).

No que respeita aos hidrogéis co-reticulados com 0,05% de genipin, com incorporação do fármaco na matriz e em microesferas, em PBS, são comparados na Figura 7.16 B. Neste gráfico, inclui-se também o perfil de liberação do hidrogel onde foram incorporados os lipossomas, mas que corresponde a uma concentração de GE de 0,10% (já que não foi testado o hidrogel correspondente à concentração de 0,05%). Contudo, e porque já se concluiu que a influência da concentração de GE na liberação de CDDP é reduzida, na falta do outro perfil, julgou-se adequado incluir o C/GP/GE10/LIP.

Relativamente às curvas correspondentes aos hidrogéis reticulados apenas com GP, constata-se que os perfis dos hidrogéis co-reticulados são agora claramente distintos uns dos outros, embora dum modo geral todos atinjam um patamar por volta das seis horas de liberação. Tal como na Figura 7.16 A verifica-se uma liberação quase completa do fármaco quando aprisionado nos lipossomas (curva C/GP/GE10/LIP). Pelo contrário, a semelhança encontrada para os perfis correspondentes aos hidrogéis fisicamente reticulados, designados por C/GP/MAT e C/GP/MIC (cujo valor total de CDDP libertada é para ambos 20%), já não se verifica nos hidrogéis co-reticulados, tendendo agora o perfil de C/CP/GE5/MAT para 60% de liberação, enquanto a matriz C/GP/GE5/MIC se limita aos 30%.

Estes resultados mostram que a liberação em PBS é muito rápida, estando terminada ao fim de seis horas, independentemente do modo de incorporação do fármaco. Contudo, a estratégia de incorporação vai influenciar a percentagem total libertada, que é máxima no caso da cisplatina estar encapsulada nos lipossomas e mínima se estiver encapsulada nas microesferas. Por fim, é de salientar que estes perfis em PBS terão pouca relevância em situações de aplicação prática, já que as condições em que ocorrem os testes (nomeadamente a composição do meio de liberação) estão longe das condições que ocorreriam se estas matrizes fossem implantadas *in vivo*.

Estudos de libertação em PBS com lisozima

Quando a libertação ocorre em PBS contendo lisozima, o perfil é mais lento, como já se discutiu na Secção 7.2.1 e 7.2.3, porquanto a presença da enzima promove a degradação da matriz, facilitando a libertação da CDDP que de outra forma ficaria aprisionada.

O efeito do modo de incorporação da CDDP nos hidrogéis reticulados fisicamente, em PBS com lisozima, apenas foi avaliado para o hidrogel C/GP/MAT, cujo perfil de libertação já foi apresentado na Figura 7.3, tendo-se verificado ser mais prolongado no tempo (relativamente ao obtido em PBS) devido à presença da enzima que, promovendo a degradação da matriz, facilita a libertação da CDDP a qual vai ocorrendo durante 20 dias, tempo para o qual se verifica uma libertação quase completa do fármaco. Todavia, não foram efetuados estudos de libertação em PBS e lisozima para os restantes hidrogéis reticulados apenas com GP, ou seja, nem para as matrizes cuja CDDP se encontra pré-encapsulada em lipossomas (porquanto a libertação em PBS já se mostrou rápida e completa nas primeiras horas, Figura 7.16 A), nem para o caso em que ela se encontra imobilizada em microesferas.

Relativamente aos perfis de libertação dos géis co-reticulados, na Figura 7.17 agrupam-se as curvas referentes às matrizes co-reticuladas com 0,05% de GE, com a incorporação de CDDP na matriz e em microesferas. Inclui-se também, para efeitos de comparação, o hidrogel onde foram incorporados os lipossomas, mas que corresponde a uma concentração de GE de 0,10% (já que não foi testado o hidrogel correspondente à concentração de 0,05%). Além disso, este último hidrogel só foi testado apenas em PBS. Mesmo assim, optou-se por incluí-lo nesta comparação porque: i) já se concluiu que a influência da concentração de GE no perfil de libertação é reduzida e ii) verificou-se que em PBS a CDDP foi libertada na totalidade nas primeiras horas, pelo que a presença da enzima não seria relevante. De notar que, neste gráfico, a escala temporal se encontra em “dia” (e não em “hora” como na Figura 7.16) em virtude dos perfis em PBS com lisozima serem mais lentos.

Assim, comparando os diferentes modos de incorporação da CDDP na estrutura: dispersa na matriz (MAT), encapsulada nos lipossomas (LIP) ou imobilizada nas microesferas (MIC), pode concluir-se que a libertação mais rápida corresponde ao encapsulamento da CDDP nos lipossomas, originando uma libertação quase completa (90%) em menos de 24 horas, seguindo-se o perfil de libertação da CDDP a partir da matriz e, por fim, a curva de libertação correspondente à imobilização da CDDP nas microesferas dispersas na matriz. O facto de a libertação de CDDP ocorrer mais lentamente neste último caso, poderá estar relacionado com a maior resistência à libertação oferecida pela presença das microesferas na matriz. Contudo, nestes dois últimos casos, as curvas tendem respetivamente para os 90% e para os 80% de libertação total a partir dos 20 dias. De notar que, enquanto a curva correspondente ao hidrogel com o fármaco disperso (C/GP/GE5/MAT) parece ter atingido o estado estacionário durante o período do teste (28 dias), o mesmo não acontece com o hidrogel carregado com as microesferas (C/GP/GE5/MIC). Ou seja, provavelmente ambos tenderiam para a mesma percentagem de CDDP libertada se o intervalo de tempo fosse ampliado.

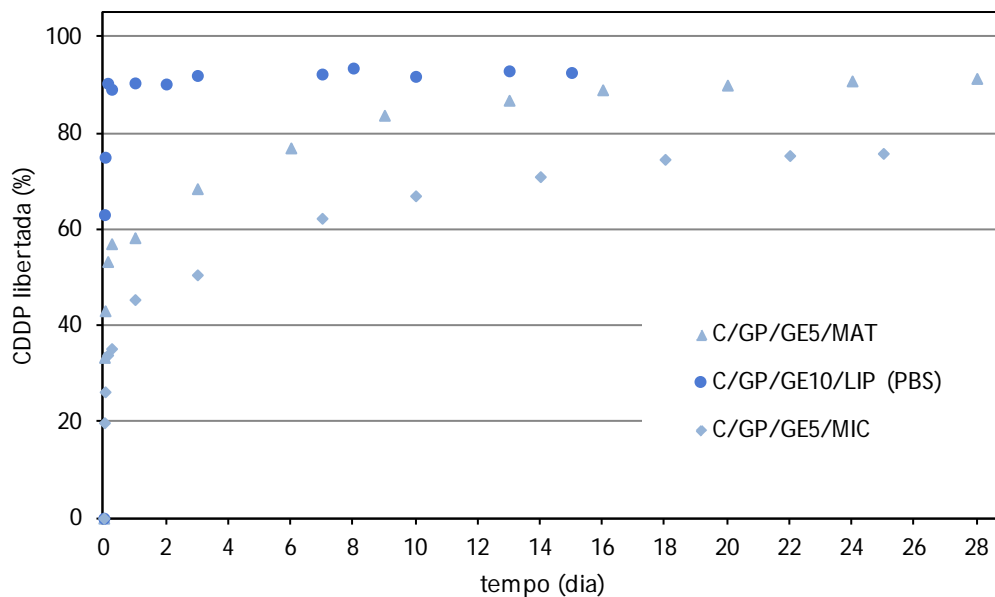


Figura 7.17 - Efeito do modo de incorporação da CDDP nos perfis obtidos, em PBS com lisozima a 37 °C, para os hidrogéis co-reticulados com 0,05% de genipin, em que o fármaco se encontra disperso na matriz e imobilizado em microesferas (C/GP/GE5/MAT e C/GP/GE5/MIC, respectivamente). Inclusão do perfil obtido em PBS para o hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin, cuja CDDP se encontra pré-encapsulada em lipossomas (C/GP/GE10/LIP).

Conclui-se, portanto, que os lipossomas num meio de PBS e lisozima não originam um perfil de liberação de CDDP sustentado, ao contrário da incorporação desta na matriz e nas microesferas (ambas de quitosano). Mais se conclui que, correspondendo os diferentes modos de incorporação da CDDP a perfis distintos, eles podem ser combinados de modo a atingir um perfil específico.

7.3 CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste capítulo ficou demonstrado que a liberação de CDDP a partir de hidrogéis de quitosano, quer reticulados fisicamente com GP, quer co-reticulados com GP e GE, é fortemente influenciada, não só pelo método de incorporação do fármaco nas matrizes, como também pela composição do meio de liberação: PBS ou PBS com lisozima.

A primeira estratégia de incorporação testada consistiu na dispersão do fármaco, na forma livre, na matriz aquando da sua preparação. Embora a grande vantagem deste método de incorporação resida na simples mistura do fármaco na solução polimérica de baixa viscosidade, precursora dos hidrogéis, os resultados mostraram que a CDDP se libertou rapidamente de todos os hidrogéis (sendo atingido o máximo após três horas de ensaio) e que a liberação foi incompleta (apenas cerca de 20% de CDDP foi libertada pelo hidrogel reticulado fisicamente e 60% pelos hidrogéis

co-reticulados), quando usado um meio de libertação constituído apenas por PBS. A libertação incompleta de CDDP está, muito provavelmente, relacionada com o método de incorporação do fármaco nas matrizes, uma vez que ao adicionar o fármaco à matriz polimérica durante a sua preparação pode ocorrer a ligação permanente deste ao polímero.

Os resultados mostraram, ainda, que a concentração de reticulante químico e a concentração inicial de fármaco na matriz não afetam significativamente os perfis de libertação de CDDP em PBS.

Quando a libertação ocorre num meio em que as condições são mais próximas das condições *in vivo*, ou seja, em presença de lisozima, a libertação nas primeiras 24 horas é rápida, para as matrizes co-reticuladas. De facto, verifica-se que 60% de CDDP é libertada nesse período. No entanto, a partir daí a libertação é contínua e prolongada ao longo de um período de cerca de um mês. Para a matriz reticulada fisicamente, o perfil de libertação é, após o primeiro dia, aproximadamente linear, com um declive de 4% de CDDP libertada/dia, desintegrando-se a matriz após 20 dias de imersão. Estes resultados estão seguramente relacionados com a degradação da matriz pela lisozima, o que, aliado ao baixo peso molecular da molécula de CDDP e à sua hidrofiliçidade, resulta numa libertação sustentada.

A utilização de lipossomas, designadamente de uma formulação lipossomal comercial (Lipoplatin™) constituiu uma outra abordagem para incorporar a CDDP nas matrizes de quitosano. Neste caso, a libertação do fármaco, em PBS, foi quase completa para todos os hidrogéis, no entanto, essa libertação ocorreu nas primeiras 24 horas. Conclui-se, assim, que os lipossomas poderão funcionar como uma barreira protetora para a CDDP, evitando a interação desta com o polímero, sendo esta estratégia de incorporação vantajosa quando se pretende um transporte rápido do fármaco.

No que respeita à CDDP encapsulada em microesferas de quitosano, constata-se que, em PBS, a libertação é rápida (até seis horas) mas grande parte do fármaco (mais de 70%) fica aprisionado nas partículas, provavelmente ligado ao quitosano que constitui as microesferas (tal como acontecia aquando da incorporação livre de CDDP na matriz (MAT)). Só na presença de lisozima, devido à degradação da matriz, a cisplatina se vai libertando, originando um perfil prolongado no tempo (até cerca de um mês).

A conclusão, quiçá mais relevante, destes estudos de libertação, é o facto de se poderem obter perfis distintos pela conjugação do tipo de reticulação (física e físico-química) e da estratégia de incorporação do fármaco (disperso na matriz ou encapsulado em lipossomas ou microesferas). Em suma, consegue-se ajustar as condições de síntese do sistema de transporte de modo a obter o perfil de libertação pretendido (perfil "por medida").

7.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbuga, J.; Bergisadi, N. Effect of formulation variables on cisplatin loaded chitosan microsphere properties. *Journal of Microencapsulation* 1999, 16, 697-703.

- Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release* 2002, 79, 123-35.
- Bansal, V.; Sharma, P. K.; Sharma, N.; Pal, O. P.; Malviya, R. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research* 2011, 5, 28-37.
- Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010, 62, 83-99.
- Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. Analytical methodologies for the determination of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 47, 451-9.
- Boulikas, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncology Reports* 2004, 12, 3-12.
- Brouwer, J.; van Leeuwen-Herberts, T.; Otting-van de Ruit, M. Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta* 1984, 142, 21-30.
- Chen, J-P.; Leu, Y-L; Fang, C-L; Chen, C-H; Fang, J-Y. Thermosensitive hydrogels composed of hyaluronic acid and gelatin as carriers for the intravesical administration of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 100, 655-66.
- Fang, J-Y; Chen, J-P; Leu, Y-L; Hu, J-W. The delivery of platinum drugs from thermosensitive hydrogels containing different ratios of chitosan. *Drug Delivery* 2008, 15, 235-43.
- Fiske, C. H.; Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 1925, 66, 375-400.
- Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by *N*-acetylation. *Biomaterials* 2005, 26, 5872-8.
- Golla, E. D.; Ayres, G. H. Spectrophotometric determination of platinum with o-phenylenediamine. *Talanta* 1973, 20, 199-210.
- Hernigou, P. Cement with antimetotics. Cap. 10, In *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*. 2004, Ed. by Poinot D. G., Springer-Verlag, London.
- Hsu, S-H; Leu, Y-L; Hu, J-W; Fang, J-Y. Physicochemical characterization and drug release of thermosensitive hydrogels composed of a hyaluronic acid/Pluronic F127 graft. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2009, 57, 453-8.
- Imsombut, T.; Srisuwan Y.; Srihanam P.; Baimark, Y. Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology* 2010, 203, 603-8.
- Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000, 21, 2475-2490.
- Kawadkar, J.; Chauhan, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 81, 563-72.
- Kim, K. K.; Pack, D. W. Microspheres for Drug Delivery, In *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, vol. I: Biological and Biomedical Nanotechnology, Eds. Ferrari, M.; Lee, A. P.; Lee, J.; Springer; 2006, 19-50.

- Konishi, M.; Tabata, Y.; Kariya, M.; Hosseinkhani, H.; Suzuki, A.; Fukuhara, K.; Mandai, M.; Takakura, K.; Fujii, S. *In vivo* anti-tumor effect of dual release of cisplatin and adriamycin from biodegradable gelatin hydrogel. *Journal of Controlled Release* 2005, 103, 7-19.
- Masuda, T.; Ueno, Y.; Kitabatake, N. Sweetness and enzymatic activity of lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 4937-41.
- Mi, F-L; Tan, Y-C; Liang, H-F; Sung, H-W. *In vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 2002, 23, 181-91.
- Moura, M. J.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linked chitosan hydrogels. *European Polymer Journal* 2013, 49, 2504-10.
- Naderi-Meshkin, H.; Andreas, K.; Matin, M. M.; Sittinger, M.; Bidkhor, H. R.; Ahmadiankia, N.; Bahrami, A. R.; Ringe, J. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising *in situ* forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biology International* 2014, 38, 72-84.
- Ruel-Gariépy, E.; Chenite, A.; Chaput, C.; Guirguis, S.; Leroux, J. C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 203, 89-98.
- Ta, H. T.; Dass, C. R.; Dunstan, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 2008, 126, 205-16.
- Wang, Y. M.; Sato, H.; Adachi, I.; Horikoshi, I. Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996, 85, 1204-10.

CAPÍTULO 8

ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

SUMÁRIO

Com o intuito de verificar a formação e permanência do hidrogel no local de injeção, bem como avaliar a intensidade da resposta inflamatória dos tecidos aos implantes, procedeu-se à realização de um trabalho de investigação experimental em modelo animal.

A avaliação macroscópica dos animais estudados, em particular da área implantada, mostrou que as formulações poliméricas líquidas, injetadas subcutaneamente em ratos da linhagem Wistar, produziram os respetivos hidrogéis nos locais de injeção. A análise histológica revelou, após uma semana de evolução, uma intensa reação inflamatória e um processo de biodegradação das matrizes em curso. No final do período experimental de 30 dias, a intensidade de células inflamatórias presentes e o volume do material sofreram uma redução em relação ao que se observou ao fim de uma semana.

8.1	INTRODUÇÃO.....	207
8.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	208
	8.2.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	208
	8.2.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	212
8.3	CONCLUSÕES	220
8.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	221

8.1 INTRODUÇÃO

Os testes de avaliação de citotoxicidade, por si só, não permitem entender toda a complexidade da interação do material com o tecido vivo, uma vez que utilizam uma única linha celular de cada vez. Adicionalmente, não consideram a homeostasia do organismo, pois são realizados em sistema fechado. Neste quadro, torna-se necessário complementar os testes de citotoxicidade com estudos *in vivo*, em modelo animal.

Como modelo animal foi utilizado um pequeno animal de laboratório, o rato. Este modelo apresenta várias vantagens em relação aos animais de médio e grande porte, entre elas é fácil de criar, apresenta uma maturação rápida, constitui uma população geneticamente semelhante e homogénea e permite, ainda, a realização de estudos estatisticamente significativos e a baixo custo (Weiss, 2002).

O objetivo do estudo experimental *in vivo* aqui realizado consistiu em verificar a formação e a permanência do hidrogel no local de injeção bem como monitorizar a resposta inflamatória dos tecidos adjacentes aos implantes no local de implantação, através de análise histológica, em ratos da linhagem Wistar, após 7 e 30 dias de implantação do material.

Inicialmente os animais foram pesados, identificados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, de acordo com o material implantado, com dois animais em cada grupo. No Grupo I cada animal recebeu três injeções subcutâneas, na região dorsal, de 200 μ L cada, da formulação polimérica de quitosano neutralizada com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e no Grupo II as mesmas três injeções subcutâneas mas da formulação de quitosano neutralizada com GP e reticulada com 10% w/w de genipin (C/GP/GE10). As formulações implantadas foram previamente preparadas, em condições estéreis (*vide* Secção 3.7.2). Um animal de cada grupo foi sacrificado após 7 dias e o outro após 30 dias de implantação do material.

Durante o período do ensaio, os animais permaneceram em ambiente controlado quanto a humidade, temperatura e ciclos de luz, em gaiolas individuais sendo alimentados *ad libitum* com ração comercial e água.

Todo o trabalho de experimentação animal foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os animais foram estudados de acordo com as regras de utilização em vigor na Universidade de Coimbra e de acordo com as normas da Comunidade Europeia, cumprindo-se as condições exigidas pela legislação referente a bem-estar animal. Os procedimentos cirúrgicos foram efetuados com os animais devidamente anestesiados e o seu sacrifício por intoxicação farmacológica.

Os resultados relativos ao estudo experimental *in vivo*, em modelo animal, são apresentados e discutidos na Secção 8.2 deste capítulo. Esta secção encontra-se, por sua vez, dividida em duas

subsecções: a Secção 8.2.1 que resume todas as observações relativas à análise macroscópica dos animais, designadamente do local dos implantes, e que inclui fotografias *in situ*; e a Secção 8.2.2 que apresenta os resultados da análise histológica da interface do implante com o tecido nativo no final de cada um dos períodos experimentais.

Por fim, na Secção 8.3 são descritas as principais conclusões obtidas ao longo deste capítulo.

8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.2.1 Avaliação macroscópica

Durante o período de ensaio os animais foram avaliados diariamente, quanto ao seu estado geral e ao aspeto do local de injeção, não se constatando alterações dignas de nota, sugerindo a não existência de qualquer rejeição aos implantes de quitosano.

Todos os animais suportaram bem as três injeções subcutâneas a que foram sujeitos, ganharam peso corporal e não houve, aparentemente, complicações durante o período do ensaio experimental. Além disso, não ocorreu nenhum caso de óbito, o que, de alguma forma, é um bom indicativo a nível toxicológico.

Na altura do sacrifício dos animais, a avaliação macroscópica da região do implante mostrou ausência de sinais de infeção, nos locais de injeção, em todos os casos.

A Figura 8.1 (A e B) mostra fotografias dos animais, evidenciando a região de implantação do material, no final de cada período: 7 e 30 dias.

Como mostra a Figura 8.1 A, a região dorsal apresentou-se coberta de pelo logo no final do período experimental de sete dias. Todavia, os animais cujo período de ensaio decorreu durante 30 dias tiveram de ser submetidos, novamente, a tricotomia manual da região dorsal (Figura 8.1 B), para melhor visualização da área implantada, uma vez que o crescimento de pelo deixou os locais de injeção praticamente impercetíveis. Só assim, foi possível visualizar um tecido íntegro, sem sinais de necrose e/ou edema.

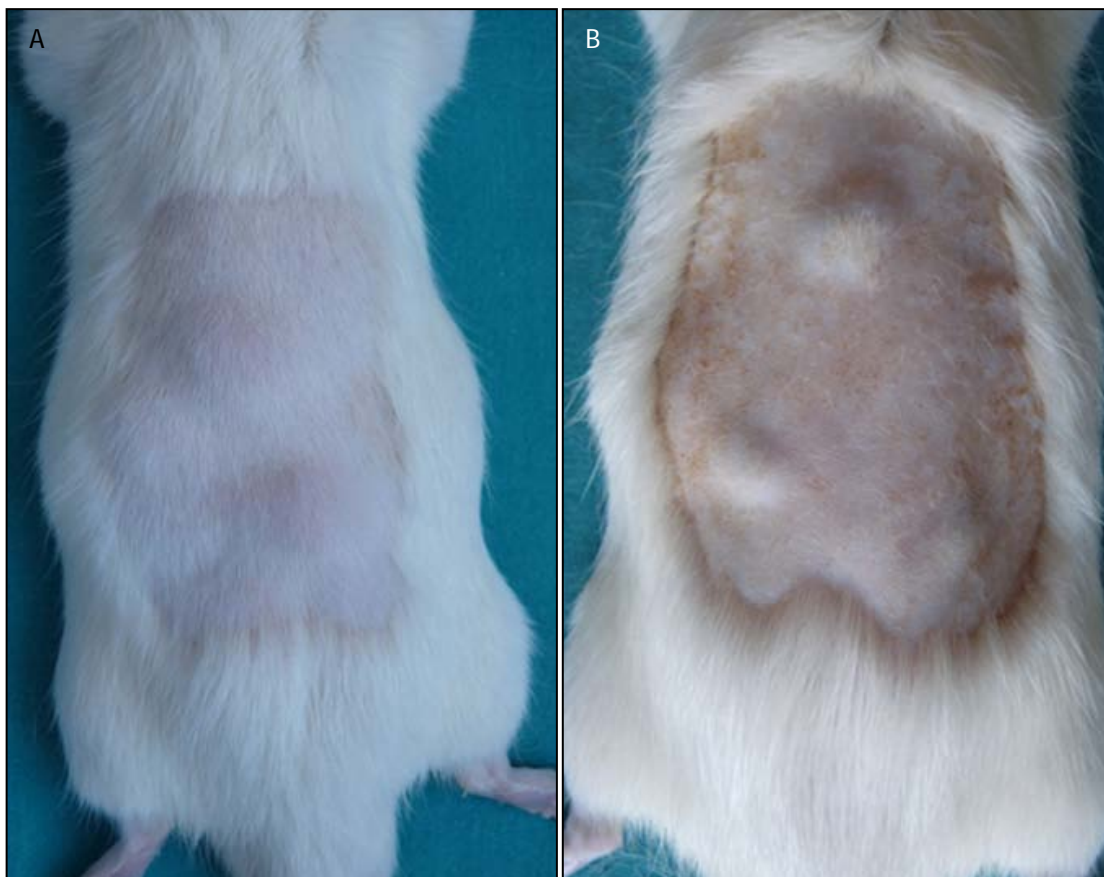


Figura 8.1 - Aspeto macroscópico da região dorsal do animal após o período experimental de: (A) 7 dias e (B) 30 dias. O animal da fotografia (B) foi submetido a tricotomia manual da região dorsal para melhor visualização dos implantes.

Após a eutanásia, cada animal foi sujeito a excisão da porção de tecido que contem os hidrogéis implantados.

A observação do tecido excisado mostra que ambas as formulações líquidas injetadas (formulação de quitosano neutralizada com o sal fosfato dissódico de glicerol, designada C/GP, e formulação de quitosano neutralizada com GP e reticulada com 10% (w/w) de genipin, designada C/GP/GE10) produziram os respectivos hidrogéis no local de injeção (Figura 8.2). A Figura 8.2 A e 8.2 B mostra, respectivamente, a formação do hidrogel reticulado fisicamente (C/GP) e do hidrogel co-reticulado com genipin (C/GP/GE10), no local de injeção após sete dias de implantação.

A Figura 8.3 mostra as porções de tecido excisado onde é possível verificar visualmente a permanência do hidrogel reticulado fisicamente (Figura 8.3 A) e do hidrogel co-reticulado (Figura 8.3 B) após 30 dias de evolução.



Figura 8.2 - Fotografias dos animais exibindo a formação de: (A) hidrogel reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10) no local de injeção, após sete dias de evolução.



Figura 8.3 - Porções de tecido excisado mostrando a formação e permanência do hidrogel: (A) reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10) no local de injeção, após 30 dias de evolução.

A partir das porções de tecido excisado (Figura 8.3 A e B) obtiveram-se as peças de necrópsia, correspondentes ao material implantado com margem de tecido, que foram conservadas em solução de formalina por 24 horas. Para a realização do estudo histológico cada uma destas peças foi seccionada longitudinalmente, obtendo-se assim duas peças.

A Figura 8.4 (A e B) mostra as peças de necrópsia, após fixação em solução de formalina, exibindo a localização dos hidrogéis nos respectivos locais de injeção. O método de fixação utilizado permite preservar e endurecer os tecidos recolhidos com o mínimo de distorção das estruturas físicas, das características químicas e das propriedades de coloração.

De seguida procedeu-se à inclusão dos materiais em blocos de parafina e aos respetivos cortes histológicos, que foram corados com hematoxilina e eosina, examinados por microscopia ótica de luz com um sistema de análise de imagem acoplada (Nikon Eclipse E200®) e fotografados.

A análise descritiva das lâminas foi realizada por um investigador independente. A avaliação incidiu não só a nível do leito de implantação mas também a nível dos tecidos adjacentes.

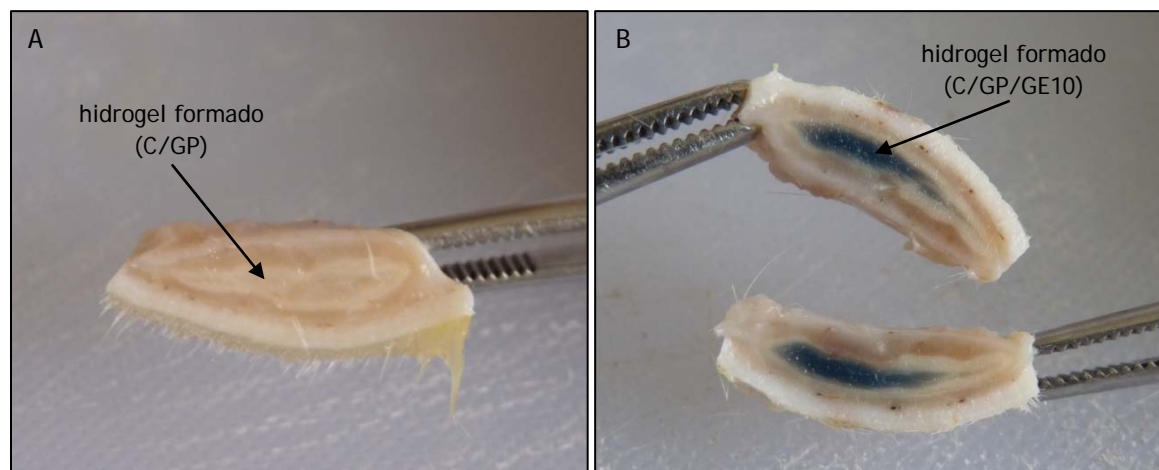


Figura 8.4 - Peças de necrópsia exibindo a localização do hidrogel no local de injeção: (A) hidrogel reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (C/GP) e (B) hidrogel co-reticulado com 0,10% de genipin (C/GP/GE10), após fixação em solução de formalina.

Os resultados da avaliação histológica são apresentados na secção seguinte.

8.2.2 Avaliação histológica

A análise das lâminas histológicas em microscopia de luz, obtidas ao fim de sete dias de evolução, mostra, quando são utilizadas pequenas ampliações (Figura 8.5 A e B), imagens sobreponíveis às imagens observadas macroscopicamente (Figura 8.4 A e B). Nestas lâminas histológicas foi possível identificar uma extensa área central eosinófila (de coloração rosada) correspondente, quer ao hidrogel de quitosano reticulado fisicamente com GP (Figura 8.5 A), quer ao hidrogel co-reticulado com genipin (Figura 8.5 B). É, ainda, possível identificar nestas imagens os diferentes constituintes da pele, nomeadamente o epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e a derme com os seus inúmeros folículos pilosos.

Como mostra a Figura 8.6 (A e B), a região eosinófila apresenta-se rodeada por uma zona caracterizada por uma intensa reação inflamatória. De facto, no tecido conjuntivo em redor do material injetado deteta-se uma grande densidade de células de natureza inflamatória.

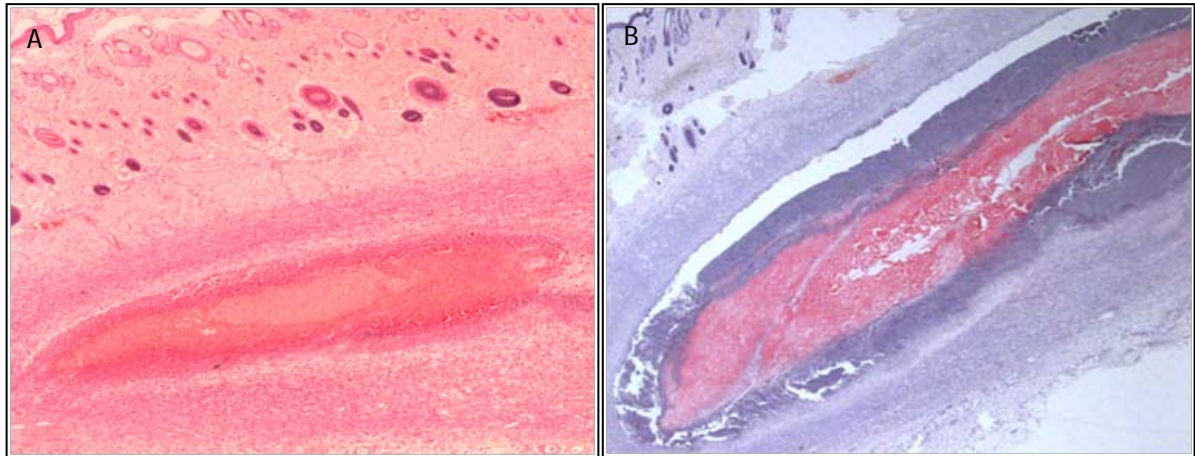


Figura 8.5 - Microfotografias mostrando um hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, implantado no tecido celular subcutâneo de um rato com uma semana de evolução. Para além da epiderme e da derme caracterizada por inúmeros folículos pilosos é visível a presença de uma massa eosinofílica, correspondente ao hidrogel, rodeada por uma região de tecido inflamatório. (ampliação 20x)

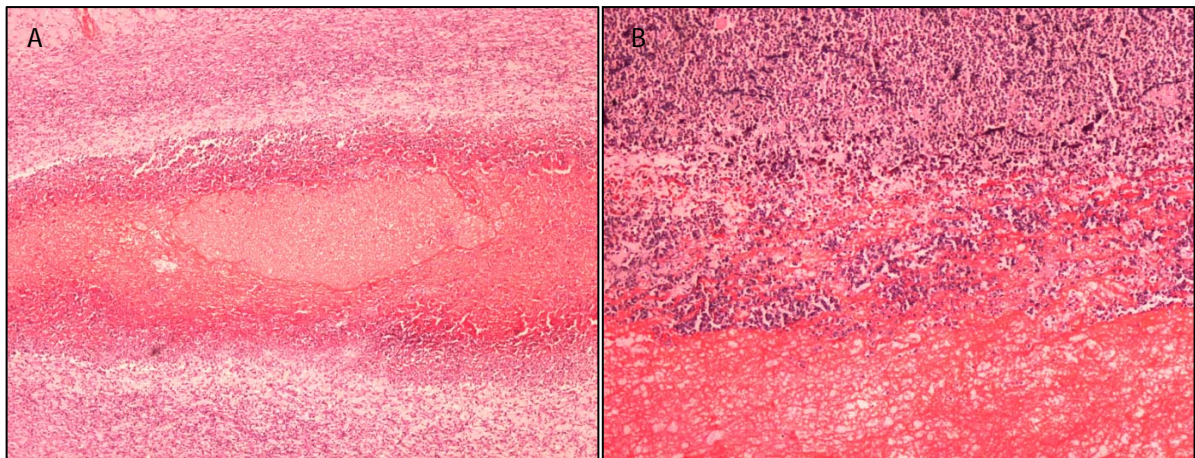


Figura 8.6 - Maior ampliação de uma região apresentada na Figura 8.5 pondo em evidência uma grande densidade de células inflamatórias em redor do hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin. (ampliação 40x e 100x, respetivamente)

Numa observação mais pormenorizada (Figura 8.7) podemos apreciar a presença de um material poroso, fortemente eosinófilo e bastante heterogéneo, formando uma massa central correspondente à matriz de quitosano reticulado fisicamente com GP (Figura 8.7 A) e à matriz de quitosano co-reticulada com GE (Figura 8.7 B). Neste último caso (Figura 8.7 B), verifica-se a existência de uma estrutura com poros de maior dimensão, quando comparados com a matriz de quitosano

reticulada fisicamente, tal como anteriormente observado por SEM (Secção 4.2.1). Foi, também, possível identificar, nesta matriz, a presença de vários vasos sanguíneos, alguns com dimensões bastante consideráveis (Figura 8.8). São, ainda, visíveis no interior deste material várias células com perfil inflamatório.

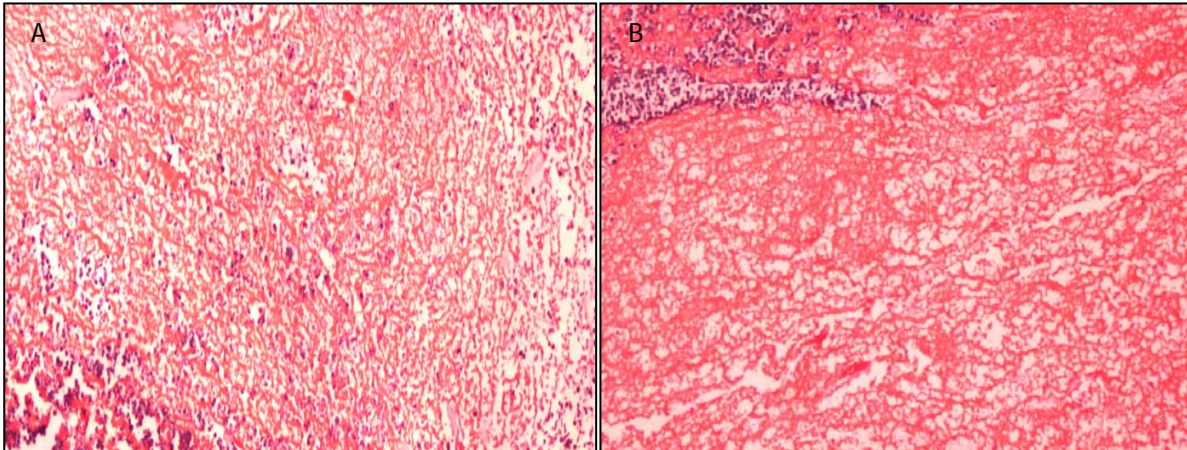


Figura 8.7 - Aspeto histológico de uma região da matriz de quitosano: (A) reticulada fisicamente e (B) co-reticulada com genipin, formando um material poroso, heterogéneo e fortemente eosinófilo. De notar que a matriz co-reticulada apresenta uma estrutura eosinófila com poros de maior dimensão do que os apresentados pela matriz reticulada fisicamente. (ampliação 100x)

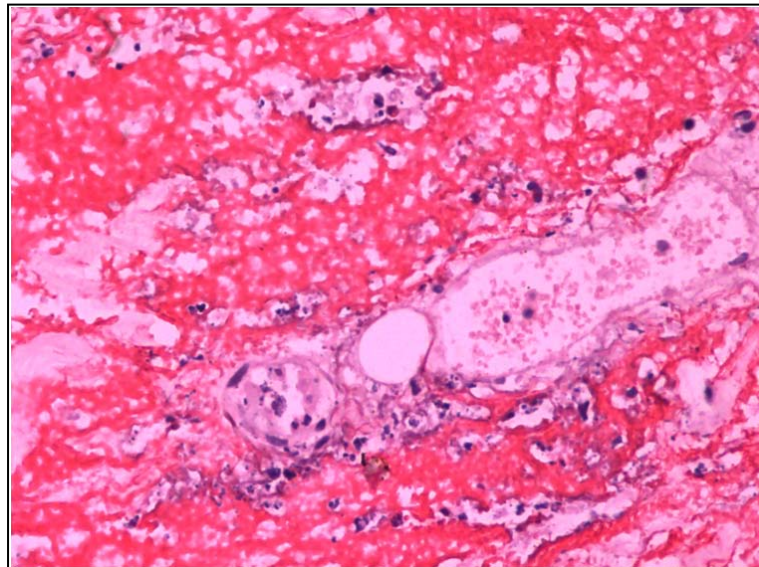


Figura 8.8 - Presença de vasos sanguíneos invadindo a matriz de quitosano co-reticulada com genipin, após uma semana de evolução. É também possível identificar a existência de várias células inflamatórias dispersas neste hidrogel. (ampliação 400x)

Na porção mais periférica dos hidrogéis é de assinalar a formação de várias estruturas arredondadas, conforme ilustrado nas Figuras 8.9 e 8.10, que parecem derivar do material, mostrando, no entanto, uma diferente afinidade tintorial no sentido de uma maior basofilia, sendo mesmo possível registrar uma zona de transição entre a estrutura habitual e eosinófila característica da matriz e estas formações granulares.

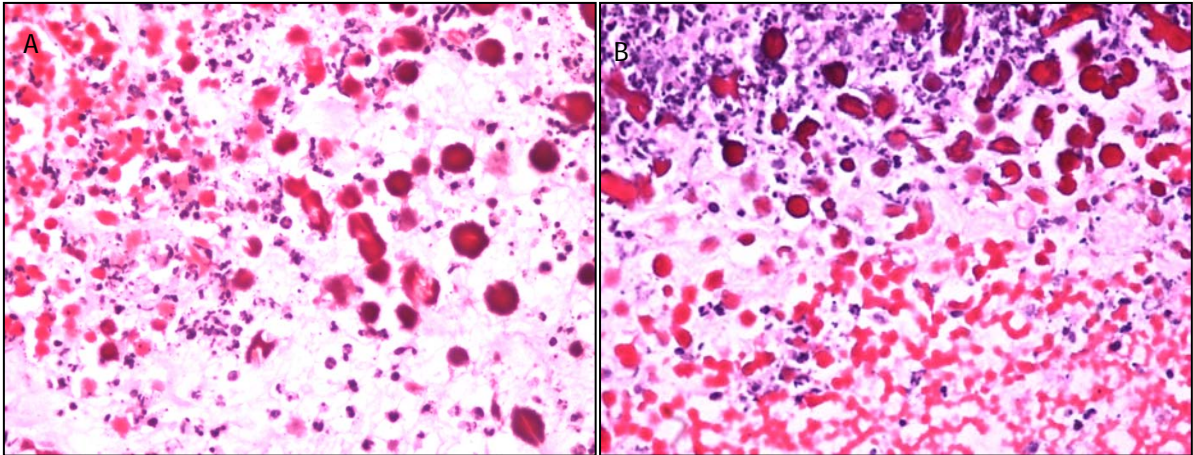


Figura 8.9 - Imagem histológica de numerosas formações granulares situadas na periferia de um hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, com uma semana de evolução. É visível uma mudança na afinidade tintorial destas formações em relação ao restante hidrogel. (ampliação 400x)

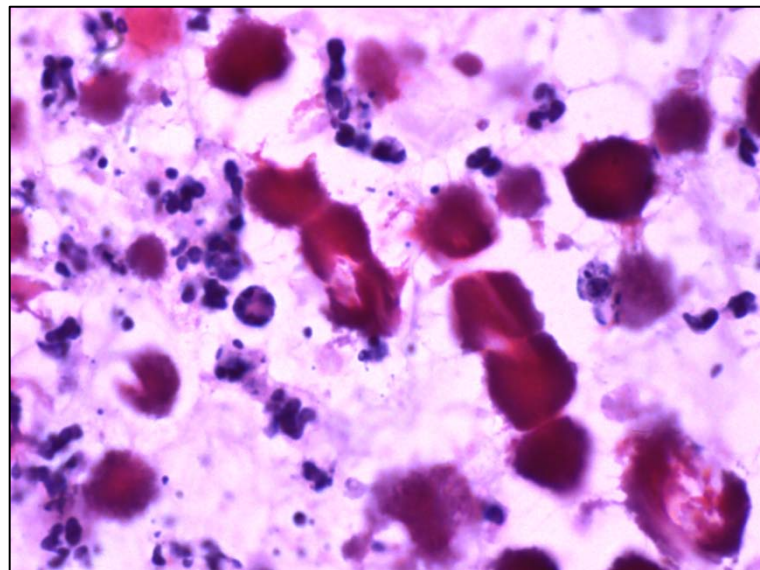


Figura 8.10 - Maior ampliação de uma região representada na Figura 8.9 mostrando, com mais pormenor, as formações granulares provenientes da degradação do hidrogel. (ampliação 1000x)

Este fenômeno poderá resultar de alterações na constituição do material durante o seu processo de degradação. De facto e de acordo com a literatura (Azab *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 1989; Mori *et al.*, 1997; Peluso *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1988), o hidrogel de quitosano não degradado apresenta-se como um material acidófilo, corando de rosa pela eosina. Por sua vez, durante o processo de degradação verifica-se uma mudança na sua afinidade tintorial apresentando uma maior basofilia e uma estrutura granular.

A presença destes hidrogéis provoca o desenvolvimento de uma acentuada resposta inflamatória, particularmente evidente nos tecidos localizados em seu redor. Esta forte reação inflamatória apresenta uma nítida predominância de polimorfonucleares neutrófilos (Figuras 8.11 e 8.12), para além de eosinófilos, basófilos e macrófagos. Podem também ser identificadas células com perfil fibroblástico, bem como um grande número de vasos sanguíneos. De notar, porém, a ausência de células gigantes de corpos estranhos, bem como a presença de fibras de colagénio formando uma cápsula.

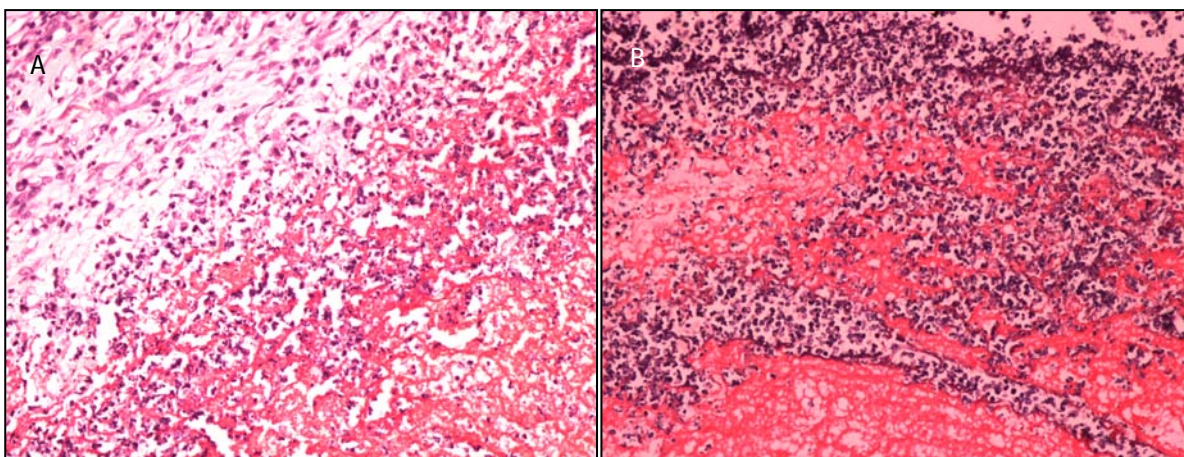


Figura 8.11 - Presença de uma acentuada resposta inflamatória particularmente evidente em redor da matriz de quitosano: (A) reticulada fisicamente e (B) co-reticulada com genipin, com uma semana de evolução. (ampliação 200x)

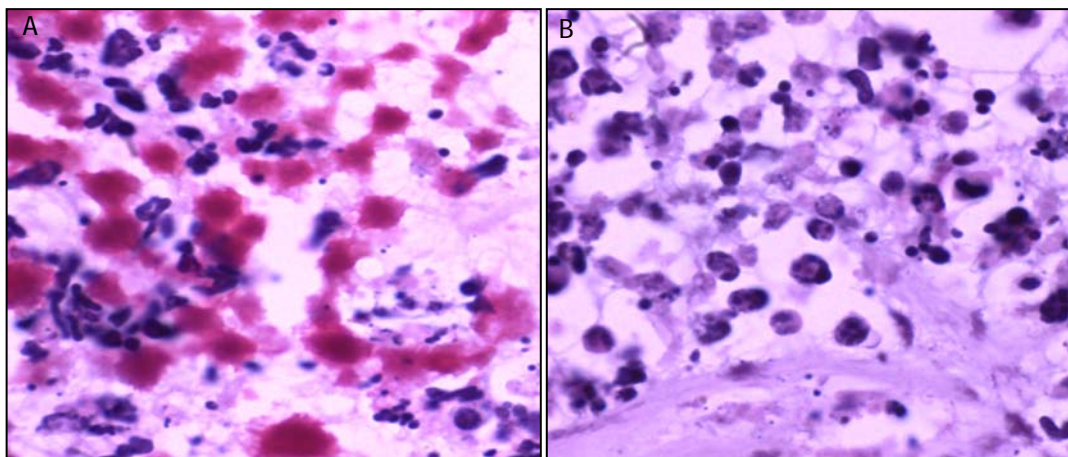


Figura 8.12 - Imagens mostrando um predomínio de polimorfonucleares neutrófilos existente no infiltrado inflamatório presente no hidrogel de quitosano: (A) reticulado fisicamente e (B) co-reticulado com genipin, após um período de sete dias de evolução. (ampliação 1000x)

O aparecimento deste infiltrado inflamatório parece estar estreitamente relacionado com o processo de degradação dos géis de quitosano. Com efeito, e tal como referido na literatura (Azab *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 1997), a presença de quitosano e seus derivados desencadeia, por parte dos fibroblastos, uma forte e persistente libertação de interleucina 8, fator responsável por uma intensa quimiotaxia e ativação dos neutrófilos. De facto, está demonstrado que as enzimas presentes nos neutrófilos, como é o caso da lisozima, está claramente envolvida no processo de degradação do quitosano (Chiu *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 1989). O ambiente oxidativo gerado pelos neutrófilos contribui, ainda, para um efeito estimulante no aparecimento de células macrófágicas que vão, depois, encarregar-se da fagocitose dos produtos de degradação. Assim, facilmente se poderá compreender o aparecimento, numa fase precoce (uma semana) de um grande número de células inflamatórias, com particular relevância para os neutrófilos, formando um infiltrado celular que terá como objetivo o processo de degradação das matrizes de quitosano (Fugita *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003).

Aos 30 dias de evolução verifica-se uma aparente diminuição do volume ocupado pelo material em relação ao que se observou ao fim de uma semana. De registar, ainda, a existência de muitas áreas ocupadas por material disperso no tecido conjuntivo da derme que envolve a massa central dos hidrogéis (Figuras 8.13 e 8.14).

Relativamente ao infiltrado inflamatório foi, também, possível detetar uma diminuição da intensidade de células inflamatórias presentes e um nítido predomínio de macrófagos, bem como de alguns linfócitos e plasmócitos. Com efeito, há que salientar, com particular relevância, a presença de numerosas células, identificadas como macrófagos, contendo muitas partículas de material

fagocitado (Figuras 8.15 e 8.16). Estas células situam-se predominantemente no tecido conjuntivo, em redor do material, podendo também ser detetadas no interior dos vasos sanguíneos.

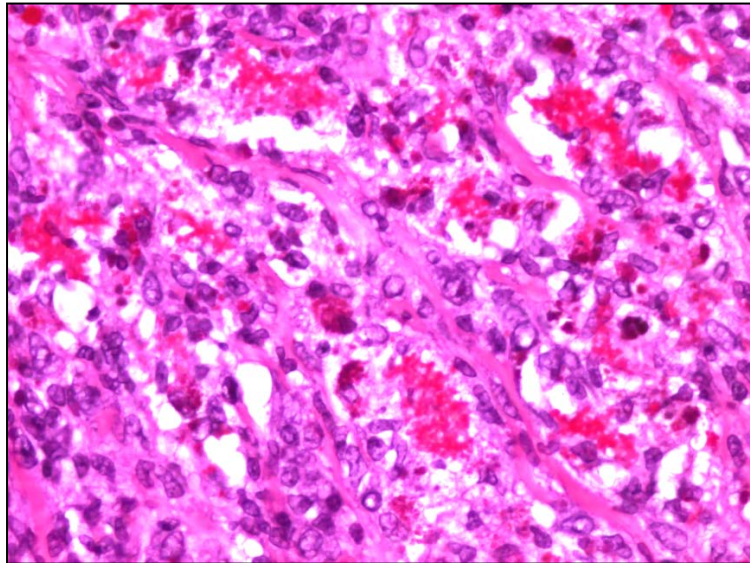


Figura 8.13 - Presença de áreas de hidrogel de quitosano reticulado fisicamente, disperso no tecido conjuntivo da derme após um período de 30 dias de evolução. São, também, visíveis algumas fibras de colagénio, células de natureza fibroblástica e células inflamatórias e alguns vasos sanguíneos. (ampliação 400x)

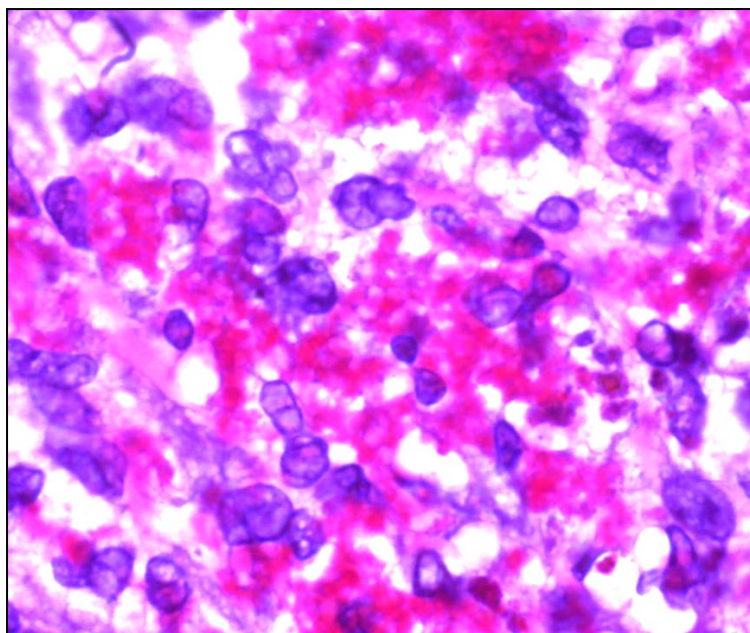


Figura 8.14 - Presença de áreas de hidrogel de quitosano co-reticulado com genipin, disperso no tecido conjuntivo da derme após um período de 30 dias de evolução. (ampliação 1000x)

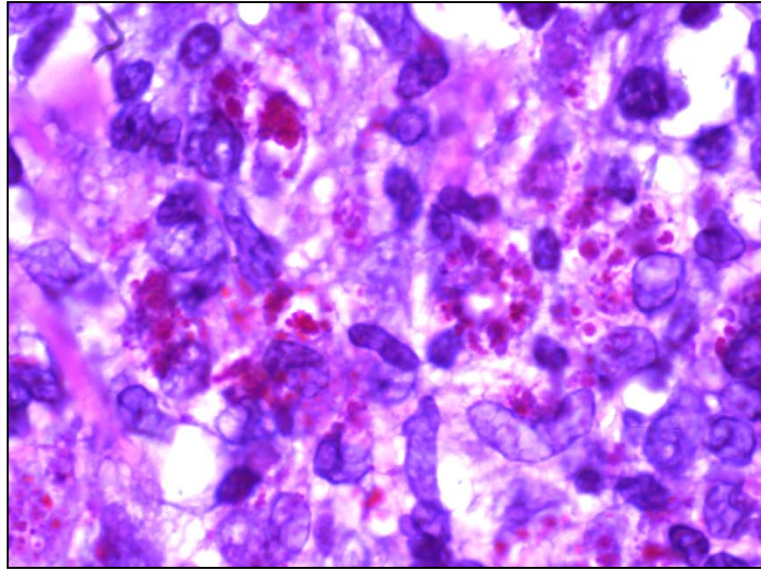


Figura 8.15 - Presença de numerosas células macrofágicas contendo partículas de hidrogel reticulado fisicamente. (ampliação 1000x)

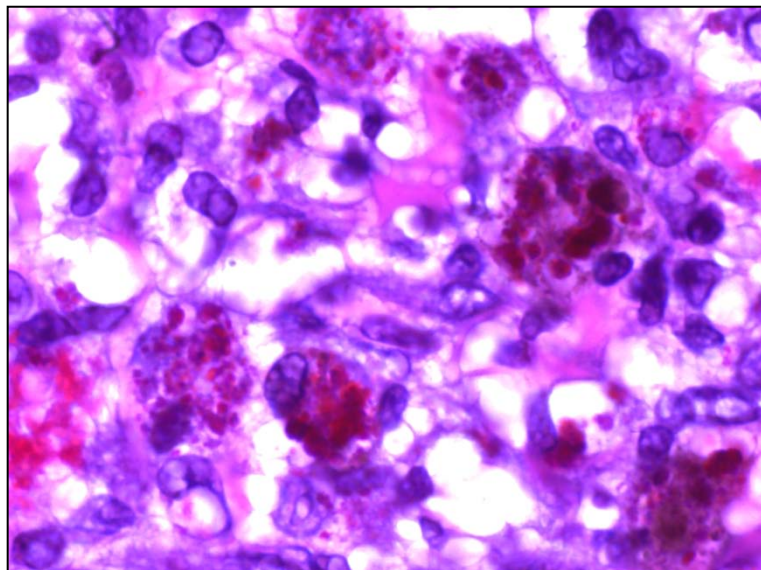


Figura 8.16 - Presença de numerosas células macrofágicas contendo partículas de hidrogel co-reticulado com genipin. (ampliação 1000x)

A presença de áreas de material disperso e de material fagocitado no interior de células macrofágicas, em conjunto com uma grande variedade de células de natureza inflamatória, fibroblastos, fibras de colagénio e vasos sanguíneos, constitui o aspeto mais saliente da derme nesta fase do período experimental (30 dias).

Em síntese, os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP (C/GP) e os co-reticulados com 0,10% w/w de genipin (C/GP/GE10) parecem seguir um padrão de comportamento bastante semelhante quando implantados no tecido subcutâneo de um rato. Mais, os resultados aqui reportados mostram uma forte concordância com os descritos na literatura para hidrogéis de base quitosano (Azab *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2002).

8.3 CONCLUSÕES

O estudo experimental *in vivo* mostrou que, quer a solução polimérica de quitosano neutralizada com fosfato dissódico de glicerol, quer a solução polimérica à qual se adicionou, também, genipin, depois de injetadas subcutaneamente em ratos da linhagem Wistar formaram os respectivos hidrogéis no local de injeção. A avaliação macroscópica da região dos implantes mostrou ausência de sinais de infecção, necrose e/ou edema, nos locais de injeção, em todos os casos.

A avaliação microscópica, realizada através de análise histológica, decorreu no final de uma semana e após 30 dias de implantação dos materiais. Aos sete dias de evolução verificou-se o desenvolvimento de uma reação inflamatória bastante acentuada com predominância de células polimorfonucleares neutrófilos associada a um forte estímulo angiogénico. Como se disse, esta situação encontra-se reportada na literatura e está, muito provavelmente, relacionada com o processo de degradação das matrizes de quitosano *in vivo*.

O processo inflamatório vai diminuindo de intensidade observando-se no final do período experimental, aos 30 dias de evolução, a presença de áreas de material disperso e de algum material fagocitado no interior de células macrofágicas. Não se registaram áreas de necrose, nem de hemorragia e, além disso, não foi visível a presença de cápsula fibrosa envolvendo os hidrogéis. Adicionalmente, é aparente uma diminuição do volume ocupado pelo material, em relação ao observado ao fim de uma semana, o que associado à fragmentação do material implantado denota uma reabsorção dos hidrogéis sem que ocorra prejuízo das condições vitais do animal. A presença de inúmeros vasos sanguíneos, em redor e dentro do material implantado, denota, igualmente, um importante estímulo angiogénico nos biomateriais.

Por fim, pode dizer-se que o estudo experimental em modelo animal, ainda que limitado, demonstrou que as matrizes de quitosano reticuladas fisicamente com GP, bem como as co-reticuladas com fosfato dissódico de glicerol e genipin, são biocompatíveis, bioativas e biodegradáveis. Estes aspetos são de extrema importância na perspetiva da aplicação dos hidrogéis de quitosano, em particular das matrizes co-reticuladas, na área farmacêutica ou biomédica.

8.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azab, A. K.; Doviner, V.; Orkin, B.; Kleinstern, J.; Srebnik, M.; Nissan, A.; Rubinstein, A.; Biocompatibility evaluation of crosslinked chitosan hydrogels after subcutaneous and intraperitoneal implantation in the rat. *Journal of Biomedical Material Research Part A* 2007, 83A, 414-22.
- Chiu, Y-L; Chen, S-C; Su, C-J; Hsiao, C-W; Chen, Y-M; Chen, H-L; Sung, H-W. pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: *In vitro* characteristics and *in vivo* biocompatibility. *Biomaterials* 2009, 30, 4877-88.
- Fujita, M.; Ishihara, M.; Simizu, M.; Obara, K.; Ishizuka, T.; Saito, Y.; Yura, H.; Morimoto, Y.; Takase, B.; Matsui, T.; Kikuchi, M.; Maehara, T. Vascularization *in vivo* caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel. *Biomaterials* 2004, 25, 699-706.
- Han, H. D.; Nam, D. E.; Seo, D. H.; Kim, T. W.; Shin, B. C.; Choi, H. S. Preparation and biodegradation of thermosensitive chitosan hydrogel as a function of pH and temperature. *Macromolecular Research* 2004, 12, 507-11.
- Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* 1989, 10, 574-6.
- Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003, 24, 4833-41.
- Mi, F-L; Tan, Y-C; Liang, H-F; Sung, H-W. *In vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 2002, 23, 181-91.
- Mori, T.; Okumura, M.; Matsuura, M.; Ueno, K.; Tokura, S.; Okamoto, Y.; Minami, S.; Fujinaga, T. *Biomaterials* 1997, 18, 947-51.
- Peluso, G.; Petillo, O.; Ranieri, M.; Santin, M.; Ambrosio, L.; Calabró, D.; Avallone, B.; Balsamo, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994, 15, 1215-20.
- Thomas, E. L.; Learn, D. B.; Jefferson, M. M.; Weatherred, W. Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* 1988, 263, 2178-86.
- Weiss, R. A. Xenotransplantação: uma pausa para reflexão. *Hospital Practice* (Edição Portuguesa) 2002, 6, 35-43.

CAPÍTULO 9

CONCLUSÕES

SUMÁRIO

Este último capítulo é dedicado à discussão dos resultados apresentados numa perspetiva integradora e que articule a potencialidade dos hidrogéis de quitosano para uso como sistemas de transporte e libertação de fármacos, segundo o conjunto de propriedades analisadas. É dado destaque fundamentalmente ao cruzamento das diferentes propriedades dos hidrogéis, uma vez que, no final de cada capítulo já foram enumeradas as conclusões mais importantes. Por fim, serão sugeridas algumas perspetivas de trabalho futuro nesta área de investigação.

9.1	CONCLUSÕES GERAIS.....	225
9.2	PERSPETIVAS FUTURAS.....	228

9.1 CONCLUSÕES GERAIS

O trabalho realizado e apresentado nesta dissertação pretende ser mais uma contribuição para o desenvolvimento de hidrogéis de quitosano para administração por via injetável. Estes hidrogéis têm sido caracterizados do ponto de vista das suas propriedades físico-químicas e biológicas e, mais recentemente, propostos, por vários autores, para inúmeras aplicações biomédicas. No entanto, apesar dos resultados promissores reportados por estudos disponíveis na literatura, poucos são os hidrogéis de quitosano investigados que têm a capacidade de, após injeção, produzirem géis *in situ*. De facto, a presente investigação foi inteiramente dedicada a esta classe de hidrogéis, ou seja, à preparação e caracterização de um sistema injetável, de base quitosano, capaz de gelificar *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e de pH.

O sistema apresentado é inovador pois, tanto quanto é do nosso conhecimento, foi desenvolvido e caracterizado pela primeira vez no âmbito do presente trabalho. A matriz formulada recorre a um mecanismo de reticulação combinado (que foi aqui designado por co-reticulação), usando como reticulante físico o sal fosfato dissódico de glicerol (GP) e como reticulante químico o genipin (GE). Deste modo, pretende conjugar-se, na mesma rede, as vantagens de cada um destes dois tipos de reticulação, nomeadamente a termossensibilidade, propriedade associada à reticulação física, e a estabilidade das redes reticuladas quimicamente.

Ao longo do trabalho produziram-se e caracterizaram-se vários hidrogéis de quitosano co-reticulados com diferentes concentrações de GE. As propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas, o controlo do tempo de gelificação, a taxa de degradação, a capacidade de intumescimento e a citotoxicidade dos hidrogéis foram alguns aspetos considerados relevantes para a caracterização do sistema. Além disso, o comportamento/propriedades do sistema co-reticulado foi sempre confrontado com o sistema em que foi utilizado o processo de reticulação apenas física, por forma a concluir-se das vantagens da reticulação química quando usada em simultâneo.

A primeira conclusão retirada dos resultados apresentados mostrou que a metodologia desenvolvida no presente trabalho, com vista à preparação de um hidrogel de quitosano co-reticulado, conduziu à formação efetiva de um gel, num curto espaço de tempo, à temperatura de 37 °C e a pH neutro, ou seja, em condições fisiológicas. O sistema proposto é baseado em produtos naturais, de elevada disponibilidade e baixo custo, e pode ser preparado à temperatura ambiente, através de metodologia também ela simples. O mecanismo de gelificação é particularmente interessante, uma vez que à solução inicial, constituída por água e quitosano, apenas são adicionados dois agentes de reticulação, o fosfato dissódico de glicerol e o genipin (em diferentes concentrações), cuja biocompatibilidade tem sido demonstrada. Deste modo, nem solventes orgânicos (ou outros aditivos) nem manipulações complexas são necessárias ao processo de gelificação.

Os hidrogéis assim preparados revelaram um conjunto de particularidades que os torna potencialmente atrativos para aplicações biomédicas. Entre elas, destaca-se a capacidade de

poderem ser administrados por via injetável (já que são líquidos à temperatura ambiente) e de produzirem estruturas sólidas, altamente porosas, *in situ*. Além disso, a adição de GE a uma solução de quitosano neutralizada com GP modifica o processo de gelificação, designadamente o tempo de gelificação e as propriedades viscoelásticas, o que naturalmente vai refletir-se nas propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas dos géis resultantes. A extensão destas alterações depende da concentração de GE. Todos os hidrogéis, incluindo o hidrogel co-reticulado com a menor concentração de reticulante químico, exibiram um comportamento típico de sistemas poliméricos estruturados, ou seja, de géis verdadeiros. A presença de GE melhorou as propriedades viscoelásticas dos géis, relativamente ao sistema reticulado fisicamente, e o aumento da sua concentração induziu um reforço das propriedades mecânicas do sistema co-reticulado.

Por outro lado, ficou demonstrado na presente investigação que as propriedades mais relevantes do quitosano, como sejam a sua biodegradabilidade, a ausência de toxicidade e a elevada capacidade de absorção de água, não se perdem com a formação de hidrogéis co-reticulados com GP e GE. Adicionalmente, e dependendo da concentração de reticulante químico, as cinéticas de degradação e a capacidade de intumescimento dos hidrogéis co-reticulados podem ser facilmente moduladas. Este aspeto merece referência, porque a análise levada a cabo aponta para o facto de se poderem controlar as propriedades físicas e reológicas do material manipulando adequadamente as concentrações de genipin.

Depois do estudo de caracterização revelar que os hidrogéis de quitosano co-reticulados com GE possuíam um elevado potencial para uso como sistemas injetáveis produzidos *in situ*, estes hidrogéis foram investigados quanto ao seu potencial de utilização como sistemas de transporte e libertação de um antitumoral - a cisplatina. Atualmente, a cisplatina (CDDP) é um dos fármacos antitumorais de maior utilização, possuindo efetividade no tratamento de vários tipos de tumores sólidos. Apesar da sua larga utilização, a sua administração está associada a graves efeitos colaterais incluindo toxicidade renal, sistémica, náusea e vômito. A eficiência de fármacos potentes com fortes efeitos colaterais (como é o caso da CDDP) requer o seu direcionamento e libertação para o local onde a sua ação é necessária. Desta forma, a entrega seletiva de CDDP no tumor poderá reduzir significativamente a toxicidade da droga e melhorar a sua ação terapêutica. Foi neste contexto que se considerou utilizar os hidrogéis aqui desenvolvidos como uma nova estratégia para o transporte e libertação local da CDDP.

Assim, foram projetadas diferentes estratégias para incorporar a cisplatina nas matrizes de quitosano. Numa primeira abordagem, o fármaco foi incorporado por dissolução diretamente na matriz polimérica. Embora este seja o processo mais simples de adição do fármaco ao hidrogel, na maior parte das vezes, ele não garante uma libertação constante durante um período alargado de tempo do agente bioativo. Neste quadro, e com o intuito de prolongar no tempo a libertação do agente terapêutico, procedeu-se à incorporação no hidrogel de dois sistemas de libertação independentes, constituídos por lipossomas e microesferas com o fármaco pré-encapsulado.

Os estudos de libertação *in vitro* foram conduzidos em PBS e num meio que melhor simula as condições que ocorreriam se estes hidrogéis fossem implantados *in vivo*, ou seja, em PBS contendo

lisozima (enzima que atua diretamente na degradação do quitosano e que se encontra presente nos tecidos, órgãos e fluidos corporais dos mamíferos). Dos estudos de liberação, ficou demonstrado que quando a liberação ocorre em PBS, a CDDP se liberta rapidamente de todos os hidrogéis (quer do hidrogel reticulado fisicamente com GP, quer dos hidrogéis co-reticulados com diferentes concentrações de GE), sendo atingido o estado estacionário decorridas três horas de ensaio. Por outro lado, verifica-se que a liberação em PBS é incompleta em todos os sistemas, à exceção do caso em que são usados lipossomas, que revelam uma liberação quase total de CDDP. Em contrapartida, na presença de lisozima a liberação de CDDP ocorre de forma contínua e prolongada por um período de quatro semanas. Estes resultados mostram que a degradação dos hidrogéis de quitosano poderá ser crucial para alcançar a viabilidade funcional destes materiais enquanto sistemas de liberação de CDDP. Isto porque, a degradação não só favorece uma liberação sustentada da CDDP a curto-médio prazo, como também contribui para a remoção do polímero do organismo, evitando a sua acumulação em casos de múltipla aplicação. Além disso, a conjugação do tipo de reticulação (física e físico-química) e da estratégia de incorporação do fármaco (disperso na matriz ou encapsulado em lipossomas ou microsferas) permitiu obter perfis de liberação de CDDP distintos. Assim, através do ajuste destas condições poder-se-á obter perfis de liberação “por medida”.

Por fim, o estudo experimental *in vivo*, em modelo animal, permitiu avaliar a capacidade das soluções poliméricas de quitosano, às quais se adicionaram os reticulantes GP e GE, formarem géis, num curto espaço de tempo, depois de injetadas subcutaneamente em ratos da linhagem Wistar. De realçar que a gelificação lenta causaria a dispersão do gel devido à difusão da solução precursora do local de injeção e, conseqüentemente, comprometeria o resultado terapêutico desejado, isto é, a atuação local. O estudo experimental *in vivo*, embora naturalmente limitado, indicou que os géis desenvolvidos foram rapidamente formados e confinados ao local de injeção. Após uma semana de implantação dos materiais, a análise histológica mostrou uma intensa resposta inflamatória, muito provavelmente, relacionada com o processo de degradação das matrizes de quitosano. No final do período de 30 dias, verificou-se uma aparente diminuição do volume ocupado pelo material, em relação ao observado ao fim de uma semana, o que denota uma reabsorção sem que ocorra prejuízo das condições vitais do animal. Além disso, constatou-se uma diminuição da intensidade de células inflamatórias presentes e um nítido predomínio de macrófagos, bem como de alguns linfócitos e plasmócitos. Em suma, os resultados obtidos demonstraram que, não só as matrizes de quitosano reticuladas fisicamente com GP, mas também as matrizes co-reticuladas com GP e GE, são biocompatíveis, bioativas e biodegradáveis o que abre excelentes perspectivas para a sua aplicação *in vivo*.

Apesar do esforço em caracterizar, sob diversos aspetos, os hidrogéis sintetizados e dos resultados alcançados serem muito promissores, com a conclusão desta dissertação fica a sensação de que muito mais trabalho será necessário desenvolver para que materiais de baixo custo e abundantes na natureza, como é o caso do quitosano, venham a substituir, com vantagem, os materiais mais

sofisticados ou aqueles que necessitam de intervenção cirúrgica para serem removidos, como é o caso dos materiais não biodegradáveis.

A secção seguinte fornece algumas sugestões para a continuidade da investigação, tendo em vista possíveis aplicações práticas dos hidrogéis de quitosano co-reticulados que pensamos de potencial interesse.

9.2 PERSPETIVAS FUTURAS

O trabalho realizado permitiu responder ao principal desafio proposto, que foi o desenvolvimento de um novo método de preparação de um hidrogel de quitosano co-reticulado, capaz de gelificar *in situ*, em condições fisiológicas de temperatura e pH. Mais, os resultados obtidos permitiram antever as potencialidades dos hidrogéis de base quitosano como veículos de transporte e libertação de fármacos em aplicações biomédicas. No entanto, muitas questões ficaram por resolver, referindo-se as seguintes como potenciais tópicos a analisar em trabalhos futuros:

- acompanhar o processo de degradação dos vários hidrogéis através de outras abordagens experimentais, incluindo a perda de propriedades mecânicas, a redução do peso molecular das cadeias poliméricas e alterações a nível morfológico;
- utilizar uma solução simulada contendo, para além da concentração em lisozima semelhante à do soro humano, um meio mais complexo envolvendo todas as substâncias constituintes do plasma humano, como sejam as proteínas, os aminoácidos e outras enzimas (ou, até mesmo, usar plasma humano) e, assim, avaliar a sua interferência no processo de degradação das matrizes e nos perfis de libertação do fármaco;
- avaliar o potencial dos hidrogéis como sistemas de transporte e libertação de fármacos; de facto, a sua caracterização como sistemas de libertação não ficou completamente definida com o estudo efetuado utilizando apenas como fármaco modelo a cisplatina, pelo que deverá prosseguir-se com outras biomoléculas, como sejam outros antitumorais, fármacos de peso molecular mais elevado, proteínas e fatores de crescimento; o aumento do peso molecular da cisplatina, ligando-a covalentemente a uma biomolécula, por exemplo a uma proteína, não será também de excluir;
- uma vez que os sistemas desenvolvidos são capazes de produzir *in situ* estruturas tipo gel, altamente porosas (com poros de grande dimensão) e biodegradáveis, seria interessante avaliar o potencial destas matrizes injetáveis como *scaffolds* para o crescimento e proliferação de células com vista a aplicações em engenharia de tecidos;
- a eficiência de imobilização da cisplatina nas microesferas, bem como a concentração de fármaco imobilizado, foram baixas e necessitam de ser melhor exploradas com vista a obter

microesferas de quitosano com um conteúdo de cisplatina satisfatório para aplicações terapêuticas;

- sintetizar/produzir conhecimento mecanístico a partir dos ensaios realizados que possa ser exportável para outros sistemas de liberação baseados em hidrogéis e fármacos; neste contexto, é por demais relevante desenvolver modelos Fickianos para a difusão do fármaco nas matrizes e relacioná-los com as propriedades físicas delas e com a estrutura da rede; é igualmente relevante desenvolver modelos preditivos para a degradação da rede que permitam prever o comportamento estrutural das matrizes e a forma como elas são afetadas pelo tempo e pelo meio envolvente; este conhecimento a ser sintetizado permitirá passar de uma abordagem casuística para a geração de conhecimento fundamental capaz de explicar diferentes sistemas; por outro lado, permitirá, posteriormente, a otimização do sistema de liberação de uma forma mais sistemática (usando um espaço contínuo de pesquisa para as propriedades) tendo como variáveis manipuláveis a composição do polímero e dos agentes reticulantes usados na formulação do hidrogel;
- investigar o potencial dos hidrogéis de quitosano co-reticulados enquanto sistemas de liberação prolongada e localizada de cisplatina (através de injeção intratumoral) para o tratamento de tumores sólidos, usando um modelo animal: avaliar a distribuição da droga no tumor, a possibilidade de aplicação de múltiplas injeções e a eficiência do tratamento através da monitorização do volume/tamanho do tumor.

Anexo A

ENSAIO DA NINIDRINA

SUMÁRIO

Neste anexo descreve-se o procedimento para a preparação da solução de ninidrina usada no ensaio com o mesmo nome e apresenta-se uma das curvas de calibração que esteve na base da determinação da percentagem de grupos amina livres, presentes nos hidrogéis após a reação de reticulação.

A.1	Preparação da solução de ninidrina	233
A.2	Curva típica de calibração	233

A.1 - Preparação da solução de ninidrina

A preparação da solução de ninidrina consistiu no seguinte:

1. Pesar 1,05 g de ácido cítrico e adicionar 10 mL de solução aquosa de NaOH (1,0 M) e 0,04 g de SnCl₂. Adicionar 25 mL de água desionizada e agitar a mistura até dissolução completa dos reagentes e obtenção de uma solução homogênea (solução A).
2. Adicionar 1 g de ninidrina em pó a 25 mL de etilenoglicol monometil éter. Continuar a agitação até obter uma solução homogênea (solução B).
3. Misturar as soluções A e B e deixar em agitação até pelos menos 45 minutos.

Todos os procedimentos foram executados ao abrigo da luz. A solução de ninidrina foi mantida no frigorífico e utilizada até 3 dias depois de preparada.

A.2 - Curva típica de calibração

Neste anexo apresenta-se, a título ilustrativo, uma das curvas de calibração que esteve na base da determinação da percentagem de grupos amina livres, presentes nos hidrogéis, uma vez que, em cada dia de experiências foi realizada uma calibração, com soluções padrão recém preparadas.

A curva de calibração da glicina foi obtida com o espectrofotómetro da marca MAPADA, modelo UV-1800 (MAPADA Shangai, China). O comprimento de onda usado foi o correspondente ao máximo de absorvância para a glicina que é de 570 nm.

Na Tabela A.2 encontram-se as concentrações das soluções de glicina que se prepararam para constituírem os padrões usados na calibração, assim como os valores das absorvâncias que lhes correspondem.

Tabela A.2 - Valores de concentração e absorvância das soluções padrão usadas na obtenção da curva de calibração da glicina.

<i>solução padrão</i>	<i>concentração ($\mu\text{mol/mL}$)</i>	<i>absorvância</i>
C1	4,6090	0,730
C2	2,3045	0,320
C3	1,3169	0,150
C4	0,7682	0,078

Na Figura A.2 encontra-se a representação gráfica dos dados experimentais da Tabela A.2 e a curva de calibração obtida por regressão linear dos pontos experimentais feita com base no critério dos mínimos quadrados.

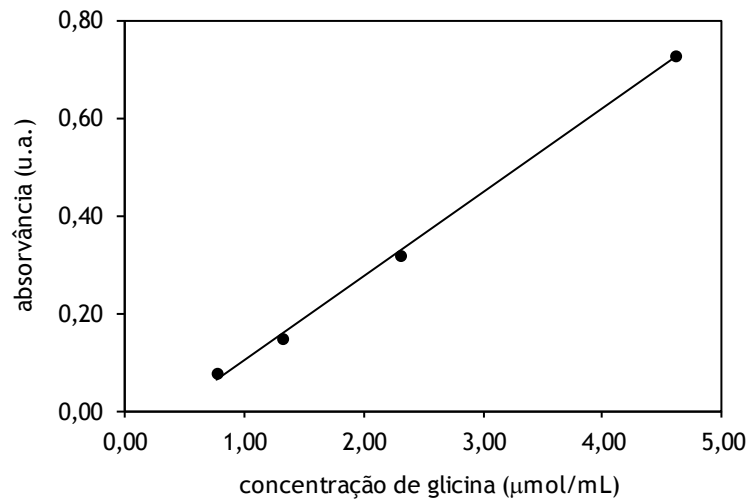


Figura A.2 - Representação gráfica da reta de calibração absorvância *versus* concentração de glicina.

A equação da reta de calibração é a seguinte:

$$\text{absorvância} = 0,1719 \times \text{concentração de glicina } (\mu\text{mol/mL}) - 0,0673 \quad (R^2 = 0,9993)$$

válida para uma gama de concentrações de glicina compreendida entre aproximadamente 0,8 e 5 µmol/mL.

Anexo B

MÉTODO COLORIMÉTRICO COM O-FENILENODIAMINA

SUMÁRIO

Neste anexo descreve-se o procedimento e apresenta-se a curva de calibração que esteve na base da determinação da concentração de cisplatina pelo método colorimétrico com a *o*-fenilenidiamina.

B.1	Curva de calibração da cisplatina	237
-----	---	-----

B.1 - Curva de calibração da cisplatina

Um dos métodos analíticos utilizados para quantificar a cisplatina libertada *in vitro* foi o método colorimétrico com *o*-fenilenodiamina.

Uma vez que a cisplatina não absorve radiação ultravioleta ou visível, foi necessário recorrer a um método indireto de forma a quantificar este composto por espectrofotometria de UV/VIS. O método utilizado baseia-se na reação entre a *o*-fenilenodiamina e a platina, cujos produtos são cromóforos com absorção máxima para um comprimento de onda próximo de 704 nm.

Assim, a quantificação do fármaco foi obtida através da medida das absorvâncias das amostras do meio de libertação recolhidas ao longo do tempo, num espectrofotómetro da marca MAPADA, modelo UV-1800 (MAPADA Shangai, China). As medidas foram realizadas a um comprimento de onda de 704 nm em cuvettes de vidro. Este valor foi obtido a partir de um conjunto de soluções padrão de cisplatina (Tabela B.1) submetidas a um varrimento de comprimentos de onda entre 200 a 900 nm, tendo-se verificado que o máximo de absorvância para a cisplatina correspondia àquele comprimento de onda. A Figura B.1 mostra os varrimentos para as diferentes soluções padrão.

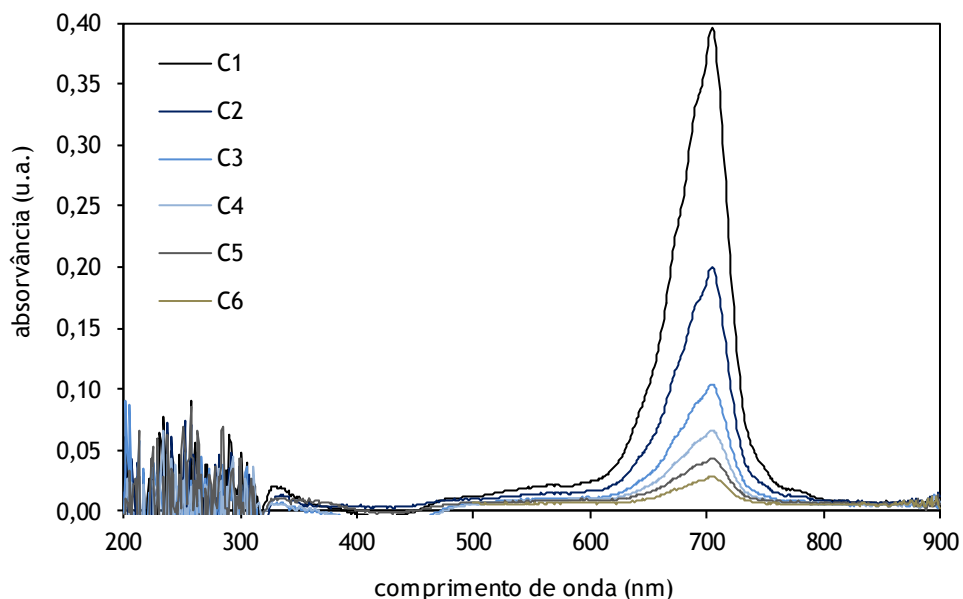


Figura B.1 - Espectros de absorvância para as diferentes soluções padrão de cisplatina submetidas a um varrimento de comprimentos de onda na gama 200 a 900 nm.

A curva de calibração foi construída com as mesmas soluções padrão, numa gama de concentrações entre 0,1 e 5 ppm (0,0001 e 0,005 mg/mL). Na Tabela B.1 encontram-se as concentrações das soluções de cisplatina assim como os valores das absorvâncias que lhes correspondem.

Tabela B.1 - Valores de concentração e absorvância das soluções padrão usadas na obtenção da curva de calibração da cisplatina.

<i>solução padrão</i>	<i>concentração (mg/mL)</i>	<i>absorvância</i>
C1	0,005750	0,780
C2	0,002875	0,396
C3	0,001426	0,200
C4	0,000713	0,106
C5	0,000460	0,067
C6	0,000230	0,043
C7	0,000138	0,029

Na Figura B.2 encontra-se a representação gráfica dos dados experimentais da Tabela B.1 e a curva de calibração obtida por regressão linear dos pontos experimentais feita com base no critério dos mínimos quadrados.

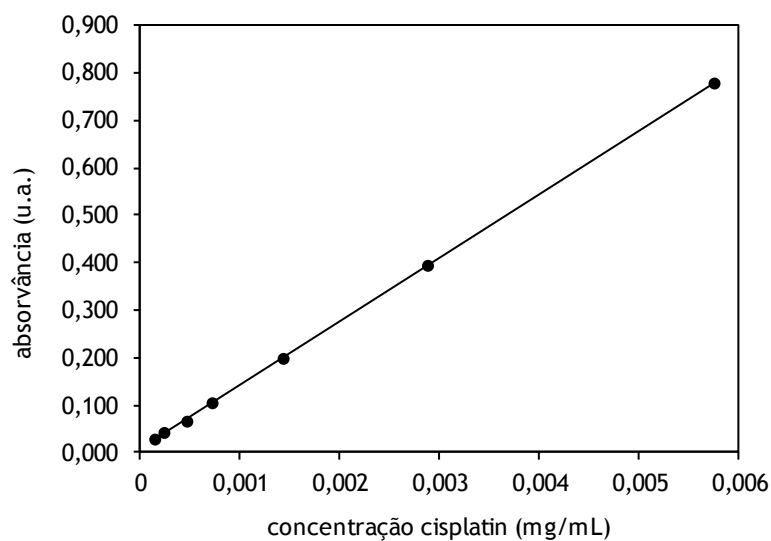


Figura B.2 - Representação gráfica da reta de calibração absorvância *versus* concentração de cisplatina.

A equação da reta de calibração é a seguinte:

$$\text{absorvância} = 133,85 \times \text{concentração de cisplatina (mg/mL)} + 0,0099 \quad (R^2 = 0,9999)$$

válida para uma gama de concentrações de cisplatina compreendida entre aproximadamente 0,0001 e 0,005 mg/mL.

Anexo C

ENSAIOS REOLÓGICOS: TESTES DE VARRIMENTO EM TEMPO

SUMÁRIO

Neste anexo apresentam-se os perfis de maturação para o sistema de quitosano reticulado fisicamente e para os sistemas co-reticulados com genipin ao longo de 12 horas.

C.1	Cinéticas de maturação	241
-----	------------------------------	-----

C.1 - Cinéticas de maturação

A Figura C.1 mostra o resultado dos testes de varrimento em tempo (em termos de representação dos valores do módulo elástico, G') para os hidrogéis de quitosano reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (GP) e co-reticulados com várias concentrações de genipin (GE).

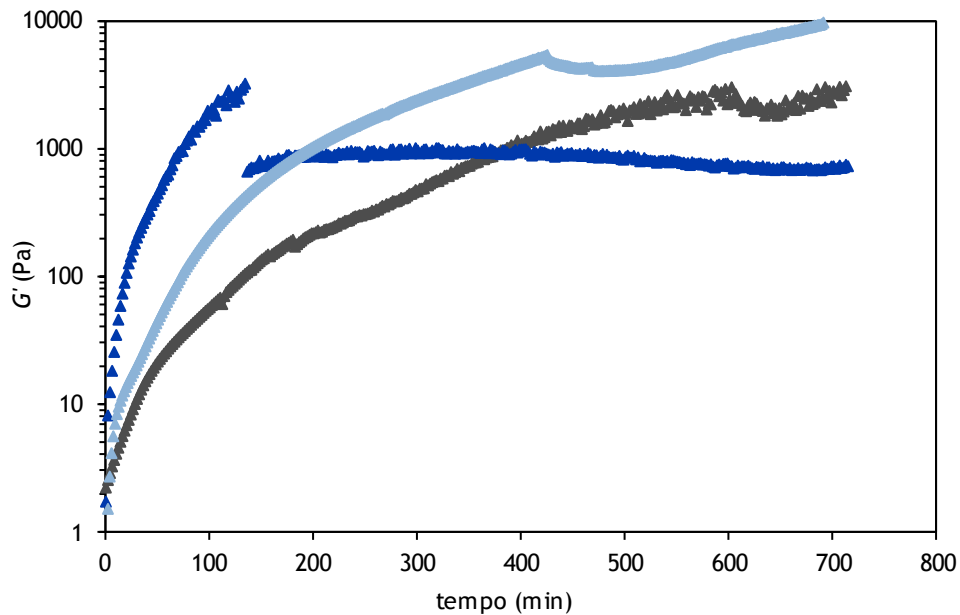


Figura C.1 - Cinéticas de maturação para o hidrogel de quitosano reticulado fisicamente (C/GP) e para os hidrogéis de quitosano co-reticulados com diferentes concentrações de genipin: 0,05 e 0,15% w/w (C/GP/GE5 e C/GP/GE15, respetivamente) a 37 °C, à frequência de 1 Hz e tensão de corte de 1 Pa.