



UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PATRÍCIA MANUELA ALMEIDA COIMBRA

Preparação e Caracterização de Sistemas de
Libertação Controlada de Fármacos com base em
Polímeros de Origem Natural

Dissertação submetida à Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química

Coimbra, 2010

Agradecimentos

Expresso os meus agradecimentos aos orientadores desta tese, a Professora Dra. Helena Gil e o Prof. Dr. Hermínio de Sousa, pela sua orientação, conselhos, e a disponibilidade que sempre apresentaram para me ajudar.

Gostaria também de agradecer, pelo seu companheirismo e ajuda, a todas as pessoas que, ao longo de quase cinco anos, foram meus colegas de laboratório. Em particular apresento os meus agradecimentos ao João Maia e à Joana Branquinho, pela ajuda que me prestraram na realização dos ensaios de H-RMN e de SEC.

Gostaria ainda de reconhecer e agradecer o apoio financeiro do Instituto de Investigação Interdisciplinar da Universidade de Coimbra, prestado através da Bolsa de Doutoramento III/BIO/35/2005.

Índice

Abstract	ix
Resumo	xiii
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Abreviaturas	xxiii
Preâmbulo	xxv
Capítulo 1 Introdução Geral.....	1
1.1 Libertação controlada de fármacos	3
1.2 Sistemas de libertação controlada de base polimérica.....	4
1.3 Polímeros de origem natural e seus derivados: aplicações na área da libertação controlada de fármacos.....	7
1.3.1 Polímeros de base proteica.....	8
1.3.2 Polissacarídeos.....	9
1.3.3 Polihidroxicanoatos	11
1.3.4 Derivados de polímeros naturais	14
1.4 Hidrogéis.....	16
1.5 Nano- e micropartículas poliméricas.....	22
1.6 Referências bibliográficas.....	26
Capítulo 2 Imobilização de um Fármaco Hidrofóbico em Micropartículas de Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)	31
2.1 Imobilização de compostos bioactivos em nano/micropartículas produzidas pelo método de extracção/evaporação do solvente	33
2.2 Imobilização de moléculas bioactivas em nano/micropartículas de PHB e PHBV	37
2.3 Parte experimental.....	41
2.3.1 Flurbiprofeno	41
2.3.2 Planeamento de experiências.....	42
2.3.3 Reagentes.....	45
2.3.4 Procedimento experimental.....	46
2.4 Resultados e discussão.....	50
2.5 Conclusões	63
2.6 Referências bibliográficas.....	66

Capítulo 3	Preparação e Caracterização de Hidrogéis de base Pectina. Sua Utilização na Libertação Controlada de Moléculas Bioactivas.....	69
3.1	Pectinas: estrutura, propriedades, produção industrial e aplicações.....	71
3.1.1	Estrutura química.....	72
3.1.2	Pectina comercial.....	74
3.1.3	Produção industrial.....	76
3.1.4	Propriedades da pectina.....	77
3.1.5	Aplicações comerciais.....	82
3.2	Aplicações da pectina em sistemas de libertação de compostos bioactivos.....	83
3.2.1	Libertação específica de compostos bioactivos no cólon por via oral.....	83
3.2.2	Sistemas de libertação mucoadesivos.....	91
3.2.3	Sistemas de libertação à base de pectina: perspectivas futuras.....	94
3.3	Modificação química da pectina e preparação de hidrogéis de base pectina.....	94
3.4	Parte experimental.....	98
3.4.1	Planeamento de experiências.....	101
3.4.2	Reagentes.....	102
3.4.3	Procedimento experimental.....	103
3.5	Resultados e discussão.....	108
3.5.1	Caracterização dos derivados de pectina.....	108
3.5.2	Caracterização dos hidrogéis de pectina modificada e hidrogéis híbridos de pectina modificada e macrómero PEGDA.....	132
3.5.3	Libertação <i>in vitro</i> de fármacos e proteínas modelo.....	148
3.6	Conclusões.....	163
3.7	Referências bibliográficas.....	166
Capítulo 4	Esponjas de Pectina e Quitosano Formadas por Complexação Polielectrolítica: Preparação e Caracterização.....	173
4.1	Introdução.....	175
4.1.1	Polielectrólitos e complexos polielectrolíticos.....	175
4.1.2	Aplicações farmacêuticas e biomédicas dos complexos polielectrolíticos.....	177
4.1.3	Complexos polielectrolíticos com quitosano.....	177
4.1.4	Complexos polielectrolíticos com quitosano e pectina.....	179

4.2	Parte experimental.....	181
4.2.1	Reagentes.....	181
4.2.2	Especificações dos polissacarídeos utilizados.....	181
4.2.3	Procedimento experimental.....	182
4.3	Resultados e discussão.....	189
4.4	Conclusões	221
4.5	Referências bibliográficas.....	223
 Capítulo 5 Considerações Finais e Sugestões para Trabalho Futuro		227
5.1	Imobilização de um fármaco hidrofóbico em micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)	229
5.2	Preparação e caracterização de hidrogéis de base pectina. Sua utilização na libertação de moléculas bioactivas	231
5.3	Esponjas de pectina e quitosano formadas por complexação polielectrolítica: preparação e caracterização	234
5.4	Referências bibliográficas	235
Anexo 3.1	Quantificação dos fármacos e proteínas por espectroscopia UV/VIS.....	237
Anexo 3.2	Resultados da análise elemental	240
Anexo 4.1	Resultados da análise elemental	241

Abstract

The main purpose of this work is the preparation and development of several controlled drug delivery systems built with natural polymers and suitable for different applications, like for colon-specific drug delivery or for the localized and prolonged delivery of drugs.

With this objective, three potential controlled drug delivery systems, based on natural polymers, were prepared and characterized.

In the first investigated system, the natural occurring polyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV, was processed in microparticles loaded with the hydrophobic drug flurbiprofen, by means of an oil-in-water emulsion/extraction solvent evaporation method, using chloroform as the organic phase and polyvinyl alcohol (PVA) as the emulsion stabilizer.

A central composite experimental design was employed to evaluate the effect of two process variables – the polymer concentration in the organic phase and the surfactant concentration in the aqueous phase - on some of the final microparticles properties, specifically the encapsulation efficiency of the drug, the mean particle size, the width of the particles size distribution, and the required time for the *in vitro* release of 50% of the encapsulated drug ($t_{50\%}$). The statistical analysis of the implemented experimental design revealed that the two investigated variables had a significant and opposite effect on the encapsulation efficiency of the drug. Also, it was found that the microparticles mean particle size increased with increasing concentrations of PHBV in organic phase and that the concentration of the surfactant in the aqueous phase played a critical role in the aggregation degree of the microparticles. It was concluded that a minimum PVA concentration was required to stabilize the oil-in-water emulsion and, in this way, obtain non-aggregated particles. The *in vitro* flurbiprofen release profiles from PHBV microparticles were very similar for all the prepared formulations, showing that more than 90% of the drug was released in the first eight hours of the assay. The time for the *in vitro* release of 50% of the encapsulated drug, $t_{50\%}$, was not significantly influenced by any of the two investigated variables. The comparison

between the release profiles of flurbiprofen from the PHBV microparticles and the dissolution profile of the pure drug lead to the conclusion that the drug was essentially dispersed at the surface of the microparticles, rather than effectively entrapped in the polymeric matrix.

Although the investigated formulations didn't led to an effective immobilization of the flurbiprofen in the PHBV microparticles, this objective can be achieve with further investigation, namely by the manipulation of the drug/polymer mass ratio used in the microparticles preparation, among other variables. With the flurbiprofen effectively immobilized in the microparticles, it will be possible to then optimize the drug release profile in order to obtain a controlled and prolonged release of the immobilized flurbiprofen, suitable for the use of the microparticles as localized and prolonged drug delivery systems.

In the second investigated system, the polysaccharide pectin was chemically modified by introducing, in its structure, vinylic or methacrylic terminal functional groups. The functionalized pectin derivatives, alone or together with the macromer poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA), were transformed in chemical hydrogels by UV-induced free radical reticulation. *In vitro* drug release studies were used to evaluate the behavior of the produced hydrogels as controlled drug delivery systems. For this purpose, two low molecular weight hydrophilic drugs (gentamicin sulphate and sodium flurbiprofen), and two model proteins (bovine serum albumin (BSA) and lysosyme), were incorporate in the hydrogels during their formation and subsequently released *in vitro*.

It was concluded that the extension of the chemical modification of pectin, which was carried out in a heterogeneous environment, was limited/controlled by the accessibility of the OH groups of the polysaccharide, which, in turn, was directly controlled by the swelling degree of the polysaccharide particles in the reaction solvent. The two low molecular weight hydrophilic drugs were rapidly liberated from the hydrogels. The release profiles revealed that, in approximately four hours, the entire incorporated drug was released. On the other hand, the *in vitro* release studies of the model proteins revealed an incomplete release of the incorporated proteins, probably because a fraction of protein was physical adsorbed in to polymeric matrix and/or covalently bounded to it. The presence of pectinolytic enzymes in the release medium result in a higher fraction of BSA released from the

hydrogels, supposedly due to the enzymatic degradation of the tridimensional network structure of the polymer matrix.

The results obtained with this work show that the produced hydrogels are suitable to be used as colon-specific drug delivery systems, especially of proteins.

In the third and last investigated system, sponges of pectin and chitosan, prepared by the freeze-drying of the insoluble polyelectrolyte complexes (PECs) formed between the two polysaccharides, were produced and characterized. Three pectin/chitosan PECs sponges were prepared, using different initial proportions of the two polysaccharides. The three sponges, independently of the used proportions, had very similar compositions, being composed mainly from pectin (74 to 78%, mass percentage). The sponges were submerged in aqueous solutions, either at pH 2 or pH 7.4, and the weight loss was recorded during six weeks. The results revealed a continuous weight loss, attributed to the gradual liberation of polymer chains, as a consequence of the progressive loss of the ionic interactions established, during PECs formation, between the COO^- groups of pectin and the NH_3^+ groups of chitosan. The composition analysis of the sponges during dissolution time, and their FTIR spectra, revealed that, at pH 2, the weight loss of the sponges was caused, equally, by the loss of pectin and chitosan. On the other hand, it was concluded that, at pH 7.4, the weight loss of the sponges was mainly due to the loss of pectin. A preliminary evaluation of the sponges as controlled drug delivery systems was made, by the incorporation of BSA in the sponges followed by the *in vitro* release, at pH 2 and pH 7.4. The *in vitro* release profiles obtained suggest that the release of the protein from the sponges is controlled by the strong interactions established between the protein molecules and the polymeric matrix. This preliminary study indicates that the produced PECs matrices can be used to immobilize proteins and build colon-specific delivery systems of this type of biomacromolecules.

In the three works presented in this Thesis it was possible to obtain significant conclusions that can be used in the future as a basis for the continuation of the development of the different controlled drug delivery systems proposed in this work.

Resumo

Este trabalho tem como principal objectivo a preparação de sistemas de libertação controlada com base em polímeros de origem natural e com o potencial de serem utilizados em diversas aplicações como a entrega específica de fármacos no cólon ou a libertação prolongada e localizada de fármacos.

Para isto desenvolveram-se e caracterizaram-se três potenciais sistemas de libertação controlada de moléculas bioactivas, preparados com diferentes polímeros de origem natural.

O primeiro sistema estudado envolveu a utilização do poliéster de origem natural poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), PHBV, o qual foi investigado enquanto matriz para a imobilização do anti-inflamatório não esteróide flurbiprofeno em micropartículas preparadas pelo método da extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água, utilizando o clorofórmio como fase orgânica e o álcool polivinílico (PVA) como surfactante.

Um desenho composto central de experiências foi implementado de forma a investigar o efeito de duas variáveis envolvidas no processo de preparação das micropartículas – a concentração do polímero na fase orgânica e a concentração do surfactante na fase aquosa - sobre algumas das propriedades finais dessas mesmas micropartículas, nomeadamente a eficiência de encapsulação do fármaco, o tamanho médio e a distribuição de tamanhos das micropartículas, e o tempo correspondente à libertação *in vitro* de 50% do fármaco encapsulado. Concluiu-se que as duas variáveis investigadas afectavam, significativamente e de forma oposta, a eficiência de encapsulação do fármaco. Igualmente, verificou-se que o tamanho médio das partículas era afectado positivamente pelo aumento da concentração do polímero na fase orgânica. A concentração do surfactante revelou ser um factor crítico no grau de agregação das micropartículas obtidas, tendo-se concluído que existe um limite mínimo requerido de concentração de surfactante para estabilizar a emulsão óleo/água e, conseqüentemente, obter micropartículas não agregadas.

Os perfis de libertação *in vitro* do fármaco, a partir de micropartículas produzidas em diferentes condições experimentais, revelaram que mais de 90% do

fármaco era libertado nas primeiras oito horas de ensaio. A análise estatística dos valores de $t_{50\%}$ (tempo correspondente à libertação *in vitro* de 50% do fármaco encapsulado) revelou que nenhuma das duas variáveis experimentais investigadas influenciava significativamente este parâmetro.

A comparação dos perfis de libertação *in vitro* do fármaco a partir de micropartículas e o perfil de dissolução do fármaco puro conduziu à conclusão de que o fármaco se encontra essencialmente disperso à superfície das micropartículas e não, como seria desejável num sistema de libertação controlada, efectivamente aprisionado na matriz polimérica.

Embora, com as formulações investigadas, não se tenha obtido um sistema de libertação do flurbiprofeno com a capacidade de libertar este de forma controlada ao longo de um período de tempo significativo (de semanas ou meses), a investigação e optimização de outras variáveis experimentais, nomeadamente a razão mássica fármaco/polímero utilizada na produção das micropartículas, poderá conduzir a um sistema de libertação capaz de libertar o flurbiprofeno da forma referida anteriormente, e que poderá ser utilizado na libertação controlada e localizada deste.

No segundo sistema investigado o polissacarídeo pectina foi quimicamente modificado através da introdução na sua estrutura de grupos terminais vinílicos ou metacrílicos. Os derivados de pectina assim obtidos, por si só ou em conjunto com o macrómero poli(etileno glicol) diacrilato (PEGDA), foram utilizados na formação de hidrogéis químicos preparados por fotoreticulação. A actuação destes hidrogéis enquanto sistemas de libertação controlada foi investigada através de estudos de libertação *in vitro* de dois fármacos hidrofílicos de baixo peso molecular (sulfato de gentamicina e flurbiprofeno sódico) e de duas proteínas modelo (albumina de soro bovino (BSA) e lisozima). Todos os compostos bioactivo acima referidos foram imobilizados no hidrogel durante a sua formação.

Relativamente à modificação química da pectina, a qual se processou em meio heterogéneo, conclui-se que a extensão da modificação química era limitada/controlada pela acessibilidade dos grupos hidroxilo do polissacarídeo, encontrando-se essa acessibilidade directamente relacionada com a capacidade de inchaço das partículas do polissacarídeo no solvente reaccional. No caso dos fármacos hidrofílicos de baixo peso molecular imobilizados nos hidrogéis

preparados, verificou-se que estes se libertavam rapidamente, sendo a libertação total atingida, no máximo, passado quatro horas de ensaio. A libertação das proteínas modelo, a partir dos hidrogéis, revelou-se incompleta devido, provavelmente, à ligação covalente e/ou adsorção física de uma fracção da proteína à matriz polimérica. Constatou-se ainda que a presença de enzimas pectinolíticas no meio de libertação conduzia a uma maior quantidade de BSA libertada, supostamente devido à degradação por via enzimática da estrutura tridimensional do hidrogel.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os hidrogéis produzidos poderão ser utilizados enquanto sistemas de libertação específica no cólon, em particular na libertação de proteínas.

Por fim, o terceiro sistema estudado envolveu a preparação e caracterização de esponjas de pectina e quitosano, as quais foram obtidas a partir da liofilização dos complexos polielectrolíticos (PECs) formados, em meio aquoso, entre os dois polissacarídeos. Foram produzidas três esponjas de PECs de pectina/quitosano utilizando diferentes proporções iniciais dos dois polissacarídeos. Independentemente das proporções utilizadas, os resultados da análise elemental revelaram que a composição das três esponjas era muito semelhante, sendo estas constituídas maioritariamente por pectina (entre 74 e 78%, percentagem mássica).

Estudos da variação do peso das esponjas, realizados ao longo de seis semanas, revelaram que as esponjas perdiam massa de forma contínua, quando mergulhadas em soluções aquosas a pH 2 ou pH 7.4. Esta perda de massa foi atribuída à libertação gradual das cadeias dos dois polissacarídeos, causada pela quebra progressiva das ligações iónicas estabelecidas durante a formação dos PECs entre os grupos COO^- da pectina e os grupos NH_3^+ do quitosano.

A análise da composição das esponjas ao longo do tempo de dissolução, e o registo dos espectros de FTIR, revelou que, nas esponjas mergulhadas a pH 2, a perda de massa resultava tanto da perda de pectina como de quitosano, enquanto, a pH 7.4, a perda de massa podia ser maioritariamente atribuída à dissolução das cadeias de pectina. Este comportamento distinto pode ser atribuído aos diferentes estados de ionização/protonação dos dois polissacarídeos nos dois meios aquosos.

Uma avaliação preliminar destas esponjas, enquanto sistemas de libertação controlada de proteínas, foi feita, através de um estudo de libertação *in vitro* de

libertação da proteína BSA. Os resultados sugerem que a libertação de proteínas a partir deste tipo de material será controlada pelas fortes interações físicas estabelecidas entre as proteínas e a matriz polimérica. Este resultado sugere que as matrizes de PECs desenvolvidas apresentam o potencial para serem utilizadas na preparação de sistemas de libertação específica de proteínas no cólon.

Em cada um dos três trabalhos desenvolvidos e apresentados nesta Tese foi possível obter conclusões significativas, que poderão ser utilizadas como bases sólidas para a continuação do trabalho de desenvolvimento dos diferentes sistemas de libertação propostos.

Lista de Figuras

Figura 1.1 Estrutura química do quitosano ($n > 60$). _____	10
Figura 1.2 Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (a); Estrutura do poli(3-hidroxiбутирато), PHB (b); Estrutura do poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато), PHBV (c); Adaptado de Williams & Martin. _____	12
Figura 2.1 Esquema da preparação de nano/micropartículas pelo método de extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água. _____	34
Figura 2.2 Esquema dos factores que influenciam as propriedades das partículas produzidas pelo método de extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água. Esquema adaptado de Li et al. _____	36
Figura 2.3 Estrutura química do flurbiprofeno. _____	41
Figura 2.4 Representação esquemática do Desenho Composto Central (DCC). _____	44
Figura 2.5 Resposta de superfície do efeito das concentrações de PHBV e de PVA na eficiência de encapsulação (EE) do flurbiprofeno nas micropartículas de PHBV produzidas. Pontos: valores experimentais. Superfície: modelo quadrático ajustado. _____	53
Figura 2.6 Curvas de distribuição de tamanhos dos onze batches de micropartículas produzidas. _____	56
Figura 2.7 Imagens de SEM de: a) micropartículas de PHBV sem fármaco imobilizado; b) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno; c) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno depois dos ensaios de libertação in vitro. _____	58
Figura 2.8 Curvas de DSC de: a) flurbiprofeno puro; b) micropartículas de PHBV sem fármaco; c) mistura física de flurbiprofeno puro e de micropartículas de PHBV sem fármaco (1:3); d) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno encapsulado. _____	59
Figura 2.9 Perfis de libertação in vitro do flurbiprofeno encapsulado nas micropartículas B1, B9 e B11 (formulação do ponto central: 2.5% PVA e 3% PHBV) e perfis de dissolução do fármaco puro (média \pm DP; $n = 3$) e do fármaco puro fisicamente misturado com micropartículas de PHBV sem fármaco (proporção fármaco: micropartículas de 1:10). _____	60
Figura 3.1 Estrutura química do ácido D-galacturónico (AGal). _____	72
Figura 3.2 Representação esquemática da estrutura básica da pectina. a) Modelo convencional. b) Modelo alternativo (imagem adaptada de Willats et al). _____	74
Figura 3.3 Poli α -(1 \rightarrow 4) (ácido D-galacturónico) parcialmente esterificado com grupos metilo (também designado por Poli α -(1 \rightarrow 4) (metil galacturonato)). _____	75
Figura 3.4 Mecanismos mais comuns de degradação das pectinas (adaptado de Zachariassen). _____	80
Figura 3.5 Modo de actuação de algumas pectinases (adaptado de Alkorta et al): PE – Pectinoesterase (EC 3.1.1.11); PMGL – Poli(metilgalacturonato) liase; PMG – Poli metilgalacturonase; PGL – Poligalacturonato liase (4.2.2.2); PG – Poligalacturonase (EC 3.2.1.15) _____	81
Figura 3.6 Estimativa do peso das diversas aplicações das pectinas no mercado global (adaptado de Zachariassen). _____	83
Figura 3.7 Esquema da modificação da pectina em meio homogéneo. _____	95
Figura 3.8 Esquema da reacção de formação de pectinas amidadas em meio heterogéneo. _____	96
Figura 3.9 Ácido galacturónico anidrido. _____	98
Figura 3.10 Isocianatos utilizados na modificação química da pectina. (a) Metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA). (b) Isocianato de alilo (AI). _____	99
Figura 3.11 Macrómero poli(etilenoglicol) diacrilato (PEGDA), $M_n \sim 700$. _____	99
Figura 3.12 Estrutura química do flurbiprofeno sódico dihidratado ($PM = 302.28$). _____	100
Figura 3.13 Estrutura química do sulfato de gentamicina. _____	100
Figura 3.14 Esquema do desenho de experiências factorial fraccionado 2^{3-1} implementado para investigar a modificação química das pectinas com o reagente AI. _____	102
Figura 3.15 Esquema da reacção de modificação da pectina (exemplificada com o reagente AI). _____	108
Figura 3.16 Espectros FTIR-ATR dos dois tipos de pectina utilizados. _____	112

Lista de Figuras

Figura 3.17 Espectros FTIR-ATR das pectinas A modificadas com o reagente isocianato de alilo (AI): a) Pectina A sem modificações. b) Pectina A-R1 (GS= 4.8). c) Pectina A-R2 (GS = 3.5). d) Pectina A-R3 (GS= 18.3). e) Pectina A-R4 (GS= 22.6).	114
Figura 3.18 Espectros FTIR-ATR das pectinas C modificadas com o reagente isocianato de alilo (AI): a) Pectina C sem modificações. b) Pectina C-R1 (GS= 1.8). c) Pectina C-R2 (GS = 4.7). d) Pectina C-R3 (GS= 2.6). e) Pectina C-R4 (GS= 3.3).	114
Figura 3.19 Espectros FTIR-ATR da Pectina A modificada com o reagente metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA): a) Fração da Pectina A-IMA insolúvel em água (GS= 41.0). b) Fração da Pectina A-IMA solúvel em água (GS= 6.1).	115
Figura 3.20 Espectros $^1\text{H-RMN}$ (em D_2O) das pectinas utilizadas.	116
Figura 3.21 Espectros $^1\text{H-RMN}$ (em D_2O) da pectina A original e dos derivados obtidos por modificação com o reagente AI.	118
Figura 3.22 Cromatogramas SEC dos dois tipos de pectinas utilizadas.	122
Figura 3.23 Cromatogramas SEC das duas pectinas e dos respectivos derivados: a) Pectina A e Pectina A modificada com o reagente AI. b) Pectina C e Pectina C modificada com o reagente AI.	123
Figura 3.24 Cromatogramas da Pectina A e da Pectina A modificada com o reagente IMA (fracção solúvel em água)	124
Figura 3.25 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores investigados sobre o GS da Pectina A. Efeitos positivos (laranja); Efeitos negativos (azul).	125
Figura 3.26 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores investigados sobre o GS da Pectina C. Efeitos positivos (laranja); Efeitos negativos (azul).	125
Figura 3.27 Desenho de experiências factorial 2^2 resultante da projecção dos dois desenhos do tipo factorial fraccionado 2^{3-1} implementados para a pectina A e pectina C.	127
Figura 3.28 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores tipo de pectina, adição de catalisador, e interacção entre eles, sobre o GS das pectinas. Efeitos positivos (laranja).	127
Figura 3.29 Partículas de pectina observadas ao microscópio óptico. A1 e C1: partículas secas de pectina A e pectina C, respectivamente (ampliação 10 \times). A2 e C2: partículas de pectina A e pectina C suspensas em DMSO (ampliação 10 \times). A3 e C3: partículas de pectina A e Pectina C suspensas em DMSO (ampliação 40 \times).	129
Figura 3.30 Representação gráfica do efeito da interacção entre os dois factores qualitativos investigados no GS das pectinas.	131
Figura 3.31 Esquema da preparação, por fotoreticulação, dos hidrogéis de pectina modificada com o reagente AI.	132
Figura 3.32 Perfis do grau de inchaço ao longo do tempo dos hidrogéis de PEGDA, da pectina modificada A-R4 (GS= 22.6), e do hidrogel híbrido de PEGDA e pectina A-R4 (50PEGDA/50A-R4); média \pm DP, n=3.	134
Figura 3.33 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4), e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis: PEGDA; hidrogéis compostos de PEGDA e pectina A-R1 (GS=4.8) em diferentes proporções; hidrogéis compostos de PEGDA e pectina C-R2 (GS=4.7) em diferentes proporções; média \pm DP, n=3.	139
Figura 3.34 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4), e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis produzidos a partir de 50% PEGDA e 50% de pectina A-AI com diferentes graus de substituição: A-R1 (GS= 4.8) e A-R4 (GS= 22.6); média \pm DP, n=3.	140
Figura 3.35 Percentagem mássica de polímero solúvel presente nos hidrogéis de PEGDA, A-IMA, e PEGDA/A-IMA em várias proporções. Comparação com a quantidade de grupos insaturados (acrílicos e metacrílicos) presentes nas soluções precursoras; média \pm DP, n=4.	142
Figura 3.36 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis: PEGDA, 75PEGDA/25A-IMA, 50PEGDA/50A-IMA, 25PEGDA/75A-IMA e A-IMA (GS= 6.1); média \pm DP, n=3.	143

Figura 3.37 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina acidificada (pH 2.0), de dois hidrogéis PEGDA formados na presença de diferentes quantidades do fotoiniciador Irgacure®2959; média ± DP, n=3. _____	144
Figura 3.38 Fotografias dos hidrogéis preparados por fotoreticulação. a) A-IMA; b) 50A-IMA/50PEGDA; c) PEGDA. Da esquerda para a direita: vista superior dos hidrogéis acabados de formar; vista superior dos hidrogéis secos; vista lateral dos hidrogéis acabados de formar; vista lateral dos hidrogéis secos. _____	144
Figura 3.39 Imagens de microscopia electrónica de varrimento da superfície dos hidrogéis: a) A-IMA; b) 75A-IMA/25PEGDA; c) 50A-IMA/50PEGDA; d)25A-IMA/75PEGDA; e)PEGDA. _____	147
Figura 3.40. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de uma secção transversal dos hidrogéis: a) A-IMA; b) PEGDA. _____	148
Figura 3.41 Curvas de libertação in vitro do flurbiprofeno sódico, a partir dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA /50A-IMA e A-IMA, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 7.4); média ± DP, n=3. _____	149
Figura 3.42 Curvas da libertação in vitro do sulfato de gentamicina, a partir dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA /50A-IMA e A-IMA, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 7.4); média ± DP, n=3. _____	150
Figura 3.43 Curvas da libertação in vitro da proteína lisozima: em solução salina tampão fosfato, pH= 7.4 (símbolos a negro); em solução salina tampão acidificada, pH= 2 (símbolos sem preenchimento); média ± DP, n=3. _____	154
Figura 3.44 Curvas da libertação in vitro da proteína BSA: em solução salina tampão fosfato, pH= 7.4 (símbolos a negro); em solução salina tampão acidificada, pH= 2 (símbolos sem preenchimento); média ± DP, n=3. _____	157
Figura 3.45 Resultados de SE-HPLC (A) e SDS-PAGE (B) representativos da degradação da BSA numa solução salina a pH 2 incubada a 37°C. Figuras reproduzidas de Estey et al sem autorização. _____	159
Figura 3.46 Curvas da libertação in vitro da proteína BSA em solução tampão salina fosfato (pH= 7.4): sem a presença de pectinase (símbolos a negro); na presença de pectinase na concentração de 1mg/ml (símbolos sem preenchimento); média ± DP, n=3. _____	161
Figura 4.1 Representação esquemática da formação dos PECs e seus agregados (figura adaptada de Tsuchida). _____	176
Figura 4.2 Esquema da formação dos complexos polielectrolíticos entre a pectina e o quitosano. _____	180
Figura 4.3 Esquema dos procedimentos adoptados na preparação das várias esponjas. _____	185
Figura 4.4 Aspecto das esponjas de pectina/quitosano preparadas por complexação polielectrolítica. _____	189
Figura 4.5 Razão entre a quantidade de grupos carboxílicos e amina (pontos) e percentagem mássica de pectina (barras) nos três PECs preparados a partir de diferentes proporções dos três polissacarídeos. Comparação com os valores teóricos que seria esperado obter se o grau de ionização de ambos os polissacarídeos fosse de 100% e a estequiometria da reacção fosse de 1:1. _____	190
Figura 4.6. Espectros FTIR-ATR de: a)Pectina; b) Quitosano; c) Soma ponderada dos espectros de pectina e quitosano (0.75pectina + 0.25quitosano); c) PECs de pectina e quitosano (pec50/quit50). Lado direito: ampliação da região dos espectros entre 1450 e 1850 cm ⁻¹ . _____	192
Figura 4.7 Espectros FTIR-ATR das esponjas dos PECs de pectina/quitosano produzidos. _____	194
Figura 4.8 Esquema das possíveis reacções da pectina com a carbodiimida solúvel em água EDC. (1) pectina; (2) carbocatião (3) O-acilisoureia; (4) pectina auto-reticulada através de uma ligação éster; (5) ureia; (6) anidrido carboxílico; (7) pectina ligada a grupos N-acilureia estáveis. _____	196
Figura 4.9 Espectros FTIR-ATR dos PECs de pectina/quitosano (linhas a preto) e dos PECs de pectina/quitosano tratados com a carbodiimida EDC (linhas a azul). _____	197
Figura 4.10 Espectros FTIR-ATR de: a) pectina; b) pectina tratada com EDC. _____	198
Figura 4.11 Esquema da possível reacção do quitosano com a carbodiimida EDC. _____	200
Figura 4.12 Espectros FTIR-ATR de: a) quitosano; b) quitosano tratado com EDC. _____	200
Figura 4.13 Capacidade de absorção de água das esponjas de pectina/quitosano (pec75/quit25) em água destilada, solução salina tampão acidificada (pH 2), solução salina tampão acetato (pH 4.5), e solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média ± DP; n=3. _____	201

Lista de Figuras

Figura 4.14 Capacidade de absorção de água das esponjas Quitosano-edc e Pectina-edc em água destilada, solução salina tampão acidificada (pH 2), solução salina tampão acetato (pH 4.5), e solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP; n=3. _____	202
Figura 4.15 Perda de massa ao longo do tempo dos PECs (pec50/quit50) e dos PECs tratados com EDC (pec50/quit50_edc) quando mergulhados numa solução salina tampão acidificada (pH 2) ou numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP, n=3. _____	203
Figura 4.16 Espectros FTIR-ATR dos PECs (pec50/quit50) após se terem encontrado mergulhados, durante 0, 0.5, 1, 2, 4 e 6 semanas, em: a) Solução salina tampão fosfato (pH 7.4); b) Solução salina tampão acidificada (pH 2). _____	205
Figura 4.17 a) Razão entre a intensidade das bandas 1737 e 1593cm ⁻¹ , nos espectros FTIR-ATR das esponjas pec50/quit50, em função do tempo de degradação, a pH2 e pH 7.4. b) Razão entre a quantidade de azoto e carbono presente nas esponjas pec50/quit50 em função do tempo de degradação, a pH 2 e pH 7.4. _____	206
Figura 4.18 Espectros FTIR-ATR dos PECs tratados com EDC (pec50/quit50_edc) após se terem encontrado mergulhados, durante 0, 0.5, 1, 2, 4 e 6 semanas, em: a) Solução salina tampão fosfato (pH 7.4); b) Solução salina tampão acidificada (pH 2). _____	208
Figura 4.19 Perda de massa ao longo do tempo das esponjas pectina-edc e quitosano-edc quando mergulhados numa solução salina tampão acidificada (pH 2) ou numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP, n=3. _____	209
Figura 4.20 Imagens de microscopia electrónica de varrimento de: a) Esponjas de PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50); b) Esponjas de PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (pec50/quit50_edc); c) Esponjas Pectina-edc; d) Esponjas Quitosano-edc. Ampliações (da esquerda para a direita): $\times 35$; $\times 200$; $\times 1000$. _____	211
Figura 4.21 Imagens de microscopia electrónica de varrimento das esponjas de PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50) em diferentes tempos de degradação: a) Esponja antes do ensaio de degradação (semana 0); b) 2 semanas; c) 4 semanas; d) 6 semanas. Coluna da direita: esponjas mergulhadas em solução tampão fosfato (pH 7.4). Coluna da esquerda: esponjas mergulhadas em solução tampão acidificada (pH 2). Ampliação: $\times 200$. _____	212
Figura 4.22 Curvas termogravimétricas de: a) Esponjas de pectina e pectina-edc. b) Esponjas de quitosano e quitosano-edc. _____	213
Figura 4.23 Curvas termogravimétricas de: a) Esponjas dos complexos pec25/quit75 e pec25/quit75_edc. b) Esponjas dos complexos pec75/quit25 e pec75/quit25_edc. Comparação com as curvas termogravimétricas das esponjas de pectina e esponjas de quitosano (não tratadas com EDC). _____	214
Figura 4.24 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas de pectina-edc. c) Esponjas de quitosano. d) Esponjas de quitosano-edc. _____	216
Figura 4.25 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas dos PECs pec25/quit75. c) Esponjas dos PECs pec25/quit75_edc. d) Esponjas de quitosano. _____	218
Figura 4.26 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas dos PECs pec75/quit25. c) Esponjas dos PECs pec75/quit25_edc. d) Esponjas de quitosano. _____	218
Figura 4.27 Curvas da libertação in vitro da proteína BSA a partir das esponjas pec75/quit25_edc: em solução tampão fosfato, pH= 7.4; em solução tampão acidificada, pH ~2. _____	219

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de SLC. _____	5
Tabela 1.2 Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de SLC. _____	8
Tabela 1.3 Principais propriedades do quitosano enquanto biomaterial. _____	11
Tabela 1.4 Vários critérios utilizados para classificar os hidrogéis. _____	18
Tabela 2.1 Resumo dos artigos publicados na literatura científica, desde 1997 a 2010, relativos à imobilização de compostos bioativos em nano/micropartículas de PHB e PHBV. _____	39
Tabela 2.2. Níveis codificados e valores reais dos factores investigados. _____	44
Tabela 2.3 Lista de reagentes utilizados. _____	45
Tabela 2.4 Valores das respostas investigadas com o DCC. _____	50
Tabela 2.5 Resumo dos modelos ajustados às variáveis dependentes. _____	51
Tabela 2.6 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas na EE (Y_1). _____	52
Tabela 2.7 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no factor SPAN das partículas produzidas (Y_3). _____	55
Tabela 2.8 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no tamanho médio das micropartículas produzidas (Y_2). _____	57
Tabela 2.9 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no tempo de libertação in vitro de 50% do fármaco encapsulado, $t_{50\%}$ (Y_4). _____	61
Tabela 3.1 Composição típica das pectinas comerciais, representada em percentagem de massa seca. _____	75
Tabela 3.2 Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura sobre a utilização de pectina no desenvolvimento de sistemas de libertação específica no cólon. _____	85
Tabela 3.3 Características das pectinas utilizadas. _____	98
Tabela 3.4 Algumas características das proteínas modelo investigadas. _____	101
Tabela 3.5 Factores e níveis seleccionados para construir o desenho factorial fraccionado 2^{3-1} , utilizado para investigar a modificação química da pectina com o reagente AI. _____	101
Tabela 3.6 Lista dos reagentes utilizados. _____	102
Tabela 3.7 Resposta (grau de substituição, GS) obtida para a Pectina A. _____	109
Tabela 3.8 Resposta (grau de substituição, GS) obtida para a Pectina C. _____	110
Tabela 3.9. GS da fracção solúvel e da fracção insolúvel (em água) da pectina A modificada com o reagente IMA. _____	110
Tabela 3.10 Bandas dos espectros FTIR-ATR da pectina e da pectina modificada. _____	113
Tabela 3.11 Pesos moleculares médios, mássicos (M_w) e numéricos (M_n), da pectina A, pectina C, e diferentes derivados, determinados por SEC. _____	122
Tabela 3.12 Análise ANOVA para o grau de substituição, obtida a partir do desenho de experiências factorial 2^2 . _____	128
Tabela 3.13 Resultados do ajuste da equação de Ritger-Peppas às curvas de inchaço dinâmico dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA/A-R4, e A-R4, nos dois meios aquosos investigados. _____	137
Tabela 3.14 Resultados do ajuste da equação de Ritger-Peppas às curvas de libertação in vitro, numa solução salina tampão fosfato (pH= 7.4), dos fármacos flurbiprofeno sódico e sulfato de gentamicina. _____	153
Tabela 4.1 Lista dos reagentes utilizados. _____	181
Tabela 4.2 Especificações da pectina e quitosano utilizados. _____	181
Tabela 4.3 Atribuição das bandas nos espectros de FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs. _____	193
Tabela 4.4 Características das curvas termogravimétricas das várias esponjas. _____	215
Tabela 4.5 Parâmetros das transições de primeira ordem, exotérmicas e endotérmicas, observadas nas curvas de DSC das esponjas produzidas. _____	216

Lista de Tabelas

<i>Tabela A.3.2.1 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio, e Enxofre, presentes na Pectina A, e nas pectinas modificados com o reagente isocianato de alilo(AI) em diferentes condições reaccionais referidas na Tabela 3.7 (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>240</i>
<i>Tabela A.3.2.2 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio, e Enxofre, presentes na Pectina C e nas pectinas modificados com o reagente isocianato de alilo (AI), em diferentes condições reaccionais referidas na Tabela 3.8 (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>240</i>
<i>Tabela A.3.2.3 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes na Pectina A e nos derivados modificados com o reagente metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA) (média \pmDP; n= 3)....</i>	<i>240</i>
<i>Tabela A.4.1.1 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre, presentes na pectina e quitosano utilizados na preparação das esponjas (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>241</i>
<i>Tabela A.4.1.2 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre, presentes nas esponjas pectina-edc e quitosano-edc.....</i>	<i>241</i>
<i>Tabela A.4.1.3 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre nos PECs de pectina/quitosano (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>241</i>
<i>Tabela A.4.1. 4 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre nos PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>241</i>
<i>Tabela A.4.1.5 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono e Hidrogénio nos PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50) para os diferentes tempos de degradação, em solução tampão salina fosfato (pH 7.4) e solução salina tampão acidificada (pH 2), (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>242</i>
<i>Tabela A.4.1.6 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono e Hidrogénio nos PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (pec50/quit50_edc) para os diferentes tempos de degradação, em solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina tampão acidificada (pH 2), (média \pmDP; n= 3).....</i>	<i>242</i>

Lista de Abreviaturas

AGla	Ácido galacturónico
AGlAn	Ácido galacturónico anidro
AI	Isocianato de alilo
BSA	Albumina de soro bovino
DBTDL	Dilaurato de dibutilo de estanho
DCC	Desenho composto central
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) HCl
EE	Eficiência de Encapsulação
EES	Extracção/evaporação do solvente
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada
GA	Grau de acetilação
GE	Grau de esterificação
GS	Grau de substituição
H-RMN	Ressonância magnética nuclear de protão
IMA	Metacrilato de 2-isocianoetilo
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
O/W	Emulsão óleo/água
PCa	Pectinato de cálcio
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PEC	Complexo polielectrolítico
Pectina A	Pectina de resíduos de maçã
Pectina ABGE	Pectina amidada de baixo grau de esterificação
Pectina BGE	Pectina de baixo grau de esterificação
Pectina C	Pectina de resíduo de frutos cítricos
Pectina EGE	Pectina de elevado grau de esterificação
PEG	Polietilenoglicol
PEGDA	Polietilenoglicol diacrilato

Lista de Abreviaturas

PEGDMA	Poli(etilenoglicol dimetacrilato)
PEL	Polieletrólito
PHAs	Polihidroxicanoatos
PHB	Poli(3-hidroxicutirato)
PHBV	Poli(3-hidroxicutirato-co-3-hidroxicvalerato)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Álcool polivinílico
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanhos
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
SLC	Sistema de liberação controlada
TBA	Tetrabutílamônio
TGA	Termogravimetria
UV	Luz ultravioleta

Preâmbulo

Ao longo deste trabalho procurou-se desenvolver e caracterizar três potenciais sistemas de libertação controlada de fármacos. Estes sistemas, com diferentes propriedades e potenciais aplicações, têm em comum o facto de serem constituídos por polímeros de origem natural.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos.

No Capítulo 1 faz-se um enquadramento geral do trabalho experimental apresentado nos capítulos posteriores através da abordagem sucinta de vários tópicos relacionados com os sistemas de libertação controlada de fármacos. Nomeadamente define-se o que se entende por um sistema de libertação controlada de fármacos e discute-se o papel que os materiais de base polimérica têm nesta área, dando-se especial atenção aos polímeros de origem natural e aos seus derivados.

Os Capítulos 2, 3 e 4 são dedicados à apresentação do trabalho experimental efectuado no desenvolvimento dos três sistemas de libertação controlada estudados, aos resultados obtidos e à discussão destes. Cada um destes capítulos é iniciado por uma introdução teórica, onde são apresentados e discutidos alguns aspectos importantes directamente relacionados com o trabalho experimental apresentado nesse mesmo capítulo.

O Capítulo 2 é dedicado ao primeiro dos sistemas investigados e envolve a imobilização de um fármaco hidrofóbico em micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) preparadas pelo método da extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água.

No Capítulo 3 apresentam-se e discutem-se os resultados referentes aos estudos da modificação química do polissacarídeo pectina, à formação de hidrogéis químicos de pectina com base nos derivados obtidos, e à investigação dos hidrogéis preparados enquanto potenciais sistemas de libertação controlada de fármacos.

No Capítulo 4 descreve-se a preparação e caracterização de esponjas bioerodíveis/biodegradáveis compostas por pectina e quitosano e obtidas a partir da liofilização dos complexos polielectrolíticos formados entre estes dois polissacarídeos.

Preâmbulo

Finalmente, no Capítulo 5, fazem-se algumas considerações sobre o trabalho efectuado e apresentam-se sugestões para o desenvolvimento e estudos futuros dos três sistemas apresentados.

Capítulo 1

Introdução Geral

Neste capítulo pretende-se apresentar e enquadrar, dentro da área mais alargada dos sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos, os SLC preparados com base em polímeros de origem natural.

Desta forma, nesta Introdução Geral começa-se por definir o que se entende por um SLC, abordando-se de seguida os SLC de base polimérica e, em particular, os SLC com base em polímeros de origem natural. Aqui apresentam-se as principais classes de polímeros naturais utilizados na preparação de SLC, as suas propriedades, e as várias aplicações que cada uma destas classes encontra na área da libertação controlada de fármacos.

1.1 Libertação controlada de fármacos

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

A libertação controlada de fármacos tem como objectivo principal o controlo temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados¹. Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioactivos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético.

A libertação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de (i) controlar, de forma pré-determinada, a taxa de libertação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou (ii) conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve actuar. Estes sistemas são designados assim por sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos.

Materiais de natureza lipídica^{2, 3}, inorgânica⁴⁻⁶ e polimérica^{1, 7-12} têm sido utilizados como suportes de SLC. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados.

Os SLC são classificados de acordo com os mais variados critérios, incluindo a classe de materiais utilizados (poliméricos ou não poliméricos), tipo de agente

terapêutico incorporado no SLC (moléculas de baixo peso molecular, proteínas, material genético), estado físico (líquidos, semi-sólidos ou sólidos), via de administração, forma como o fármaco se encontra imobilizado no sistema e a natureza do mecanismo que controla a libertação deste, etc. Na literatura, é possível encontrar inúmeros livros e artigos de revisão sobre SLC⁸⁻¹⁷.

O desenvolvimento de um SLC eficaz é um empreendimento complexo, pois envolve o conhecimento e integração de uma série de aspectos de natureza diversa, tais como:

- As propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco.
- A via de administração e as conseqüentes barreiras fisiológicas e bioquímicas impostas à absorção do fármaco.
- As propriedades do material/materiais base do SLC: propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, comportamento *in vivo*, interações com o fármaco, etc.
- Os métodos e tecnologias envolvidas na produção do SLC.

Estas várias vertentes envolvem o domínio de conhecimentos associados a áreas científicas como a medicina, farmácia, bioquímica, química, engenharia e outras. Por esta razão, a área da libertação controlada de fármacos é considerada uma área inerentemente interdisciplinar.

1.2 Sistemas de libertação controlada de base polimérica

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento de SLC. De facto, o desenvolvimento actual de novos SLC mais sofisticados e eficientes anda a par com o desenvolvimento de novos polímeros, desenhados para ter propriedades cada vez mais específicas⁸.

Uma grande variedade de polímeros, sintéticos, naturais ou semi-sintéticos, pode encontrar aplicações no desenvolvimento de SLC. Na Tabela 1.1 encontram-se listados alguns dos polímeros sintéticos mais utilizados e investigados nesta área.

Um requisito fundamental para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de um SLC é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos, e que apresentem uma boa biocompatibilidade, pelo menos nos tecidos com que vão ter contacto directo.

Como os sistemas vivos são compostos maioritariamente por água, as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas dos polímeros são também um aspecto fundamental a ter em conta na altura de seleccionar um polímero para uma aplicação específica.

Outra propriedade determinante na viabilidade de um polímero para uma determinada aplicação é a forma como este se degrada (ou não) *in vivo*, ou seja, se este é biodegradável ou não biodegradável. Um polímero biodegradável pode ser definido como um polímero que sofre degradação química *in vivo*, por hidrólise ou acção enzimática, originando produtos não tóxicos e bicompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais¹³. Os poliésteres, polifosfazenos, poliortoésteres, poliaminoácidos, polianidridos e as poliuretanas são exemplos de classes de polímeros sintéticos biodegradáveis utilizados na construção de SLC.

Alguns polímeros podem ainda ser classificados de bioerodíveis, sendo estes definidos como polímeros que, embora não sofram uma degradação química (quer por via hidrolítica ou enzimática) são susceptíveis de serem dissolvidos em condições fisiológicas. Dependendo das suas propriedades, nomeadamente do peso molecular, estes podem ser excretados ou permanecer no organismo.

Tabela 1.1 Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de SLC^{1,13}.

Polímeros não biodegradáveis

- Acrilatos: poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(ácido acrílico) (PA), poli(metacrilato de 2-hidroxiétilo) (PHEMA), ...
- Acrilamidas: poli(acrilamida), poli(*N*-isopropilacrilamida)
- Polidimetilsiloxano (PDMS)
- Polietilenoglicol (PEG)
- Copolímeros de acetato de etilenovinil (EVA)
- Polivinilpirrolidona (PVP)

Polímeros biodegradáveis

- Poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PLC), poli(diaxanona) (PDS)
 - Poliortoésteres
 - Polifosfazenos
 - Polianidridos
 - Poliuretanas
 - Poliaminoácidos sintéticos
-

Os SLC preparados a partir de materiais poliméricos podem ser classificados em três grandes categorias, de acordo com o mecanismo/princípio que governa a

libertação do fármaco¹⁷: (i) Sistemas de libertação controlados por difusão; (ii) Sistemas de libertação activados pelo solvente; (iii) Sistemas de libertação controlados por acção química.

Os sistemas de libertação controlados por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais.

Um SLC reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo de fármaco, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável, através da qual o fármaco se difunde lentamente. Geralmente, estes dispositivos assumem uma geometria esférica, cilíndrica ou na forma de disco. As propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, conseqüentemente, a taxa de libertação do fármaco.

Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de libertação controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz.

Os sistemas de libertação activados pelo solvente encontram-se também divididos em dois tipos - sistemas de libertação controlados pela pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água (*swelling*).

O mais simples sistema de libertação controlado pela pressão osmótica consiste num reservatório de volume constante constituído por um invólucro de uma membrana polimérica semi-permeável (permeável ao solvente mas não ao soluto), com um orifício, e com o interior cheio com o fármaco no estado sólido e uma solução saturada de fármaco. A pressão osmótica, formada devido à diferença de concentrações do fármaco no exterior e interior da membrana semi-permeável, origina um fluxo de fluido (água) do exterior para interior do dispositivo, forçando desta forma a solução saturada no interior a sair pelo orifício presente na membrana.

Nos sistemas de libertação controlados pela absorção de água o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolverem sendo que, nestes sistemas, a taxa de libertação do fármaco é essencialmente controlada pela taxa de absorção de água da matriz polimérica.

Os sistemas de libertação controlados por acção química são normalmente divididos em sistemas de cadeias pendentes e em sistemas biodegradáveis.

Nos sistemas de cadeias pendentes, também designados de pró-fármacos, as moléculas de fármaco encontram-se quimicamente ligadas à cadeia de polímero por ligações susceptíveis de degradação. *In vivo*, estas ligações são quebradas por hidrólise ou por acção enzimática, originando assim a libertação do fármaco a uma taxa controlada.

Nos sistemas biodegradáveis, o fármaco é disperso ou dissolvido numa matriz polimérica biodegradável, sendo a taxa de libertação controlada pela desintegração da matriz, provocada pela biodegradação do polímero.

Refira-se que, na prática, alguns SLC não encaixam perfeitamente em nenhuma destas três categorias, pois em muitos casos não existe um mecanismo dominante responsável pela libertação do fármaco, sendo este determinado por uma combinação dos vários mecanismos possíveis. Exemplos são alguns sistemas matriciais biodegradáveis em que a libertação controlada do fármaco é controlada tanto pela difusão do fármaco como pela biodegradação do polímero ou, em alguns hidrogéis, em que a libertação do fármaco é determinada tanto pela taxa de absorção de água como pela taxa de difusão do polímero através da matriz inchada pelo solvente.

1.3 Polímeros de origem natural e seus derivados: aplicações na área da libertação controlada de fármacos

Os polímeros naturais são polímeros produzidos por organismos vivos. Estes incluem as proteínas, os ácidos ribonucleicos (ARN) e ácidos desoxirribonucleicos (ADN), os polissacarídeos, e outros polímeros como a borracha natural e alguns poliésteres. Os derivados de polímeros naturais, também designados por semi-sintéticos, são polímeros naturais modificados quimicamente.

Tal como os polímeros sintéticos, os polímeros naturais e seus derivados são também bastante utilizados na produção de SLC.

Na Tabela 1.2 encontram-se listados alguns dos polímeros naturais e derivados com mais interesse na área da libertação controlada de fármacos. Estes

podem ser divididos em três grandes classes: polímeros de base proteica, polissacarídeos e polihidroxialcanoatos.

Tabela 1.2 Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de SLC.

Polímeros de base proteica:

- Gelatina, albumina, colagénio, fibrina, proteína de soja, ...

Polissacarídeos:

- Quitosano, dextrano, alginato, agarose, carragenina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, pectina, amido, derivados de celulose,

Polihidroxialcanoatos

Poli(3-hidroxi butirato), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato),

1.3.1 Polímeros de base proteica

Os polímeros de base proteica encontram uma extensa aplicação na área da libertação controlada de fármacos. Dos mais utilizados e investigados, encontram-se algumas proteínas de origem animal como a albumina, a fibrina, o colagénio e a gelatina^{10, 18-26}, esta última obtida a partir da desnaturação química do colagénio.

Proteínas de origem vegetal, como é o caso da proteína de soja, ou de poliaminoácidos produzidos por microrganismos, como o poli(ϵ -L-lisina) e o poli(γ -ácido glutâmico), têm sido também investigados na preparação de SLC, mas de uma forma muito mais limitada²⁷⁻³¹.

Inúmeros sistemas à base de albumina²³, fibrina^{22, 26}, colagénio^{18, 21}, e gelatina²⁰, processados na forma de géis injectáveis, filmes, hidrogéis, esponjas, fibras e nano- e micropartículas, têm sido preparados e investigados enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos de baixo peso molecular, factores de crescimento, proteínas terapêuticas^{10, 24} e DNA¹⁹.

Os polímeros mencionados acima, para além de serem biocompatíveis e biodegradáveis por hidrólise química ou acção enzimática, apresentam muitas vezes uma arquitectura e propriedades químicas, físicas e mecânicas semelhantes à matriz extracelular, podendo até conter resíduos químicos reconhecidos pelas células e aos quais elas respondem²⁶. Estas características fazem com que estes materiais exibam propriedades bioactivas únicas e com grande interesse para a ciência dos biomateriais, especialmente na área da engenharia de tecidos.

Contudo, e devido à origem animal da maioria destes materiais, estes têm sempre associados a si o risco de imunogenicidade e de transmissão de vectores patogénicos. Uma estratégia para superar estes riscos consiste no desenvolvimento de tecnologias que permitam a obtenção destas proteínas através de fontes não animais. Isto já é possível através da tecnologia recombinante de proteínas. Alguns tipos de colagénio humano e gelatina já foram expressos em diferentes tipos de células e sistemas transgénicos³² e, possivelmente, o futuro destas proteínas, enquanto biomateriais, encontrar-se-á ligado ao desenvolvimento destas tecnologias.

1.3.2 Polissacarídeos

A enorme diversidade de estruturas químicas e de propriedades físicas exibidas pelos polissacarídeos tem sido extensivamente explorada no desenvolvimento de um grande número de sistemas de libertação de fármacos destinados às mais diversas aplicações.

Um elevado número de polissacarídeos, sintetizados por animais, plantas e microrganismos, já foram utilizados. Na Tabela 1.2 são referidos alguns dos mais investigados.

O que torna esta classe de polímeros naturais tão atractiva, para além da sua abundância e fácil obtenção, é a biodegradabilidade, a biocompatibilidade e a actividade biológica exibida por muitos dos seus membros. Para além disto, muitos polissacarídeos possuem uma série de propriedades reológicas atractivas como, por exemplo, a capacidade de gelificar em certas condições físicas e químicas³³. A isto somam-se a facilidade de processamento destes nas mais diversas formas (filmes, partículas, fibras, cápsulas, etc), e a disponibilidade de um grande número de grupos funcionais, nomeadamente grupos hidroxilo, o que possibilita que estes polímeros possam ser sujeitos facilmente a um grande número de modificações químicas.

No contexto desta introdução é impossível, mesmo que sucintamente, falar de todos os polissacarídeos que se destacam na área da libertação controlada de fármacos, devido seu grande número e à diversidade de aplicações que proporcionam. Na literatura é possível reunir facilmente uma extensa bibliografia acerca deste tema^{19, 33, 34}.

Algumas propriedades e aplicações do quitosano, um dos polissacarídeos utilizados na preparação dos SLC desenvolvidos neste trabalho, são apresentadas de seguida. Para o outro polissacarídeo utilizado neste trabalho, a pectina, optou-se por fazer uma abordagem mais alargada acerca das suas propriedades e aplicações. Esta será apresentada no início do Capítulo 3.

A quitina, o polissacarídeo a partir do qual o quitosano é obtido, é um polímero linear, constituído maioritariamente por resíduos de (1→4)-2-acetamida-2-desoxi-β-D-glucopiranosose (GlcNAc)^{33, 35}. Este polissacarídeo, que se organiza numa estrutura cristalina altamente ordenada, é sintetizado por um grande número de organismos, nomeadamente por animais que possuem exoesqueleto. A quitina é insolúvel em solventes aquosos e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo esta característica o principal factor limitante à sua utilização.

O quitosano, Figura 1.1, é obtido através da desacetilação da quitina em meio alcalino. Geralmente designa-se por quitosano todos os derivados da quitina que apresentam um grau de acetilação (GA) inferior a 40%. Alguns autores propõem a classificação de quitina ou quitosano com base, não no grau de acetilação, mas na solubilidade numa solução aquosa de ácido acético, considerando que o quitosano é solúvel numa solução de ácido acético 0.1M e a quitina insolúvel nessa mesma solução³⁵.

A solubilidade em soluções aquosas ácidas e a insolubilidade em soluções aquosas neutras ou básicas é uma característica bem conhecida do quitosano, isto porque a sua solubilização é promovida pela protonação dos grupos NH₂³⁵.

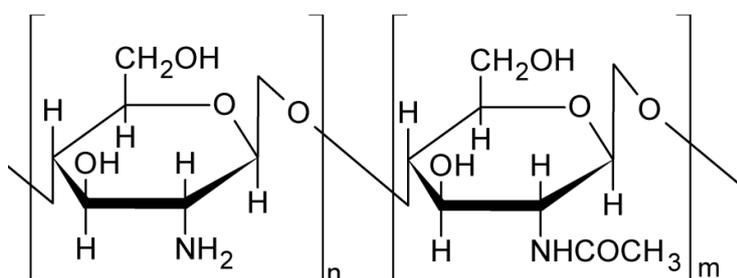


Figura 1.1 Estrutura química do quitosano (n>60).

Ao longo das últimas décadas o quitosano e os seus derivados químicos têm sido intensivamente investigados e utilizados enquanto biomateriais^{34, 36-43}. Este é, sem dúvida, o polissacarídeo mais investigado em aplicações biomédicas e

farmacêuticas. O grande interesse que o quitosano desperta advém das muitas propriedades atractivas por ele exibidas. Na Tabela 1.3 encontram-se listadas algumas dessas propriedades.

Tabela 1.3 Principais propriedades do quitosano enquanto biomaterial.

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

As propriedades acima indicadas têm sido exploradas no desenvolvimento de uma série de aplicações farmacêuticas e biomédicas, tais como *scaffolds*^{38, 44}, *wound dressings*^{45, 46} e sistemas de libertação controlada de fármacos. Nesta última área de aplicação, o quitosano e os seus derivados têm sido processados na forma de géis, hidrogéis, partículas, nano- e micropartículas, filmes, esponjas e comprimidos, com os mais variados agentes terapêuticos incorporados. Estes veículos têm sido investigados, *in vitro* e *in vivo* enquanto SLC administrados por via oral, ocular, nasal, subcutânea e transdérmica^{37, 39, 41, 43}.

1.3.3 Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de poliésteres produzidos por uma grande variedade de microorganismos⁴⁷⁻⁵⁴. A estrutura geral destes poliésteres é apresentada na Figura 1.2a⁴⁷. Presentemente, conhecem-se mais de 100 monómeros diferentes que podem incorporar a estrutura dos PHAs⁵¹. No entanto apenas cerca de meia dúzia destes polímeros são produzidos à escala industrial através de processos biotecnológicos⁴⁸.

Os PHAs investigados em aplicações biomédicas incluem o poli(3-hidroxiбутирато), PHB, o poli(3-hidroxiбутирато-*co*-3-hidroxiуалерато), PHBV, o poli(4-hidroxiбутирато), o poli(3-hidroxiбутирато-*co*-4-hidroxiбутирато) e o poli(3-hidroxiоктаноато-*co*-3-hidroxiуексаноато)⁴⁷.

Devido às suas propriedades, incluindo a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, estes polímeros apresentam grandes potencialidades enquanto biomateriais, sendo considerados como uma alternativa promissora aos vários poliésteres sintéticos utilizados actualmente na produção de vários dispositivos biomédicos, como por exemplo, o poli(ácido láctico) e o poli(ácido láctico-*co*-glicólico).

Por serem até há poucos anos os únicos PHAs produzidos a nível industrial, o PHB (Figura 1.2b) e o seu copolímero PHBV (Figura 1.2c), são presentemente os PHA melhor caracterizados (nomeadamente a nível da sua biocompatibilidade) e simultaneamente os mais investigados na área biomédica^{47, 50-52}.

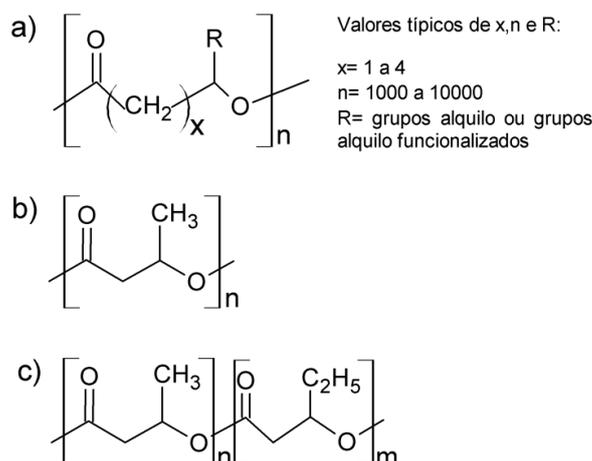


Figura 1.2 Estrutura geral dos polihidroxicanoatos (a); Estrutura do poli(3-hidroxi-*butirato*), PHB (b); Estrutura do poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*), PHBV (c); Adaptado de Williams & Martin⁴⁷.

Devido à diversidade estrutural, a família dos PHAs é composta por poliésteres com propriedades mecânicas e térmicas muito variadas, que incluem desde polímeros termoplásticos com elevado grau de cristalinidade (como é o caso do PHB e PHBV) até polímeros com propriedades típicas de elastómeros⁵³.

O PHB é um polímero isotático perfeito, com um elevado grau de cristalinidade, consideravelmente rígido e duro, com uma resistência à tracção comparável com a do polipropileno isotático e com uma temperatura de fusão entre 160 e 180°C⁵³.

O copolímero PHBV apresenta um grau de cristalinidade e uma temperatura de fusão inferior à do PHB^{52, 53}. A introdução do comonómero hidroxivalerato (HV) é responsável pelas propriedades mecânicas mais atractivas deste copolímero relativamente ao homopolímero PHB (i.e., aumento da elasticidade e resistência (*toughness*) acompanhado pela diminuição da rigidez)^{52, 53}. Estas propriedades são controladas pela percentagem de HV no polímero. Adicionalmente, o PHBV é um polímero piezoeléctrico, o que lhe confere um grande potencial em aplicações na área da regeneração óssea, pois sabe-se que a estimulação eléctrica promove a regeneração do tecido ósseo^{47, 52}.

A biodegradabilidade do PHB e PHBV, *in vitro* e *in vivo*, tem sido alvo de vários estudos, por vezes com resultados contraditórios. Contudo, parece claro que a degradação destes dois polímeros, *in vitro* ou *in vivo*, é significativamente mais lenta do que a degradação dos análogos PLA e PLGA, processando-se esta maioritariamente por erosão da superfície, ao contrário do que acontece nos sistemas compostos por PLA e PLGA, onde a erosão na massa representa o principal mecanismo de degradação^{47, 52}. Os estudos *in vitro* evidenciam também que a degradação do PHB se processa de forma mais lenta do que a do seu co-polímero PHBV. No entanto não parece existir uma correlação directa e evidente entre o aumento da taxa de degradação e o aumento do conteúdo de HV⁵².

Um aspecto que tem um impacto profundo na taxa de degradação é a forma como o polímero é processado. Técnicas de processamento em que os sistemas produzidos apresentam uma baixa porosidade e em que o polímero se encontra num estado altamente cristalino originam sistemas com uma taxa de degradação mais lenta, devido a uma maior resistência ao ataque hidrolítico⁵². Obviamente que outro aspecto que influencia significativamente a taxa de degradação é a área superficial dos sistemas fabricados. Pensa-se que, *in vivo*, e para além da degradação hidrolítica, outros factores contribuem também para a degradação destes polímeros, como a presença de enzimas, de radicais livres, de lípidos, de peróxidos e a actividade de fagocitose das células^{47, 52}.

Na literatura, um período de tempo entre 24 a 30 meses é referido como o tempo típico que um sistema de PHB demora a ser completamente absorvido *in vivo*⁴⁷.

Os PHAs já foram investigados no desenvolvimento de uma série de dispositivos biomédicos. Alguns exemplos incluem o fabrica de válvulas, *grafts* vasculares e *stents*, para aplicações cardiovasculares, e implantes e dispositivos de fixação, para aplicações ortopédicas^{47, 51}. Alguns destes dispositivos já se encontram disponíveis comercialmente⁵⁵.

Também na área da engenharia de tecidos os PHAs são um material bastante promissor. *Scaffolds* compósitos de PHAs e de hidroxiapatite, ou de vidro bioactivo, têm sido investigados para a reparação e regeneração de tecido ósseo. Igualmente, mas embora em menor escala, diferentes matrizes de vários PHAs foram já investigadas como suporte na regeneração de tecidos moles, como por exemplo na reparação de lesões no tracto gastrointestinal⁴⁷.

O potencial do PHB e PHBV enquanto matrizes para a libertação controlada de fármacos tem sido igualmente alvo de vários estudos desde o início dos anos 80^{47, 50, 52}. Estes foram investigados sobretudo com o intuito de preparar sistemas de libertação controlada de longa duração de, principalmente, drogas anticancerígenas⁵⁶⁻⁵⁹, antibióticos⁶⁰⁻⁶⁵ e esteróides⁶⁶⁻⁶⁹. Com este objectivo estes polímeros têm sido processados através de várias técnicas na forma de implantes ou de nano- e micropartículas destinadas a serem injectadas por via intramuscular ou intra-venosa. Sem dúvida a maior parte da investigação têm-se focado na produção de nano/micropartículas destes dois polímeros enquanto sistemas de libertação controlada. Uma revisão da literatura sobre SLC de nano/micropartículas de PHB e de PHBV é apresentada no Capítulo 2.

Uma das principais conclusões que se pode retirar ao longo destes anos de investigação sobre SLC construídos à base de PHB e PHBV é que, para a grande maioria dos sistemas preparados, a libertação do fármaco encapsulado é inteiramente controlada por processos difusionais e não pela degradação do polímero, uma vez que a totalidade do fármaco é normalmente libertada num tempo demasiado curto para que a degradação do polímero tenha um papel significativo no controlo da libertação deste^{47, 52}.

1.3.4 Derivados de polímeros naturais

Os polímeros naturais de base proteica e os polissacarídeos têm sido alvo das mais variadas modificações químicas. Por possuírem inúmeros grupos funcionais,

principalmente grupos hidroxilo (OH), ácido carboxílico (COOH) e amino (NH₂), é relativamente fácil alterar a sua estrutura química e introduzir nesta outras funcionalidades desejadas. Estas modificações têm sempre o intuito de modificar e/ou melhorar algumas das propriedades físicas, químicas e biológicas do polímero natural. Estas estratégias permitem assim obter, a partir dos polímeros naturais originais, uma enorme variedade de materiais com propriedades únicas, desenhadas e desenvolvidas especificamente para a aplicação a que se destinam, e que simultaneamente conservam, em menor ou maior grau, as propriedades originais específicas dos polímeros naturais.

Muitas das modificações introduzidas nos polímeros naturais têm o intuito de melhorar as propriedades mecânicas, de alterar o carácter hidrofóbico/hidrofílico, de melhorar a bicompatibilidade, e de controlar a biodegradabilidade destes materiais³⁴. Normalmente estas modificações envolvem uma ou mais das seguintes estratégias:

- Modificação ou alteração da quantidade de grupos funcionais.
- Acoplamento de novas entidades químicas, através da reacção dos grupos funcionais com os mais variados compostos químicos.
- Introdução de cadeias de polímeros sintéticos, através de copolimerizações de enxerto.
- Auto-reticulação ou reticulação com outros polímeros por meio de variados reagentes químicos.

Na literatura é possível encontrar um enorme número de trabalhos dedicados à modificação química de inúmeros polissacarídeos e de polímeros de base proteica e à investigação dos derivados assim obtidos na preparação dos mais variados sistemas de libertação controlada.

Por exemplo, a modificação química do quitosano tem sido intensamente investigada. Esta envolve normalmente reacções com o grupo NH₂, na posição C-2, ou com os grupos OH, nas posições C-3 e C-6³⁴. Na literatura é ainda possível encontrar vários artigos de revisão sobre os muitos derivados de quitosano preparados bem como as suas potenciais aplicações na área da libertação controlada de fármacos^{34, 36, 37, 39, 42, 70-72}.

Dos muitos derivados investigados referem-se dois exemplos com grandes potencialidades na construção de SLC: os quitosanos quaternizados e os carboximetilquitosanos.

Os quitosanos quaternizados, como por exemplo o cloreto de *N,N,N*-trimetilquitosano, são derivados de quitosano com uma elevada densidade de carga eléctrica positiva. Ao contrário do quitosano, estes derivados são solúveis tanto a pH ácido como básico. Simultaneamente, apresentam excelentes propriedades mucoadesivas e aumentam significativamente a permeação/absorção de fármacos através de vários tecidos de natureza mucosa⁷⁰.

Os carboximetilquitosanos, nomeadamente o *O*- e o *N*-carboximetilquitosano, constituem outro tipo de derivados que apresentam uma excelente biocompatibilidade e propriedades químicas e físicas únicas, derivadas da sua natureza polianfotérica⁷².

Quando, na área da libertação de fármacos, se fala de derivados de polímeros naturais, é impossível não referir os derivados da celulose, nomeadamente alguns éteres de celulose, como a metilcelulose, a etilcelulose, a hidroxipropilmetilcelulose e a carboximetilcelulose de sódio, e alguns ésteres de celulose como o acetato de celulose, o acetatoftalato de celulose ou o acetatobutirato de celulose. Estes derivados tiveram um grande impacto no desenvolvimento de várias tecnologias e formas de dosagem farmacêuticas, sendo por isso muito utilizados pela indústria farmacêutica⁷³. Note-se ainda que muitos dos processos/técnicas de modificação química aplicados actualmente aos mais diversos tipos de polissacarídeos foram desenvolvidos originalmente para a modificação da celulose.

1.4 Hidrogéis

Os hidrogéis podem ser descritos como sendo polímeros hidrofílicos, com cadeias mais ou menos reticuladas, e com a capacidade de absorver e reter uma grande quantidade de água sem perder a sua estrutura tridimensional, ou seja, sem se dissolverem^{74, 75}.

Devido à grande percentagem de água retida por estes materiais, os hidrogéis em equilíbrio num sistema aquoso apresentam algumas propriedades semelhantes

aos tecidos vivos, como sejam uma consistência macia e elástica e uma baixa tensão superficial com a água e fluidos biológicos⁷⁵.

Desde que há cerca de 50 anos Wichterle e Lim propuseram a utilização do hidrogel de poli(metilmacrilato de 2-hidroxietilo) em aplicações biomédicas⁷⁶, esta classe de biomateriais tem sido alvo de grande interesse por parte dos investigadores. Na literatura encontram-se um enorme número de artigos dedicados ao desenvolvimento e aplicações de muitos tipos de hidrogéis. Estes apresentam um grande potencial na área da libertação controlada de fármacos, especialmente como SLC de macromoléculas terapêuticas como sejam os péptidos, proteínas e material genético.

Presentemente, hidrogéis com as mais variadas propriedades físico-químicas e biológicas são preparados recorrendo a diversas técnicas. Esta diversidade permite que os hidrogéis sejam classificados com base num grande número de critérios, normalmente relacionados com as suas propriedades e o seu modo de fabricação. Na Tabela 1.4 são apresentadas algumas características dos hidrogéis utilizadas na classificação destes.

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de vários polímeros e copolímeros sintéticos ou naturais^{75, 77, 78}. Como seria de esperar, os hidrogéis obtidos a partir de polímeros naturais apresentam as propriedades características destes biomateriais. No entanto, geralmente as propriedades mecânicas destes hidrogéis não são as ideais sendo ainda relativamente difícil manter a fabricação destes com propriedades reprodutíveis, devido à inerente variabilidade dos polímeros naturais. Pelo contrário, os polímeros sintéticos permitem construir hidrogéis com arquitecturas e propriedades bastante bem definidas e constantes. No entanto muitos destes não são biodegradáveis. A combinação de polímeros naturais e sintéticos, na construção dos chamados hidrogéis híbridos, permite a conjugação das propriedades destas duas classes de polímeros, o que geralmente resulta em hidrogéis com propriedades bastante atractivas.

Os hidrogéis podem ser classificados em hidrogéis químicos ou físicos, conforme o tipo de ligações estabelecidas entre as cadeias poliméricas. Nos hidrogéis químicos as cadeias dos polímeros encontram-se covalentemente ligadas entre si. Nos hidrogéis físicos as cadeias encontram-se associadas através de

ligações físicas reversíveis, mais ou menos fortes, e que incluem as ligações por pontes de hidrogénio, ligações iónicas ou interacções hidrofóbicas.

Tabela 1.4 Vários critérios utilizados para classificar os hidrogéis.

Natureza	Sintéticos Naturais Híbridos (formados por polímeros naturais e sintéticos)
Tipo de reticulação	Química (covalente) Física (não covalente)
Formação	Pré-formados Formados <i>in situ</i>
Biodegradabilidade	Biodegradáveis Não biodegradáveis
Taxa de absorção de água	Baixa taxa absorção de água Média taxa de absorção de água Alta taxa de absorção de água Superabsorventes
Porosidade	Não porosos Microporosos Macroporosos Superporosos
Sensibilidade a estímulos ambientais	Não sensíveis Sensíveis (ao pH, temperatura, sinais eléctricos, luz, moléculas específicas, etc...)

Mais recentemente têm sido desenvolvidos hidrogéis com a capacidade de formação *in situ*.⁷⁹ Os precursores destes hidrogéis são colocados, normalmente no estado líquido ou em solução, no local da aplicação, sendo o hidrogel formado de seguida. Esta estratégia permite introduzir o hidrogel no local exacto da sua acção de uma forma muito pouco invasiva. A gelificação *in situ* da solução precursora pode ocorrer através de várias formas de reticulação, físicas e químicas.

Também já foram desenvolvidos vários hidrogéis que possuem a capacidade de responder a estímulos do ambiente que os rodeia, estímulos esses como a temperatura, o pH, a luz ou a presença de moléculas específicas. Estes hidrogéis passam por transições reversíveis de volume e de fases quando o ambiente à sua volta sofre alterações específicas. Estes hidrogéis são designados por hidrogéis

sensíveis/reactivos ao ambiente ou, mais comumente, por hidrogéis “inteligentes”. Este tipo de hidrogéis permite assim o desenvolvimento de SLC “inteligentes”, com a capacidade de libertar o agente bioactivo encapsulado apenas quando ocorre uma mudança específica do ambiente que o rodeia^{80, 81}.

Os agentes terapêuticos podem ser incorporados no hidrogel depois deste se encontrar formado ou durante a sua formação. No primeiro caso o fármaco é normalmente incorporado no hidrogel pela difusão do fármaco para o interior deste. Isto implica mergulhar o hidrogel numa solução saturada com o fármaco por um tempo suficiente para que o sistema atinja o equilíbrio. Normalmente a libertação *in vitro* dos fármacos incorporados desta forma é caracterizado por um *burst release* considerável⁴³. O *burst release* pode ser definido como a libertação, não controlada e rápida, de uma quantidade significativa do fármaco encapsulado nos tempos iniciais dos ensaios *in vitro* e/ou da administração *in vivo*.

Quando o fármaco é incorporado durante a formação do hidrogel, este é adicionado à solução precursora, ficando aprisionado na estrutura tridimensional do hidrogel à medida que esta se forma. Normalmente nestes casos o fenómeno de *burst release* ocorre numa escala mais moderada⁴³. Contudo, nestes casos pode ocorrer, durante o processo de formação da matriz tridimensional, a ligação covalente do agente terapêutico aos monómeros ou polímeros constituintes dessa matriz, o que resulta na imobilização permanente do fármaco na matriz polimérica. Este fenómeno, que tem como consequência a libertação incompleta do fármaco encapsulado, ocorre com alguma frequência em sistemas onde o agente terapêutico é uma proteína ou DNA⁷⁸.

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

Geralmente existe um fenómeno dominante que controla a taxa a libertação do fármaco a partir do hidrogel. Este pode ser a difusão do fármaco ou o processo de

absorção de água por parte do hidrogel. Em alguns casos utiliza-se a estratégia de ligar covalentemente o fármaco à matriz polimérica por meio de ligações susceptíveis de degradação. Neste caso a libertação do fármaco a partir do hidrogel é controlada pela degradação química ou enzimática dessas ligações.

Os polímeros naturais hidrofílicos (polímeros de base proteica e vários polissacarídeos), e os seus derivados, têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de hidrogéis para aplicações na área da libertação controlada de fármacos. Estes têm sido utilizados por si só, em misturas, ou em combinação com polímeros sintéticos na preparação de hidrogéis físicos e químicos.

Os hidrogéis químicos de polímeros naturais são maioritariamente preparados recorrendo a agentes reticulantes ou através da pré-funcionalização destes polímeros com grupos reactivos e posterior reticulação.

No primeiro caso são utilizadas pequenas moléculas bifuncionais para ligar covalentemente as cadeias dos polímeros, através dos vários grupos funcionais presentes ao longo destas (nomeadamente grupos OH). Exemplos de alguns agentes reticulantes utilizados incluem o glutaraldeído, o éter de diglicídido ou vários diisocianatos⁸²⁻⁸⁶. Uma das limitações desta estratégia encontra-se na biocompatibilidade de algumas destas moléculas, pois algumas delas são reconhecidamente tóxicas (como o glutaraldeído) enquanto a biocompatibilidade de outras é ainda desconhecida⁴³.

Uma estratégia alternativa, e que evita o uso de agentes reticulantes, é a pré-funcionalização dos polímeros com grupos funcionais reactivos e a subsequente formação dos hidrogéis, através da reacção entre esses mesmos grupos ou entre grupos complementares. Dentro desta estratégia, um método muito utilizado é a funcionalização dos polímeros com grupos susceptíveis de reticulação radicalar (como por exemplo, grupos vinílicos ou metacrílicos), induzida por iniciadores químicos⁸⁷⁻⁹⁰ ou fotoquímicos⁹¹.

Alguns polissacarídeos com carácter iónico possuem a capacidade de gelificar na presença de certo tipo de iões di- ou tri-valentes de carga oposta, através de um processo conhecido por gelificação ionotrópica. Exemplos são os hidrogéis preparados através da gelificação do quitosano na presença de iões de tripolifosfato⁹² e do alginato na presença de iões cálcio⁹³. Na literatura encontram-se

muitos exemplos de SLC, à base de quitosano ou alginato, preparados a partir destes processos.

Em certas condições, polímeros com grupos pendentes ionizáveis de natureza oposta formam hidrogéis físicos estáveis, através de interações electrostáticas. Estes são geralmente designados por complexos polielectrolíticos (PECs). Vários tipos de PECs, formados por polímeros naturais, têm sido propostos e investigados na preparação de SLC. No Capítulo 4 é apresentada uma discussão mais aprofundada sobre este tipo de sistemas.

Relativamente aos hidrogéis químicos, os hidrogéis físicos formados por gelificação ionotrópica ou complexação polielectrolítica apresentam a vantagem de serem produzidos em meios totalmente aquosos e de não requererem a utilização de compostos químicos como reticulantes, iniciadores, catalisadores, ou outros compostos potencialmente tóxicos e/ou nocivos. Por outro lado, este tipo de hidrogéis apresenta geralmente fracas propriedades mecânicas e, por serem formados por ligações reversíveis, são susceptíveis de serem dissolvidos facilmente.

A conjugação de polímeros naturais e sintéticos no desenvolvimento de hidrogéis é feita normalmente por meio de copolimerizações de enxerto⁹⁴⁻⁹⁶ ou pela formação de vários tipos de redes interpenetrantes (IPN's)⁹⁷⁻¹⁰².

Nas copolimerizações de enxerto as cadeias do polímero sintético são geralmente enxertadas nas cadeias do polímero natural, recorrendo para o efeito a iniciadores químicos ou físicos.

Nas redes interpenetrantes, as cadeias do polímero sintético são também formadas 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.

Uma estratégia muito investigada é a associação de polímeros naturais com polímeros sintéticos com grupos ionizáveis como por exemplo o poli(ácido acrílico) ou o poli(ácido metacrílico), ou com polímeros cujas propriedades são sensíveis a variações da temperatura, como por exemplo a poli(*N*-isopropilacrilamida). Desta forma é possível construir hidrogéis híbridos sensíveis a variações de pH e de temperatura e que, simultaneamente, mantêm a biocompatibilidade associada aos polímeros naturais e, em certo grau, a biodegradabilidade⁹⁴⁻¹⁰².

1.5 Nano- e micropartículas poliméricas

A utilização de partículas enquanto veículos para a libertação controlada de fármacos, especialmente nano- e micropartículas poliméricas, é e tem sido alvo de muita investigação¹⁰³⁻¹¹¹.

Embora não exista uma definição única do que é uma nanopartícula, a definição que reúne mais consenso define as nanopartículas como sendo partículas em que pelo menos uma das suas dimensões tem um tamanho inferior a 100 nm¹¹². No entanto, em algumas áreas, como é o caso da libertação controlada de fármacos, é bastante comum classificar as nanopartículas como sendo partículas com um diâmetro inferior a 1 μm ^{103, 105, 108, 110} e, por sua vez, as micropartículas como sendo partículas com um diâmetro entre 1 μm e 1000 μm ¹¹¹. Assim, esta última definição foi adoptada ao longo deste trabalho.

As nano/micropartículas poliméricas, enquanto sistemas de imobilização de fármacos, são geralmente classificadas de nano/microesferas ou de nano/microcápsulas. Quando estas partículas são constituídas por uma matriz polimérica maciça, onde o fármaco se encontra uniformemente disperso ou solubilizado, estas são designadas por microesferas ou por nanoesferas. Quando as partículas são sistemas vesiculares, com um coro interior constituído pelo fármaco no estado sólido ou líquido envolvido por uma membrana polimérica, estas são designadas por microcápsulas ou por nanocápsulas.

Têm sido desenvolvidos vários métodos para a produção de nano- e de micropartículas^{9, 113-117}. Geralmente, e variando as condições operacionais, estes métodos podem ser utilizados para produzir ambos os tipos de partículas. As nano/micropartículas podem ser produzidas a partir de polímeros pré-fomados ou, no caso de serem constituídas por polímeros sintéticos, estas podem ser ainda produzidas simultaneamente aquando da formação das cadeias poliméricas, através técnicas de polimerização em emulsão ou em suspensão.

As nano/micropartículas podem ser constituídas tanto por polímeros hidrofóbicos como por polímeros hidrofílicos. Neste último caso tem de existir algum tipo de reticulação entre as cadeias poliméricas, para que as partículas não se dissolvam quando em contacto com um meio aquoso. No fundo, estas partículas são hidrogéis processados na forma de nano- ou de micropartículas, exibindo por isso, e

adicionalmente às propriedades associadas às nano/micropartículas, as propriedades normalmente associadas aos hidrogéis.

As nanopartículas, especialmente as de tamanhos iguais ou inferiores a 100 nm, exibem propriedades únicas e apresentam um enorme potencial na área da libertação controlada de fármacos^{103-107, 109-111}. Estas possuem uma elevada área superficial, podendo também exibir uma série de propriedades magnéticas e ópticas interessantes. Para além disso são facilmente suspensas em meios líquidos, podendo, em muitos casos, ser esterilizadas por meio de filtração. Adicionalmente, e por terem um tamanho comparável ao dos organelos celulares, estas podem ser facilmente interiorizadas por diversos tipos de células. Estas propriedades têm sido exploradas no desenvolvimento de vários sistemas de libertação controlada localizados, desenhados para libertarem o fármaco num tipo específico de tecido/células, como por exemplo nas células de tumores¹⁰⁵. Ainda devido ao seu tamanho, algumas nanopartículas possuem a capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (cérebro), uma das zonas de mais difícil acesso do organismo. Desta forma estas são vistas com grande interesse na preparação de SLC de fármacos que actuam directamente sobre o sistema nervoso central¹⁰⁴.

Adicionalmente, e também devido seu tamanho, as nanopartículas podem ser injectadas por via intravenosa, permitindo-lhes uma rápida distribuição e acesso aos tecidos alvo. No entanto, as nanopartículas hidrofóbicas são reconhecidas e rapidamente eliminadas da circulação sanguínea pelo sistema reticuloendotelial. De forma a se tornarem evasivas a este sistema e a, dessa forma, aumentar o seu tempo de circulação, a superfície das nanopartículas hidrofóbicas, como são exemplo as partículas de PLA ou PLGA, são normalmente revestidas/modificadas com um polímero hidrofílico, geralmente o polietileno glicol (PEG). A este agente de revestimento podem ainda ser acoplados ligandos com a capacidade de interagir especificamente com as membranas de determinadas células, através de um processo de reconhecimento molecular. A utilização desta estratégia permite direccionar, de uma forma activa, as nanopartículas até aos tecidos/células alvo.

Apesar do enorme esforço de investigação dedicado à nanotecnologia e às suas aplicações biomédicas, 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, sendo que, e dentro deste grupo, a maioria destes sistemas é de natureza lipídica (lipossomas)¹⁰⁴. Actualmente, um dos poucos produtos aprovados para uso humano à base de nanopartículas poliméricas é o Abraxane™, o qual é utilizado no tratamento do cancro da mama. Este consiste em partículas de albumina com cerca de 130 nm conjugadas com a droga anticancerígena paclitaxel¹⁰⁵. Este sistema aumenta a eficácia desta droga ao direccioná-la preferencialmente para as células cancerígenas, minimizando desta forma os graves efeitos secundários associados a este fármaco.

As nanopartículas têm também vindo a ser investigadas na administração de fármacos de natureza proteica por via oral^{103, 109}. A natureza pouco invasiva desta via de administração faz com que esta seja a via preferível para a introdução de fármacos no organismo. No entanto, a administração de fármacos de natureza proteica é sobretudo feita por via injectável, isto porque a administração oral deste tipo de fármacos resulta numa baixa biodisponibilidade, devido à instabilidade destes fármacos no ambiente gastrointestinal e à sua fraca permeabilidade através do tecido mucoso intestinal.

Vários estudos mostram que o encapsulamento de fármacos de natureza proteica em nanopartículas poliméricas resultam num aumento da biodisponibilidade destes quando administrados por via oral¹⁰³. Este efeito deve-se sobretudo à capacidade que as nanopartículas têm de proteger eficazmente o fármaco do meio físico-químico e enzimático do tracto gastrointestinal e de, simultaneamente, aumentarem a absorção deste, pela promoção do transporte através do tecido mucoso intestinal.

Outra área onde as nanopartículas têm despertado grande interesse é na área da libertação ocular^{109, 118}. A entrega de fármacos a nível ocular pelas formulações tradicionais disponíveis comercialmente resulta normalmente numa biodisponibilidade do fármaco bastante baixa, isto devido à rápida eliminação deste do local de acção pelos mecanismos de limpeza/protecção do olho. Um exemplo típico são as formulações líquidas, na forma de soluções ou suspensões, administradas topicamente no olho. Nanopartículas de polímeros carregadas de fármacos, administradas topicamente na forma de soluções coloidais, já demonstraram serem capazes de aumentar significativamente a biodisponibilidade dos fármacos, ao prolongarem o tempo de residência destes na área pré-corneal. A

mucoadesividade dos polímeros que constituem estas nanopartículas parece ser uma propriedade chave no sucesso destas formulações¹¹⁸. Exemplos de polímeros mucoadesivos já utilizados para construir nanopartículas para administração oftalmológica incluem o poli(ácido acrílico) e os polímeros naturais quitosano e alginato de sódio¹¹⁸.

Relativamente às nanopartículas, as micropartículas apresentam algumas limitações pois, devido às suas maiores dimensões, estas não são interiorizadas pela maioria das células e não podem ser administradas por via intravenosa, mas apenas por via intramuscular ou subcutânea. Contudo estas são preferíveis para alguns tipos de aplicações, como para a libertação prolongada e localizada, uma vez que permanecem maioritariamente concentradas no local de administração, ao contrário do que acontece com as nanopartículas, que rapidamente entram na corrente sanguínea e se dispersam no organismo¹⁰⁴.

1.6 Referências bibliográficas

1. Uchegbu, I., Introduction. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
2. Müller, R. H.; Mäder, K.; Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, (1), 161-177.
3. Singh, R.; Vyas, S. P., Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. *Journal of Dermatological Science* **1996**, *13*, (2), 107-111.
4. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, (11), 1307-1315.
5. Gultepe, E.; Nagesha, D.; Sridhar, S.; Amiji, M., Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, (3), 305-315.
6. Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y., Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, (11), 1278-1288.
7. Bajpai, A. K.; Shukla, S. K.; Bhanu, S.; Kankane, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, (11), 1088-1118.
8. Kim, S.; Kim, J.-H.; Jeon, O.; Kwon, I. C.; Park, K., Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71*, (3), 420-430.
9. Freiberg, S.; Zhu, X., Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *282*, (1-2), 1-18.
10. Lee, K. Y.; Yuk, S. H., Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, (7), 669-697.
11. Kwon, G. S., Ed. *Polymeric drug delivery systems*. Taylor & Francis: NY, 2005.
12. Ottembrite, R. M.; Kim, S. W., Eds. *Polymeric Drugs & Drug Delivery Systems*. CRC Press: Boca Raton, 2001.
13. Saltzman, W., *Drug Delivery - Engineering principles for drug therapy*. Oxford University Press: NY, 2001.
14. Gupta, R. B.; Kompella, U. B., Eds. *Nanoparticle technology for drug delivery*. Taylor & Francis: NY, 2006.
15. Li, X.; Jasti, B. R., *Design of controlled release drug delivery systems*. McGraw-Hill: NY, 2006.
16. Rathbone, M. J.; Hadgraft, J.; Roberts, M. S., Eds. *Modified-release drug delivery technology*. Marcel Dekker: NY, 2002.
17. Jain, K. K., Ed. *Drug Delivery Systems*. CRC Press: Boca Raton, 2004.
18. Wallace, D. G.; Rosenblatt, J., Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, (12), 1631-1649.
19. Dang, J. M.; Leong, K. W., Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, (4), 487-499.
20. 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*, (1-3), 256-274.
21. Ruzszak, Z.; Friess, W., Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, (12), 1679-1698.
22. Lei, P.; Padmashali, R. M.; Andreadis, S. T., Cell-controlled and spatially arrayed gene delivery from fibrin hydrogels. *Biomaterials* **2009**, *30*, (22), 3790-3799.
23. Patil, G. V., Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research* **2003**, *58*, (3), 219-247.
24. Gombotz, W. R.; Pettit, D. K., Biodegradable Polymers for Protein and Peptide Drug-Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, *6*, (4), 332-351.
25. Nair, L. S.; Laurencin, C. T., Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, (8-9), 762-798.
26. Breen, A.; O'Brien, T.; Pandit, A., Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules. *Tissue Engineering Part B-Reviews* **2009**, *15*, (2), 201-214.
27. Vaz, C. M.; van Doeveren, P. F. N. M.; Reis, R. L.; Cunha, A. M., Soy matrix drug delivery systems obtained by melt-processing techniques. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, (6), 1520-1529.
28. Shih, I.-L.; Shen, M.-H.; Van, Y.-T., Microbial synthesis of poly([epsilon]-lysine) and its various applications. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, (9), 1148-1159.

29. Zheng, H.; Zhou, Z. Y.; Chen, Y.; Huang, J.; Xiong, F. L., PH-Sensitive alginate/soy protein microspheres as drug transporter. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 106, (2), 1034-1041.
30. Xu, W. J.; Yang, Y. Q., Drug sorption onto and release from soy protein fibers. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2009**, 20, (12), 2477-2486.
31. Liang, H.-F.; Chen, C.-T.; Chen, S.-C.; Kulkarni, A. R.; Chiu, Y.-L.; Chen, M.-C.; Sung, H.-W., Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* **2006**, 27, (9), 2051-2059.
32. 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, (12), 1547-1567.
33. Rinaudo, M., Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* **2008**, 57, (3), 397-430.
34. d'Ayala, G. G.; Malinconico, M.; Laurienzo, P., Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. *Molecules* **2008**, 13, (9), 2069-2106.
35. Vaarum, K. M.; Smidsrod, O., Structure-property relationship on chitosans. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2nd edition ed.; Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker, Inc: NY, 2005; pp 625-660.
36. Sashiwa, H.; Aiba, S. I., Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science* **2004**, 29, (9), 887-908.
37. Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (12), 6017-6084.
38. Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Reis, R. L., Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, (4-5), 207-233.
39. Thanou, M.; Junginger, H. E., Pharmaceutical Applications of chitosan and derivatives. In *Polysaccharides - Structural diversity and functional versatility*, Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker: NY, 2005.
40. 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, (1), 19-34.
41. Khor, E.; Lim, L. Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003**, 24, (13), 2339-2349.
42. Mourya, V. K.; Inamdar, N. N., Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers* **2008**, 68, (6), 1013-1051.
43. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Q., Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (1), 83-99.
44. Li, Z. S.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D. M.; Zhang, M. Q., Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, 26, (18), 3919-3928.
45. Wang, L. H.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L. Y., Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 63, (5), 610-618.
46. Ozturk, E.; Agalar, C.; Kececi, K.; Denkbaz, E. B., Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 101, (3), 1602-1609.
47. Williams, S. F.; Martin, D. P., Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers: Polyesters III - Applications and commercial products*, Doi, Y.; Steibuchel, A., Eds. Weinheim: Wiley - VCH, 2002; Vol. 4.
48. Chen, G. Q., A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (8), 2434-2446.
49. Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2007**, 82, (3), 233-247.
50. Nobes, G. A. R.; Marchessault, R. H.; Maysinger, D., Polyhydroxyalkanoates: Materials for delivery systems. *Drug Delivery* **1998**, 5, (3), 167-177.
51. Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T., Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, (1), 5-21.
52. Pouton, C. W.; Akhtar, S., Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 18, (2), 133-162.
53. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y., Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **2000**, 25, (10), 1503-1555.

54. Chen, G. Q.; Wu, Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **2005**, 26, (33), 6565-6578.
55. <http://www.tepha.com/about-us.htm> (consultado em 2010-06-24).
56. Kazuhiko, J.; Masahiro, N.; Miho, K., Controlled release of aclarubicin, an anticancer antibiotic, from poly-[beta]-hydroxybutyric acid microspheres. *Journal of Controlled Release* **1986**, 4, (1), 25-32.
57. Juni, K.; Seki, T.; Mizuta, Y.; Ichihara, T.; Nakano, M., Controlled Delivery of Anticancer Drugs by Using Microspheres and Nanospheres of Biodegradable Polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1987**, 76, (11), S272-S272.
58. Kawaguchi, T.; Tsugane, A.; Higashide, K.; Endoh, H.; Hasegawa, T.; Kanno, H.; Seki, T.; Juni, K.; Fukushima, S.; Nakano, M., Control of Drug Release with a Combination of Prodrug and Polymer Matrix - Antitumor-Activity and Release Profiles of 2',3'-Diacyl-5-Fluoro-2'-Deoxyuridine from Poly(3-Hydroxybutyrate) Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, 81, (6), 508-512.
59. Khang, G.; Kim, S. W.; Cho, J. C.; Rhee, J. M.; Yoon, S. C.; Lee, H. B., Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres for the sustained release of 5-fluorouracil. *Bio-Medical Materials and Engineering* **2001**, 11, (2), 89-103.
60. Collins, A. E. M.; Deasy, P. B.; Maccarthy, D. J.; Shanley, D. B., Evaluation of a Controlled-Release Compact Containing Tetracycline Hydrochloride Bonded to Tooth for the Treatment of Periodontal-Disease. *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, 51, (2), 103-114.
61. Deasy, P. B.; Collins, A. E. M.; Maccarthy, D. J.; Russell, R. J., Use of Strips Containing Tetracycline Hydrochloride or Metronidazole for the Treatment of Advanced Periodontal-Disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1989**, 41, (10), 694-699.
62. Korkusuz, F.; Korkusuz, P.; Eksioğlu, F.; Gursel, I.; Hasirci, V., In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, 55, (2), 217-228.
63. Li, H. Y.; Chang, J., Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres. *Journal of Controlled Release* **2005**, 107, (3), 463-473.
64. Lionzo, M. I. Z.; Re, M. I.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R., Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *Journal of Microencapsulation* **2007**, 24, (2), 175-186.
65. Wang, Y. J.; Wang, X. D.; Wei, K.; Zhao, N. R.; Zhang, S. H.; Chen, J. D., Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Materials Letters* **2007**, 61, (4-5), 1071-1076.
66. Gangrade, N.; Price, J. C., Poly(Hydroxybutyrate-Hydroxyvalerate) Microspheres Containing Progesterone - Preparation, Morphology and Release Properties. *Journal of Microencapsulation* **1991**, 8, (2), 185-202.
67. Gangrade, N.; Price, J. C., Properties of Implantable Pellets Prepared from a Biodegradable Polyester. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1992**, 18, (15), 1633-1648.
68. Mcleod, B. J.; Haresign, W.; Peters, A. R.; Humke, R.; Lamming, G. E., The Development of Subcutaneous-Delivery Preparations of GnRH for the Induction of Ovulation in Acyclic Sheep and Cattle. *Animal Reproduction Science* **1988**, 17, (1-2), 33-50.
69. Lu, B.; Wang, Z. R.; Yang, H., Long-acting delivery microspheres of levo-norgestrol-poly(3-hydroxybutyrate): their preparation, characterization and contraceptive tests on mice. *Journal of Microencapsulation* **2001**, 18, (1), 55-64.
70. Amidi, M.; Mastrobattista, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E., Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (1), 59-82.
71. Park, J. H.; Saravanakumar, G.; Kim, K.; Kwon, I. C., Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (1), 28-41.
72. Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Nair, S. V.; Tokura, S.; Tamura, H.; Selvamurugan, N., Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science* **2010**, 55, (7), 675-709.
73. Edgar, K. J., Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose* **2007**, 14, (1), 49-64.
74. Hoare, T. R.; Kohane, D. S., Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **2008**, 49, (8), 1993-2007.
75. Jeong, S. H.; Huh, K. M.; Park, K., Hydrogel drug delivery systems. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
76. Wichterle, O.; Lim, D., Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **1960**, 185, (4706), 117-118.

77. Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications. *Bioartificial Organs Iii: Tissue Sourcing, Immunoisolation, and Clinical Trials* **2001**, 944, 62-73.
78. Lin, C. C.; Metters, A. T., Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, (12-13), 1379-1408.
79. Van Tomme, S. R.; Storm, G.; Hennink, W. E., In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 355, (1-2), 1-18.
80. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Dave, A. M.; Kumbar, S. G.; Rudzinski, W. E., Stimulus-responsive "smart" hydrogels as novel drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2002**, 28, (8), 957-974.
81. Qiu, Y.; Park, K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, (3), 321-339.
82. George, M.; Abraham, T. E., pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 335, (1-2), 123-129.
83. Kulkarni, A. R.; Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M., Controlled release of diclofenac sodium from sodium alginate beads crosslinked with glutaraldehyde. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **1999**, 74, (1), 29-36.
84. Jensen, M.; Birch Hansen, P.; Murdan, S.; Frokjaer, S.; Florence, A. T., Loading into and electro-stimulated release of peptides and proteins from chondroitin 4-sulphate hydrogels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 15, (2), 139-148.
85. Annabi, N.; Mithieux, S. M.; Boughton, E. A.; Ruys, A. J.; Weiss, A. S.; Dehghani, F., Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **2009**, 30, (27), 4550-4557.
86. Hovgaard, L.; Brøndsted, H., Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1995**, 36, (1-2), 159-166.
87. Oudshoorn, M. H. M.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Hennink, W. E., Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution. *Polymer* **2007**, 48, (7), 1915-1920.
88. Reis, A. V.; Cavalcanti, O. A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C., Synthesis and characterization of hydrogels formed from a glycidyl methacrylate derivative of galactomannan. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 267, (1-2), 13-25.
89. Van den Mooter, G.; Vervoort, L.; Kinget, R., Characterization of methacrylated inulin hydrogels designed for colon targeting: In vitro release of BSA. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, (2), 303-307.
90. Wang, L. F.; Shen, S. S.; Lu, S. C., Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2003**, 52, (4), 389-396.
91. Kim, S. H.; Won, C. Y.; Chu, C. C., Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 40, (3), 183-190.
92. Anal, A. K.; Stevens, W. F.; Remuñán-López, C., Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 312, (1-2), 166-173.
93. 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, (5), 393-408.
94. Kim, J. H.; Lee, S. B.; Kim, S. J.; Lee, Y. M., Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Polymer* **2002**, 43, (26), 7549-7558.
95. Pourjavadi, A.; Harzandi, A. M.; Hosseinzadeh, H., Modified carrageenan 3. Synthesis of a novel polysaccharide-based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air. *European Polymer Journal* **2004**, 40, (7), 1363-1370.
96. Saboktakin, M. R.; Maharramov, A.; Ramazanov, M. A., pH-sensitive starch hydrogels via free radical graft copolymerization, synthesis and properties. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 77, (3), 634-638.
97. de Moura, M. R.; Ahmad Aouada, F.; Favaro, S. L.; Radovanovic, E.; Forti Rubira, A.; Muniz, E. C., Release of BSA from porous matrices constituted of alginate-Ca²⁺ and PNIPAAm-interpenetrated networks. *Materials Science and Engineering: C* **2009**, 29, (8), 2319-2325.
98. Guo, B.-L.; Gao, Q.-Y., Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly(N-isopropylacrylamide)semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs. *Carbohydrate Research* **2007**, 342, (16), 2416-2422.
99. Li, X.; Wu, W.; Liu, W., Synthesis and properties of thermo-responsive guar gum/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer network hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 71, (3), 394-402.

100. Li, X.; Wu, W.; Wang, J.; Duan, Y., The swelling behavior and network parameters of guar gum/poly(acrylic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 66, (4), 473-479.
101. Wang, M.; Fang, Y.; Hu, D., Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) full-IPN hydrogels. *Reactive and Functional Polymers* **2001**, 48, (1-3), 215-221.
102. Wen, X.; Cao, X.; Yin, Z.; Wang, T.; Zhao, C., Preparation and characterization of konjac glucomannan-poly(acrylic acid) IPN hydrogels for controlled release. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 78, (2), 193-198.
103. 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), 1-27.
104. Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, (8), 2950-2962.
105. Haley, B.; Frenkel, E., Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* **2008**, 26, (1), 57-64.
106. Hans, M. L.; Lowman, A. M., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2002**, 6, (4), 319-327.
107. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75, (1), 1-18.
108. Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* **2008**, 125, (3), 193-209.
109. Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F., Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2006**, 2, (2), 53-65.
110. Singh, R.; Lillard, J. W., Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* **2009**, 86, (3), 215-223.
111. Tan, M. L.; Choong, P. F. M.; Dass, C. R., Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides* **2010**, 31, (1), 184-193.
112. Holister, P.; Weener, J.-W.; Román, C.; Harper, T. Nanoparticles *Periodical* [Online], 2003. http://images.iop.org/dl/nano/wp/nanoparticles_WP.pdf (accessed 2019-06-24).
113. Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release* **2005**, 102, (2), 313-332.
114. Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D., Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 363, (1-2), 26-39.
115. Lassalle, V.; Ferreira, M. L., PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, (6), 767-783.
116. Mishra, B.; Patel, B. B.; Tiwari, S., Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, 6, (1), 9-24.
117. Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2006**, 2, (1), 8-21.
118. Nagarwal, R. C.; Kant, S.; Singh, P. N.; Maiti, P.; Pandit, J. K., Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2009**, 136, (1), 2-13.

Capítulo 2

Imobilização de um Fármaco Hidrofóbico em
Micropartículas de Poli(3-hidroxi-butirato-co-
3-hidroxi-valerato)

O trabalho apresentado neste capítulo resultou na seguinte publicação:

Coimbra, P.; de Sousa, H.C.; Gil, M.H., Preparation and characterization of flurbiprofen-loaded poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Microencapsulation* 2008, 25 (3), 170-178.

Ao longo deste capítulo descreve-se o trabalho realizado para o desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármacos sob a forma de micropartículas de poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato), PHBV.

Com este objectivo, prepararam-se micropartículas deste polímero com um fármaco hidrofóbico nele imobilizado através da técnica de extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água. O fármaco utilizado foi o flurbiprofeno, um anti-inflamatório não-esteróide (AINE).

Adicionalmente, as propriedades das micropartículas mais relevantes no seu desempenho enquanto sistemas de libertação controlada foram caracterizadas e relacionadas com algumas das variáveis envolvidas no processo de preparação dessas mesmas micropartículas. Para isto, planeou-se e implementou-se um desenho de experiências compósito central.

2.1 Imobilização de compostos bioactivos em nano/micropartículas produzidas pelo método de extracção/evaporação do solvente

A extracção/evaporação do solvente (EES) é uma das técnicas normalmente utilizadas na indústria farmacêutica para imobilizar compostos terapêuticos em nano/micropartículas poliméricas, biodegradáveis e/ou biocompatíveis. Na literatura científica esta técnica tem sido extensivamente utilizada e investigada, principalmente na preparação de nano/micropartículas de poli(ácido láctico), PLA, e do seu copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA¹⁻³. Vários artigos de revisão sobre esta técnica encontram-se disponíveis na literatura⁴⁻⁶.

Existem diversas formas de imobilizar um agente bioactivo em nano/micropartículas poliméricas utilizando a técnica da extracção/evaporação do solvente. A escolha do método específico a utilizar é normalmente feita considerando as características de solubilidade do composto bioactivo, sendo geralmente o critério subjacente a esta escolha a maximização da eficiência de imobilização.

Para compostos hidrofóbicos e com uma fraca solubilidade em soluções aquosas, o método geralmente adoptado é o da EES numa emulsão óleo/água

(O/W). A execução deste método envolve quatro passos gerais que são esquematizados na Figura 2.1:

- (1) Preparação da fase orgânica: dissolução do polímero e do composto bioactivo num solvente orgânico volátil.
- (2) Emulsificação, por meio da adição e agitação, da fase orgânica (fase dispersa) numa solução aquosa contendo um agente estabilizante (fase contínua).
- (3) Formação das partículas: extracção do solvente orgânico da fase dispersa para a fase contínua e subsequente evaporação deste, com a consequente precipitação do polímero e fármaco na forma de partículas sólidas.
- (4) Isolamento das partículas, por filtração ou centrifugação, e posterior secagem.

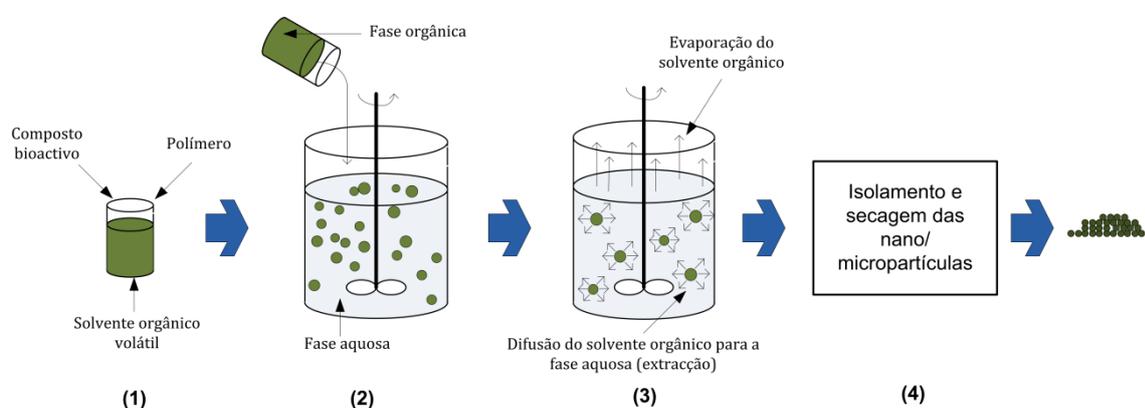


Figura 2.1 Esquema da preparação de nano/micropartículas pelo método de extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água.

A escolha do solvente orgânico é feita com base numa série de critérios: o solvente a utilizar tem de ser capaz de dissolver o polímero escolhido, deve possuir uma fraca solubilidade na fase contínua, deve ter um baixo ponto de ebulição e uma alta volatilidade e, adicionalmente, deve possuir uma baixa toxicidade. Os solventes mais utilizados são o clorofórmio, o diclorometano, o acetato de etilo e o formiato de etilo⁶.

Por vezes, e quando o composto activo é pouco solúvel no solvente orgânico escolhido, são utilizados co-solventes como a acetona ou o metanol. No entanto, e devido à relativa miscibilidade destes na fase aquosa, a sua utilização tem um grande impacto na estrutura interna das partículas obtidas e na eficiência final de imobilização do composto bioactivo.

Uma alternativa ao uso de co-solventes é a imobilização do composto bioactivo no estado sólido. Em vez de solubilizado, este é disperso na fase orgânica e a suspensão resultante é emulsionada na fase contínua (emulsão sólido/óleo/água – S/O/W)^{3, 6}. Este método é utilizado também para preparar partículas compósitas de polímero e de materiais inorgânicos bioactivos, como por exemplo, a hidroxiapatite^{7, 8}.

Geralmente a emulsão é estabilizada com um surfactante que deve estar presente na fase contínua. Este reduz a tensão superficial da fase contínua, evitando assim a coalescência e a aglomeração das gotas da fase dispersa⁶. Dos surfactantes tipicamente utilizados salientam-se o poli(álcool vinílico) parcialmente hidrolizado (PVA), um surfactante não iónico, o sulfato de dodecilo de sódio, um surfactante aniónico, e o cetiltrimetilamónio de bromo, um surfactante catiónico. No entanto, e nas emulsões O/W, o surfactante mais frequentemente utilizado é, sem dúvida, o PVA. Para além do surfactante, é por vezes adicionado um agente anti-espuma à fase contínua, principalmente quando as condições operacionais envolvem uma agitação muito forte⁶.

As propriedades finais das nano/micropartículas com o composto activo incorporado são afectadas por uma série de factores. Estes são, e para além das propriedades físico-químicas dos materiais utilizados (isto é, princípio activo, polímero, solvente orgânico, surfactante, co-solvente, agente anti-espuma), as condições operacionais do processo (tipo de agitação, velocidade de agitação, temperatura, pressão, etc) e outros parâmetros como a viscosidade da fase dispersa, a concentração de surfactante, a fracção mássica entre o composto bioactivo e o polímero, e a fracção volumétrica entre fase dispersa e fase contínua.

Este conjunto de factores, bem como os efeitos das interacções entre eles, determinam as propriedades das nano/micropartículas obtidas (tamanho médio e distribuição de tamanhos das partículas, estrutura interna e morfologia da superfície, quantidade de composto bioactivo imobilizado, distribuição e estado do composto bioactivo), propriedades essas que, por sua vez, determinarão o perfil de libertação do composto bioactivo. Estas relações, entre factores, propriedades das partículas e perfil de libertação, são esquematizadas na Figura 2.2.

Considerando que o objectivo final do processo de imobilização do composto bioactivo em nano/micropartículas é a obtenção de um perfil de libertação

controlada com as características mais favoráveis para a aplicação que se tem em vista, é necessário assim considerar não só os factores que determinam directamente as propriedades das partículas como também as propriedades de biodegradação do polímero que, embora não afectem directamente o processo de produção das partículas podem ter um impacto significativo no perfil final de libertação. Deve-se também ter em conta a natureza química do composto bioactivo e do polímero, bem como as eventuais interacções que possam surgir entre estes, como a aceleração do processo de degradação do polímero induzida pelo composto bioactivo. Um exemplo, bastante bem documentado, é a capacidade que algumas drogas amínicas têm de actuarem como catalisadores das reacções de degradação dos poliésteres PLA e PLGA³.

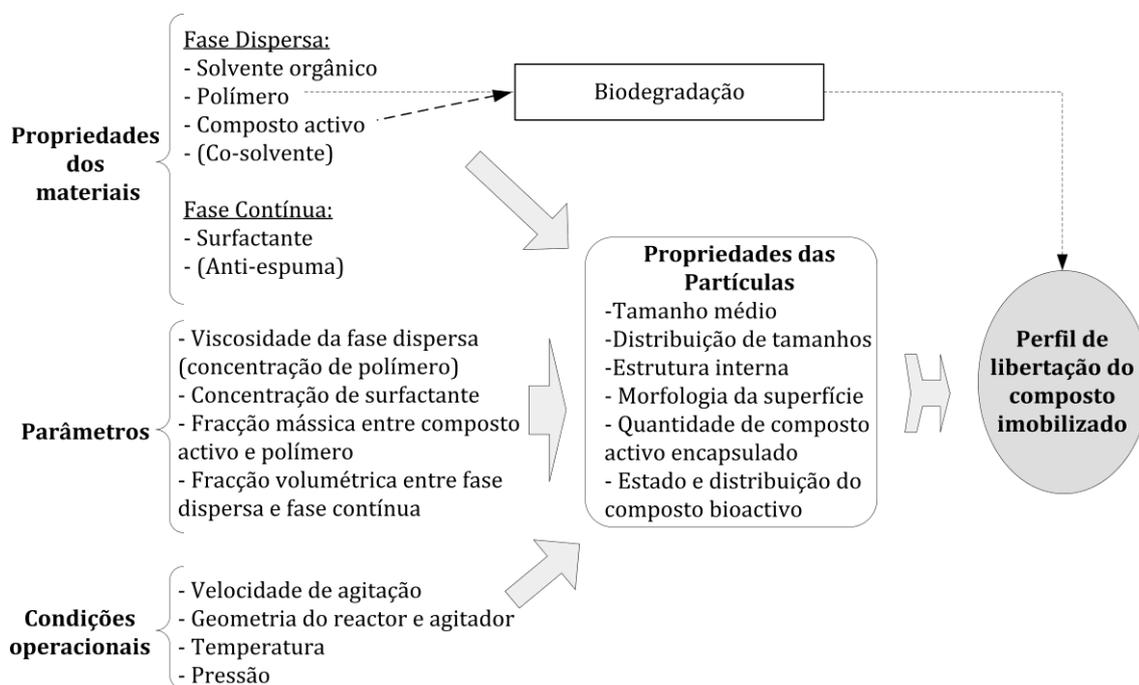


Figura 2.2 Esquema dos factores que influenciam as propriedades das partículas produzidas pelo método de extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água. Esquema adaptado de Li *et al*⁶.

A utilização do método de extracção/evaporação do solvente numa emulsão O/W na encapsulação (imobilização) de compostos hidrofílicos resulta, geralmente, em eficiências de encapsulação muito baixas, devido à difusão para a fase aquosa de uma grande quantidade de composto bioactivo durante o processo de emulsificação e de solidificação das partículas.

De forma a evitar este problema normalmente recorre-se a métodos alternativos à emulsão O/W para imobilizar compostos bioactivos hidrofílicos (moléculas de pequenas dimensões ou proteínas e péptidos). Um dos métodos mais utilizados é a dupla emulsão água/óleo/água (W/O/W). Neste caso, uma solução aquosa do composto bioactivo é emulsionada numa fase orgânica que contém o polímero dissolvido, formando-se assim uma emulsão W/O. Por sua vez, esta emulsão é depois dispersa numa segunda solução aquosa, formando desta forma uma segunda emulsão. As partículas sólidas são formadas pela evaporação do solvente orgânico. Geralmente, a técnica da dupla emulsão é mais difícil de otimizar do que a emulsão O/W. A estabilidade da primeira emulsão parece ser fundamental para o sucesso do processo de encapsulação⁴. As partículas formadas por esta técnica podem ter uma estrutura interna maciça ou assumir a forma de cápsulas, conforme as condições operacionais utilizadas.

Outro método alternativo para imobilizar compostos hidrofílicos é a emulsão óleo/óleo (O/O), onde a fase contínua aquosa é substituída por uma fase orgânica relativamente pouco volátil, como um óleo mineral ou um óleo vegetal. Contudo este método tem a desvantagem de requerer um processo de lavagem final das partículas, com hexano ou éter de petróleo, de forma a remover os resíduos da fase orgânica contínua^{3,6}.

2.2 Imobilização de moléculas bioactivas em nano/micropartículas de PHB e PHBV

Tal como foi referido no Capítulo 1, os poliésteres de origem natural genericamente designados de polihidroxicanoatos, e em particular o poli(hidroxitirato), PHB, e o copolímero poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxiacetato), PHBV, têm vindo a suscitar grande interesse enquanto materiais para as mais diversas aplicações biomédicas, inclusive na preparação de sistemas de libertação controlada. Neste último caso estes polímeros têm sido maioritariamente processados na forma de nano- e micropartículas. Na Tabela 2.1 apresenta-se um resumo da maioria dos trabalhos publicados na literatura nos anos mais recentes sobre a imobilização de compostos bioactivos em nano/micropartículas de PHB ou PHBV. O número de trabalhos não é muito elevado, principalmente se comparado

com os inúmeros trabalhos dedicados à imobilização de fármacos em nano/micropartículas de PLA e PLGA. No entanto, nota-se uma tendência clara para o aumento deste número nos últimos anos, o que reflecte assim o interesse crescente nestes poliésteres.

Nestes trabalhos, a maioria das partículas obtidas foi preparada pelo método de extracção/evaporação do solvente, utilizando para isso os vários tipos de emulsões referidas anteriormente, conforme a natureza hidrofóbica ou hidrofílica do composto bioactivo a imobilizar.

A maioria dos trabalhos foi dedicada à imobilização de antibióticos^{7, 9-13} ou de anti-inflamatórios^{11, 14-16}. Além destes, existem outros compostos imobilizados, tais como o anestésico tramadol¹⁷, o contraceptivo levonorgestrel¹⁸ ou a proteína modelo BSA^{19, 20}. Muitos destes trabalhos tinham como objectivo obter um sistema de libertação controlada de libertação local e prolongada^{7-9, 12, 13}.

De forma a actuarem simultaneamente como promotores da regeneração do tecido ósseo e como sistemas de libertação controlada local de antibióticos, micropartículas compósitas de PHB ou PHBV e grânulos de minerais bioactivos, como a hidroxiapatite e a volastonite, foram também preparadas através da EES numa emulsão sólido/óleo/água^{7, 8, 12}.

Micropartículas resultantes da mistura de PHBV com o poliéster poli- ϵ -caprolactona, PCL, também já foram preparadas e caracterizadas enquanto sistemas de libertação controlada^{15, 16, 21}. Descobriu-se que a adição de PCL ao PHBV dá origem a micropartículas com uma morfologia bastante diferenciada, e que os perfis de libertação do composto bioactivo encapsulado podem ser também manipulados com a variação da percentagem de PCL na composição das micropartículas.

Paralelamente a estes trabalhos, a biocompatibilidade das micropartículas de PHB e PHBV, preparadas pelo método de extracção/evaporação do solvente, foi também investigada *in vitro* e *in vivo*^{22, 23}. Os resultados obtidos *in vivo* sugerem que este tipo de partículas pode ser utilizado na preparação de sistemas de libertação injectáveis pela via intra-muscular.

Tabela 2.1 Resumo dos artigos publicados na literatura científica, desde 1997 a 2010, relativos à imobilização de compostos bioactivos em nano/micropartículas de PHB e PHBV.

Materiais	Método de preparação	Agente bioativo imobilizado	Tamanho das partículas	Aplicação pretendida ou sugerida	Libertação <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	Referência
PHBV	EES, O/W	Ácido fusídico	100 -138 μm	Libertação local de antibióticos	<i>In vitro</i> : <i>Burst release</i> significativo que aumenta com a quantidade de fármaco imobilizado	9
PHBV/ hidroxiapatite	EES, S/O/W	Alendronato de sódio	215 -232 μm	Reparação óssea/ libertação local prolongada	<i>In vitro</i> : Libertação sustentada até cerca de 20 dias	8
PHB/ quitosano	EES, O/W seguida de uma emulsão S/W/O	Piroxicam, Cetoprofeno	89 - 410 μm	-	<i>In vitro</i> : Libertação total até 24 horas. <i>Burst release</i> controlado pela concentração da solução de quitosano e a reticulação com glutaraldeído	14
PHB	EES, W/O/W	BSA	6.9 -20.3 μm	-	<i>In vitro</i> : 8.9% a 63.1% da proteína libertada nos tempos iniciais	19
PHBV	EES, W/O/W	Cloridrato de metformina	5.5 - 26.3 μm	-	<i>In vitro</i> : Libertação total em 2 horas	24
PHBV	EES, O/W	Rifampicina	20-60 μm	Administração oral	<i>In vitro</i> : libertação de 90% do antibiótico em 24 h	10
PHBV/ hidroxiapatite	EE, S/O/W	Gentamicina	3-4 μm	Sistema de libertação controlada de longa duração	<i>In vitro</i> : Libertação controlada até cerca de 10 semanas	7
PHBV/ QUIT/ALG	EES, O/W; revestimento com polielectrólitos por <i>layer-by-layer self-assembly</i>	Ibuprofeno	560-770 ηm	-	<i>In vitro</i> : redução do <i>burst effect</i> e prolongamento do tempo de libertação nas microesferas revestidas por várias camadas dos polielectrólitos.	11
PHBV/ PD/PSS	EES, O/W	Diclofenaco	122 - 273 μm	-	<i>In vitro</i> : Perfis de libertação controlados pela variação da % de PCL nas micropartículas	15
PHBV/PCL	EES, O/W	Indometacina	81 - 116 μm	-	<i>In vitro</i> : Libertação sustentada até cerca de 10 dias	16
PHBV/PCL	EES, O/W	Acetato de dexametasona	100-150 μm	-	<i>In vitro</i> : Libertação sustentada até cerca de 10 dias	12
PHBV/ volastonite	EES, S/O/W	Gentamicina	100-150 μm	Reparação óssea/libertação local de antibióticos	<i>In vitro</i> : libertação de 90% da gentamicina em 22 dias.	12

Tabela 2.1. Resumo dos artigos publicados na literatura científica, desde 1997 a 2010, relativos à imobilização de compostos bioactivos em nano/micropartículas de PHB e PHBV (continuação).

Materiais	Método de preparação	Agente bioactivo imobilizado	Tamanho das partículas	Aplicação pretendida ou sugerida	Libertação <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	Referência
PHB	EES, O/W	Tramadol	7.50 ± 1.31µm	Anestesia local (epidural)	<i>In vitro</i> : 100% de libertação em 7 dias <i>In vivo</i> (ratos): Efeito analgésico prolongado até quase um dia	17
PHBV Gelatina/PHBV	EES, O/W EES, W/O/W	Diazepam	20-40 µm 30-45 µm	-	<i>In vitro</i> : libertação de 40 a 90% do fármaco em 30 dias. <i>Burst effect</i> reduzido nas microesferas de gelatina/PHBV	25
PHB	EES, O/W	Levonorgestrel	64 µm	Contraceptivo de longa duração	<i>In vitro</i> : libertação sustentada até cerca de 100 dias. <i>In vivo</i> (ratos): Efeito contraceptivo até cerca de 60 dias	18
PHBV	EES, O/W, W/O/W, O/O	5-fluorouracilo	12-335 µm	-	<i>In vitro</i> : Microesferas preparadas por dupla emulsão W/O/W ou O/O: 90% da droga libertada no primeiro dia. Microesferas preparadas por emulsão O/W: libertação sustentada até cerca de 8 dias.	26
PHB	<i>Spray drying</i>	Dinitrato de isossorbida	0.6 – 1.1 µm	Administração oral ou injectável	<i>In vitro</i> : 80% da droga libertada num período de 12 h.	27
PHBV	EES, W/O/W	Tetraciclina	400 -580 µm	Administração/libertação localizada para o tratamento da doença periodontal	<i>In vitro</i> : perfis de libertação dependentes da %HV no PHBV e na forma em que o antibiótico se encontra (forma neutra ou acidíca)	13
PHB PHBV	EES, W/O/W	BSA	?	Administração intramuscular	<i>In vitro</i> : libertação sustentada até aproximadamente 15 dias	20

PHB- Poli(3-hidroxibutirato); PHBV - Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato); PCL - Policrapolactona; QUIT – Quitosano; ALG – Alginato; PD – Poli(cloreto de dialilodimetilamónio); PSS – Poli(estirenosulfonato) de sódio; EES – Emulsificação/extracção do solvente; O/W – Emulsão óleo/água; W/O/W – Dupla emulsão água/óleo/água; S/O/W – Emulsão sólido/óleo/água; BSA – Albumina de soro bovino; O/O – Emulsão óleo/óleo.

2.3 Parte experimental

O método escolhido para encapsular o flurbiprofeno em micropartículas de PHBV foi o método da extracção/evaporação do solvente (EES). Considerando a fraca solubilidade aquosa deste composto, as partículas foram produzidas numa emulsão óleo/água, usando o clorofórmio como solvente orgânico volátil e o PVA como surfactante.

2.3.1 Flurbiprofeno

O flurbiprofeno, Figura 2.3, é um derivado do ácido propiónico pertencente à classe dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE's). É um composto quiral que é utilizado enquanto mistura racémica.

O flurbiprofeno apresenta uma solubilidade em água e em soluções aquosas muito reduzida. Por ser um ácido fraco, a sua solubilidade é ainda dependente do pH. A 25°C esta varia de cerca de 7 µg/ml, a pH 2.0, até cerca de 130 µg/ml, a pH 7.4²⁸. Devido a esta baixa solubilidade, em algumas aplicações é utilizado na sua forma salina (flurbiprofeno sódico), forma esta que é bastante solúvel em água e soluções aquosas.

O flurbiprofeno é normalmente administrado como anti-inflamatório e analgésico no tratamento de várias desordens desenvolvidas pelo sistema muscoesquelético e tecidos moles (como osteoartrites e artrites reumatóides). É também utilizado na atenuação de várias dores, como a dor pós-operatória, dores de cabeça ou dores de garganta. É ainda utilizado em oftalmologia, na inibição da miose intra-operativa durante a cirurgia ocular e no controlo das inflamações pós-operativas no segmento anterior do olho²⁹.

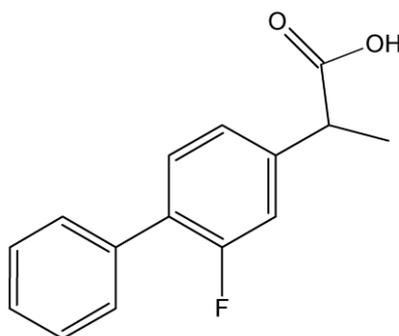


Figura 2.3 Estrutura química do flurbiprofeno.

O flurbiprofeno é administrado por via oral na forma de comprimidos ou por via rectal na forma de supositórios. No tratamento da dor de garganta é administrado na forma de pastilhas. No tratamento a nível ocular é administrado na forma de gotas oftalmológicas. Nestas formulações normalmente é utilizado o flurbiprofeno sódico.

A nível académico o flurbiprofeno, tal como outros AINE's, tem sido alvo de várias investigações com o intuito de desenvolver formulações alternativas e mais eficazes às disponíveis comercialmente. A encapsulação deste fármaco em nano- ou micropartículas tem sido uma das estratégias investigadas.

Um dos problemas associados à administração oral do flurbiprofeno, e dos restantes AINE's em geral, é a sua potencial toxicidade a nível do tracto gastrointestinal³⁰. De forma a minimizar este risco tem-se investigado o desenvolvimento de formulações orais mais eficientes, que minimizem a dose de fármaco necessária para atingir o efeito terapêutico desejado. Uma das estratégias investigadas é a imobilização do flurbiprofeno em micropartículas destinadas a administração oral^{31,32}. Alternativamente tem-se investigado também a imobilização do flurbiprofeno em nano/micropartículas destinadas a serem administradas localmente, no sítio onde ocorre o processo inflamatório, como nas articulações³³ ou na região periodontal³⁴.

A nível da administração ocular, os sistemas coloidais de nanopartículas com flurbiprofeno imobilizado têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do fármaco pois, e como é reconhecido, a biodisponibilidade dos fármacos administrados topicamente pelas soluções oftalmológicas tradicionais é bastante reduzida³⁴⁻³⁷.

2.3.2 Planeamento de experiências

Como foi referido, as propriedades das nano/micropartículas obtidas pelo método EES numa emulsão O/W e, em última análise, o perfil de libertação do composto bioactivo imobilizado, encontram-se fortemente dependentes de uma série de variáveis operacionais/experimentais.

Devido à elevada quantidade das variáveis envolvidas, não é fácil estabelecer uma formulação otimizada, isto é, uma formulação que conduza à obtenção de micropartículas com as propriedades mais adequadas para a aplicação desejada.

Assim, a utilização de um desenho de experiências pode revelar-se bastante útil. Na literatura encontram-se vários exemplos de aplicações de desenhos de experiências na otimização das propriedades de nano/micropartículas preparadas pelo método EES³⁸⁻⁴².

Um desenho de experiências adequado pode revelar, através da análise estatística associada, quais as variáveis que afectam significativamente as propriedades finais das partículas, e a forma como essas propriedades são afectadas por essas mesmas variáveis (os chamados efeitos). Adicionalmente, o desenho de experiências permite ainda investigar os efeitos das interações entre as várias variáveis.

As variáveis do processo são as chamadas variáveis independentes ou factores (genericamente designadas pela letra X). As propriedades afectadas por essas variáveis (como a eficiência de encapsulação ou o tamanho médio das partículas) são designadas por variáveis dependentes ou respostas (genericamente designadas pela letra Y).

Neste trabalho optou-se por utilizar um desenho composto central (DCC) para investigar duas das variáveis do processo de formação das micropartículas:

- X_1 : A concentração do surfactante, PVA, na fase aquosa, [PVA].
- X_2 : A concentração do polímero na fase orgânica, [PHBV].

Uma esquematização do DCC, para dois factores, é representada na Figura 2.4. Neste desenho cada factor é investigado a cinco níveis. Os valores desses níveis, para as duas variáveis investigadas, são apresentados na Tabela 2.2. O desenho pode ser visto como um desenho factorial do tipo 2^2 ao qual se adicionam quatro pontos axiais e um ponto central. Este ponto central é replicado no mínimo três vezes, de forma a possibilitar o cálculo do erro puro associado às experiências.

Neste trabalho o ponto central foi replicado três vezes. Ao todo a implementação do DCC implicou a realização de onze experiências, correspondentes à produção de onze *batches* de micropartículas.

Quatro variáveis dependentes, correspondentes a quatro propriedades das partículas, foram investigadas:

- Y_1 : A eficiência de encapsulação do fármaco, EE.
- Y_2 : O tamanho médio das partículas.

- Y_3 : A largura da distribuição de tamanhos das partículas, expressa pelo parâmetro SPAN.
- Y_4 : O tempo de libertação *in vitro* de 50% do fármaco encapsulado, $t_{50\%}$.

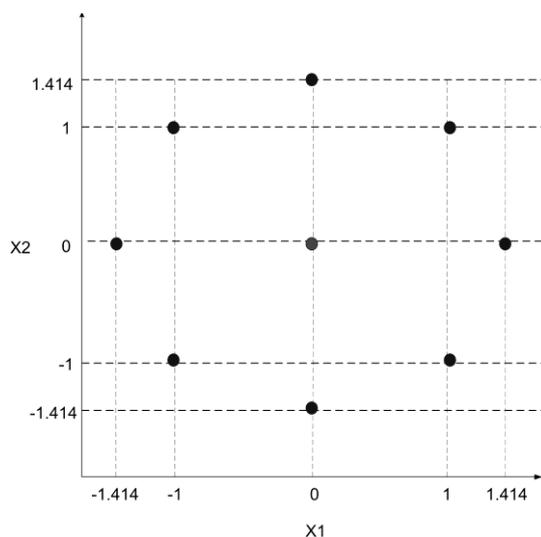


Figura 2.4 Representação esquemática do Desenho Composto Central (DCC).

Tabela 2.2. Níveis codificados e valores reais dos factores investigados.

Factores	Níveis				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1 : Concentração de PVA (% m/v)	0.38	1.00	2.50	4.00	4.60
X_2 : Concentração de PHBV (% m/v)	0.88	1.50	3.00	4.50	5.12

O desenho adoptado pertence a uma classe de desenhos designados por Métodos de Resposta de Superfície (*Surface Response Methods*)⁴³. Este tipo de desenhos permite ajustar a resposta investigada a um modelo polinomial quadrático, o qual descreve quantitativamente os efeitos das variáveis independentes na variável dependente investigada. Para dois factores, o modelo geral corresponde à seguinte equação:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Nesta equação, X_1 e X_2 são as variáveis independentes, e, Y , a variável dependente. O coeficiente b_0 corresponde à média aritmética dos valores da resposta obtidos em todas as experiências realizadas. Os coeficientes b_1 e b_2 descrevem os efeitos das variáveis independentes, os coeficientes b_{11} e b_{22} os efeitos de segunda ordem e, o coeficiente b_{12} , representa o efeito da interacção entre os dois factores.

Se os modelos quadráticos ajustados para as várias respostas forem válidos, ou seja, se descreverem adequadamente o comportamento das variáveis dependentes no espaço experimental investigado, estes podem ser utilizados para otimizar essas mesmas respostas, através da determinação de pontos máximos ou mínimos.

A selecção das variáveis independente a serem investigadas – a concentração do polímero na fase dispersa, [PHBV], e a concentração do surfactante na fase contínua, [PVA]- foi feita a pensar na optimização da distribuição de tamanhos das partículas. Por detrás deste propósito encontrava-se a futura intenção de investigar o desempenho das partículas formadas enquanto sistemas de libertação local para actuar na região ocular, mais especificamente através da administração tópica na região anterior do olho. Nesta aplicação em particular, o tamanho das partículas é considerado uma propriedade fundamental, pois para que se torne viável a administração tópica das micropartículas no olho estas têm de possuir um tamanho inferior a 10 μm ⁴⁴.

Assim, estipulou-se como objectivo principal a obtenção de micropartículas de PHBV com uma distribuição de tamanhos entre 1 e 10 μm . Para isso decidiu-se investigar as variáveis [PHBV] e [PVA], pois sabe-se que estas têm uma influência significativa nas distribuição de tamanhos das partículas produzidas pelo método EES. Adicionalmente, fixou-se a velocidade do sistema de agitação disponível (agitação mecânica) na velocidade máxima possível (1400 rpm), pois este é o factor com mais impacto no tamanho das partículas obtidas. As restantes variáveis foram fixadas em níveis típicos, depois de se ter consultado a literatura^{9-11, 13, 16-18, 25, 26}.

2.3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados, bem como o grau de pureza, fornecedor e número de registo do *Chemical Abstracts Service* (CAS), são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Lista de reagentes utilizados.

Reagente	Pureza	Marca	CAS
PHBV (6% mol HV, M_w = 233 kDa)	?	PHB Industrial SA	80181-31-3
Álcool Polivinílico, PVA (80% hidrolisado, M_w =13-23 kDa)	?	Sigma-Aldrich	9002-89-5
Flurbiprofeno	> 98%	Sigma-Aldrich	5104-49-4
Clorofórmio	?	José Vaz Pereira	67-66-3

2.3.4 Procedimento experimental

2.3.4.1 Preparação das micropartículas

O PHBV foi dissolvido em 10 ml de clorofórmio nas várias concentrações referidas na Tabela 2.2. Em cada uma das soluções preparadas dissolveu-se o fármaco na proporção mássica de 3:10 (3g de flurbiprofeno/10g PHBV).

Cada solução orgânica assim obtida foi adicionada, gota a gota, a 100 ml de uma solução aquosa de PVA sob agitação mecânica. As concentrações das soluções de PVA utilizadas encontram-se igualmente indicadas na Tabela 2.2. De forma a evaporar o clorofórmio, cada emulsão O/W formada foi deixada sobre agitação mecânica, a 1400 rpm, durante 4 horas e a uma temperatura de 30°C.

Depois de evaporado o solvente, as partículas formadas foram recolhidas por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos) e lavadas por três vezes com água desionizada. Depois de lavadas, estas foram secas numa estufa de vácuo a 40°C e, finalmente, armazenadas num excicador até futura utilização.

Desta forma, e de acordo com o desenho de experiências adoptado, foram produzidos 11 *batches* de micropartículas de PHBV com flurbiprofeno encapsulado (MS-PHBV-FLU). Adicionalmente, e utilizando um procedimento idêntico, prepararam-se micropartículas sem fármaco, utilizando as concentrações de PHBV e PVA correspondentes ao ponto central do desenho de experiências (3% PHBV, 2.5% PVA)

2.3.4.2 Determinação da quantidade experimental de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulação (EE)

A quantidade de flurbiprofeno presente nas micropartículas foi determinada por espectroscopia UV/VIS. Para isso dissolveu-se uma quantidade conhecida de MS-PHBV-FLU (~10mg) em 1 ml de clorofórmio, seguida da adição de 9 ml de metanol, de forma a precipitar o polímero. A suspensão de polímero resultante foi depois centrifugada. O sobrenadante foi separado do precipitado e filtrado com filtros de acetato de celulose (45 µm). O sobrenadante filtrado foi diluído com uma mistura clorofórmio/metanol (1:9, v/v) até uma concentração apropriada, e a absorvância a 247 nm, correspondente ao pico de absorção do flurbiprofeno, foi determinada num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-550). Soluções padrão de

flurbiprofeno, com concentrações entre 1.8 e 9 µg/ml e preparadas com a mesma mistura de clorofórmio/metanol, foram utilizadas para construir a curva de calibração. Este processo de quantificação foi repetido três vezes para cada *batch* de micropartículas.

A quantidade experimental de fármaco encapsulado (imobilizado) nas micropartículas foi calculada da seguinte forma:

$$\begin{aligned} & \text{Quantidade experimental de fármaco encapsulado (\%)} \\ &= \frac{\text{massa de fármaco quantificada}}{\text{massa (MS_PHBV_FLU)}} \times 100 \end{aligned}$$

A quantidade teórica de fármaco encapsulado corresponde à percentagem de fármaco que as micropartículas teriam se nenhum fármaco fosse perdido durante o processo da sua formação. Esta quantidade é definida da seguinte forma:

$$\begin{aligned} & \text{Quantidade teórica de fármaco encapsulado (\%)} \\ &= \frac{\text{massa de fármaco adicionado}}{\text{massa de fármaco adicionado} + \text{massa de PHBV adicionado}} \times 100 \end{aligned}$$

Este parâmetro foi mantido constante em todas as formulações, a um valor de 23%.

A eficiência de encapsulação (EE, %) expressa a razão entre a quantidade fármaco efectivamente imobilizado (quantidade experimental de fármaco encapsulado) e a quantidade de fármaco adicionada inicialmente:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade experimental de fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade teórica de fármaco encapsulado}} \times 100$$

2.3.4.3 Determinação da solubilidade do flurbiprofeno em soluções aquosas de PVA

A solubilidade do flurbiprofeno em duas soluções aquosas de PVA, com concentrações de 0.50% (m/v) e 4.50%, foi determinada a 25°C. Para isso adicionou-se uma quantidade conhecida de flurbiprofeno a 20 ml de cada solução de PVA, e deixou-se este a dissolver nestas durante 5 dias, em frascos fechados e com agitação magnética. Foram preparadas 3 amostras para cada concentração de PVA.

Passados esses dias, parou-se a agitação e deixou-se as soluções repousarem durante algumas horas, de forma a deixar assentar os cristais de fármaco não solubilizados. Uma pequena quantidade dessas soluções foi então retirada, convenientemente diluída com uma solução de PVA de igual concentração, e a absorvância a 247 nm foi determinada num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco, modelo V-550). A quantidade de flurbiprofeno solubilizado foi determinada utilizando soluções padrão de flurbiprofeno preparadas a partir de soluções de PVA com a mesma concentração.

2.3.4.4 *Determinação da distribuição de tamanhos*

A distribuição de tamanhos das micropartículas foi determinada num aparelho de difracção de luz laser (Coulter, modelo LS130). Para cada formulação, uma quantidade apropriada de micropartículas secas foi suspensa em água desionizada e sonicada. A suspensão resultante foi analisada e o diâmetro médio volumétrico e a distribuição de tamanhos foram determinadas pelo método de Fraunhofer.

A amplitude da distribuição de tamanhos foi expressa em termos do factor SPAN, definido como:

$$SPAN = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

Nesta equação, os parâmetros d_{10} , d_{50} , e d_{90} , representam os valores dos diâmetros para os quais uma certa percentagem de partículas da amostra (percentagem indicada pelo valor do subíndice) é inferior a esse tamanho. Um valor de SPAN próximo de 1.0 indica uma distribuição de tamanhos estreita.

2.3.4.5 *Análise morfológica das micropartículas*

A morfologia da superfície das micropartículas de PHBV, com e sem fármaco, foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM). As micropartículas foram dispersas numa fita adesiva de grafite colada a um suporte de metal e revestidas com ouro. As observações foram realizadas a 20 kV num microscópio electrónico de varrimento JSM-5310 (JEOL, Japão).

2.3.4.6 *Análise térmica*

A análise térmica das micropartículas e do fármaco puro foi realizada por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) num aparelho da TA Instruments (modelo Q100). As amostras, com um peso entre 2.5 e 12 mg, foram colocadas em cadinhos de alumínio. Estes foram selados e as amostras aquecidas, a uma taxa constante de 5°C/min, desde a temperatura ambiente até 200°C, sob uma atmosfera de azoto.

2.3.4.7 *Estudos de libertação in vitro*

Os perfis de libertação *in vitro* do flurbiprofeno foram avaliados num meio de libertação composto por uma solução de cloreto de sódio (3.5g/l Na⁺, 5.4 g/l Cl⁻, pH~6), utilizando o método da diálise.

Uma quantidade conhecida de MS-PHBV-FLU, correspondente a aproximadamente 1 mg de fármaco, foi colocada no interior de membranas de acetato de celulose (com um *cut-off* entre 12 e 14 kDa). Os sacos com as micropartículas foram cheios com 20 ml da solução salina, fechados, e colocados em frascos selados contendo 50 ml de solução salina, sob agitação magnética (120 rpm). A temperatura do meio de libertação foi mantida a cerca de 37°C, por meio de um banho de água termoestabilizado.

Em tempos pré-determinados, um certo volume do meio de libertação exterior (1.6 ml) era retirado e substituído por um volume igual de solução salina fresca.

A quantidade de flurbiprofeno nas amostras foi determinada através da análise da absorvância a 247 nm, num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-550).

Como controlo negativo, micropartículas de PHBV sem fármaco encapsulado foram sujeitas ao mesmo procedimento e análises.

Para efeitos comparativos, o estudo da dissolução de 1mg de fármaco puro, e de 1mg de fármaco puro fisicamente misturado com micropartículas de PHBV sem fármaco, foi realizado, utilizando o mesmo procedimento adoptado para a libertação das partículas MS-PHBV-FLU.

2.4 Resultados e discussão

Os valores experimentais das respostas investigadas, obtidos com a implementação do desenho compósito central (DCC) já descrito, são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Valores das respostas investigadas com o DCC.

<i>Batch</i> (formulações)	X_1 [PVA] (%, m/v)	X_2 [PHBV] (%, m/v)	Y_1 EE (%)	Y_2 Tamanho médio (μm)	Y_3 SPAN	Y_4 $t_{50\%}$ (min)
B1*	2.5	3	40.6 \pm 1.4	8.7	2.2	105
B2	0.38	3	71.1 \pm 2.1	7.0	3.7	108
B3	4.62	3	29.6 \pm 1.9	10.4	1.8	123
B4	2.5	0.88	22.0 \pm 1.0	4.6	1.7	112
B5	4	1.5	20.9 \pm 0.7	5.4	2.2	105
B6	1	1.5	42.5 \pm 1.1	9.9	3.5	145
B7	4	4.5	56.0 \pm 1.3	8.5	1.8	155
B8	1	4.5	60.4 \pm 3.8	11.3	4.6	220
B9*	2.5	3	41.9 \pm 1.9	12.0	1.6	112
B10	2.5	5.12	50.2 \pm 0.5	19.2	2.0	110
B11*	2.5	3	39.5 \pm 0.7	10.3	1.8	112

* Ponto central.

O *software* Design Expert® (versão 7.0.0) foi utilizado para analisar as respostas obtidas e ajustá-las a modelos matemáticos através da correlação dos valores experimentais. Cada variável dependente (resposta) foi inicialmente ajustada a um modelo quadrático. No caso de nenhum dos termos quadráticos se revelar estatisticamente significativo, o modelo era simplificado e transformado num modelo linear. Quando pelo menos um dos termos quadráticos se revelou significativo manteve-se o modelo quadrático integral, de forma a não comprometer a hierarquia polinomial da equação. Um resumo dos modelos ajustados a cada variável, e dos parâmetros associados às respectivas regressões, é apresentado na Tabela 2.5.

Mais do que ajustar um modelo é necessário verificar a validade deste, ou seja, averiguar se este possui ou não a capacidade para descrever de forma adequada o comportamento exibido pela variável dependente investigada. Existem uma série de ferramentas que permitem avaliar a validade do modelo, como testes estatísticos, o cálculo de parâmetros associados à regressão, como o coeficiente de correlação quadrático, R^2 , ou métodos gráficos de análise dos resíduos⁴³. No entanto

não existem normas rígidas que se possam seguir para tomar a decisão de validar ou não o modelo matemático ajustado. Neste trabalho estabeleceu-se como critérios necessários para que o modelo fosse válido que este fosse estatisticamente significativo (Análise ANOVA do modelo com valores de $p < 0.05$, Tabela 2.5) e que o R^2 do ajuste tivesse um valor superior a 0.9. Seguindo estes critérios, e considerando o valor destes parâmetros para os modelos ajustados, apresentados na Tabela 2.5, apenas se pode validar o modelo quadrático ajustado para a variável EE (variável Y_1). Para as variáveis tamanho médio das partículas (Y_2), e índice SPAN (Y_3), não foi possível validar nenhum dos possíveis modelos ajustáveis (linear ou quadrático), sendo que os modelos apresentados na Tabela 2.5 são os modelos que melhor se ajustam aos dados experimentais. Relativamente à variável Y_4 , concluiu-se que a média de todos os valores experimentais era uma melhor previsão do que a dada por um modelo linear ou quadrático.

Assim, os modelos apresentados na Tabela 2.5 (excepto o modelo quadrático ajustado à EE) têm de ser vistos apenas de forma qualitativa. Isto significa que estes podem ser utilizados para elucidar a forma como as variáveis independentes afectam as variáveis dependentes, mas não podem ser utilizados, sem um risco elevado de obter resultados duvidosos, como modelos interpolativos, ou em processos de optimização das respostas.

Tabela 2.5 Resumo dos modelos ajustados às variáveis dependentes.

	Y₁: EE	Y₂: Tamanho médio (μm)	Y₃: SPAN	Y₄: t_{50%} (min.)
Tipo de modelo	Quadrático	Linear	Quadrático	Média
Modelo	$Y_1 = 56.6 - 24.5[\text{PVA}] + 7.9[\text{PHBV}] + 2.4[\text{PVA}]^2 - 0.8[\text{PHBV}]^2 + 1.9[\text{PVA}] \times [\text{PHBV}]$	$Y_2 = 4.08 - 0.23[\text{PVA}] + 2.10[\text{PHBV}]$	$Y_3 = 4.17 - 1.45[\text{PVA}] + 0.05[\text{PHBV}] + 0.28[\text{PVA}]^2 + 0.08[\text{PHBV}]^2 - 0.17[\text{PVA}] \times [\text{PHBV}]$	$Y_4 = 128$
ANOVA	$p = 0.0059$	$p = 0.0501$	$p = 0.0383$	-
R²	0.9329	0.6024	0.8528	-
Validação	Sim	Não	Não	-

Nos 11 *batches* de micropartículas, a EE do flurbiprofeno (Tabela 2.4) varia entre 20.9 ± 0.7 (para a formulação com 4% PVA e 1.5% PHBV) e 71.1 ± 2.1 (0.38% PVA, 3% PHBV), o que corresponde a uma percentagem de flurbiprofeno nas

micropartículas de $4.8 \pm 0.2\%$ e $16.4 \pm 0.5\%$, respectivamente. Na Tabela 2.6 pode-se observar os resultados da análise ANOVA para os coeficientes do modelo quadrático ajustado a esta variável. Esta revela que as duas variáveis independentes investigadas têm um efeito muito significativo sobre a EE ($p < 0.01$) e que, adicionalmente, a concentração de PVA tem um efeito quadrático significativo ($p < 0.1$). Estes efeitos podem ser observados na Figura 2.5, onde as EE determinadas experimentalmente e a superfície de resposta correspondente ao modelo quadrático ajustado (Tabela 2.5) são representadas em função da concentração de PVA e da concentração de PHBV.

Tabela 2.6 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas na EE (Y_1).

Origem da variação	SQ	GL	QM	F	p Prob> F
[PVA]*	896.55	1	896.55	27.35	0.0034
[PHBV]*	1078.36	1	1078.36	32.89	0.0023
[PVA] × [PHBV]	73.96	1	73.96	2.26	0.1934
[PVA] ² *	157.01	1	157.01	4.79	0.0803
[PHBV] ² *	19.37	1	19.37	0.59	0.4768
Resíduo	163.93	5	32.79		
Total	2441.39	10			

SQ – Soma de quadrados; GL – Graus de liberdade; QM – Média de quadrados; F – teste F; p – valor p do teste F.

* Efeitos significativos ($p < 0.1$)

A resposta de superfície apresentada na Figura 2.5 evidencia o efeito oposto que as duas variáveis independentes têm na eficiência de encapsulação do flurbiprofeno. Enquanto o aumento da concentração do polímero na fase orgânica, [PHBV], resulta num aumento da EE do fármaco (efeito positivo), o aumento da concentração de PVA na fase aquosa, [PVA], resulta numa diminuição acentuada da EE (efeito negativo).

Na literatura, o efeito da concentração de PVA na EE de compostos encapsulados em nano/micropartículas pelo método de EES numa emulsão O/W varia conforme o sistema polímero/composto activo investigado. Enquanto alguns autores descrevem que um aumento da [PVA] conduz a um aumento da EE³⁴, outros referem que esta variável não afecta significativamente a EE⁴⁵, enquanto outros, tal como neste trabalho, assinalam o efeito negativo que a [PVA] tem na EE do composto bioactivo^{46, 47}.

Considerando que a EE é uma consequência da partição do composto bioactivo entre a fase dispersa e a fase aquosa durante o processo de emulsificação e de solidificação das partículas, e que a magnitude dessa partição é determinada sobretudo pela solubilidade do composto bioactivo na fase aquosa, a diminuição da EE do flurbiprofeno com o aumento da [PVA] pode ser justificada pelo aumento da solubilidade deste fármaco em soluções com uma crescente quantidade deste surfactante. Este comportamento foi verificado experimentalmente através determinação da solubilidade do flurbiprofeno em duas soluções de PVA, tendo-se observado que a solubilidade do flurbiprofeno aumentava de 0.173 ± 0.010 mg/ml, numa solução com 0.5% de PVA (m/v), para 0.336 ± 0.006 mg/ml, numa solução com 4.5% de PVA.

O aumento da solubilidade de fármacos fracamente solúveis em água em soluções de surfactantes (micelização) é um fenómeno bastante bem documentado, sendo uma das estratégias utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de fármacos com uma solubilidade aquosa reduzida, como é o caso dos AINE's^{48, 49} e do flurbiprofeno em particular^{50, 51}.

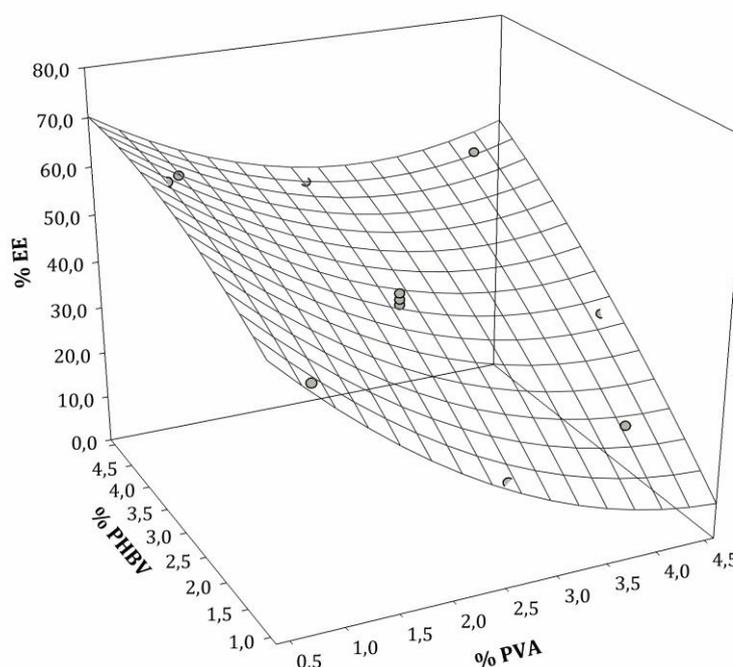


Figura 2.5 Resposta de superfície do efeito das concentrações de PHBV e de PVA na eficiência de encapsulação (EE) do flurbiprofeno nas micropartículas de PHBV produzidas. Pontos: Valores experimentais. Superfície: modelo quadrático ajustado.

Como foi mencionado, a concentração do polímero na fase dispersa, [PHBV], tem um efeito positivo significativo sobre a EE do flurbiprofeno. O aumento da EE com o aumento da concentração do polímero encontra-se bem documentado e estabelecido na literatura⁵, sendo a causa para este comportamento atribuída à restrição da migração do composto activo da fase dispersa para a fase contínua, devida ao aumento da viscosidade da fase dispersa com o aumento da concentração do polímero nesta.

A influência da [PVA] e [PHBV] nas dimensões das partículas produzidas foi investigada através da análise das variáveis dependentes tamanho médio das partículas (Y_2) e factor SPAN (Y_3). Nos 11 *batches*, o tamanho médio das partículas varia entre 4.6 μm (B4) e 19.2 μm (B10). Os valores de SPAN variam entre 1.6 (B9) e 4.6 (B8).

Na Figura 2.6 encontram-se representadas as curvas de distribuições de tamanhos de todos os *batches* de partículas produzidas. Como é observável, as distribuições de tamanhos não assumem uma distribuição normal, e nem todas as curvas são unimodais. Considerando que os conceitos de tamanho médio e do factor SPAN, enquanto parâmetros válidos para descrever as características de uma distribuição de tamanhos, implicam uma distribuição normal ou aproximadamente normal, os valores obtidos neste trabalho têm de ser interpretados criticamente. O próprio facto dos valores experimentais destas duas variáveis não serem adequadamente descritos por um modelo, linear ou quadrático, reflecte a inerente inadequação destes parâmetros para caracterizar as curvas de distribuição de tamanhos obtidas.

Na Tabela 2.7 encontram-se os resultados da análise ANOVA para os efeitos das variáveis [PVA] e [PHBV] sobre o índice SPAN. Estes indicam que a [PVA] tem um efeito muito significativo ($p < 0.01$) e que o efeito quadrático desta variável é também estatisticamente significativo ($p < 0.1$). Os efeitos da [PHBV] e da interacção dos dois factores revelaram-se estatisticamente não significativos ($p > 0.1$).

Pela observação das curvas de distribuição de tamanhos da Figura 2.6 pode-se ver que as partículas formadas utilizando as concentrações de PVA mais baixas

(B2, 0.38% PVA; B6 e B8, 1% PVA), apresentam as distribuições de tamanhos mais irregulares e alargadas. Em contraste, as partículas formadas na presença de concentrações mais elevadas de PVA (2.5%, 4% e 4.62%), apresentam uma distribuição de tamanhos mais semelhante a uma distribuição normal. Estas observações indiciam que existe uma concentração mínima de PVA necessária para obter uma emulsão O/W estável, ou seja, que minimize a coalescência e a agregação das partículas formadas. Na literatura alguns autores referem também este efeito. Adicionalmente é assinalado que uma concentração demasiado elevada de PVA pode conduzir também à agregação das partículas formadas¹, o que pode justificar o efeito positivo significativo do termo quadrático [PVA]², detectado pela análise ANOVA efectuada.

Tabela 2.7 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no factor SPAN das partículas produzidas (Y₃).

Origem da variação	SQ	GL	QM	F	<i>p</i> Prob> F
[PVA]*	5.76	1	5.76	19.23	0.0071
[PHBV]	0.16	1	0.16	0.53	0.5001
[PVA] × [PHBV]	0.56	1	0.56	1.88	0.2288
[PVA] ² *	2.19	1	2.19	7.32	0.0425
[PHBV] ²	0.17	1	0.17	0.56	0.4865
Resíduo	1.50	5	0.30		
Total	10.17	10			

* Efeitos significativos ($p < 0.1$)

Na Tabela 2.8 são apresentados os resultados da análise ANOVA para o tamanho médio das partículas. O único factor que apresenta um efeito (positivo) estatisticamente significativo ($p < 0.1$) é a concentração do polímero na fase orgânica. O aumento do tamanho médio das partículas produzidas pelo método EES numa emulsão O/W, devido aumento da concentração de polímero, é um efeito também bem estabelecido na literatura ^{4,5}. O aumento da concentração do polímero implica um aumento da viscosidade da fase orgânica, tornando-a mais difícil de dispersar em pequenas gotículas. Este efeito pode ser detectado observando directamente as curvas de distribuição de tamanhos das partículas obtidas com uma concentração de PVA fixa de 2.5% (Figura 2.6) e concentrações de PHBV de 0.88, 3.0 e 5.12%. Nestas observa-se o deslocamento das curvas para tamanhos mais elevados com o aumento da [PHBV].

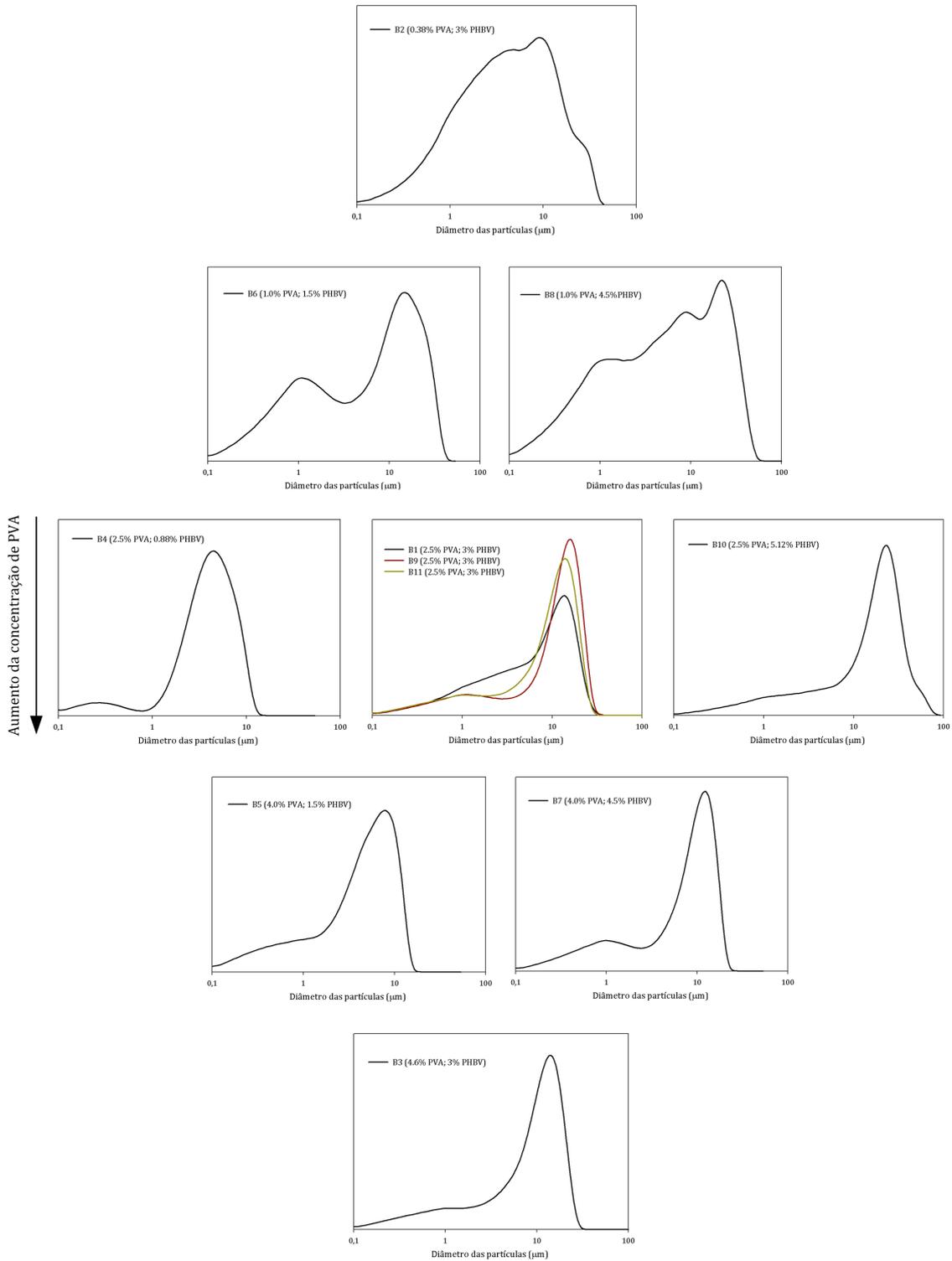


Figura 2.6 Curvas de distribuição de tamanhos dos onze *batches* de micropartículas produzidas.

Tabela 2.8 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no tamanho médio das micropartículas produzidas (Y_2).

Origem da variação	SQ	GL	QM	F	p Prob> F
[PVA]	0.96	1	0.96	0.080	0.7892
[PHBV]*	79.05	1	79.05	6.54	0.0509
[PVA] × [PHBV]	0.72	1	0.72	0.060	0.8166
[PVA] ²	7.60	1	7.60	0.63	0.4638
[PHBV] ²	0.86	1	0.86	0.071	0.8007
Resíduo	60.48	5			
Total	152.12	10			

* Efeitos significativos ($p < 0.1$)

A morfologia da superfície das micropartículas produzidas pode ser observada nas imagens de SEM apresentadas na Figura 2.7. As micropartículas de PHBV sem fármaco (Figura 2.7a) apresentam uma forma esférica e uma superfície bastante rugosa que, segundo Martin *et al*⁵², é uma consequência do elevado grau de cristalinidade do polímero. A morfologia observada corresponde à morfologia típica exibida pelas micropartículas de PHBV ou PHB produzidas pelo método EES.

As micropartículas com o flurbiprofeno imobilizado (MS_PHBV_FLU), Figura 2.7b, apresentam uma morfologia bastante acidentada, onde é visível a presença de grandes cavidades.

O aspecto das MS_PHBV_FLU depois dos ensaios de libertação *in vitro* pode ser observado na Figura 2.7c. Comparativamente com o aspecto das micropartículas antes do ensaio de libertação, estas apresentam um aspecto “lavado”, o que sugere a existência de fármaco a cobrir a superfície das micropartículas antes da libertação, e que, devido à sua dissolução, altera o aspecto e morfologia das micropartículas libertadas. No entanto, a observação da superfície das micropartículas antes da libertação (Figura 2.7b) não permite afirmar, com certeza, que existem partículas de fármaco à superfície destas.

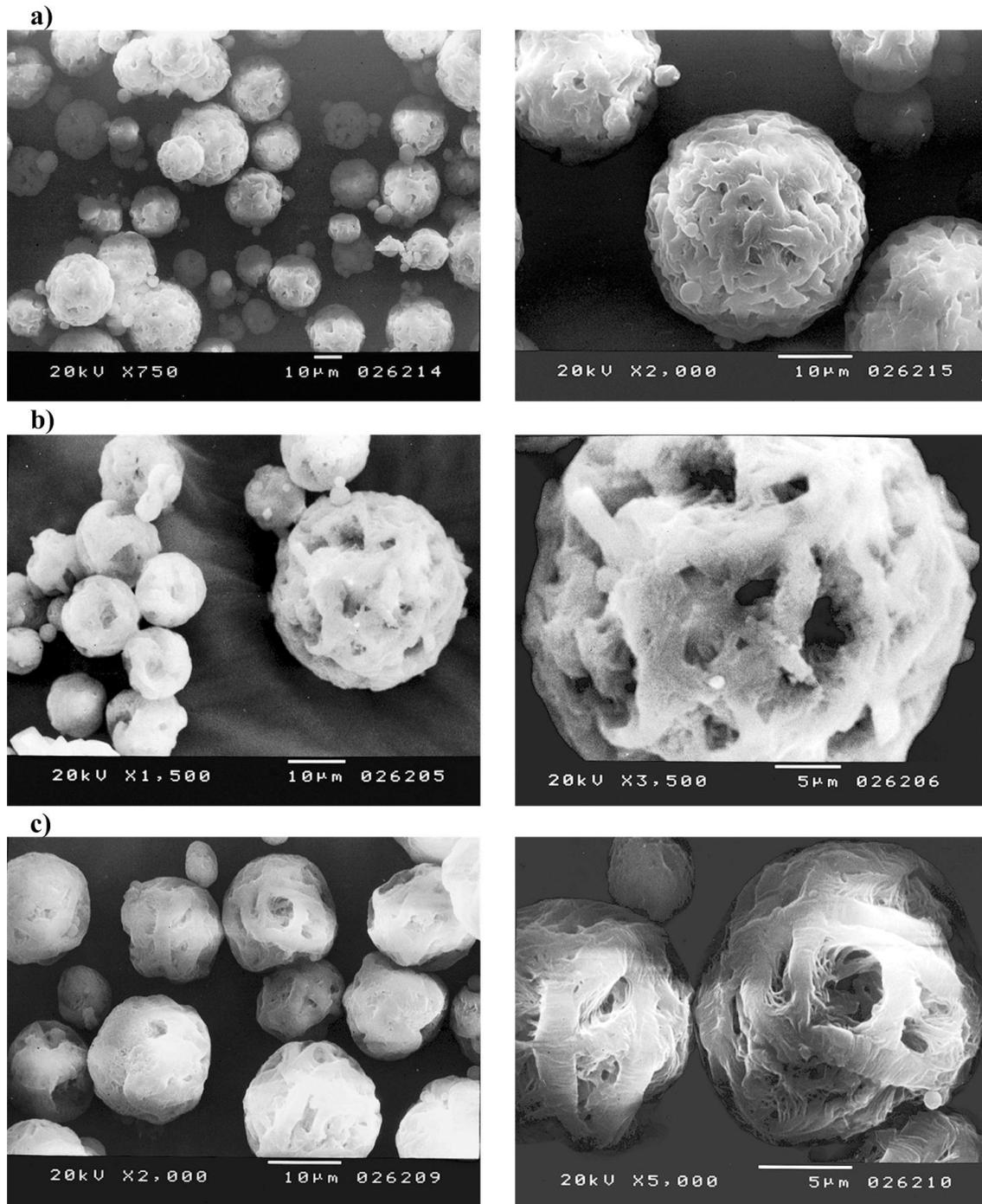


Figura 2.7 Imagens de SEM de: a) micropartículas de PHBV sem fármaco imobilizado; b) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno; c) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno depois dos ensaios de liberação *in vitro*.

Na Figura 2.8 apresentam-se as curvas de DSC do flurbiprofeno puro (curva a), das micropartículas de PHBV sem fármaco imobilizado (curva b), da mistura física de fármaco puro e micropartículas sem fármaco imobilizado (curva c), e das MS_PHBV_FLU (curva d).

Na curva correspondente ao fármaco puro é possível observar um evento endotérmico, centrado a cerca de 115 °C, correspondente ao fenómeno de fusão do sólido cristalino puro.

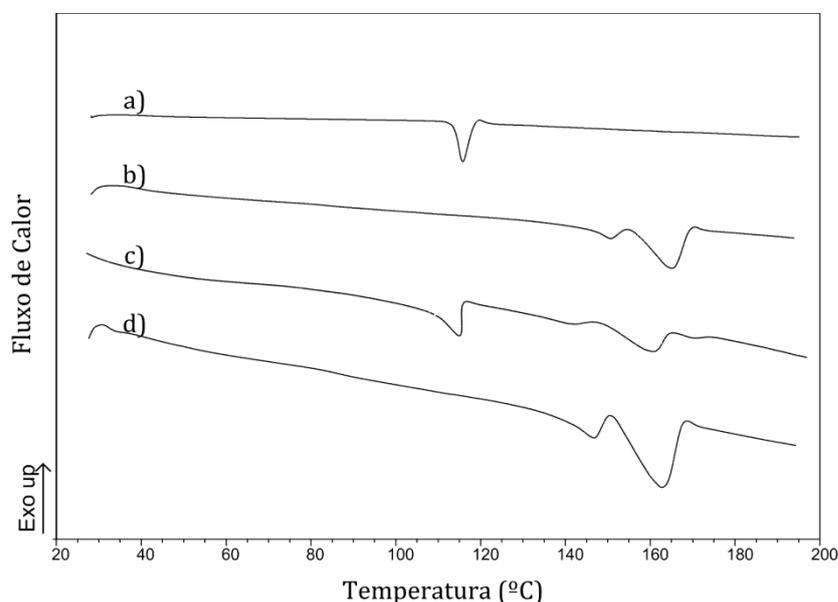


Figura 2.8 Curvas de DSC de: a) flurbiprofeno puro; b) micropartículas de PHBV sem fármaco; c) mistura física de flurbiprofeno puro e de micropartículas de PHBV sem fármaco imobilizado (1:3); d) micropartículas de PHBV com flurbiprofeno encapsulado.

Na curva b) observam-se dois picos endotérmicos, situados a cerca de 145 e 165°C. Estes são atribuídos ao fenómeno de fusão dos domínios cristalinos do PHBV. O aparecimento de dois picos endotérmicos ou mais associados ao processo de fusão de filmes de PHB ou PHBV, obtidos pelo método de *solvent casting*, encontra-se relatado na literatura⁵³. Aparentemente este comportamento deve-se à fusão, recristalização, e a uma novamente fusão do polímero durante o processo de aquecimento.

Na curva c), correspondente à mistura física de flurbiprofeno puro e micropartículas sem fármaco imobilizado, manifestam-se os eventos térmicos observados nas duas curvas anteriores.

A curva d) ilustra o comportamento térmico das MS_PHBV_FLU com uma percentagem de flurbiprofeno de 9.4 % (B1). Nesta é possível observar os picos endotérmicos característicos da fusão do polímero. Pelo contrário, o pico de fusão do fármaco não é observado.

O desaparecimento do pico de fusão do fármaco encapsulado em partículas preparadas pelo método EES, nas curvas de DSC, é um fenómeno relatado por alguns

autores⁵. Segundo Dubernet⁵⁴ este comportamento indica que o fármaco se encontra dissolvido no polímero, numa solução sólida, ou que este se encontra disperso a nível molecular na matriz polimérica, numa dispersão molecular metaestável. Uma hipótese alternativa, e que parece ser provável, atendendo aos perfis de libertação *in vitro*, apresentados mais à frente, é que, devido à fraca solubilidade do fármaco no polímero, este, durante o processo de evaporação do solvente, precipite, na sua maioria, numa forma não cristalina, em finas partículas, dispersas pelas cavidades e superfície das micropartículas.

Os ensaios de libertação *in vitro* do flurbiprofeno a partir das MS_PHBV_FLU revelaram perfis de libertação bastante semelhantes, para todos 11 *batches* de micropartículas. Estes são caracterizados, na primeira meia hora de ensaio, por um *burst release* de cerca de 15 a 25% do fármaco encapsulado, e pela libertação de cerca de 90% do fármaco até 8 às horas de libertação. Os perfis de libertação *in vitro* dos *batches* de micropartículas produzidas com a formulação do ponto central do desenho de experiências (2.5% PVA, 3.0% PHBV; *batches* B1, B9 e B11) encontram-se representados na Figura 2.9.

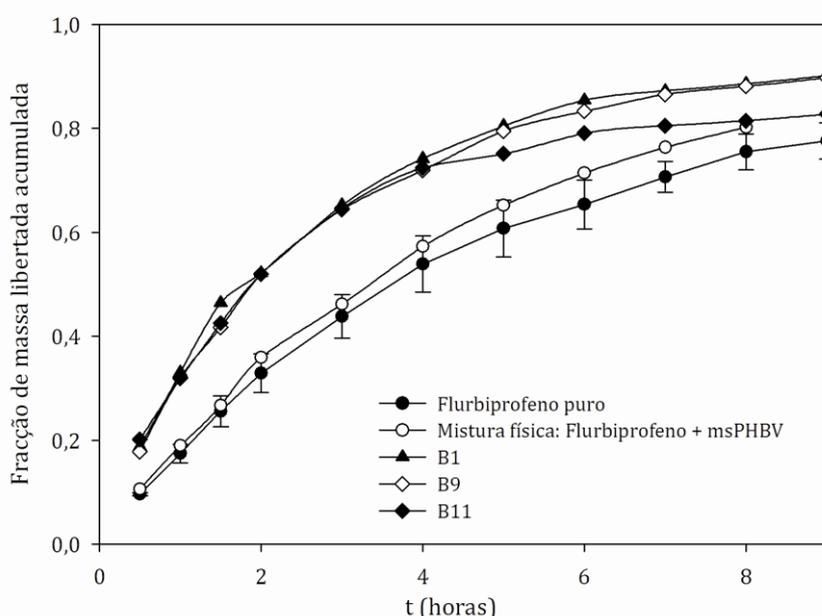


Figura 2.9 Perfis de libertação *in vitro* do flurbiprofeno encapsulado nas micropartículas B1, B9 e B11 (formulação do ponto central: 2.5% PVA e 3% PHBV) e perfis de dissolução do fármaco puro (média \pm DP; n= 3) e do fármaco puro fisicamente misturado com micropartículas de PHBV sem fármaco (proporção fármaco: micropartículas de 1:10).

O tempo corresponde a 50% de libertação do fármaco encapsulado ($t_{50\%}$, variável dependente Y_4) variou entre 105 e 155 minutos, para todas as formulações, excepto a formulação B8, cujo $t_{50\%}$ foi calculado em 220 minutos. A análise ANOVA sobre o efeito dos factores investigados sobre esta variável é apresentada na Tabela 2.9. Esta revela que nenhum dos factores ou a interacção entre eles afecta de forma estatisticamente significativa a variável $t_{50\%}$. Isto significa que a melhor previsão para esta variável corresponde à média dos valores de $t_{50\%}$ obtidos para os 11 *batches* de micropartículas libertadas ($Y_4 = 128$ min).

Tabela 2.9 Análise ANOVA dos efeitos das variáveis investigadas no tempo de libertação *in vitro* de 50% do fármaco encapsulado, $t_{50\%}$ (Y_4).

Origem da variação	SQ	GL	QM	F	p Prob> F
[PVA]	877.53	1	877.53	0.57	0.4861
[PHBV]	1865.74	1	1865.74	1.20	0.3230
[PVA] × [PHBV]	156.25	1	156.25	0.10	0.7639
[PVA] ²	1054.75	1	1054.75	0.68	0.4474
[PHBV] ²	736.04	1	736.04	0.47	0.5218
Resíduo	7764.40	5			
Total	12056.91	10			

Contrariamente ao esperado, os valores de $t_{50\%}$ associados aos perfis de dissolução do flurbiprofeno puro, e da mistura deste com micropartículas de PHBV sem fármaco, revelaram ser significativamente maiores (cerca de 255 minutos), o que significa que a taxa de dissolução do fármaco no estado puro é menor do que taxa de libertação do flurbiprofeno a partir das micropartículas. Os perfis de dissolução do fármaco encontram-se igualmente representados na Figura 2.9, onde podem ser comparados com os perfis de libertação do flurbiprofeno a partir das micropartículas.

A Figura 2.9 revela também claramente que a percentagem de flurbiprofeno libertado a partir das micropartículas nos tempos iniciais do ensaio (primeira meia hora) é claramente superior à percentagem de fármaco puro dissolvido no mesmo período de tempo (~10% do fármaco total).

Estes resultados sugerem que, com as formulações investigadas, mais do que uma imobilização do fármaco obteve-se uma dispersão deste. Ou seja, a formação de micropartículas com fármaco originou, essencialmente, uma dispersão do fármaco

pela superfície e cavidades das micropartículas, e não a imobilização efectiva do fármaco no interior da matriz polimérica.

Desta forma a libertação do fármaco a partir das micropartículas não é controlada pela difusão deste através da matriz polimérica, ou pela biodegradação dessa mesma matriz, mas sim pela taxa de dissolução das partículas de fármaco dispersas à superfície das micropartículas de PHBV.

O facto das partículas de fármaco nas micropartículas se dissolverem mais rapidamente que as partículas de fármaco original (fármaco puro) pode ser atribuída a uma série de propriedades dessas mesmas partículas, como o seu tamanho e área superficial, molhabilidade e natureza (amorfa ou cristalina), pois sabe-se que todas estas propriedades afectam a taxa de dissolução de sólidos com carácter marcadamente hidrofóbico⁵⁵, como é o caso do flurbiprofeno.

Uma variável não investigada, e que possivelmente é a principal responsável pelas características dos perfis de libertação obtidos, é a proporção fármaco/polímero utilizada na preparação das partículas (equivalente à percentagem teórica de fármaco encapsulado _ PTFE, definida na secção 2.3.4.2), pois esta é uma variável que tem um grande impacto na modulação dos perfis de libertação. Normalmente a utilização de PTFE elevadas, como se utilizou neste trabalho (a PTFE foi fixada em 23%) resulta numa libertação rápida do fármaco encapsulado, devido à formação de partículas irregulares e porosas e à separação de fases entre fármaco e polímero³.

2.5 Conclusões

Neste capítulo investigou-se a imobilização do fármaco flurbiprofeno em micropartículas de PHBV preparadas pelo método EES numa emulsão O/W. O efeito de duas variáveis do processo – a concentração do polímero na fase orgânica, [PHBV], e a concentração do surfactante na fase aquosa, [PVA], - sobre as propriedades das micropartículas obtidas, foi analisado através da implementação de um desenho composto central de experiências.

A análise dos resultados experimentais permitiu concluir que os dois factores investigados afectam de forma muito significativa e oposta a EE do fármaco. Enquanto o aumento de [PHBV] favorece a EE, o aumento da [PVA] afecta de forma marcadamente negativa o EE do fármaco, isto devido ao aumento da solubilidade deste na fase aquosa com concentrações crescentes de surfactante. Um modelo quadrático foi ajustado e validado para descrever a EE.

As características das distribuições de tamanhos das partículas, nomeadamente o tamanho médio (Y_2) e o factor SPAN (Y_3), revelaram também ser afectadas significativamente pelos factores investigados. Enquanto o tamanho médio das partículas revelou ser afectado positivamente pelo aumento da [PHBV], a [PVA] revelou ser um factor crítico no grau de agregação das partículas obtidas e, conseqüentemente, nos valores do factor SPAN. Conclui-se que existe um limite mínimo requerido de [PVA] para estabilizar a emulsão O/W e obter micropartículas não agregadas. Os resultados indicam que o valor desta concentração é superior a 1% (w/v). Nenhum modelo, linear ou quadrático, se revelou válido para descrever estas duas variáveis.

Os perfis de libertação *in vitro* do fármaco a partir dos vários *batches* de micropartículas produzidas revelaram ser bastante semelhantes entre si, sendo que em todos se verifica que cerca de 90% do fármaco é libertado nas primeiras oito horas de libertação. A análise estatística dos valores de $t_{50\%}$ (tempo correspondente à libertação *in vitro* de 50% do fármaco encapsulado) revelou que nenhum dos dois factores investigado influencia significativamente este parâmetro.

A comparação dos perfis de libertação do fármaco a partir das micropartículas com o perfil de dissolução do fármaco puro revelou que este se liberta mais rapidamente das micropartículas do que demora a dissolver-se na sua forma pura. Esta constatação conduziu à conclusão de que o fármaco se encontra

essencialmente disperso pelas cavidades e superfície das micropartículas poliméricas, e não efectivamente imobilizado na matriz polimérica.

Como foi referido, o principal objectivo por detrás da investigação da variáveis [PVA] e [PHBV] e da selecção do desenho de experiências utilizado era a optimização da distribuição de tamanhos das partículas, nomeadamente, obter distribuições com um tamanho médio inferior a $10\mu\text{m}$, e uma distribuição de tamanhos o mais apertada possível (ou seja, com valores de SPAN próximos de 1.0). Subjacente a este objectivo encontrava-se a intenção de utilizar as micropartículas de PHBV com flurbiprofeno imobilizado enquanto um sistema de libertação controlada para aplicações oftalmológicas, nomeadamente através da aplicação tópica destas, na forma de uma suspensão, na zona anterior do olho. Como foi referido no início deste trabalho, esta aplicação requer partículas com um tamanho inferior a $10\mu\text{m}$ ⁴⁴.

Infelizmente, e provavelmente porque algumas distribuições de tamanhos se afastavam significativamente de uma distribuição normal, não foi possível ajustar um modelo linear ou quadrático que descrevesse de forma válida o comportamento do tamanho médio das partículas e do factor SPAN em função dos dois factores investigados. Desta forma não foi possível utilizar os modelos ajustados para a optimização deste problema (encontrar os valores de [PVA] e [PHBV] que dessem origem a distribuição de tamanhos com um tamanho médio inferior a $10\mu\text{m}$ e valores de SPAN próximos de 1.0).

Contudo, e observando directamente as curvas de distribuição de tamanhos (Figura 2.6) e os valores experimentais obtidos (Tabela 2.4), pode-se concluir que a formulação que deu origem às partículas com a granulometria mais próxima da desejada é a formulação B4, que deu origem a micropartículas com um tamanho médio de $4.6\mu\text{m}$ e um factor SPAN de 1.7. Esta formulação corresponde ao nível médio da [PVA] investigada (2.5%) e ao nível inferior da [PHBV] (0.88%). Assim, pode-se afirmar que as micropartículas obtidas através desta formulação apresentam uma distribuição de tamanhos adequada para a aplicação pretendida.

Considerando que o tempo de residência das nano-micropartículas na zona pré-corneal é bastante curto (podendo variar de alguns minutos a algumas horas, conforme o tamanho das partículas e as interações que estas estabelecem com os

tecidos pré-corneais)⁴⁴, pode-se dizer que os perfis de libertação *in vitro* obtidos, nos quais se observa uma libertação de mais de 50% do fármaco nas duas primeiras duas horas do ensaio, são satisfatoriamente adequados para esta aplicação.

No entanto as aplicações mais promissoras para as microesferas de PHBV com flurbiprofeno imobilizado passam pela sua utilização enquanto sistemas de libertação prolongada (com a duração de várias semanas ou meses) e localizada, em locais do organismo sujeitos a processos inflamatórios crónicos, como por exemplo, nas articulações. Para estas aplicações, e de forma a ter um perfil de libertação prolongado, o fármaco tem de se encontrar efectivamente imobilizado nas micropartículas, e a sua libertação deverá ser controlada pela difusão deste através da matriz polimérica e pela biodegradação dessa mesma matriz. Como se viu isto não acontece nas micropartículas com flurbiprofeno preparadas neste trabalho. Assim, e para estas aplicações, será necessário investigar novas formulações que conduzam a micropartículas com o fármaco efectivamente imobilizado.

2.6 Referências bibliográficas

1. Lassalle, V.; Ferreira, M. L., PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, (6), 767-783.
2. Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* **2008**, *125*, (3), 193-209.
3. Wischke, C.; Schwendeman, S. P., Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *364*, (2), 298-327.
4. O'Donnell, P. B.; McGinity, J. W., Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *28*, (1), 25-42.
5. Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release* **2005**, *102*, (2), 313-332.
6. Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D., Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *363*, (1-2), 26-39.
7. Wang, Y. J.; Wang, X. D.; Wei, K.; Zhao, N. R.; Zhang, S. H.; Chen, J. D., Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Materials Letters* **2007**, *61*, (4-5), 1071-1076.
8. Huang, W.; Wang, Y. J.; Ren, L.; Du, C.; Shi, X. T., A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2009**, *29*, (7), 2221-2225.
9. Yang, C. M.; Plackett, D.; Needham, D.; Burt, H. M., PLGA and PHBV Microsphere Formulations and Solid-State Characterization: Possible Implications for Local Delivery of Fusidic Acid for the Treatment and Prevention of Orthopaedic Infections. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, (7), 1644-1656.
10. Duran, N.; Alvarenga, M. A.; Da Silva, E. C.; Melo, P. S.; Marcato, P. D., Microencapsulation of Antibiotic Rifampicin in Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Archives of Pharmacal Research* **2008**, *31*, (11), 1509-1516.
11. Wang, C.; Ye, W.; Zheng, Y.; Liu, X.; Tong, Z., Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *338*, (1-2), 165-173.
12. Li, H. Y.; Chang, J., Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres. *Journal of Controlled Release* **2005**, *107*, (3), 463-473.
13. Sendil, D.; Gursel, I.; Wise, D. L.; Hasirci, V., Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release* **1999**, *59*, (2), 207-217.
14. Bazzo, G. C.; Lemos-Senna, E.; Pires, A. T. N., Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77*, (4), 839-844.
15. Poletto, F. S.; Jäger, E.; Ré, M. I.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R., Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345*, (1-2), 70-80.
16. Lionzo, M. I. Z.; Re, M. I.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R., Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *Journal of Microencapsulation* **2007**, *24*, (2), 175-186.
17. Salman, M. A.; Sahin, A.; Onur, M. A.; Oge, K.; Kassab, A.; Aypar, U., Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro release and epidural analgesic effect in rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **2003**, *47*, (8), 1006-1012.
18. Lu, B.; Wang, Z. R.; Yang, H., Long-acting delivery microspheres of levo-norgestrol-poly(3-hydroxybutyrate): their preparation, characterization and contraceptive tests on mice. *Journal of Microencapsulation* **2001**, *18*, (1), 55-64.
19. Zhao, Y. L.; Tian, F.; Liu, C. J.; Li, F.; Xing, N., Preparation and Evaluation of Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres Containing Bovine Serum Albumin for Controlled Release. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *110*, (6), 3826-3835.
20. Conway, B. R.; Eyles, J. E.; Alpar, H. O., A comparative study on the immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres. *Journal of Controlled Release* **1997**, *49*, (1), 1-9.
21. Lionzo, M. Micropartículas de P(HBV) de de blendas de P(HBV):PCL contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelos de fármacos: caracterização físico-química e perfis de liberação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2006.

22. Shishatskaya, E. I.; Voinova, O. N.; Goreva, A. V.; Mogilnaya, O. A.; Volova, T. G., Tissue reaction to intramuscular injection of resorbable polymer microparticles. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **2007**, 144, (6), 786-790.
23. Shishatskaya, E. I.; Voinova, O. N.; Goreva, A. V.; Mogilnaya, O. A.; Volova, T. G., Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2008**, 19, (6), 2493-2502.
24. Farago, P. V.; Raffin, R. P.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Zawadzki, S. F., Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2008**, 19, (7), 1298-1305.
25. Chen, J.; Davis, S. S., The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Microencapsulation* **2002**, 19, (2), 191-201.
26. Khang, G.; Kim, S. W.; Cho, J. C.; Rhee, J. M.; Yoon, S. C.; Lee, H. B., Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres for the sustained release of 5-fluorouracil. *Bio-Medical Materials and Engineering* **2001**, 11, (2), 89-103.
27. Kim, G. J.; Bang, K. H.; Kim, Y. B.; Rhee, Y. H., Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology Letters* **2000**, 22, (18), 1487-1492.
28. Perlovich, G. L.; Kurkov, S. V.; Bauer-Brandl, A., The difference between partitioning and distribution from a thermodynamic point of view: NSAIDs as an example. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 27, (2-3), 150-157.
29. <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/2009/ms-2653-r.htm> (consultado em 2010-03-19).
30. Richy, F.; Rabenda, V.; Mawet, A.; Reginster, J. Y., Flurbiprofen in the symptomatic management of rheumatoid arthritis: a valuable alternative. *International Journal of Clinical Practice* **2007**, 61, (8), 1396-1406.
31. Maiti, S.; Singha, K.; Ray, S.; Dey, P.; Sa, B., Adipic acid dihydrazide treated partially oxidized alginate beads for sustained oral delivery of flurbiprofen. *Pharmaceutical Development and Technology* **2009**, 14, (5), 461-470.
32. Ranjha, N. M.; Khan, I. U.; Naseem, S., Encapsulation and characterization of flurbiprofen loaded poly(N^ε-caprolactone)-poly(vinylpyrrolidone) blend microspheres by solvent evaporation method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2009**, 50, (3), 281-289.
33. Lu, Y.; Zhang, G. Q.; Sun, D. X.; Zhong, Y. Q., Preparation and evaluation of biodegradable flurbiprofen gelatin micro-spheres for intra-articular administration. *Journal of Microencapsulation* **2007**, 24, (6), 515-524.
34. Samati, Y.; Yuksel, N.; Tarimci, N., Preparation and characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing flurbiprofen sodium. *Drug Delivery* **2006**, 13, (2), 105-111.
35. Vega, E.; Egea, M. A.; Valls, O.; Espina, M.; Garcia, M. L., Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 95, (11), 2393-2405.
36. Vega, E.; Gamisans, F.; Garcia, M. L.; Chauvet, A.; Lacoulonche, F.; Egea, M. A., PLGA Nanospheres for the Ocular Delivery of Flurbiprofen: Drug Release and Interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 97, (12), 5306-5317.
37. Araujo, J.; Vega, E.; Lopes, C.; Egea, M. A.; Garcia, M. L.; Souto, E. B., Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, 72, (1), 48-56.
38. Martinez-Sancho, C.; Herrero-Vanrell, R.; Negro, S., Optimisation of aciclovir poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 273, (1-2), 45-56.
39. Vandervoort, J.; Ludwig, A., Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 238, (1-2), 77-92.
40. Gohel, M. C.; Amin, A. F., Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. *Journal of Controlled Release* **1998**, 51, (2-3), 115-122.
41. Pean, J. M.; Venier-Julienne, M. C.; Filmon, R.; Sergent, M.; Phan-Tan-Luu, R.; Benoit, J. P., Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 166, (1), 105-115.

42. Hariharan, M.; Price, J. C., Solvent, emulsifier and drug concentration factors in poly(D, L-lactic acid) microspheres containing hexamethylmelamine. *Journal of Microencapsulation* **2002**, 19, (1), 95-109.
43. Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: NY, 2001.
44. Zimmer, A.; Kreuter, J., Microspheres and Nanoparticles Used in Ocular Delivery Systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, (1), 61-73.
45. Bolourtchian, N.; Karimi, K.; Aboofazeli, R., Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. *Journal of Microencapsulation* **2005**, 22, (5), 529-538.
46. Lai, M. K.; Tsiang, R. C. C., Encapsulating acetaminophen into poly(L-lactide) microcapsules by solvent-evaporation technique in an O/W emulsion. *Journal of Microencapsulation* **2004**, 21, (3), 307-316.
47. Fu, X.; Ping, Q.; Gao, Y., Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *Journal of Microencapsulation* **2005**, 22, (7), 705-714.
48. Park, S. H.; Choi, H. K., The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 321, (1-2), 35-41.
49. Cheng, Y. Y.; Yang, J. P., Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of tween series surfactants. *Physics and Chemistry of Liquids* **2006**, 44, (3), 249-256.
50. Li, D. X.; Han, M. J.; Balakrishnan, P.; Yan, Y. D.; Oh, D. H.; Joe, J. H.; Seo, Y.; Kim, J. O.; Park, S. M.; Yong, C. S.; Choi, H. G., Enhanced Oral Bioavailability of Flurbiprofen by Combined Use of Micelle Solution and Inclusion Compound. *Archives of Pharmacal Research* **2010**, 33, (1), 95-101.
51. Li, P.; Zha, L. W., Solubilization of flurbiprofen in pH-surfactant solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92, (5), 951-956.
52. Martin, M. A.; Miguens, F. C.; Rieumont, J.; Sanchez, R., Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2000**, 17, (2), 111-116.
53. Gunaratne, L. M. W. K.; Shanks, R. A., Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. *European Polymer Journal* **2005**, 41, (12), 2980-2988.
54. Dubernet, C., Thermoanalysis of Microspheres. *Thermochimica Acta* **1995**, 248, 259-269.
55. Zaghoul, A. A.; Vaithiyalingam, S. R.; Faltinek, J.; Reddy, I. K.; Khan, M. A., Response surface methodology to obtain naproxen controlled release tablets from its microspheres with Eudragit L100-55. *Journal of Microencapsulation* **2001**, 18, (5), 651-662.

Capítulo 3

Preparação e Caracterização de Hidrogéis de
base Pectina. Sua Utilização na Liberação
Controlada de Moléculas Bioactivas

Com base no trabalho apresentado neste Capítulo encontram-se em preparação dois artigos com a intenção de serem submetidos para publicação na revista *Carbohydrate Research*:

P. Coimbra, H.C. de Sousa, M.H. Gil, Preparation and characterization of vinyl-functionalized pectin derivatives and of their chemical hydrogels.

P. Coimbra, H.C. de Sousa, M.H. Gil, Methacrylated pectin based hydrogels prepared by photoinduced reticulation: synthesis, characterization and their *in vitro* evaluation as controlled drug delivery systems.

Neste Capítulo, duas pectinas comerciais (pectina derivada de resíduos de frutos cítricos e pectina derivada de resíduos de maçã) foram modificadas quimicamente através da introdução na sua estrutura de grupos vinílicos ou metacrílicos terminais. Os derivados assim obtidos foram caracterizados e posteriormente utilizados na produção de hidrogéis químicos preparados por fotoreticulação. Dois fármacos e duas proteínas, nomeadamente o flurbiprofeno sódico, o sulfato de gentamicina, e as proteínas lisozima e albumina do soro bovino, foram também incorporados nos hidrogéis produzidos e o desempenho destes foi investigado enquanto sistema de libertação controlada (SLC) através de ensaios de libertação *in vitro*.

3.1 Pectinas: estrutura, propriedades, produção industrial e aplicações

As pectinas constituem uma família de polissacarídeos estruturalmente complexos que se encontram presentes nas paredes celulares primárias e regiões intracelulares das plantas, e onde desempenham várias funções estruturais e funcionais^{1,2}.

O termo pectina provém do grego *pektikos*, que significa congelar ou solidificar³ e que reflecte a capacidade que estes polissacarídeos têm de gelificar. Devido a esta propriedade a pectina é abundantemente utilizada na indústria alimentar como agente de gelificação⁴. Por apresentar uma boa biocompatibilidade, a pectina é também utilizada na produção de produtos cosméticos, farmacêuticos e de higiene pessoal.

Vários estudos têm evidenciado o potencial da pectina, por si só ou em conjunto com outros polímeros, enquanto biomaterial para a fabricação de *scaffolds*⁵, revestimento de superfícies de dispositivos biomédicos⁶ e produção de sistemas de libertação controlada de moléculas terapêuticas^{7,8}. Por ser um polissacarídeo que não é degradado no estômago ou pelas enzimas presentes no tracto gastrointestinal superior, sendo apenas degradado no cólon, a pectina tem sido extensivamente investigada na produção de sistemas de libertação de fármacos destinados a actuar especificamente nesta parte do sistema gastrointestinal^{9,10}.

Seguidamente, apresentar-se-ão os aspectos mais importantes relacionados com estes polissacarídeos, salientando-se a sua estrutura química, produção industrial, propriedades gerais e aplicações.

3.1.1 Estrutura química

O termo pectina é utilizado para descrever uma família complexa e heterogénea de polissacarídeos e oligossacarídeos encontrados nas plantas e que têm como característica comum o facto de possuírem na sua estrutura resíduos de ácido D-galacturónico (AGal), (Figura 3.1) unidos por uma ligação α -(1 \rightarrow 4)^{1, 2, 11-13}.

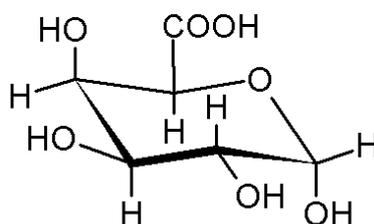


Figura 3.1 Estrutura química do ácido D-galacturónico (AGal).

Na Figura 3.2a encontra-se representado o modelo que actualmente reúne mais consenso sobre a forma como as várias estruturas pectídicas conhecidas se encontram organizadas entre si. Três tipos de polissacarídeos pectídicos, designados por Homogalacturonanas, Ramnogalacturonanas do tipo I e Ramnogalacturonanas do tipo II, constituem os principais elementos estruturais deste modelo.

As Homogalacturonanas (HGA), também designadas por região lisa, constituem a maior parte da pectina (cerca de 65%), consistindo numa cadeia linear de Poli- α -(1 \rightarrow 4)-(ácido D-galacturónico) com 100 a 200 unidades de AGal. As HGA apresentam proporções variáveis de grupos carboxílicos esterificados com o grupo metilo, podendo apresentar também, em menor grau, grupos acetilo nas posições O-2 e/ou O-3.

As Ramnogalacturonanas do tipo I e Ramnogalacturonanas do tipo II constituem a chamada região ramificada da pectina.

As Ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) são o segundo maior constituinte da pectina (cerca de 25% a 30%). Estas consistem numa cadeia principal constituída pela repetição do dissacarídeo [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Ram-(1 \rightarrow], onde Ram

significa Ramnose. Ligados a esta cadeia, pelos resíduos de Ramnose, encontram-se várias cadeias de resíduos de açúcar neutros, compostas predominantemente por L-arabinose e/ou D-galactose. Estas cadeias laterais podem ter até cerca de 20 unidades de comprimento e podem ser, elas próprias, ramificadas.

As Ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) constituem cerca de 10% das pectinas e são compostas por uma cadeia principal de poli- α -(1 \rightarrow 4)-(ácido D-galacturónico) com cerca de 8 unidades de AGal. A estes resíduos encontram-se ligadas cadeias laterais ramificadas compostas por cerca de 12 tipos de açúcares (alguns deles bastante raros), arranjados entre si numa forma complexa.

Para além dos três principais polissacarídeos pectídicos descritos acima, são ainda conhecidas outras duas estruturas pectídicas – as xilogalacturonanas e as apiogalacturonanas, presentes em pequenas percentagem e expressas apenas por algum tipo de plantas e/ou tecidos vegetais.

Até recentemente era consensual representar a pectina como sendo uma cadeia principal constituída por HGA, onde pontualmente se inseriam zonas ramificadas de RG-I e RG-II, tal como é esquematizado na Figura 3.2a. No entanto, recentemente foi proposta uma nova estrutura para descrever a pectina¹². Neste novo modelo, representado na Figura 3.2b, a pectina é representada como sendo uma cadeia principal constituída por RG-I e onde as HGA, juntamente com as RG-II, são consideradas como ramificações longas desta cadeia.

O facto de um modelo para a estrutura básica da pectina ainda não estar completamente estabelecido reflecte bem a extrema complexidade e diversidade estrutural deste tipo de polissacarídeos. Sabe-se que a estrutura fina das pectinas pode ser altamente heterogénea entre diferentes tipos de plantas, entre tecidos, e até mesmo dentro de uma única parede celular. Também o tamanho das cadeias dos principais domínios pode variar consideravelmente e sabe-se que composição e estrutura dos açúcares da região RG-I são altamente variáveis. Pelo contrário, há estudos que indicam que a estrutura RG-II é consideravelmente conservada de espécie para espécie.

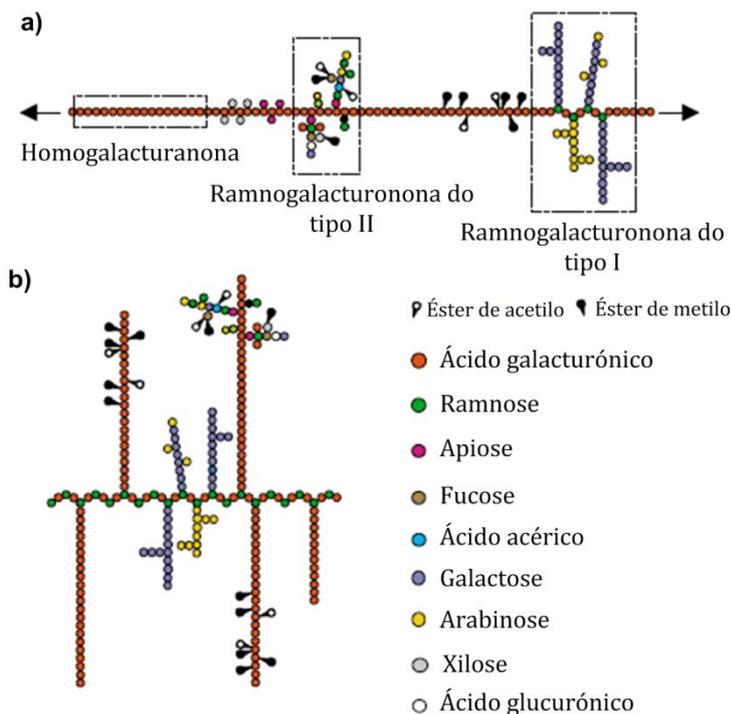


Figura 3.2 Representação esquemática da estrutura básica da pectina. a) Modelo convencional. b) Modelo alternativo (imagem adaptada de Willats *et al* ³).

3.1.2 Pectina comercial

A estrutura da pectina descrita anteriormente corresponde ao que se pensa ser a pectina tal como ela existe nas plantas intactas, designada por pectina nativa ou protopectina.

Na produção industrial das pectinas, a maior parte da região ramificada é perdida durante o processo extractivo. Assim, a pectina comercial é composta principalmente por resíduos de ácido galacturónico (tipicamente mais de 70%), com um grau de esterificação, GE (definido como a razão entre o número de unidades de ácido galacturónico esterificadas com o grupo metilo e o número total de unidades de ácido galacturónico), entre 30 a 80%.

Por esta razão, muitas vezes a pectina comercial é considerada como sendo apenas um polímero linear de resíduos de ácido D-galacturónico (AGal) unidos por uma ligação α -(1→4) e com parte dos grupos carboxílicos parcialmente esterificados com o grupo metilo (Figura 3.3). Contudo esta representação é uma simplificação da realidade pois, em maior ou menor grau, parte da região ramificada da pectina é retida após o seu processamento industrial.

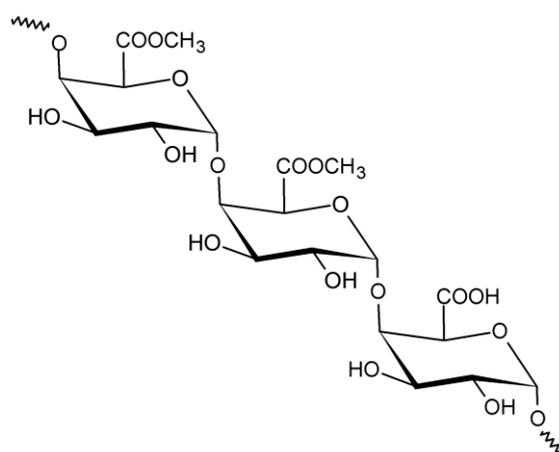


Figura 3.3 Poli α -(1 \rightarrow 4) (ácido D-galacturónico) parcialmente esterificado com grupos metilo (também designado por Poli α -(1 \rightarrow 4) (metil galacturonato)).

Na Tabela 3.1 encontra-se a composição típica de duas pectinas comerciais obtidas a partir de resíduos de frutos cítricos e de maçã, as duas grandes fontes de matéria-prima da indústria de produção de pectinas¹⁴. Sendo constituídas maioritariamente por ácido galacturónico, na sua composição existe ainda uma quantidade significativa de açúcares neutros e uma percentagem residual de proteínas e de compostos fenólicos. Estima-se também que algumas unidades de AGIa se encontrem acetiladas, num grau de 1.5% para as pectinas de limão e de 5% para a pectina de maçã. Encontra-se ainda uma pequena percentagem de compostos inorgânicos (principalmente iões sódio e potássio). A pectina extraída da maçã contém mais açúcares neutros e mais compostos fenólicos mas menos proteínas que a pectina de limão.

Tabela 3.1 Composição típica de duas pectinas comerciais (composição representada em percentagem de massa seca)¹⁴.

Componente (%)	Citricos (Limão)	Maçã
Ácido galacturónico anidro	76.4	60.8
Grupos metoxilo (% GE)	4.4 (71.5)	3.6 (74.3)
Grupos acetilo (% GAc)	0.26 (1.4)	0.72 (5.0)
Açúcares neutros	8.5	27
Proteínas	3	1.6
Fenóis	0.18	0.59
Cinza	2.38	1.89

O grau de esterificação das pectinas (GE) é o parâmetro que mais influência tem nas suas propriedades funcionais, tendo uma importância fundamental na sua

solubilidade e nas suas condições de gelificação. Por esta razão as pectinas comerciais são classificadas em duas categorias, de acordo com o seu grau de esterificação: Pectinas de elevado grau de esterificação - pectinas EGE- quando estas têm um GE superior a 50%, e pectinas de baixo grau de esterificação - pectinas BGE- para as pectinas de com um GE inferior a 50%.

Industrialmente são ainda produzidas as chamadas pectinas amidadas⁴, onde parte dos grupos éster são substituídos por grupos amida, sendo o grau de amidação (GA) resultante definido como a razão entre as unidades de ácido galacturónico amidadas e as unidades de ácido galacturónico totais. Normalmente este tipo de pectinas é produzido a partir pectinas com elevado grau de esterificação, resultando em pectinas com GE menor de 50% e GA entre 10% e 25%, sendo por esta razão designadas por pectinas amidadas de baixo grau de esterificação (pectinas ABGE).

3.1.3 Produção industrial

Como já foi referido, as pectinas comerciais são quase exclusivamente obtidas a partir dos resíduos de frutos cítricos (limão, laranja e lima) e de maçã, os quais se encontram disponíveis em grandes quantidades enquanto subprodutos da indústria alimentar.

A pectina contida nestes resíduos (10-15%, em base seca, para os resíduos de maçã, e 20 a 30% para os resíduos de frutos cítricos), é extraída com água quente acidificada por um ácido forte (ácido nítrico) ^{4, 15}. As condições de extracção típicas são pH entre 1 e 3, temperatura de 50 a 90°C, e um tempo de extracção de 3 a 12 horas. A razão sólido/solvente utilizada é escolhida de forma a que, no final da extracção, a concentração de pectina em solução seja cerca de 5-10g/l. Dependendo das condições de extracção e da matéria-prima, o GE da pectina extraída varia entre 55% e 80%.

Depois da extracção, a solução aquosa obtida é filtrada, para remover os sólidos insolúveis, e feita passar por uma resina de permuta iónica, para remover os iões cálcio, sendo de seguida concentrada por evaporação ou por filtração por membranas.

A pectina é então precipitada e lavada com álcool (normalmente álcool isopropílico), prensada, seca, moída e as partículas obtidas peneiradas de forma a obter um pó com uma distribuição de tamanhos controlada.

Na produção de pectinas com um GE <55%, um passo de de-esterificação adicional é realizado depois da extração. Este pode ser feito imediatamente antes da precipitação, por tratamento ácido da pectina dissolvida, ou imediatamente depois da precipitação, por reacção com uma base forte (como por exemplo NaOH), com a pectina suspensa no álcool. Se neste último método for utilizada amónia como o reagente básico, alguns grupos éster (OCH₃) são convertidos, por amonólise, em grupos amida (ONH₂), obtendo-se dessa forma as chamadas pectinas amidadas.

Por ser obtida a partir de um produto natural, a pectina assim extraída é bastante polidispersa, podendo apresentar, em diferentes *batches*, variações significativas no que diz respeito ao peso molecular médio, grau de esterificação, presença de outros substituintes (como grupos amida e grupos acetilo) e percentagem de AGIa. Assim, no final do processo, é necessário fazer a sua padronização para que as características do produto final obedçam a uma série de especificações. Algumas dessas especificações, como a % de AGIa, são gerais para todos os tipos de pectinas e são estabelecidas pelas autoridades competentes. Outras especificações caracterizam um tipo de pectina em particular, sendo implementadas para garantir que as propriedades do produto final sejam as adequadas para o uso a que é destinado. Estas especificações podem envolver propriedades simples de padronizar, como o grau de esterificação e a percentagem de AGIa, ou mais complexas, como a força de gelificação.

A padronização é feita misturando quantidades adequadas de diferentes *batches* de forma as propriedades da mistura final obedçam às especificações pretendidas. Se as especificações incluírem a força de gelificação, como é o caso das pectinas comerciais que têm como destino a indústria alimentar, podem ser ainda adicionados açúcares, normalmente a sacarose.

3.1.4 Propriedades da pectina

3.1.4.1 Propriedades ácidas

Devido à presença das unidades de AGIa, a pectina apresenta as propriedades características de um ácido fraco poliprótico e, como tal, sem um pK_a bem definido. Os valores apresentados na literatura para o pK_a (correspondente a 50% de grupos

carboxílicos dissociados) situam-se entre 3.5 e 4.5. Estimativas do pK intrínseco (o pK extrapolado para os zero graus de dissociação) varie entre 2.9 e 3.3⁴.

3.1.4.2 *Gelificação e interações com outros biopolímeros*

Como já foi referido, as pectinas são muito utilizadas pela indústria alimentar na preparação de uma grande variedade de produtos. Uma das razões desta extensa utilização advém da sua capacidade para formar géis físicos em meio ácido, na presença de iões divalentes ou de açúcares.

A gelificação das substâncias pectídicas pode ocorrer por via de dois mecanismos diferentes, sendo o mecanismo dominante na formação de um gel de pectina determinado pelo grau de esterificação.

As pectinas de elevado grau de esterificação (pectinas EGE) gelificam a um pH inferior a 3.8 e na presença de sólidos solúveis (tipicamente açúcares) numa concentração superior a 55% (m/m)⁴. Estas condições promovem as interações entre as moléculas de pectina, permitindo a formação e estabilização de zonas de junção, quer por meio da formação de ligações de pontes de hidrogénio entre os grupos -COOH e OH, quer pelo estabelecimento de interações hidrofóbicas entre grupos metilo¹⁶. Este mecanismo de gelificação encontra-se presente em muitas das utilizações comerciais da pectina, nomeadamente na produção de geleias e de compotas.

As pectinas de baixo grau de esterificação, pectinas BGE, amidadas ou não, apresentam um mecanismo de gelificação completamente diferente e que requer um pH superior a 3 e a presença de uma quantidade suficiente de iões metálicos di- ou tri-valentes^{4, 16}. O processo de gelificação deste tipo de pectinas é semelhante ao que ocorre na gelificação do alginato, sendo descrito por um modelo denominado de *egg box*¹⁷. Este mecanismo envolve a formação de complexos iónicos coordenados entre os grupos carboxílicos dissociados da pectina e os catiões di- ou tri-valentes. Na indústria alimentar, o ião Ca²⁺ é normalmente utilizado. Como a gelificação deste tipo de pectinas não requer a presença de açúcares, estas são utilizadas na preparação de compotas e geleias com baixo teor de açúcar.

Sendo que o grau de esterificação é o factor que determina o tipo de mecanismo pelo qual as pectinas gelificam, outros factores intrínsecos das moléculas de pectina, como o padrão de distribuição dos grupos carboxílicos livres, o peso

molecular, o grau de amidação, a presença de grupos acetilo e de regiões ramificadas, vão também determinar as propriedades finais dos géis obtidos.

A pectina interage com outros biopolímeros em solução como é o caso de proteínas e outros polissacarídeos. Dependendo da natureza do outro biopolímero, e de factores como o pH, força iónica, concentração e temperatura, pode-se observar a co-existência dos dois biopolímeros em solução ou, pelo contrário, o aparecimento de fenómenos de separação de fases segregativos ou associativos, como por exemplo a coacervação complexa¹⁸.

A estabilização de bebidas lácticas acidificadas, como é o caso dos iogurtes líquidos, é um exemplo de aplicação das pectinas comerciais na indústria alimentar que envolve a interacção entre este polissacarídeo e as proteínas do soro de leite. Nesta aplicação, a pectina actua como agente estabilizante ao ligar-se, por meio de interacções electrostáticas, às proteínas do leite, nomeadamente à caseína, impedindo dessa forma a tendência que estas proteínas têm de, em pH ácido (pH~4) se agregarem e formarem precipitados^{3,4}.

3.1.4.3 *Degradação química*

As pectinas, em soluções aquosas, sofrem reacções de de-esterificação e despolimerização (Figura 3.4), apresentando uma estabilidade máxima em soluções aquosas a um pH entre 3 e 4^{3,4}. Acima ou abaixo destes valores de pH a velocidade de ambas as reacções aumenta, especialmente quando estas condições são combinadas com temperaturas elevadas.

A pH alcalino, as cadeias das homogalacturonanas despolimerizam rapidamente por eliminação β da ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 4). As pectinas EGE são particularmente vulneráveis a este tipo de reacção. Para um pH inferior a 4, a pectina sofre despolimerização por hidrólise das ligações glicosídicas. As pectinas BGE são mais sensíveis a esta reacção.

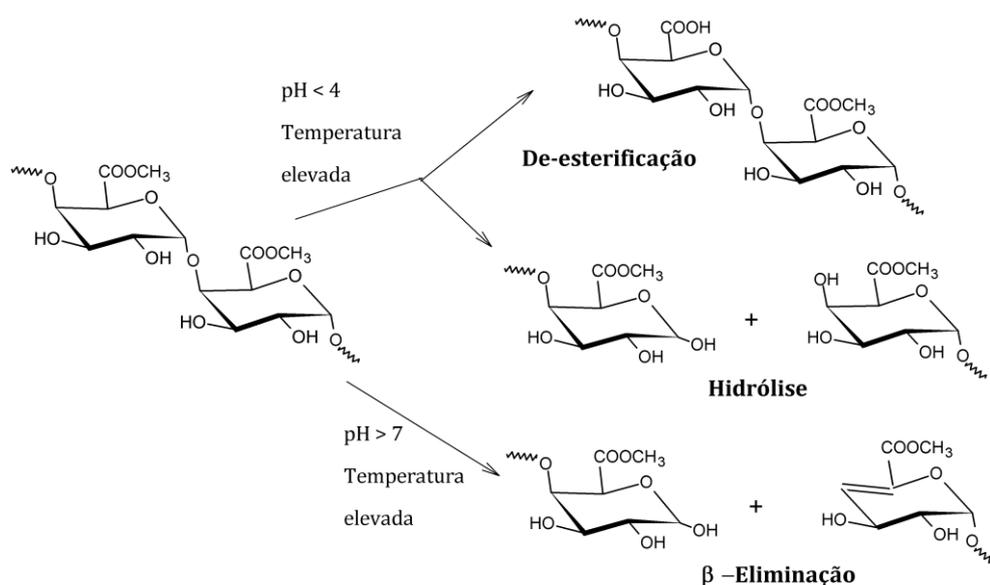


Figura 3.4 Mecanismos mais comuns de degradação das pectinas (adaptado de Zachariassen¹⁵).

3.1.4.4 Degradação enzimática

As substâncias pectídicas são degradadas por um largo e heterogêneo grupo de enzimas, designadas por pectinases ou enzimas pectinolíticas, produzidas por plantas e por microrganismos¹⁹⁻²¹.

Estas enzimas estão divididas em três grandes grupos: I) Protopectinases; II) Pectinoesterases; III) Enzimas despolimerizantes.

I) As protopectinases são responsáveis pela transformação da protopectina (insolúvel) em pectina solúvel com um elevado grau de polimerização. Estas são também conhecidas por enzimas digestivas, pois separam a protopectina dos restantes constituintes das paredes celulares a que ela possa estar ligada.

II) As pectinoesterases (PE) catalisam a de-esterificação da ligação éster dos resíduos AGIa metoxilados, transformando o Poli α -(1→4) (metil galacturonato) em Poli α -(1→4) (ácido D-galaturónico).

III) As enzimas despolimerizantes quebram a ligação glicosídica α -(1→4) entre as unidades galacturónicas da pectina, quer por hidrólise (hidrolases) quer por eliminação β (liases).

As hidrolases e liases que atacam preferencialmente as ligações glicosídicas estabelecidas entre resíduos de AGIa esterificados são designadas por poli-metilgalacturonases (PMG) e poli-metilgalactaronato liases (PMGL), respectivamente. As enzimas que actuam preferencialmente sobre as ligações

glicosídicas estabelecidas entre duas unidades de ácido galaturónico são chamadas de poligalacturonases (PG), no caso das hidrolases, e poligalacturonato liases (PGL), no caso das liases. Estas quatro categorias de enzimas podem ser ainda classificadas de acordo com o seu padrão de acção, ou seja, se quebram as ligações glicosídicas aleatoriamente (endo-enzimas) ou se actuam apenas sobre a ligação terminal (exo-enzimas). Na Figura 3.5 encontra-se esquematizado o modo de actuação das pectinoesterases e das enzimas despolimerizantes referidas acima.

As pectinases são produzidas industrialmente em culturas microbianas sendo um produto com um elevado potencial comercial: estima-se que a comercialização destas constitui cerca de 25% do valor das vendas de todas as enzimas consumidas pela indústria alimentar a nível mundial²⁰.

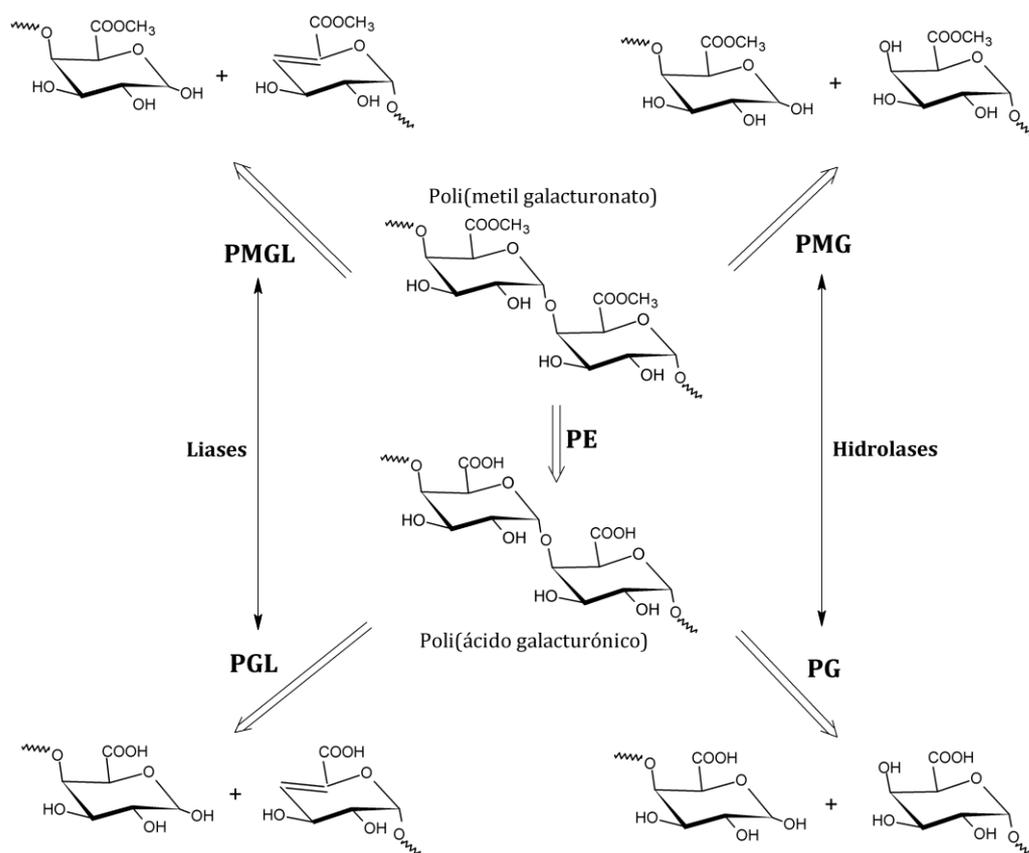


Figura 3.5 Modo de actuação de algumas pectinases (adaptado de Alkorta *et al*¹⁹): PE – Pectinoesterase (EC 3.1.1.11); PMGL – Poli(metilgalacturonato) liase; PMG – Poli metilgalacturonase; PGL – Poligalacturonato liase (EC 4.2.2.2); PG – Poligalacturonase (EC 3.2.1.15).

3.1.4.5 *Actividade biológica e farmacológica*

Numa dieta ocidental normal, cada pessoa ingere cerca de 4 a 5 g de pectina por dia, estando o seu consumo associado a vários benefícios para a saúde humana, em parte devido à sua função enquanto fibra dietética. Existem evidências da relação entre o consumo desta e a redução do colesterol no sangue. Este polissacarídeo actua também como um profilático natural contra o envenenamento por catiões tóxicos, como o chumbo e o mercúrio, ao remover estes metais do tracto gastrointestinal. A pectina é também conhecida pela sua eficácia no tratamento da diarreia, sendo administrada frequentemente a crianças e animais²².

Vários estudos demonstram também a actividade anti-cancerígena de algumas substâncias pectídicas (como a redução do crescimento de tumores e inibição da formação de metástases), particularmente a chamada pectina de citrinos modificada – uma pectina de baixo peso molecular (20 a 30 kDa) obtida a partir de frutos citrinos e de um tratamento a pH e temperatura elevados²³⁻²⁵. Embora estes estudos tenham demonstrado o potencial dos polissacarídeos pectídicos enquanto agentes terapêuticos de doenças cancerígenas, ainda se encontra por elucidar os mecanismos pelos quais as pectinas induzem a apoptose de células cancerígenas e inibem a propagação de metáteses, bem como ainda não é claro, devido à sua complexidade estrutural, que tipos de estruturas moleculares em particular são responsáveis por esta actividade. No entanto, a maioria das evidências obtidas até agora sugerem que as zonas ramificadas da pectina desempenham um papel importante na sua actividade anti-cancerígena bem como em outras propriedades bioactivas³.

3.1.5 **Aplicações comerciais**

O mercado global das pectinas apresenta um crescimento anual de cerca de 3.5% e um volume anual de vendas estimado em 34 000 toneladas, com um valor de mercado de cerca de 400 milhões de euros¹⁵. No gráfico apresentado na Figura 3.6 é possível observar que a grande maioria das pectinas, cerca de 94%, tem como destino final a indústria alimentar, sendo que mais de um terço destas é utilizada na confecção de geleias e gelatinas. A utilização das pectinas na produção de bebidas lácticas acidificadas ou fermentadas é outra das grandes aplicações na indústria alimentar, encontrando-se esta aplicação em rápido crescimento.

As indústrias farmacêutica e de produtos de higiene pessoal são responsáveis pelo consumo da restante produção de pectinas (cerca de 6% da produção total), utilizando estas na produção de cosméticos, loções, pasta de dentes, produtos para os cabelos e pele e ainda compressas para o tratamento de feridas e sacos colectores para doentes ostomizados¹⁵.

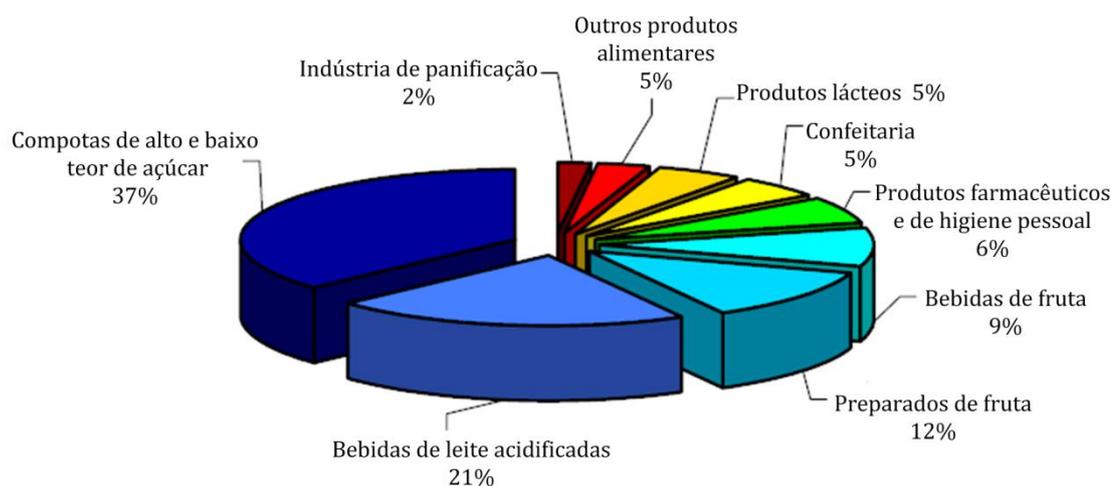


Figura 3.6 Estimativa do peso das diversas aplicações das pectinas no mercado global (adaptado de Zachariassen¹⁵).

3.2 Aplicações da pectina em sistemas de libertação de compostos bioactivos

Tal como outros polissacarídeos, a pectina tem sido investigada como matriz para a incorporação e libertação controlada de compostos bioactivos. Devido às propriedades desta, a maior parte da investigação nesta área encontra-se focada no desenvolvimento de sistemas de libertação destinados a actuarem em zonas específicas do tracto gastrointestinal.

3.2.1 Libertação específica de compostos bioactivos no cólon por via oral

Os polissacarídeos têm sido extensivamente utilizados na formulação de sistemas de libertação capazes de, quando administrados por via oral, actuarem numa zona específica do tracto gastrointestinal - o cólon.

As propriedades dos polissacarídeos têm sido exploradas para ultrapassar uma série de desafios que o desenvolvimento destes sistemas apresenta: por um lado, estes sistemas têm de permanecer intactos no seu trânsito pelo tracto gastrointestinal (TGI) superior, de forma a proteger os compostos bioactivos da degradação química e enzimática e, por outro lado, devem ter a capacidade de libertar os compostos incorporados logo que atinjam o seu alvo.

As pectinas, em particular, têm sido bastante estudadas enquanto material para a construção deste tipo de sistemas^{7, 9, 10, 22}: estas são resistentes às proteases e amilases activas na zona superior do TGI mas são degradadas pelas enzimas produzidas por uma grande variedade de microrganismos presentes unicamente no cólon. Por outro lado, as pectinas apresentam sensibilidade a variações de pH, tendo uma tendência para formar agregados insolúveis em meio ácido (meio característico do estômago). Pelo contrário, em meios neutros ou perto da neutralidade (como se verifica no cólon), têm tendência a expandir-se e dissociar-se. Para além destas propriedades, que teoricamente possibilitariam a libertação de compostos bioactivos preferencialmente na zona do cólon, as pectinas exibem outras propriedades atractivas como a sua biocompatibilidade, mucoadesividade e a capacidade de gelificar facilmente na presença de agentes não tóxicos e não agressivos para os compostos bioactivos.

Têm sido preparados sistemas de libertação, que têm como alvo o cólon, utilizando somente a pectina ou a pectina em combinação com outros polímeros. Esta tem sido utilizada basicamente de duas formas:

- Como sistema matricial, onde são incorporados os compostos bioactivos dispersos ou dissolvidos, formulada na forma de géis, partículas e comprimidos.
- Incorporada em filmes de revestimento.

Na Tabela 3.2 encontra-se o resumo de alguns trabalhos encontrados na literatura e exemplificativos dos diversos modos como a pectina tem sido utilizada na preparação de sistemas de libertação específica no cólon. A actuação destes sistemas tem sido investigada *in vitro* e em alguns casos *in vivo*, utilizando variados compostos bioactivos, desde moléculas de baixo peso molecular, hidrofílicas e hidrofóbicas, até biomacromoléculas terapêuticas.

Tabela 3.2 Resumo de alguns trabalhos publicados na literatura sobre a utilização da pectina no desenvolvimento de sistemas de libertação específica no cólon.

Forma de utilização da pectina	Composto activo	Descrição	Desempenho	Ref.
Matrizes	Insulina	Comprimidos de pectinato de cálcio (PCa) e insulina	<i>In vivo</i> (cães): Os comprimidos começavam a libertar insulina passado pouco tempo de serem ingeridos.	28
	BSA	Partículas de pectinato de cálcio obtidas por gelificação iónica.	<i>In vitro</i> : perfil de libertação dependente do tipo de pectina utilizada (pectina BGE ou pectinas ABGE) e extensão de reticulação.	27
	Indometacina	Comprimidos pectina EGE + cloreto de cálcio + indometacina	<i>In vitro</i> : A complexação <i>in situ</i> da pectina com iões cálcio permite uma libertação retardada do composto activo.	26
	Teofilina	Partículas de pectinato de cálcio revestidas com Eudragite®100	<i>In vitro</i> : Perfis de libertação adequados para sistemas específicos de libertação no cólon.	30
	Marcador radioactivo	Comprimidos de PCa/pectina ou PCa/goma de guar revestidos com Eudragite®L	<i>In vivo</i> (humanos): Comprimidos desintegraram-se apenas no cólon.	32
	Indometacina	Comprimidos de HPMC/pectina EGE/cloreto de cálcio	<i>In vivo</i> (cães): concentração máxima de indometacina no sangue atingida 4 horas depois da ingestão dos comprimidos.	36
	Vancomicina	Partículas de pectina/quitosano. Comprimidos de vancomicina/partículas de pectina/quitosano.	<i>In vitro</i> : Perfis de libertação adequados para sistemas específicos de libertação no cólon.	35, 37
Filmes de revestimento	BSA	Partículas de pectina/alginato/quitosano	<i>In vitro</i> : sistemas com elevada sensibilidade ao pH e susceptíveis de degradação enzimática.	38
	Marcador radioactivo	Revestimento por <i>compression coating</i> com Pectina EGE	<i>In vivo</i> (humanos): Comprimidos desintegraram-se apenas no cólon.	42
	Insulina	Comprimidos com insulina revestidos por <i>compression coating</i> com PCa.	<i>In vivo</i> (cães): elevação abrupta da concentração de insulina no sangue passado 5 a 8 horas depois da ingestão.	28
	Marcador radioactivo	Revestimento por <i>compression coating</i> com Pectina/HPMC	<i>In vivo</i> (humanos): Comprimidos desintegraram-se apenas no cólon.	44
	Paracetamol	Revestimento por <i>spray-coating</i> com dispersões de pectina e etilcelulose	<i>In vitro</i> : Perfis de libertação modelados pela quantidade de pectina presentes nos filmes. Revestimento sensível ao ataque enzimático.	52
	Teofilina	Revestimento por <i>spray-coating</i> com pectina EGE ou PCa e dispersões de etilcelulose ou acrílicas	<i>In vitro</i> : Os revestimentos de pectina EGE com o polímero acrílico Eudragite®NE30D revelaram-se os mais eficazes na retardação da libertação do fármaco.	48, 49

Sistemas matriciais

Quando utilizada isoladamente, a pectina tem sido frequentemente utilizada na sua forma complexada com iões cálcio, os chamados pectinatos de cálcio^{9, 26-29}. Como foi referido anteriormente, as pectinas de baixo grau de esterificação formam géis na presença de iões cálcio e outros iões di- ou trivalentes. Estes géis são estáveis em meios com pH baixo, sendo capazes de absorver uma quantidade de água considerável sem se dissolverem, e simultaneamente conservam a susceptibilidade das pectinas às enzimas produzidas pela microflora presente no cólon.

Num trabalho pioneiro, Rubinstein *et al*²⁹ preparou pectinatos de cálcio a partir de pectina de-esterificada (GE 16%), utilizando estes para formular comprimidos matriciais com indometacina, uma droga com uma solubilidade aquosa muito reduzida. A degradação das matrizes e a libertação do fármaco foram avaliados *in vitro*, na presença de Pectinex 3XL, uma mistura típica de várias pectinases, e na presença da bactéria *Bacteroides ovatus*, uma estirpe presente na microflora do cólon humano. Os autores verificaram que a taxa de degradação das matrizes era influenciada positivamente pela concentração das enzimas em solução e que a velocidade de libertação do fármaco aumentava consideravelmente na presença destas. Este trabalho é referido como dos primeiros a provar o potencial da utilização da pectina enquanto material para o desenvolvimento de sistemas de libertação específica no cólon sensíveis à microflora presente nesta região do TGI.

Liu *et al*⁹ estudaram a influência da quantidade de cálcio utilizada nas propriedades reológicas destes tipos de géis e no seu desempenho enquanto sistemas de libertação, tendo concluído que existe uma quantidade de cálcio óptima para a formação dos géis, a qual maximiza a força de gelificação destes e minimiza a velocidade de libertação da droga incorporada. Outros autores investigaram ainda a influência do grau de esterificação e amidação da pectina nas propriedades dos géis produzidos²⁷.

Outra estratégia investigada foi a formação de géis de pectinato de cálcio *in situ*. Wei *et al*²⁶ prepararam comprimidos de pectina e de indometacina aos quais adicionaram várias percentagens de cloreto de cálcio, partindo do pressuposto que, em contacto com um meio aquoso a pectina complexaria com os iões de cálcio dissolvidos, formando assim um gel que retardaria a libertação da droga. Este

pressuposto verificou-se, tendo-se também observado que a taxa da libertação do fármaco diminuía com o aumento das quantidades de cálcio nas formulações.

Os diversos estudos envolvendo pectinatos de cálcio levou os investigadores a concluir que, devido à elevada hidrofiliabilidade destas matrizes, a aplicabilidade destas enquanto sistemas efectivos de libertação específica no cólon se encontra restringida, na melhor das hipóteses, à libertação de moléculas pouco solúveis em meio aquoso⁹. Com efeito, estudos *in vivo* realizados com compostos bioactivos hidrofílicos, como por exemplo a insulina²⁸, revelaram que os pectinatos de cálcio, embora retardem a libertação do composto activo, começavam a libertar este muito antes de atingirem o cólon.

Desta forma, o revestimento das matrizes de pectina com vários polímeros, em particular com polímeros entéricos da família Eudragite®, tem sido proposto para aumentar a eficiência destas matrizes enquanto sistemas de libertação específica de fármacos hidrofílicos no cólon³⁰⁻³². Por exemplo, Maestrilli *et al*³⁰ revestiu com Eudragit®S100 micropartículas de pectinato de cálcio preparadas por gelificação ionotrópica e investigou a libertação *in vitro* da droga modelo teofilina, numa sequência de meios que simulava as várias condições de pH encontradas ao longo do tracto gastrointestinal. Estes autores verificaram que, com um revestimento com uma espessura adequada, as partículas de pectinato de cálcio possuíam a capacidade de libertar a teofilina de forma modelada, inibindo de forma completa a libertação da droga nas primeiras 2 horas de libertação em ambiente gástrico (pH 1.1) e limitando a 10% a sua libertação nas duas horas seguintes, ocorridas num meio que simulava as condições do intestino delgado (pH 6.8), e libertando a restante droga em menos de 24 horas, num meio que simulava as condições de pH do cólon (pH 7.4). Investigações *in vivo* sobre a desintegração de matrizes de pectinato de cálcio revestidas com polímeros entéricos revelaram ainda que estas atingiam o cólon praticamente intactas, desintegrando-se depois completamente passado apenas algum tempo³².

Outro modo de aproveitar as propriedades favoráveis das pectinas, por um lado, e de desenvolver matrizes mais estáveis e menos hidrofílicas, por outro, é a combinação da pectina com outros polímeros, particularmente outros polissacarídeos, como por exemplo, o quitosano e a hidroxipropilmetilcelulose³³⁻³⁸.

Até agora os sistemas mais investigados envolveram a combinação da pectina com o quitosano. O interesse desta combinação prende-se com as propriedades sobejamente conhecidas do quitosano, e com o facto destes dois polímeros, por possuírem grupos ionizáveis de natureza oposta, interagirem entre si por forças electrostáticas, tendo a capacidade de formar complexos polielectrolíticos insolúveis.

Na literatura encontram-se diversos trabalhos sobre a possível utilização enquanto veículos para a entrega específica de compostos bioactivos no cólon de matrizes compostas por pectina e quitosano (ou de derivados de quitosano), formuladas sobretudo na forma de partículas e micropartículas^{34, 35, 37-40}. Estas partículas são preparadas apenas pela complexação polielectrolítica da pectina e do quitosano, em meios com um pH intermédio dos pKa dos dois polissacarídeos, ou formadas na presença de agentes reticulantes, quer da pectina (Ca²⁺), quer do quitosano (tripolifosfato). Estes trabalhos focaram-se sobretudo na optimização das propriedades destas formulações que são relevantes para o seu desempenho enquanto sistemas específicos de libertação no cólon, como por exemplo a sensibilidade ao pH e à degradação enzimática. Variando as proporções dos dois polímeros e a concentração dos agentes reticulantes, entre outras variáveis de processo, é possível encontrar as formulações com um comportamento de inchaço mais favorável, isto é, que exibam um baixo grau de inchaço a pH ácido e o maior grau de inchaço possível em meios com valores de pH iguais aos encontrados no cólon.

Um exemplo destes estudos é o trabalho desenvolvido por Bigguci *et al*^{35, 37} sobre o estudo de matrizes compostas de pectina e de quitosano enquanto veículos para a libertação de vancomicina no cólon. Estes autores prepararam complexos de pectina e de quitosano, utilizando várias proporções dos dois polímeros e meios de complexação com diferentes valores de pH. Os complexos formados foram processados em micropartículas por *spray drying*. O fármaco foi incorporado durante a formação dos complexos ou, alternativamente, foi misturado fisicamente com as micropartículas, e a mistura processada em comprimidos. Os autores estudaram as condições de formação dos complexos que maximizavam a sensibilidade ao pH e as propriedades mucoadesivas destes. Os testes de libertação *in vitro* confirmaram a capacidade dos sistemas preparados de limitarem a

libertação do fármaco em meio ácido, libertando este preferencialmente num meio com pH semelhante ao presente no cólon (7.4). Adicionalmente, estudos de libertação na presença de pectinases revelaram que a percentagem do fármaco libertado aumentava consideravelmente, indiciando assim a susceptibilidade destas matrizes à degradação enzimática.

Filmes de revestimento

O revestimento com filmes poliméricos de formulações sólidas administradas por via oral é frequentemente usado na indústria farmacêutica como forma de atingir uma libertação sustentada⁴¹. Assim, e devido às propriedades já mencionadas, a pectina, isoladamente ou em combinação com outros polímeros, tem sido utilizada no revestimento de formulações sólidas destinadas à libertação específica no cólon^{28, 42-52}.

Ashford *et al*⁴² revestiram com pectina EGE comprimidos de sorbitol com vestígios de um marcador radioactivo e investigaram o comportamento destes *in vivo*, em voluntários humanos. O revestimento foi feito por *compression-coating*, um processo onde o material de revestimento, em estado sólido, é submetido a pressões elevadas de forma a formar uma camada de revestimento em torno de um material central. Em todos os voluntários observou-se que a desintegração dos comprimidos revestidos com pectina se processava apenas no cólon. Contudo, os investigadores verificaram que, para impedir o sistema de começar a libertar o composto radioactivo antes deste atingir o cólon, era necessário um filme de revestimento com uma espessura considerável. Assim, os autores sugeriam o revestimento com filmes de pectinato de cálcio, por ser um derivado da pectina com mais resistência à dissolução e que no entanto mantém a capacidade de ser degradado pela microflora presente no cólon.

Rubinstein & Radai²⁸ exploraram esta sugestão e utilizaram a técnica de *compression coating* para revestir comprimidos contendo insulina com um filme de pectinato de cálcio, tendo monitorizado de seguida a libertação da proteína *in vivo* a partir dos comprimidos revestidos, utilizando cães pancreatectomizados. Estes autores verificaram que, em alguns animais, existia um atraso na libertação, observando-se uma elevação abrupta da concentração de insulina no sangue passado apenas 5 a 8 horas depois da ingestão da formulação, um intervalo de

tempo suficiente para esta transitar do estômago até ao intestino grosso do cão. No entanto, em alguns casos, observava-se uma libertação de insulina logo a partir dos tempos iniciais. Estes resultados foram atribuídos às limitações técnicas associadas ao método de *compression-coating*, com o qual é difícil obter um revestimento homogéneo em termos de espessura e densidade. Desta forma, os revestimentos formados por esta técnica apresentam uma maior probabilidade de colapsarem e de desintegram-se antes de atingirem o cólon.

O desempenho de outros filmes preparados por *compression-coating* e constituídos por uma mistura da pectina com outros polímeros, nomeadamente a hidroxipropilmetilcelulose e o quitosano, foram também investigados^{43-47, 50, 51}. Estudos de libertação, *in vitro* e *in vivo*, de comprimidos revestidos com estes filmes demonstraram a capacidades destes em retardar a libertação de compostos bioactivos. Além disso verificou-se que a taxa de libertação dos compostos activos protegidos por estes filmes aumenta na presença de enzimas pectinolíticas, o que indica que a pectina, quando misturada com outros polímeros, continua a manter a sua susceptibilidade à degradação enzimática.

O revestimento de formulações com dispersões aquosas de pectina e de polímeros insolúveis (ex: etilcelulose, eudragite®) foi também alvo da atenção dos investigadores^{48, 49}.

Dispersões aquosas de pectina EGE e de etilcelulose foram investigadas no revestimento de comprimidos. A etilcelulose, por ser um polímero hidrofóbico, mascara a inerente solubilidade da pectina. A mistura destes dois polímeros permite assim a obtenção de um filme compósito com uma permeabilidade reduzida e capaz de proteger o fármaco de uma libertação prematura no TGI superior. Isto permitirá a libertação do princípio activo preferencialmente no cólon, onde a pectina encontra as condições mais propícias para se dissolver e onde é ainda degradada pela flora microbiana.

Wakerly *et al*⁵² utilizaram esta formulação para revestir comprimidos contendo paracetamol. Estes verificaram que a proporção entre os dois polímeros controlava o perfil de libertação do fármaco, sendo que o aumento da proporção de etilcelulose e da espessura do revestimento conduzia a uma menor taxa de libertação do fármaco, em meios aquosos a pH 1 e pH 7.4. A presença de enzimas pectinolíticas, num meio aquoso de pH 6, aumentava a taxa de libertação do

fármaco. Os autores argumentaram que os perfis de libertação observados eram compatíveis com um mecanismo de libertação que envolvia a formação de canais no filme protector, os quais eram formados pela dissolução da pectina no meio de libertação.

Semdé *et al*^{48, 49} investigaram a libertação de teofilina em comprimidos revestidos com filmes preparados com diferentes tipos e percentagens de pectina (pectina EGE ou pectinatos de cálcio) e de dispersões aquosas de etilcelulose (Aquacoat® EDC 30 ou Surelease®) ou de polímeros insolúveis de base acrílica com diferentes quantidades de grupos NH₂ (Eudragite®NE30D, Eudragite®RS30D). Estes autores verificaram que o perfil de libertação deste fármaco era afectado por todas as variáveis estudadas, e sobretudo pelas proporções de pectina incorporadas nos filmes. Os revestimentos de pectina EGE com o polímero Eudragite®NE30D revelaram-se os mais eficazes na retardação da libertação do fármaco, atingindo o seu melhor desempenho quando estes tinham uma composição de pectina de 20% (m/m, relativamente ao polímero insolúvel). Curiosamente os autores verificaram que a libertação da teofilina dos comprimidos revestidos com estes filmes e com a percentagem de pectina referida, era mais lenta na presença de enzimas pectinolíticas do que na sua ausência.

Como conclusão, e analisando as várias abordagens propostas até agora para a utilização da pectina na preparação de sistemas de libertação específica no cólon, a mais promissora, em termos de viabilidade industrial, parece ser o revestimento de comprimidos com dispersões aquosas de pectina e de polímeros insolúveis. De facto, a técnica utilizada na formação destes filmes, *spray-coating*, é utilizada comumente pela indústria farmacêutica no revestimento de formulações sólidas, apresentando uma série de vantagens relativamente à técnica referida anteriormente- o *compression-coating*, onde a formação dos filmes é feita pela compressão dos materiais de revestimento em estado sólido. Refira-se, a propósito, que esta última técnica caiu em desuso há várias décadas, sendo utilizada apenas na preparação de algumas formulações muito específicas⁵³.

3.2.2 Sistemas de libertação mucoadesivos

Embora a maior parte da investigação dedicada ao desenvolvimento de sistemas de libertação à base de pectina se encontre centrado na aplicação desta na

formulação de sistemas de libertação específica no cólon, alguns estudos têm evidenciado também o potencial deste polissacarídeo na preparação de diversas formulações desenhadas para serem administradas topicamente em tecidos de natureza mucosa como, por exemplo, os olhos ou a cavidade nasal⁵⁴⁻⁵⁹. Nestas formulações, as propriedades mucoadesivas das pectinas são exploradas no aumento da biodisponibilidade do composto bioactivo através do aumento do tempo de residência do fármaco no local onde este é absorvido.

Refira-se que o desempenho da pectina enquanto polímero mucoadesivo é altamente dependente de algumas das suas propriedades, como o peso molecular, o grau de esterificação e o grau de amidação⁶⁰⁻⁶³. Desta forma é redutor e pouco esclarecedor classificar as pectinas, em geral, como bons ou maus polímeros mucoadesivos. No entanto a influência das diversas propriedades moleculares da pectina na manifestação de mucoadesividade não se encontram ainda completamente esclarecidas, encontrando-se na literatura resultados contraditórios sobre, por exemplo, a influência do grau de esterificação no aumento das propriedades mucoadesivas destes polissacarídeos.

Um exemplo de um sistema de libertação assente nas propriedades mucoadesivas da pectina foi proposto por Giunchedi *et al*⁵⁸. Estes autores investigaram a utilização de microesferas de pectina BGE como forma de melhorar a fraca biodisponibilidade das formulações oftalmológicas convencionais (colírios).

Micropartículas de pectina, com um marcador fluorescente incorporado, foram preparadas pelo método de *spray drying*, tendo a distribuição deste ao longo do tempo nos tecidos pré-corneais sido investigada *in vivo* em coelhos albinos. Verificou-se que o marcador formulado com as micropartículas apresentava um aumento considerável do tempo de residência no local de administração, em comparação com o tempo de residência exibido por este quando administrado em solução (2.5 vs 0.5 h). Este estudo revelou ainda que, quando o piroxicam (um dos mais potentes anti-inflamatórios não esteróides) era administrado incorporado nas micropartículas, a biodisponibilidade deste no humor aquoso aumentava cerca de 2.5 vezes comparativamente a quando este era administrado com as formulações comerciais.

A administração de fármacos por via nasal, tradicionalmente utilizada apenas no tratamento de patologias locais, como o congestionamento e alergias, é

presentemente vista com grande interesse enquanto via para a entrega de fármacos a nível sistémico e a nível do sistema nervoso central⁶⁴. De facto, esta via apresenta várias vantagens, como uma rápida actuação dos fármacos, a ausência da primeira passagem a nível hepático e uma administração fácil e com elevada aceitação por parte dos pacientes.

As pectinas, nomeadamente pectinas BGE, apresentam um grande potencial enquanto veículos para a entrega de fármacos por via nasal. Devido às suas propriedades mucoadesivas, estas podem aumentar consideravelmente o tempo de residência do fármaco no local de absorção, aumentando dessa forma a biodisponibilidade deste. Por outro lado, sabe-se que soluções de pectinas BGE gelificam em contacto com a mucosa nasal (sem a necessidade de adicionar iões cálcio), o que permite o desenvolvimento de formulações com libertação prolongada. Este último aspecto torna-se muito vantajoso no desenvolvimento de formulações para a entrega de moléculas pequenas e lipofílicas, para as quais a mucosa nasal é altamente permeável. Explorando estas propriedades, a empresa farmacêutica Archimedes desenvolveu e patenteou um sistema de libertação à base de pectina destinado à administração nasal deste tipo de moléculas terapêuticas⁶⁵. Este sistema de libertação, designado de PecSysTM, consiste numa solução de baixa viscosidade à base de pectina administrada sob a forma de *spray* na cavidade nasal⁶⁶. Esta solução gelifica em contacto com a mucosa nasal permitindo, segundo os inventores, a modulação da absorção dos fármacos nela incorporados e a obtenção de perfis farmacocinéticos mais favoráveis: ao mesmo tempo que a rápida absorção do fármaco é preservada, com T_{max} curtos (T_{max} - tempo que corresponde à concentração máxima do fármaco na corrente sanguínea), o pico de concentração de fármaco (C_{max}) é reduzido, atenuando dessa forma o aparecimento de efeitos secundários indesejáveis. Presentemente, a Archimedes tem vários produtos baseados nesta tecnologia em fase de testes clínicos. Destes, o mais promissor e que se encontra em fase mais avançada (fase III de teste clínicos), é um *spray* destinado à administração do analgésico citrato de fentanilo – o NasalFent®^{65, 66}. Este fármaco é um analgésico altamente efectivo da família dos opiáceos, comumente utilizado no combate a episódios de dor repentina e intensa manifestada por cerca de 95% dos pacientes com doenças oncológicas.

3.2.3 Sistemas de libertação à base de pectina: perspectivas futuras.

Com a excepção de alguns casos, como o exemplo referido acima, e apesar dos resultados promissores apresentados na literatura, o potencial comercial da pectina na indústria farmacêutica, nomeadamente na produção de sistemas de libertação de fármacos, encontra-se ainda por realizar. Um dos maiores obstáculos à realização deste potencial deve-se à inerente complexidade e diversidade molecular deste polissacarídeo. Actualmente, a grande maioria das pectinas extraídas industrialmente tem como aplicação final a indústria alimentar. Desta forma, o controlo de qualidade e as características finais destes produtos são desenvolvidos de forma a satisfazer as necessidades e requisitos desta indústria, e não os requisitos da indústria farmacêutica que são, naturalmente, bem mais exigentes e complexos. Assim, e para que a pectina possa competir com outros polissacarídeos já utilizados pela indústria farmacêutica, será necessário desenvolver produtos com um elevado grau de padronização e bastante bem caracterizados a nível molecular. Isto implicará a investigação e o desenvolvimento de novas tecnologias de isolamento, purificação e caracterização destes polissacarídeos, só possíveis de realizar com o reconhecimento, por parte dos produtores de pectina, do potencial comercial subjacente a estas novas aplicações.

3.3 Modificação química da pectina e preparação de hidrogéis de base pectina

Devido à disponibilidade de numerosos grupos funcionais, a modificação química e a reticulação química dos polissacarídeos têm sido extensivamente exploradas como forma de obter derivados destes com novas características e propriedades favoráveis para a sua utilização em aplicações específicas, como por exemplo, na preparação de sistemas de libertação controlada de moléculas bioactivas.

Também com a pectina estas estratégias foram investigadas. No entanto, e comparativamente com outros polissacarídeos, como por exemplo o quitosano e o alginato, o número de trabalhos publicados na literatura sobre a modificação química das pectinas é surpreendentemente escasso.

A maioria dos estudos dedicados à modificação química da pectina tem como objectivo modificar a hidrofiliicidade desta, através da introdução na sua estrutura de grupos alifáticos, aromáticos ou outros grupos hidrofóbicos.

Crescenzi & Callegaro⁶⁷ patentearam um método de produção de ésteres de ácidos pécticos ou ácidos pectínicos num solvente orgânico em meio homogéneo. Como a pectina é praticamente insolúvel em todos os solventes orgânicos comuns, a solubilização desta em solventes como, por exemplo, o DMSO, requer a sua transformação prévia numa forma solúvel de sais de tetrabutylamónio (TBA). Esta transformação envolve normalmente a de-esterificação total ou parcial dos grupos COCH_3 , e a conversão dos grupos carboxílicos formados em sais de TBA, através de permuta iónica. Na forma de sais de TBA, a pectina é completamente solúvel em DMSO, e a reacção de esterificação ocorre na presença de agentes esterificantes como haletos alquílicos ou haletos arílicos (Figura 3.7). Como a reacção ocorre em meio homogéneo, o grau de modificação pode ser facilmente controlado através da variação das proporções dos reagentes. Para além disso, visto que a reacção ocorre em meio orgânico, a despolimerização por hidrólise das cadeias poliméricas ocorre numa fraca extensão.

A introdução de grupos hidrofóbicos altera drasticamente as propriedades das pectinas em meio aquoso, quer em termos de solubilidade (os derivados podem ser solúveis, parcialmente solúveis ou insolúveis), quer em termos das propriedades de gelificação e de emulsificação⁶⁷⁻⁷⁰. Desta forma, variando a natureza dos grupos introduzidos e controlando o grau de modificação, é possível desenvolver derivados da pectina que exibam propriedades optimizadas para uma aplicação específica.



Figura 3.7 Esquema da modificação da pectina em meio homogéneo.

Sinitsya *et al* têm vindo a produzir e a caracterizar uma série de derivados de pectinas amidadas⁷¹⁻⁷³. No método de modificação desenvolvido por estes

investigadores a pectina de elevado grau de esterificação é modificada na presença de diferentes aminas primárias em metanol. Através da reacção de aminólise entre os ésteres de metilo da pectina e as aminas primárias obtêm-se pectinas parcialmente amidadas (Figura 3.8). Esta reacção ocorre em meio heterogéneo, com as partículas de pectina suspensas em metanol. Tal como no método referido anteriormente, variando a natureza da amina primária utilizada na modificação, é possível obter uma série de derivados de pectina com diferentes propriedades físico-químicas. No entanto, por esta reacção ocorrer em meio heterogéneo o grau de modificação é mais difícil de controlar.

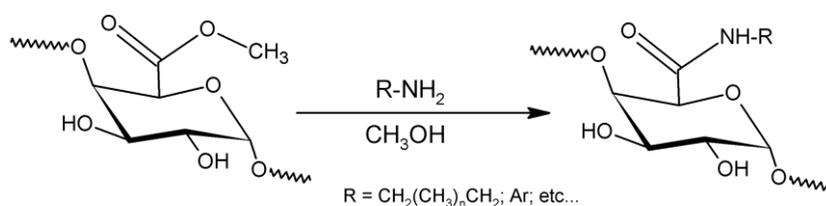


Figura 3.8 Esquema da reacção de formação de pectinas amidadas em meio heterogéneo.

A reticulação das cadeias de pectina através dos grupos funcionais OH ou COOH por agentes reticulantes tais como o glutaraldeído, etileno glicol diglicidil éter e epicloriglicina, tem sido uma estratégia investigada na preparação de hidrogéis químicos deste polissacarídeo^{70, 74, 75}. Comparativamente com os hidrogéis físicos, de que são exemplo os pectinatos de cálcio, os hidrogéis químicos são mais estáveis, sendo que as propriedades destes, nomeadamente o grau de inchaço, podem ser facilmente manipuladas através da variação da densidade de reticulação. Adicionalmente, estudos de degradação efectuados com a presença de enzimas pectinolíticas indicam que estes conservam a sensibilidade à acção destas enzimas⁷⁰. Estes hidrogéis têm sido indicados como possíveis veículos para a libertação controlada de fármacos.

A funcionalização da pectina com grupos insaturados terminais, e a sua consequente transformação em hidrogéis por reticulação radicalar, uma das estratégias vulgarmente apresentadas na literatura na preparação de hidrogéis químicos de uma variedade de polissacarídeos, foi apenas relatada por um grupo de investigação⁷⁶⁻⁷⁸. Nestes trabalhos, a funcionalização da pectina foi feita através da

reacção com o reagente metacrilato de glicidilo, quer em condições homogéneas quer heterogéneas.

A preparação de hidrogéis híbridos de pectina e de polímeros sintéticos também já foi investigada. A combinação de polissacarídeos com polímeros sintéticos é uma estratégia bastante promissora, pois permite desenvolver materiais que retêm as propriedades favoráveis dos polissacarídeos, como a biocompatibilidade e a biodegradabilidade, ao mesmo tempo que apresentam melhores propriedades mecânicas, mais estabilidade e, dependendo do polímero utilizado, alguma sensibilidade a estímulos exteriores, como à temperatura e ao pH.

Na literatura, encontram-se alguns exemplos de hidrogéis híbridos de pectina preparados quer por co-polimerização de enxerto quer pela formação de redes poliméricas interpenetradas^{76, 79-83}. O ácido acrílico, a acrilamida e a dimetilacrilamida foram os monómeros sintéticos utilizados. A conjugação da pectina com os polímeros resultantes da polimerização deste tipo de monómeros permite obter hidrogéis com uma elevada sensibilidade a variações de pH e, como tal, com propriedades atraentes para aplicações como sistemas de libertação controlada destinados a actuarem no tracto gastrointestinal.

3.4 Parte experimental

A produção dos hidrogéis químicos de pectina envolveu a realização de duas etapas distintas:

i) Numa primeira fase, a pectina foi modificada quimicamente com a introdução de grupos reactivos terminais (vinílicos ou metacrílicos), tendo-se procedido à caracterização dos derivados obtidos.

ii) Numa segunda fase, os derivados de pectina foram convertidos em hidrogéis químicos por fotoreticulação dos grupos funcionais introduzidos anteriormente. Estes hidrogéis foram subsequentemente caracterizados e investigados enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos, recorrendo a ensaios de libertação *in vitro* de alguns fármacos de baixo peso molecular e proteínas modelos.

Para a modificação da pectina foram seleccionadas duas pectinas com diferentes graus de esterificação e obtidas a partir de dois resíduos diferentes: polpa de maçã ou frutos cítricos (Tabela 3.3). Nos cálculos realizados, o ácido galacturónico anidro (AGIAn, Figura 3.9) foi considerado como sendo a unidade básica constituinte destes polissacarídeos.

Tabela 3.3 Características das pectinas utilizadas.

Tipo de Pectina	Descrição	Grau de esterificação (GE)*	AGIa*	Mw** (g/mol)
Pectina A	Pectina de elevado grau de esterificação, extraída da polpa de maçãs (<i>Apples</i>)	70.5%	?	1.2×10 ⁶
Pectina C	Pectina de baixo grau de esterificação, extraída de frutos cítricos (<i>Citrus</i>)	40.0%	87.0%	1.0×10 ⁶

* Dados do fornecedor.

** Determinado por cromatografia de exclusão de tamanhos.

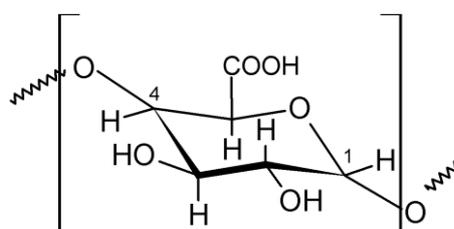


Figura 3.9 Ácido galacturónico anidro.

Dois isocianatos com grupos pendentes insaturados, o isocianato de alilo (AI) e o metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA), representados na Figura 3.10, foram utilizados na modificação química das pectinas. A reacção entre as pectinas e estes compostos ocorre na ausência de água, através da formação de ligações uretana entre os grupos OH da pectina e os grupos isocianato. Como a pectina é insolúvel em solventes orgânicos, a reacção ocorreu em meio heterogéneo, com as partículas de pectina em suspensão.

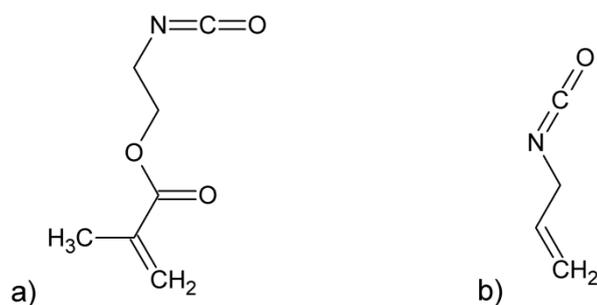


Figura 3.10 Isocianatos utilizados na modificação química da pectina. (a) Metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA). (b) Isocianato de alilo (AI).

Neste trabalho procedeu-se também à preparação e caracterização de hidrogéis híbridos, compostos por pectina modificada e por um polímero sintético biocompatível, o polietileno glicol (PEG). Na produção destes hidrogéis utilizou-se um PEG de baixo peso molecular funcionalizado com dois grupos acrílicos terminais, o macrómero PEG diacrilato (PEGDA), representado na Figura 3.11.

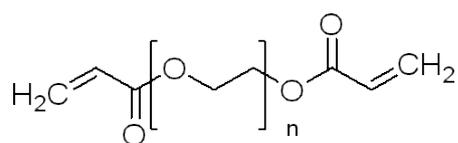


Figura 3.11 Macrómero poli(etilenoglicol) diacrilato (PEGDA), $M_n \sim 700$.

De forma a avaliar o desempenho dos hidrogéis produzidos enquanto sistemas de libertação controlada de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular, dois fármacos com hidrofílicos, o flurbiprofeno sódico (Figura 3.12) e o sulfato de gentamicina (Figura 3.13), foram incorporados nos hidrogéis durante a sua produção e posteriormente a sua cinética de libertação *in vitro* foi investigada.

O sulfato de gentamicina é um antibiótico aminoglicosídico de largo espectro, produzido pela estirpe bacteriana *Micromonospora purpúrea*. O sulfato de gentamicina é constituído pela mistura de 3 substâncias na forma de sais de sulfato (Figura 3.13). Este antibiótico é administrado normalmente por meio de uma injeção intra-muscular, sendo utilizado com frequência no tratamento de infecções graves.

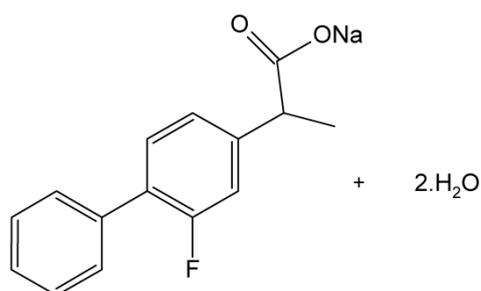
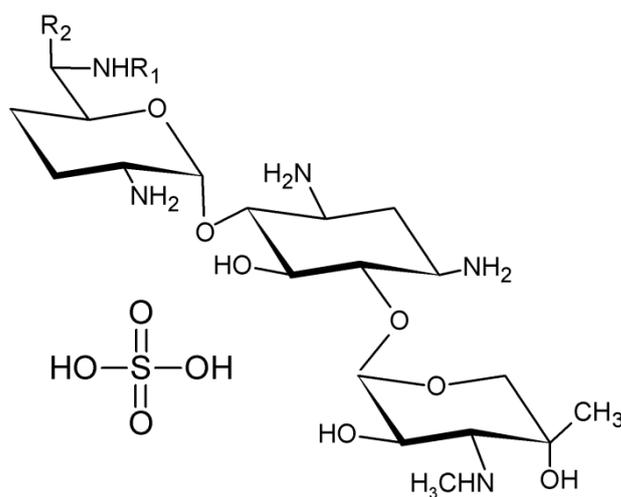


Figura 3.12 Estrutura química do flurbiprofeno sódico dihidratado (PM = 302.28).



Nome	R1	R2	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)
Gentamicina C1	CH3	CH3	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	477.61
Gentamicina C1a	H	H	C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇	449.55
Gentamicina C2	H	CH3	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	463.58

Figura 3.13 Estrutura química do sulfato de gentamicina.

Adicionalmente, e de forma a avaliar o desempenho dos hidrogéis na libertação de biomacromoléculas terapêuticas, procedeu-se à incorporação e libertação de duas proteínas – a lisozima e a albumina - comumente utilizadas na literatura enquanto proteínas modelo. Algumas características destas duas proteínas encontram-se assinaladas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Algumas características das proteínas modelo investigadas.

Proteína	Origem	Ponto Isoelétrico	Peso Molecular* (kDa)	Raio de Stokes* (Å)
Albumina (BSA)	Soro bovino	4.7	65.0	34.8
Lisozima	Clara de ovo	11.1	14.1	16.0

* Valores retirados de Lu & Anseth ⁸⁴.

3.4.1 Planeamento de experiências

Nos dois tipos de pectinas modificadas com o reagente AI investigou-se a forma como algumas das condições reaccionais afectam o grau de substituição obtido, ou seja, a quantidade de grupos insaturados introduzidos na estrutura química da pectina.

Para isso construiu-se e implementou-se um desenho de experiências factorial fraccionada do tipo 2^{3-1} ⁸⁵. Este tipo de desenho experimental permite, com um mínimo de experiências, identificar as variáveis investigadas (factores) que afectam significativamente a resposta de interesse (neste caso o grau de substituição).

Três factores foram investigados: a adição ou não de catalisador (factor *A*), a quantidade de reagente AI (factor *B*), e o tempo de reacção (factor *C*). Estes factores foram analisados a dois níveis, nível inferior, (-), e nível superior, (+). Os valores atribuídos a estes níveis, para os três factores investigados, encontram-se assinalados na Tabela 3.5. As combinações destes três factores, a dois níveis, podem ser visualizadas como sendo os oito vértices de um cubo, onde cada dimensão deste corresponde a um dos factores investigados. Por ser um desenho factorial fraccionado, apenas metade destas condições são implantadas, ou seja, apenas são realizadas quatro experiências (Figura 3.14). Este desenho foi implementado, de forma independente, para os dois tipos de pectina (Pectina A ou Pectina C).

Tabela 3.5 Factores e níveis seleccionados para construir o desenho factorial fraccionado 2^{3-1} , utilizado para investigar a modificação química da pectina com o reagente AI.

Factor	Nome	Tipo de factor	Nível (-)	Nível (+)
<i>A</i>	Catalisador	Qualitativo	Sem adição de catalisador	Com adição de catalisador
<i>B</i>	Quantidade de AI*	Quantitativo	0.5/1	1/1
<i>C</i>	Tempo (h)	Quantitativo	24	72

* Razão molar: moles AI/moles AGLAn

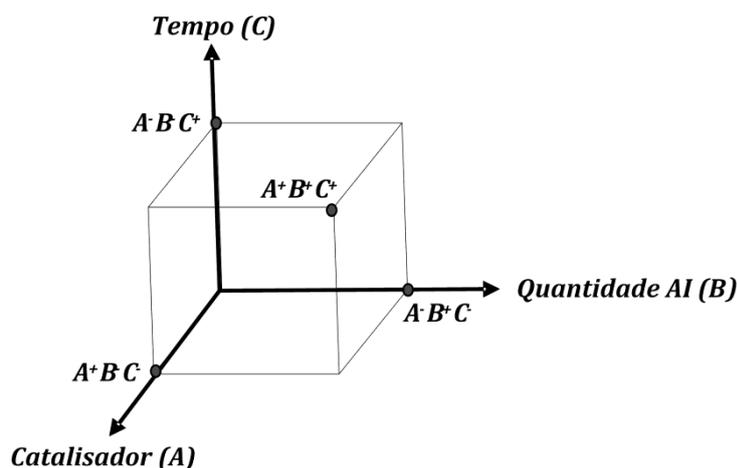


Figura 3.14 Esquema do desenho de experiências factorial fraccionado 2^{3-1} implementado para investigar a modificação química das pectinas com o reagente AI.

3.4.2 Reagentes

O nome dos reagentes utilizados, bem como o seu grau de pureza, fornecedor, e número de registo do *Chemical Abstract Service* (CAS), são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Lista dos reagentes utilizados.

Reagente	Pureza	Marca	CAS
Dimetil sulfóxido (DMSO)	≥ 99%	Fluka	67-68-5
Dilaurato de dibutilo de estanho	95%	Aldrich	77-56-7
Isocianato de alilo (AI)	≥ 97.0	Fluka	1476-23-9
Metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA)	98%	Aldrich	30674-80-7
Poli(etilenoglicol) diacrilato (Mn ~ 700)	-	Aldrich	26570-48-9
Irgacure®2959 (2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona)	97-99.5%	Ciba Specialty Chemicals	106797-53-9
Pectina de citrinos	-	Sigma	900-69-5
Pectina de maçã	-	Fluka	900-69-5
Flurbiprofeno Sódico dihidratado	-	Edol	56767-76-1
Sulfato de gentamicina	-	Aldrich	1405-41-0
o-ftaldialdeído	≥ 97.0	Sigma	643-79-8
2-Mercaptoetanol	≥ 99%	Aldrich	60-24-2
Metanol	-	J. Vaz Pereira	67-56-1
Álcool isopropílico	-	J. Vaz Pereira	1303-96-4
Borato de Sódio	-	J. Vaz Pereira	1303-96-4
Lisozima de clara de ovo de galinha (EC 3.2.1.17)	≥ 95%	Sigma	12650-88-3
Albumina de soro bovino (BSA)	≥ 96%	Sigma	9048-46-8
Reagente de Bradford	-	Sigma	-
Pectinase de <i>Aspergillus niger</i> , > 1 U/mg (EC 3.2.1.15)	-	Biochemika	9032-75-1
Cloreto de Sódio	≥ 99.5%	Sigma	7647-14-5
Tampão fosfato salino (tablets)	-	Sigma	-
Ácido clorídrico	-	J. Vaz Pereira	7647-01-0

3.4.3 Procedimento experimental

3.4.3.1 Síntese dos derivados de pectina

O procedimento geral adoptado na síntese dos derivados de pectina modificada com o reagente isocianato de alilo (Pectina-AI) e com o reagente metacrilato de 2-isocianoetilo (Pectina-IMA) baseia-se no procedimento descrito e utilizado por Zhang *et al*⁸⁶ na síntese de dextrano-AI.

Antes da reacção, a pectina foi seca numa estufa a cerca de 80 °C durante dois a três dias, de forma a remover toda a humidade do polímero.

5g de pectina seca (A ou C) foram adicionadas a 125 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) num balão de fundo redondo com uma tubuladura, ao qual se adaptou uma torre de desumificação de forma a evitar a entrada de humidade no sistema. O balão, com o solvente e o polímero, foi colocado num banho de água termoestabilizado a 60°C, e a mistura foi deixada a agitar, com um agitador magnético, durante cerca de 4 horas, de forma a permitir que o solvente impregnasse e inchasse as partículas de polímero. Decorrido este período de tempo, o balão foi retirado do banho tendo-se adicionado à suspensão o catalisador da reacção (dilaurato de dibutilo de estanho, adicionado na razão molar 0.1/1, catalisador/ácido galacturónico anidro), se fosse esse o caso, e o reagente de modificação (AI ou IMA). O balão foi colocado novamente no banho termoestabilizado à mesma temperatura e a mistura reaccional foi deixada a agitar durante o período de tempo estabelecido para o decorrer da reacção (24 ou 72 horas).

No final, a mistura reaccional foi deixada a arrefecer até à temperatura ambiente tendo-se de seguida adicionado a esta uma certa quantidade de álcool isopropílico, de forma a precipitar a fracção de pectina solúvel em DMSO (~200 ml). Este precipitado foi filtrado e resuspenso várias vezes em álcool isopropílico de forma a remover o DMSO. Por último, a pectina modificada precipitada foi dissolvida em água destilada e colocada em membranas de diálise (membranas de celulose, *cut-off* ~ 14 000 Da), onde foi dialisada contra água destilada durante cerca de 5 dias, de forma a remover o solvente orgânico residual e os possíveis resíduos do catalisador e dos isocianatos. Depois de dialisada, a solução de pectina modificada foi congelada e a água removida por liofilização. As amostras foram então guardadas num excicador ao abrigo de luz até futura utilização.

3.4.3.2 *Análise elemental*

A quantidade de Oxigénio, Carbono, Nitrogénio e Enxofre presentes nas amostras de pectina, original e modificada, foi determinada por análise elemental (Fissons Instruments, modelo EA1108 CHNS-O).

3.4.3.3 *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)*

Os espectros na zona de infravermelhos das pectinas originais e modificadas foram registados pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), num espectrofotometro Magma-IR Spectrometer 750 (Nicolet Instrument Corp.). Os espectros foram registados a 32 *scans* e a uma resolução de 4 cm⁻¹, entre os números de onda de 4000 e 400 cm⁻¹.

3.4.3.4 *Ressonância magnética nuclear de protão (¹H-RMN)*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (¹H-RMN) das pectinas A e C e dos respectivos derivados foram registados em água deuterada (20-25 mg em 0.2 ml) com um espectrómetro de RMN (Varian 500), utilizando uma sonda de banda larga de 5 mm, um pulso de 90°, e um tempo de relaxamento de 30s. O sinal da água foi utilizado como linha de referência tendo sido fixado a 4.75 ppm e parcialmente suprimido por irradiação durante o tempo de relaxamento. Um total de 32 *scans* foram adquiridos para cada espectro.

3.4.3.5 *Cromatografia de exclusão de tamanhos (SEC)*

Os pesos moleculares das pectinas A e C e dos respectivos produtos modificados foram determinados por Cromatografia de Exclusão de Tamanhos (*Size Exclusion Chromatography* -SEC). As análises foram realizadas num cromatógrafo equipado com uma coluna PLaquagel-OH Mixed, 8µm, 300×7.5 mm (Varian Inc.) e um detector de difracção de luz (modelo PL-EMD 960, Polymer Laboratories). A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de dihidrogénio fosfato de sódio numa concentração de 0.001M, sendo o caudal fixado em 0.4 ml/min.

As amostras de pectina e dos padrões foram preparadas a uma concentração de cerca de 2 mg/ml utilizando uma solução com a mesma composição da fase

móvel. Antes de injectadas as amostras foram filtradas com um filtro de teflon de 0.45 μm .

A curva de calibração foi construída com amostras padrão de dextrano (Fluka) com pesos moleculares de 12000, 25000, 50000 e 80000 g/mol. Os cromatogramas foram adquiridos e tratados com o software EZChrom™ (Scientific Software Inc.)

3.4.3.6 Preparação dos hidrogéis por fotoreticulação

Prepararam-se vários hidrogéis com os derivados de pectina e com o macrómero poli(etilenoglicol) diacrilato (PEGDA), por fotoreticulação radicalar induzida por luz UV.

Os precursores Pectina-AI (ou Pectina-IMA) e PEGDA, em diferentes proporções mássicas, foram dissolvidos em água destilada de forma a obter soluções com uma concentração de 5 % (massa/volume). As proporções mássicas Pectina-AI/PEGDA utilizadas foram: 100% Pectina-AI (100/0), 75/25, 50/50, 25/75 e 100% PEGDA (0/100). O fotoiniciador Irgacure®2959 (1% ou 5% da massa dos precursores) foi adicionado e dissolvido nestas soluções.

As soluções homogéneas foram vertidas em pequenos poços (8 mm diâmetro \times 4 mm altura) escavados em placas de *teflon*, e irradiadas com uma lâmpada portátil de luz UV (365 nm, 8W) durante cerca de 2 horas. Ao fim deste tempo, os hidrogéis obtidos, na forma de discos, foram desenformados e mergulhados em água destilada durante 24 horas, de forma a remover da estrutura tridimensional as cadeias de polímero não reticuladas. Depois de extraídos, os hidrogéis foram secos numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante vários dias.

Em alguns casos os hidrogéis foram secos logo depois de formados, pesados, e só depois extraídos em água destilada. Desta forma foi possível determinar a percentagem de pectina e de PEGDA não reticulados ainda presentes na estrutura dos diferentes hidrogéis.

Na preparação dos hidrogéis com os fármacos ou proteínas incorporados utilizou-se apenas a Pectina A modificada com o reagente IMA (Pectina A-IMA). Neste caso, as proporções mássicas de Pectina A-IMA/PEGDA utilizadas foram: 100% Pectina A-IMA (100/0), 50/50, e 100% PEGDA (0/100). Os precursores foram dissolvidos em água destilada numa concentração de 5% (massa/volume),

juntamente com 1% de fotoiniciador e 10% de fármaco (percentagens relativas à massa total dos precursores). O tempo de irradiação manteve-se em 2 horas. Depois de formados os hidrogéis foram secos numa estufa de vácuo à temperatura ambiente.

3.4.3.7 Determinação do grau de inchaço dos hidrogéis

Estudos de inchaço, em estado dinâmico e em equilíbrio, foram efectuados em vários meios aquosos: água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH= 7.4; 0.01M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 0.1M NaCl) e solução salina acidificada (pH= 2.0; 0.01M HCl; 0.1M NaCl).

Os hidrogéis secos foram pesados e mergulhados nos vários meios, em tubos de ensaio, e estes colocados num banho de água termoestatizado a 37°C.

Nos estudos de inchaço dinâmicos, os hidrogéis foram pesados a intervalos de tempo pré-determinados, depois de a água em excesso à superfície ser removida cuidadosamente com papel de filtro. Depois de pesados, os hidrogéis eram novamente mergulhados nos meios e os tubos de ensaio recolocados no banho de água. Nos estudos de inchaço em equilíbrio, os hidrogéis foram deixados mergulhados durante 24 horas e pesados ao fim desse tempo.

A quantidade de água ou de solução absorvida pelos hidrogéis foi quantificada pelo grau de inchaço, definido da seguinte forma:

$$\text{Grau de inchaço (\%)} = \frac{W_t - W_s}{W_s} \times 100$$

Nesta relação, W_t representa a massa do hidrogel no tempo t e, W_s , a massa do hidrogel seco.

3.4.3.8 Ensaio de libertação *in vitro*

Os hidrogéis secos em forma de disco (com pesos entre 10-20 mg) e com fármaco ou proteína modelo incorporado (10% da massa de polímero), foram mergulhados em 10 ml de meio de libertação, em tubos de ensaio com tampa, e colocados numa incubadora a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e agitação orbital de 100 rpm. Em tempos pré-determinados, uma amostra do meio de libertação era retirada e substituída por um volume igual de meio de libertação fresco.

Uma solução salina de tampão fosfato (pH= 7.4; 0.01M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 0.137M NaCl; 0.0027M KCl; I= 0.16M) e uma solução salina acidificada (pH= 2.0; 0.01M HCl; 0.15M NaCl, I= 0.16M), foram utilizadas como meios de libertação.

Foi também investigado a libertação da proteína modelo BSA num meio com a presença de enzimas pectinolíticas, para os hidrogéis constituídos por pectina. Neste caso o meio consistia numa solução salina de tampão fosfato (pH= 7.4) com uma concentração de enzima de 1mg/mL (pectinase de *Aspergillus niger*, > 1 U/mg). Nestes ensaios, e de forma a preservar a actividade enzimática, em cada amostragem o meio de libertação era totalmente substituído por um meio de libertação fresco e preparado no momento.

As drogas e proteínas libertadas ao longo do tempo foram quantificadas por espectroscopia UV/VIS. Os pormenores dos procedimentos seguidos para a quantificação dos diferentes compostos encontram-se descritos no Anexo 3.1.

3.4.3.9 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A morfologia interna e superficial dos hidrogéis preparados com Pectina A-IMA, PEGDA, e com diferentes proporções destes dois polímeros, foi analisado por microscopia electrónica de varrimento (*scanning electronic microscopy* - SEM). Estes foram preparados conforme foi descrito anteriormente e secos numa estufa de vácuo. Seguidamente os hidrogéis foram rehidratados até atingirem o estado de equilíbrio. Neste estado foram cuidadosamente fracturados em duas partes. Em seguida foram congelados e liofilizados.

As amostras liofilizadas foram colocadas em suportes revestidos de fita de carbono e revestidas com ouro. Estas foram dispostas para que durante a análise de SEM fosse possível observar tanto a superfície como o corte transversal. As análises foram realizadas com espectrómetro electrónico de varrimento JSM-5310 (JEOL, Japão). A diferença de potencial aplicada foi de 20 kV.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 Caracterização dos derivados de pectina

Na Figura 3.15 encontra-se representada, de forma esquemática, a reacção de modificação efectuada nos dois tipos de pectinas utilizadas. Nesta reacção, que ocorre em meio heterogéneo, os grupos isocianato dos reagentes AI ou IMA (representados na Figura 3.10), reagem com os grupos hidroxilo do polissacarídeo, formando uma ligação uretana. Em algumas reacções foi utilizado o catalisador metálico dilaurato de dibutilo de estanho. Este catalisador é frequentemente utilizado nas reacções de formação de uretanas pois é extremamente efectivo na promoção da reacção entre os grupos isocianato e os grupos hidroxilo⁸⁷.

Esta reacção permite introduzir, na estrutura química das pectinas, grupos insaturados terminais. Estes grupos funcionais possibilitarão, posteriormente, a formação de hidrogéis químicos de pectina, através da reticulação radicalar destes.

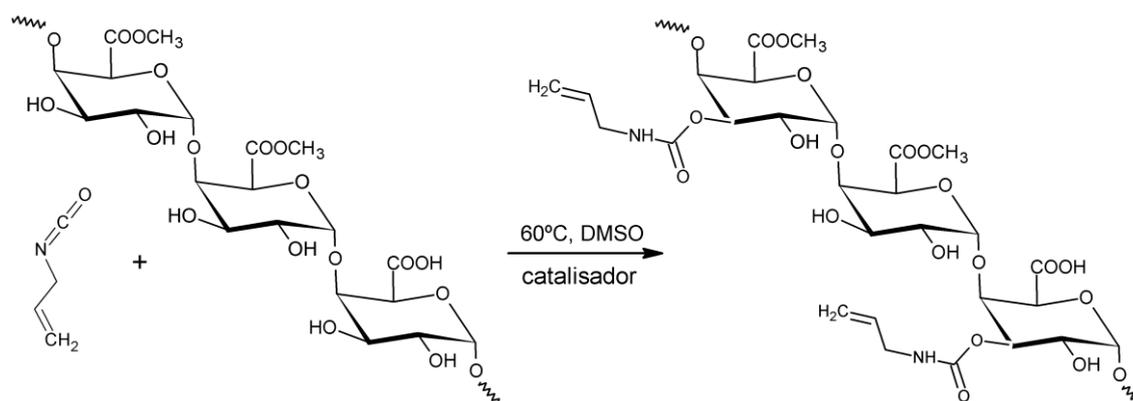


Figura 3.15 Esquema da reacção de modificação da pectina (exemplificada com o reagente AI).

A extensão das modificações obtidas nas várias reacções realizadas foi quantificada recorrendo aos resultados da análise elemental, apresentados no Anexo 3.2.

Como se pode ver por estes resultados, os dois tipos de pectina apresentam uma quantidade residual de azoto (0.466% para a pectina A e 0.560% para a pectina C), atribuído a vestígios de proteínas, presentes normalmente em quantidade residual nas pectinas comerciais, como já foi mencionado na secção 3.1.2.

Nas amostras de pectina modificada verifica-se um aumento da percentagem de azoto relativamente às amostras do polissacarídeo não modificado, e que correspondente aos átomos de azoto das ligações uretana introduzidas. Este aumento da percentagem de azoto foi utilizado para quantificar o grau de modificação dos derivados de pectina, através do parâmetro *grau de substituição*, *GS*, definido como o número de ligações duplas presentes por cada 100 unidades de ácido galaturónico anidro, calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$GS = \frac{\%N \times M_w(\text{AGIaAn})}{100 \times M_w(\text{N}) - \%N \times M_w(\text{ISO})} \times 100$$

Nesta expressão, %N (massa/massa), é a diferença entre a quantidade de azoto presente na amostra de pectina modificada e a quantidade de azoto presente na pectina por modificar. $M_w(\text{N})$ representa o peso molecular do azoto e $M_w(\text{AGaAn})$ o peso molecular do ácido galaturónico anidro (176.1 g/mol). $M_w(\text{ISO})$ é o peso molecular dos isocianatos AI (83.09 g/mol) ou IMA (155.15 g/mol).

Nestes cálculos assume-se que as pectinas são constituídas somente por unidades de ácido galaturónico anidro e que, a cada átomo de azoto corresponde uma ligação dupla terminal (grupo vinílico ou metacrílico, conforme o isocianato utilizado na modificação).

Os valores GS calculados desta forma, para as diferentes reacções de modificação efectuadas com o reagente AI, realizadas de acordo com o desenho experiências esquematizado na Tabela 3.5, são apresentados na Tabela 3.7, para as reacções efectuadas com a pectina A, e na Tabela 3.8, para as reacções com a Pectina C. A interpretação estatística dos resultados, bem como discussão da influência das condições reaccionais investigadas nos valores de GS obtidos, será discutida um pouco mais à frente.

Tabela 3.7 Resposta (grau de substituição, GS) obtida para a Pectina A.

Amostra	Factor			Resposta GS
	A Catalisador	B Quantidade AI**	C Tempo (h)	
A-R1	Sem cat.	1/1	24	4.8±0.5
A-R2	Sem cat.	0.5/1	72	3.5±0.5
A-R3	Com cat. (0.1/1)*	1/1	72	18.3±0.5
A-R4	Com cat. (0.1/1)*	0.5/1	24	22.6±0.7

* Razão molar: moles Catalisador/moles AGIAn.

** Razão molar: moles AI/moles AGIAn.

Tabela 3.8 Resposta (grau de substituição, GS) obtida para a Pectina C.

Amostra	Factor			Resposta GS
	A Catalisador	B Quantidade AI**	C Tempo (h)	
C-R1	Sem cat.	1/1	24	1.8±0.2
C-R2	Sem cat.	0.5/1	72	4.7±0.1
C-R3	Com cat. (0.1/1)*	1/1	72	2.6±0.1
C-R4	Com cat. (0.1/1)*	0.5/1	24	3.0±0.7

* Razão molar: moles Catalisador/moles AGIAn.

** Razão molar: moles AI/moles AGIAn.

Na reacção de modificação com o isocianato IMA, a qual foi efectuada unicamente para a pectina A, verificou-se que o derivado de pectina obtido se tornou parcialmente insolúvel em água. Assim separou-se a fracção solúvel da insolúvel por centrifugação e filtração. A fracção solúvel (A-IMA sol.) foi liofilizada e a fracção insolúvel (A-IMA-Ins) foi seca numa estufa. Como se pode ver pelos GS obtidos para as duas fracções de pectina A-IMA, apresentados na Tabela 3.9, a fracção insolúvel apresenta um grau de substituição bastante elevado, cerca de sete vezes superior ao calculado para a fracção solúvel. De facto, a alteração das propriedades aquosas desta fracção de pectina altamente modificada é devida à introdução, na sua estrutura química, de numerosos grupos metacrílicos (hidrofóbicos). A formação de duas fracções de derivados de pectina e os seus respectivos GS indicam que a reacção de modificação não ocorreu na mesma extensão em todas as cadeias de polímero presentes na mistura reaccional, tal como seria de esperar num meio reaccional heterogéneo.

Tabela 3.9. GS da fracção solúvel e da fracção insolúvel (em água) da pectina A modificada com o reagente IMA.

Amostra	Catalisador*	Quantidade IMA**	Tempo (h)	GS
A-IMA-Sol (fracção solúvel)	0.1/1	0.75/1	24	6.1±0.5
A-IMA-Ins (fracção insolúvel)	0.1/1	0.75/1	24	41.0±1.4

* Razão molar: moles Catalisador/moles AGIAn.

** Razão molar: moles IMA/moles AGIAn.

Os espectros FTIR-ATR dos dois tipos de pectina encontram-se representados na Figura 3.16. Estes espectros podem ser divididos em três regiões:

i) Entre os 3600 e 2800 cm^{-1} , onde se encontram duas grandes bandas de absorção. A primeira, centrada à volta dos 3300 cm^{-1} , e com uma extensa largura, é característica dos polissacarídeos, sendo atribuída ao alongamento dos grupos O-H. A segunda banda, centrada à volta dos 2900 cm^{-1} , corresponde às vibrações de alongamento da ligação C-H dos grupos CH_3 .

ii) Entre os 1600 e 1800 cm^{-1} encontra-se a região mais interessante do espectro no que diz respeito à informação fornecida sobre o grau de esterificação das pectinas, pois nesta encontram-se as bandas de absorvância do grupo carbonilo (C=O) do ácido carboxílico e do éster metil carboxílico. A análise desta região do espectro revela a existência de duas bandas centradas à volta de 1715 cm^{-1} e de 1630 cm^{-1} . Segundo vários autores^{71, 88-90}, a primeira banda desta região (1710 – 1750 cm^{-1}) corresponde às vibrações de alongamento da ligação C=O nos grupos carboxílicos protonados (na sua forma não ionizada, COOH) e nos grupos carboxílicos esterificados com o grupo metilo (COOCH₃). A ionização dos grupos carboxílicos (com formação de sais de sódio ou potássio, por exemplo) leva ao aparecimento de duas novas bandas, correspondentes às vibrações de alongamento simétricas e assimétricas da ligação C=O do grupo carboxílico na sua forma COO⁻. A segunda banda nesta região, assinalada entre 1600-1650 cm^{-1} , corresponde à vibração de alongamento assimétrica.

iii) Abaixo dos 1500 cm^{-1} situa-se a chamada região *finger print*, única para cada composto. Nesta zona encontram-se uma série complexa de bandas que muitas vezes não podem ser atribuídas sem ambiguidade a uma vibração em particular, pois estas são o resultado da interacção de vários sistemas vibracionais complexos. Nesta região encontram-se as bandas correspondentes às vibrações típicas dos compostos polissacarídeos, como as vibrações do anel piranóide sobrepostas com as vibrações de alongamento dos grupos (C-OH) e as vibrações da ligação glicosídica (C-O-C).

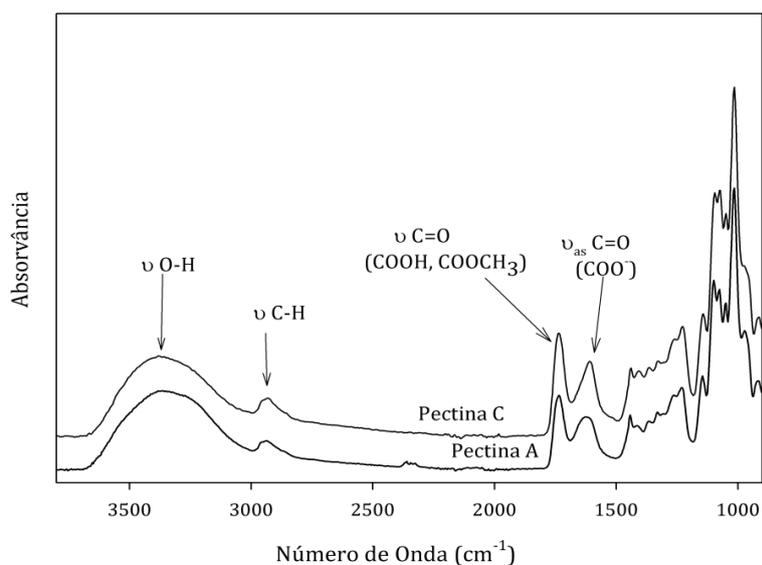


Figura 3.16 Espectros FTIR-ATR dos dois tipos de pectina utilizados.

Como se pode verificar pela Figura 3.16, os espectros FTIR-ATR das Pectinas A e C são praticamente idênticos, apesar dos seus diferentes graus de esterificação e muito provavelmente das diferenças existentes na quantidade e composição dos resíduos de açúcares presentes nas zonas ramificadas.

Na Figura 3.17 pode-se comparar o espectro FTIR-ATR da pectina A não modificada com os espectros da pectina A modificada com o reagente isocianato de alilo (AI).

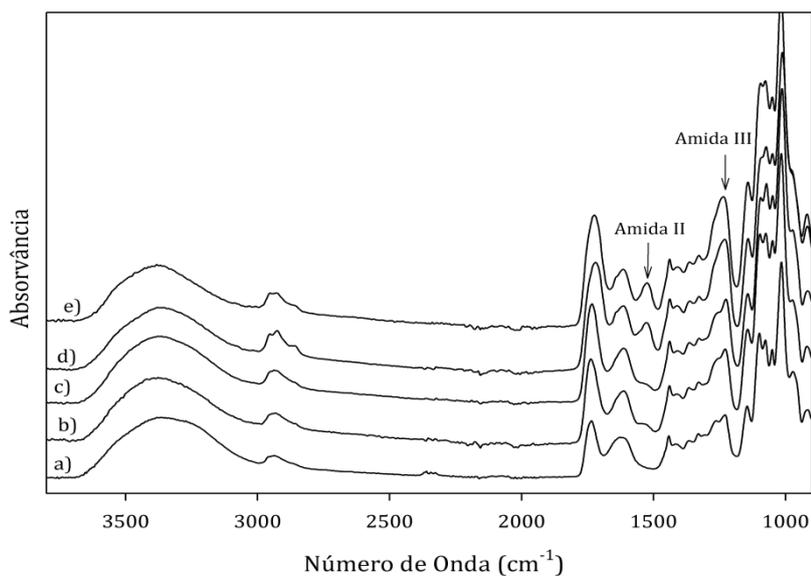


Figura 3.17 Espectros FTIR-ATR da pectina A modificada com o reagente isocianato de alilo (AI): a) Pectina A sem modificações. b) Pectina A-R1 (GS= 4.8). c) Pectina A-R2 (GS = 3.5). d) Pectina A-R3 (GS= 18.3). e) Pectina A-R4 (GS= 22.6).

Da análise dos espectros destaca-se, nas pectinas A modificadas, o aparecimento de duas novas bandas, características das vibrações dos grupos envolvidos na ligação uretana. Estas duas bandas, resultantes do acoplamento das vibrações de deformação da ligação N-H com as vibrações de alongamento da ligação C-N, situam-se aproximadamente a 1530 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} e são designadas na literatura por Amida II e Amida III, respectivamente^{91, 92}. Na Tabela 3.10 estão indicadas as principais bandas identificadas nos espectros FTIR-ATR das pectinas não modificadas e modificadas. Outras bandas características da ligação uretana, como o alongamento da ligação C-N ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$) e a deformação do grupo carbonilo ($1700\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$), encontram-se sobrepostas com bandas correspondentes ao espectro da pectina, o que torna impossível a sua atribuição. Esta limitação estende-se também à identificação da banda correspondente à vibração de alongamento da ligação dupla C=C, pois esta, localizada a cerca de 1640 cm^{-1} , encontra-se sobreposta com a banda correspondente à vibração assimétrica da ligação C=O dos grupos carboxílicos ionizados.

Note-se que, como seria de esperar, a intensidade das bandas Amina II e Amina III aumenta com o aumento do grau de substituição (GS) das pectinas modificadas. Assim, nos espectros dos derivados de pectina A-R4 e A-R3 (Figura 3.17, *e*) e *d*)), com um GS de cerca de 20, as bandas Amida II e Amida III são perfeitamente detectáveis, enquanto nos espectros correspondentes aos derivados A-R1 e A-R2, com GS de aproximadamente 4, a banda Amida II aparece apenas como uma pequena elevação sendo que a banda Amida III não é de todo identificável.

Tabela 3.10 Bandas dos espectros FTIR-ATR da pectina e da pectina modificada.

Nº de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referências
<i>Pectina</i>		
3000 - 3600	ν OH	71,72, 88-90
2800 - 3000	$\nu_{s, as}$ C-H	
1710 - 1750	ν C=O (COOH e COOCH ₃)	
1600 - 1650	ν_{as} C=O (COO ⁻)	
<i>Ligação uretana</i>		
1530-1540 (Amida II)	δ N-H + ν C-N	91, 92
1220-1230 (Amida III)	δ N-H + ν C-N	

ν -alongamento; δ -deformação; *s* -simétrico; *as* - assimétrico.

Na Figura 3.18 encontram-se representados os espectros FTIR-ATR da pectina C e dos derivados produzidos pela reacção com o reagente AI. Devido ao

pequeno grau de substituição obtido com este tipo de pectina (GS entre 1.8 e 4.7), os espectros correspondentes às pectinas modificadas são idênticos ao espectro da pectina C original, sendo praticamente impossível assinalar a presença das bandas características da ligação uretana identificadas anteriormente nos espectros das pectinas A modificadas.

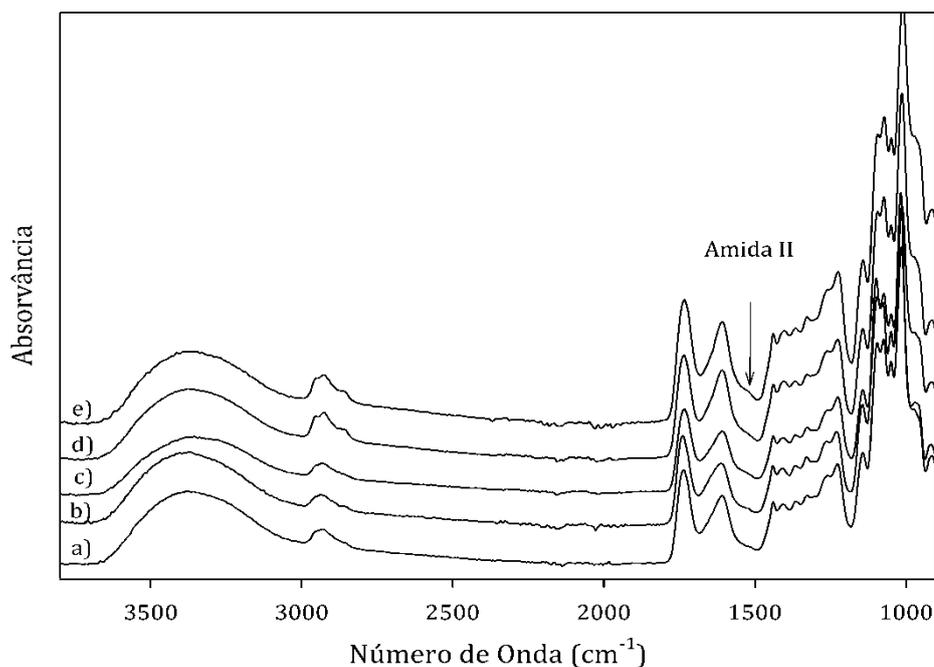


Figura 3.18 Espectros FTIR-ATR da pectina C modificada com o reagente isocianato de alilo (AI): a) Pectina C sem modificações. b) Pectina C-R1 (GS= 1.8). c) Pectina C-R2 (GS = 4.7). d) Pectina C-R3 (GS= 2.6). e) Pectina C-R4 (GS= 3.3).

Na Figura 3.19 encontram-se representados os espectros FTIR-ATR da fracção solúvel e da fracção insolúvel da pectina A modificada com o reagente IMA. Como se pode observar, e devido aos GS substancialmente diferentes apresentados por estas duas fracções, os dois espectros apresentam diferenças notórias. O espectro da fracção de pectina A-IMA solúvel, Figura 3.19b), com um GS relativamente baixo de 6.1, não difere muito do espectro da pectina A não modificada, distinguindo-se apenas pelo aparecimento de uma deformação na banda atribuída à vibração de alongamento assimétrica da ligação C=O dos grupos carboxílicos ionizados. Esta deformação, situada a cerca de 1530 cm^{-1} , é provavelmente a banda não resolvida Amida II, da ligação uretana.

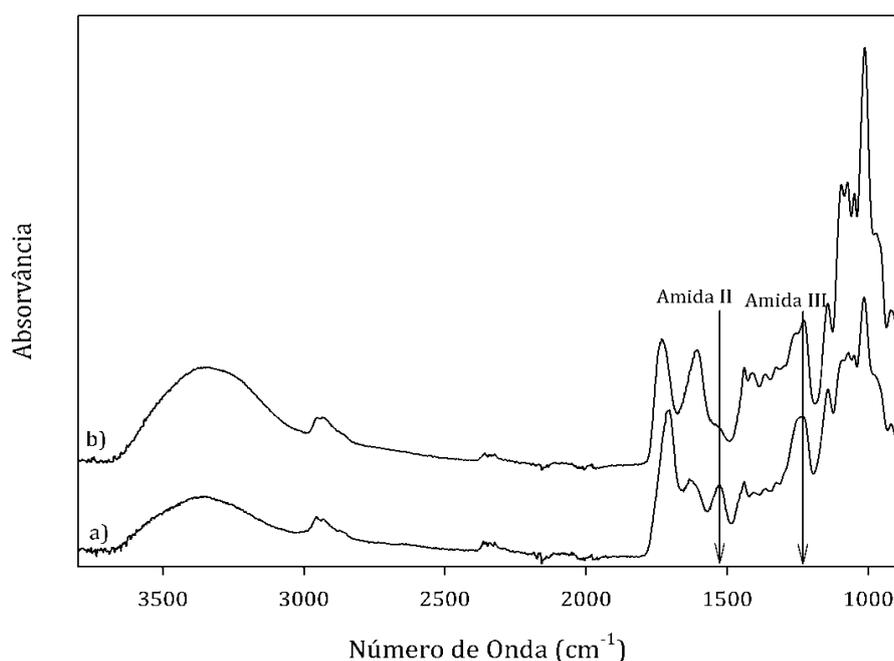


Figura 3.19 Espectros FTIR-ATR da Pectina A modificada com o reagente metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA): a) Fração da Pectina A-IMA insolúvel em água (GS= 41.0). b) Fração da Pectina A-IMA solúvel em água (GS= 6.1).

No espectro da fração insolúvel de pectina A-IMA, com um grau de substituição considerável (GS = 41.0), a banda correspondente à Amida II aparece totalmente resolvida com um pico a 1540 cm^{-1} . Também a banda Amida III é visível neste espectro, aparecendo como uma banda a 1220 cm^{-1} que se sobrepõe às várias combinações de vibrações presentes nessa região do espectro. Na região do espectro entre 1600 e 1800 cm^{-1} , tal como acontece na pectina não modificada, são apenas visíveis duas bandas. No entanto no caso da pectina modificada estas duas bandas são o resultado de uma série de vibrações combinadas que se manifestam nesta zona do espectro, atribuídas ao grupo carbonílo das pectinas, bem como aos grupos envolvidos na ligação uretana e à vibração de alongamento da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (^1H -RMN), em água deuterada, das pectinas originais e dos respectivos derivados, foram registados, numa tentativa de obter mais evidências da modificação química destes polissacarídeos. Os espectros ^1H -RMN dos dois tipos de pectina (Pectina A e Pectina C) encontram-se representados na Figura 3.20.

Antes de se passar à discussão dos resultados obtidos refira-se que a aquisição dos espectros de ^1H -RMN deste polissacarídeo revelou-se uma tarefa complexa devido à elevada viscosidade das amostras. Os espectros apresentados, embora não exibam grande qualidade, correspondem aos melhores registos conseguidos, no que se refere à resolução e à sensibilidade dos sinais.

Para além das dificuldades técnicas experimentadas na aquisição dos espectros de pectina, os espectros ^1H -RMN de compostos polissacarídeos são intrinsecamente difíceis de interpretar devido à complexidade e quantidade de sinais gerados, resultantes da diversidade estrutural dos diferentes protões presentes nestes compostos. Esta complexidade torna-se ainda maior nos espectros de polissacarídeos de natureza heterogénea como é o caso da pectina. Relembre-se que esta, embora seja composto maioritariamente por cadeias lineares de poli(ácido galaturónico) parcialmente metilado, possui zonas ramificadas, compostas por resíduos de vários açúcares como a arabinose, a galactose e a ramnose. Refira-se no entanto que a espectroscopia de ^1H -RMN tem sido utilizada, em combinação com técnicas de degradação química e enzimática, na investigação da estrutura deste polissacarídeo, revelando-se uma ferramenta bastante útil na elucidação da composição e da estrutura das zonas ramificadas e do grau e padrões de metilação nas zonas lineares das pectinas⁹³⁻⁹⁶.

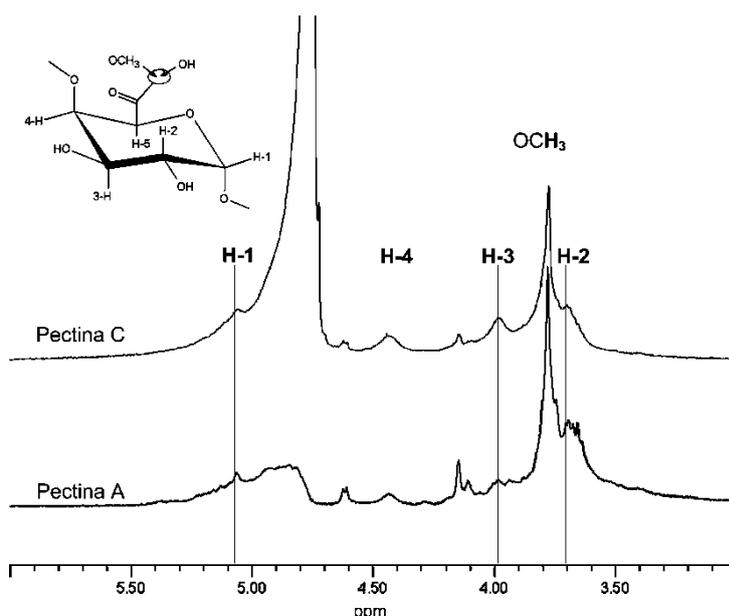


Figura 3.20 Espectros ^1H -RMN (em D_2O) das pectinas utilizadas.

Da observação dos espectros H-RMN das pectinas A e C destaca-se, pela sua intensidade, o sinal correspondente aos prótons do grupo metoxilo das unidades de ácido galacturónico esterificadas, situado na zona de campo alto do espectro. Como não foi utilizado nenhum composto de referência durante o registo dos espectros, e visto este ser o único sinal no espectro $^1\text{H-RMN}$ das pectinas claramente identificável, estabeleceu-se a posição deste sinal como referência, na posição 3.78 ppm, de acordo com o que se encontra assinalado na literatura⁹⁵.

Com base nos valores dos desvios químicos indicados na literatura para os prótons das unidades do ácido D-galacturónico em homogalaturanas padrão (Poli α -(1 \rightarrow 4) (ácido D-galacturónico) totalmente deesterificado), foi possível identificar a origem de alguns sinais presentes no espectros, conforme é assinalado na Figura 3.20. Assim, foram atribuídos os sinais a 3.70, 3.98 e 4.44 ppm aos prótons H-2, H-3 e H-4 do ácido D-galacturónico, respectivamente^{69, 93-97}. De acordo com a literatura, os padrões de ressonância destes três prótons mantêm-se praticamente inalterados quando a unidade de ácido galacturónico se encontra esterificada^{69, 97}. Pelo contrário, os padrões de ressonância dos prótons H-1 e H-5 alteram-se significativamente conforme se encontrem numa unidade de ácido galacturónico não esterificada (AGal) ou numa unidade de ácido galacturónico esterificada (AGalMe), sendo ainda influenciados pelo estado das unidades de ácido galacturónico vizinhas.

Quando presente em unidades de AGal, o próton H-1 manifesta um sinal de ressonância entre 5.06 e 5.16 ppm, conforme o estado das unidades vizinhas. Quando este próton se encontra numa unidade AGalMe, o sinal desloca-se para a zona de campo alto, manifestando-se entre 4.97 e 4.92 ppm⁹⁷. Quanto ao próton H-5, este apresenta um pico de ressonância entre 4.5 e 4.7 ppm, quando se encontra numa unidade AGal, sendo que, quando presente numa unidade de AGalMe, este sinal desloca-se para a zona de campo baixo, entre 4.9 e 5.1 ppm, conforme a natureza das unidades vizinhas⁹⁸.

Considerando o comportamento de ressonância destes dois prótons, e tendo em conta que o padrão de esterificação das unidades de ácido galacturónico é, nas pectinas produzidas industrialmente, aleatório, é óbvio que um espectro de pectina na zona de ressonância destes dois prótons apresentará um padrão complexo, composto de múltiplos sinais. Devido à fraca qualidade dos espectros obtidos neste trabalho, todos esses sinais aparecem completamente não resolvidos na forma de

uma larga banda situada sensivelmente entre 4.8 e 5.2 ppm (Figura 3.20). Adicionalmente, e adjacente a esta zona do espectro, manifesta-se o sinal da água residual presente nas amostras, o que torna ainda mais complicado a obtenção de um espectro bem resolvido.

Os restantes sinais presentes nos espectros das duas pectinas, situados fora das posições assinaladas como correspondentes à ressonância dos prótons constituintes das unidades de ácido galacturónico, não foram atribuídos, sendo que estes são provavelmente originados pelos prótons presentes nos resíduos de açúcares que compõem a região ramificada das pectinas.

Na Figura 3.21 encontram-se representados os espectros ^1H -RMN da pectina A e dos derivados obtidos pela modificação com o reagente AI. Relativamente ao espectro da pectina A original destaca-se, nos espectros das pectinas modificadas, o aparecimento de uma nova banda a cerca de 5.85 ppm. De acordo com Zhang *et al*⁸⁶ este sinal corresponde aos dois prótons ligados ao carbono terminal do grupo vinílico ($=\text{CH}_2$) presente no composto AI. A presença deste sinal representa uma evidência da presença de grupos insaturados na estrutura química das pectinas modificadas. Note-se ainda que este sinal apresenta uma maior intensidade nos espectros A-R3 e A-R4, que correspondem precisamente aos derivados com um maior grau de substituição (GS), de acordo com os valores calculados com base dos dados recolhidos por análise elemental.

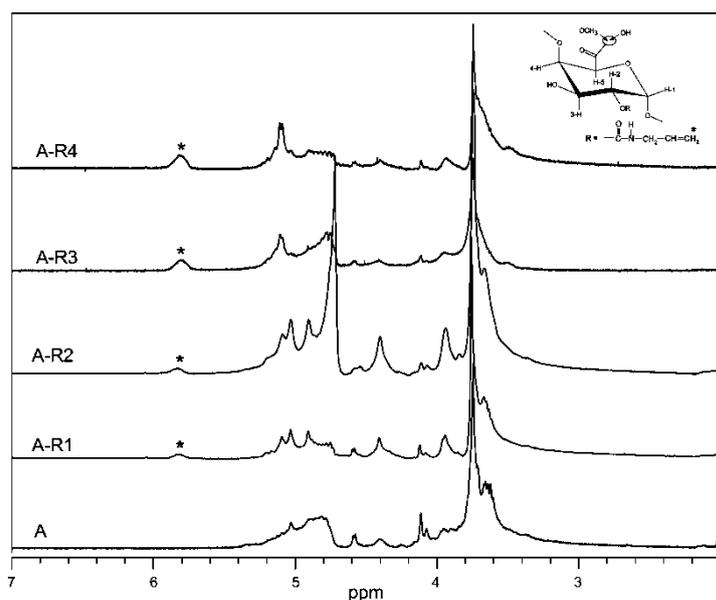


Figura 3.21 Espectros ^1H -RMN (em D_2O) da pectina A original e dos derivados obtidos por modificação com o reagente AI.

Ainda de acordo com Zang *et al*⁸⁶ nos espectros das pectinas modificadas seria de esperar a observação de mais dois sinais com um desvio químico superior ao referido anteriormente: um a cerca de 7.22 ppm, correspondente ao protão do grupo $-\text{CH}=\text{CH}_2$, e outro a 7.38 ppm, correspondente ao protão da ligação uretana ($-\text{CO}-\text{NH}-$). No entanto nos espectros obtidos estes sinais não foram detectados, possivelmente devido à sua menor intensidade.

Em relação à zona do espectro correspondente às ressonâncias dos protões do polissacarídeo (entre 3.5 e 5.5 ppm aproximadamente), verifica-se algumas diferenças nos espectros das pectinas modificadas relativamente ao espectro da pectina original, o que seria de esperar, pois a presença dos protões da molécula de Al provoca alterações no ambiente químico sentido pelos protões da pectina, o que leva a alterações dos padrões de ressonância destes. Em teoria seria possível, através dessas diferenças, obter algumas informações sobre o padrão de substituição como, por exemplo, a localização preferencial da ligação uretana. No entanto, devido à multiplicidade de sinais e fraca qualidade dos espectros, torna-se impossível extrair qualquer informação a partir desta zona do espectro.

Contudo tentou ainda quantificar-se, a partir espectros ^1H -RMN, o grau de substituição (GS) dos derivados, de forma a comparar estes com os valores obtidos com base na análise elemental. Para isso dividiu-se a área do pico identificado com a ressonância dos protões envolvidos na ligação dupla ($=\text{CH}_2$, $\delta= 5.85$ ppm) pelo dobro da área do pico atribuído à ressonância do protão H-4 ($\delta= 4.44$ ppm) da unidade de ácido glaturónico. O pico do protão H-4 foi escolhido porque, dentro dos sinais assinalados no espectro como pertencentes aos protões da pectina, este é o pico mais isolado/resolvido. Os valores de GS obtidos para os quatro derivados foram: A-R1, 8.0; A-R2, 8.5; A-R3, 30.0; A-R4 81.0. Se considerarmos que, através da metodologia de cálculo utilizada, os valores de GS obtidos incorporam um considerável grau de sobrestimação (a área do pico do protão H-4, representa apenas as unidades de AGla e AGlaMe), pode-se dizer que estes são comparáveis, em termos relativos, aos obtidos por análise elemental (A-R1, 4.8; A-R2, 3.5; A-R3, 18.3; A-R4, 22.6), com excepção para os valores calculados para o derivado A-R4, que diferem consideravelmente, mesmo tendo em conta a sobrestimação dos valores obtidos com base nos espectros de ^1H -RMN.

Os espectros ^1H -RMN dos derivados da Pectina C-AI e da fracção solúvel da Pectina A-IMA não são apresentados pois foi impossível extrair qualquer informação relevante destes.

A cromatografia de exclusão de tamanhos de alta eficiência (HPSEC), acoplada a vários modos de detecção (índice refractivo, dispersão de luz, viscosimetria, entre outros) é uma das técnicas mais utilizadas e investigadas na determinação da distribuição dos pesos moleculares das pectinas⁹⁹⁻¹¹¹. O desenvolvimento e a optimização de um método para a determinação correcta dos pesos moleculares das pectinas é uma tarefa bastante difícil pois, devido à natureza heterogénea da sua estrutura e às suas propriedades enquanto polielectrólito, esta exhibe estruturas e conformações complexas quando em solução.

Na Tabela 3.11 são apresentados os pesos moleculares médios das Pectinas A e C e dos diferentes derivados sintetizados, obtidos por Cromatografia de Exclusão de Tamanhos (SEC). Os vários pesos moleculares mássicos médios (M_w) situam-se sensivelmente entre os 500 000 e 1 500 000 g/mol. Estes valores são, provavelmente, sobrestimativas do M_w real das amostras analisadas. Embora os compostos pectídicos possam apresentar pesos moleculares médios muito variados (desde 15 000 até cerca de 1 000 000 g/mol), dependendo da natureza da matéria-prima, condições de extracção e processo de purificação, o peso molecular mássico típico dos extractos de pectina comercial situa-se à volta dos 200 000 g/mol. A sobrestimação dos pesos moleculares das pectinas é uma característica do método adoptado e as causas dessa sobrestimação encontram-se bem estudadas. De facto, sabe-se que as substâncias pectídicas formam agregados supramoleculares termodinamicamente estáveis quando em água ou soluções salinas de baixa concentração^{99, 103, 105-108}. Isto conduz a uma sobrestimação dos pesos moleculares quando utilizados modos de detecção baseados em técnicas de dispersão de luz^{99-101, 107}, como é o caso do método utilizado neste trabalho.

Outro factor que conduz à sobrestimação dos pesos moleculares, quando são utilizados métodos relativos, é a natureza dos padrões empregues na construção da curva de calibração universal. Normalmente são padrões de base dextrano ou pululano. Contudo, a natureza estrutural destes é bastante diferente da estrutura das pectinas. Adicionalmente, estes polissacarídeos não possuem grupos ionizáveis,

um factor que conduz à sobrestimação dos pesos moleculares. Isto acontece porque, considerando dois polímeros com o mesmo peso molecular, um de natureza iónica e outro neutro, o volume hidrodinâmico do polímero carregado electricamente, devido às repulsões electrostáticas que se estabelecem entre os grupos ionizados, é sempre superior ao volume hidrodinâmico do polímero neutro. Neste trabalho, a curva de calibração foi construída com padrões de dextrano o que, de acordo com a discussão anterior, pode ter contribuído para os resultados obtidos. Para além disso a gama de pesos moleculares utilizada (entre 12 000 e 80 000 g/mol) não terá sido a mais adequada.

Ainda, e porque a pectina é um polielectrólito, a natureza da fase móvel, como o tipo de sal utilizado, pH e força iónica, afectam de forma muito significativa os perfis de eluição obtidos.

Embora os valores dos pesos moleculares obtidos com o método utilizado tenham de ser encarados com reserva, a análise e comparação dos perfis de eluição das várias pectinas providência alguma informação sobre as características das curvas de distribuição de pesos moleculares dessas e o impacto causado pelas reacções de modificação.

Na Figura 3.22 podem-se observar os perfis de eluição para as pectinas A e C originais. Os cromatogramas das duas pectinas são parecidos, indicando que estas duas pectinas possuem uma distribuição de pesos moleculares semelhante. A curva da Pectina A apresenta um pequeno patamar na zona de tempos de retenção mais baixos, possivelmente devido aos agregados de pectina com um tamanho considerável presentes em solução. Por terem graus de esterificação diferentes, é de esperar que a extensão e o tamanho dos agregados formados pelos dois tipos de pectina sejam diferentes pois, para além das propriedades da solução aquosa, o grau de esterificação é um factor determinante no tipo de conformações e de agregados formados pelas moléculas de pectina quando estas se encontram em solução¹⁰³⁻¹⁰⁵. Embora o estado de agregação das pectinas em solução afecte os pesos moleculares obtidos e o índice de dispersão desses mesmos pesos moleculares, os índices de dispersão obtidos (M_w/M_n) (Tabela 3.11) e os perfis de eluição indicam que as amostras de pectina são extremamente polidispersas. A inerente polidispersividade deste polímero, que deriva da forma como este é obtido, é assinalada na literatura⁹⁹.

¹⁰³, ¹⁰⁵. Índices de polidispersão na gama dos apresentados na Tabela 3.11 são também referidos por alguns autores¹⁰⁶.

Tabela 3.11 Pesos moleculares médios, mássicos (M_w) e numéricos (M_n), da pectina A, pectina C, e diferentes derivados, determinados por SEC.

Pectina A	M_w	M_n	M_w/M_n	Pectina C	M_w	M_n	M_w/M_n
A	1.2×10^6	7.2×10^4	16.2	C	1.0×10^6	9.7×10^4	10.2
A-R1	1.1×10^6	1.1×10^5	9.7	C-R1	1.0×10^6	8.9×10^4	11.6
A-R2	5.3×10^5	6.3×10^4	8.2	C-R2	1.1×10^6	6.1×10^4	17.4
A-R3	7.3×10^5	6.5×10^4	11.2	C-R3	1.4×10^6	8.0×10^4	16.9
A-R4	7.5×10^5	8.7×10^4	8.6	C-R4	9.7×10^5	9.3×10^4	10.4
A-IMA	1.6×10^6	2.9×10^5	5.5				

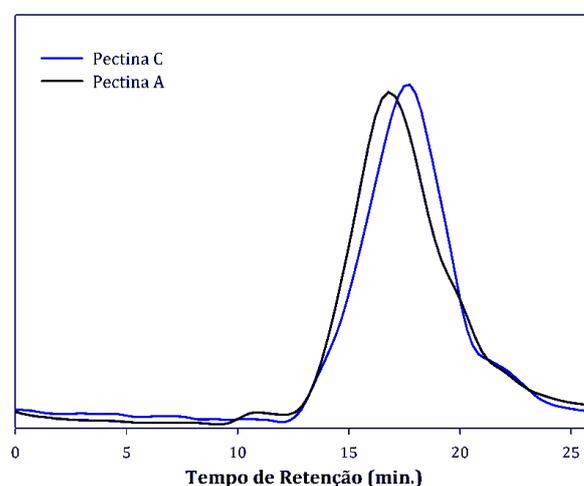


Figura 3.22 Cromatogramas SEC dos dois tipos de pectinas utilizadas.

Na Figura 3.23 são comparados os cromatogramas das duas pectinas com os cromatogramas dos respectivos derivados obtidos com o reagente AI. Estes dois gráficos evidenciam que, enquanto os perfis de eluição dos derivados de pectina C se mantêm semelhantes ao cromatograma da pectina C original (Figura 3.23b), os cromatogramas dos derivados da pectina A diferem significativamente do cromatograma desta pectina antes da modificação (Figura 3.23a). Independentemente do grau de substituição dos derivados, as curvas de eluição são mais estreitas, com os tempos de retenção, correspondentes aos máximos das curvas, mais elevados (o que corresponde a pesos moleculares mais baixos). Para além disso, surge um segundo pico a tempos de retenção mais elevados, sobreposto à curva de distribuição principal. Uma vez que a reacção de modificação se dá em

DMSO, é pouco provável que as cadeias de pectina tenham sofrido alguma reacção de despolimerização durante o processo reaccional. No entanto, durante o processo de diálise é possível que as pectinas tenham sofrido alguma despolimerização por eliminação β , sobretudo a pectina A, pois como se referiu na secção 3.1.4.3, esta, por ser uma pectina de elevado grau de esterificação, é mais susceptível a sofrer este tipo de reacção.

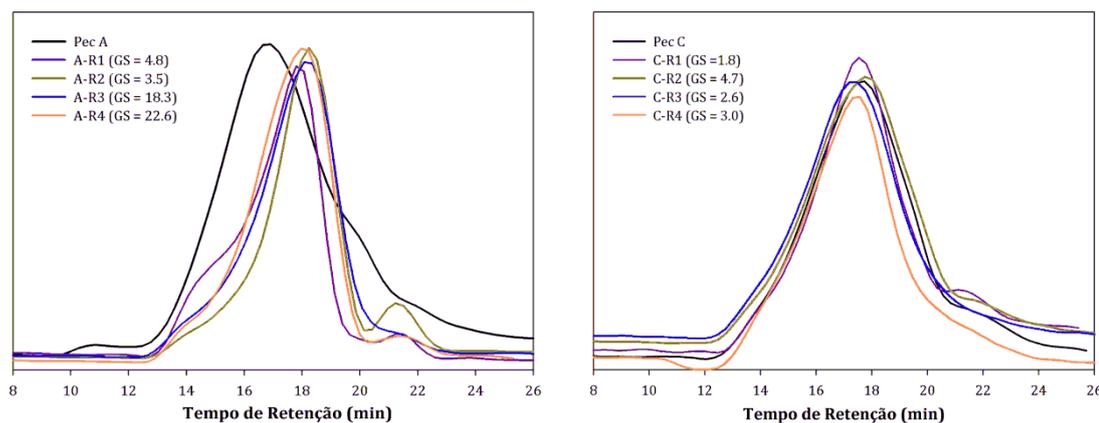


Figura 3.23 Cromatogramas SEC das duas pectinas e dos respectivos derivados: a) Pectina A e Pectina A modificada com o reagente AI. b) Pectina C e Pectina C modificada com o reagente AI.

Outra hipótese possível, para justificar a alteração dos perfis de eluição dos derivados de pectina A, é que a introdução de novos grupos químicos possa conduzir a uma alteração do comportamento em solução da pectina A modificada. Ou seja, a introdução de grupos hidrofóbicos nas cadeias de pectina A pode ter um efeito disruptivo no balanço entre forças atractivas e repulsivas, intra- e intermoleculares, estabelecidas entre as moléculas de pectina quando em solução, levando a que estas assumam diferentes estruturas supramoleculares e conformações, e alterando dessa forma o perfil de eluição dos derivados.

As mesmas alterações referidas acima podem ser observadas no perfil de eluição do derivado da pectina A modificada com o agente IMA (fracção solúvel), representado na Figura 3.2

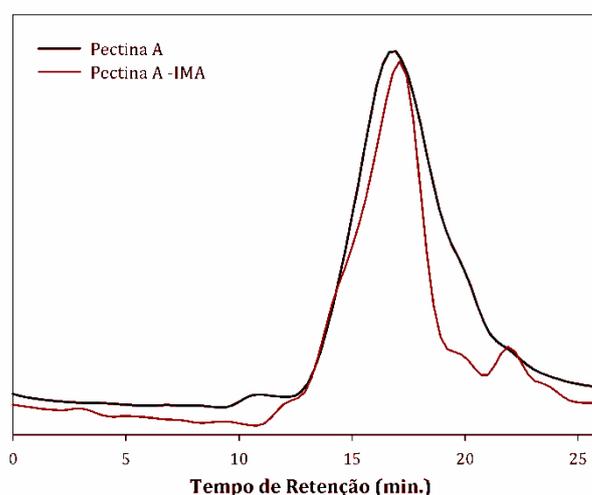


Figura 3.24 Cromatogramas da Pectina A e da Pectina A modificada com o reagente IMA (fracção solúvel em água)

Como foi referido, para os dois tipos de pectinas modificadas com o reagente AI foi implementado um desenho de experiências factorial fraccionado do tipo 2^{3-1} (Tabela 3.5), de forma a investigar a influência de três parâmetros reaccionais na extensão da reacção de modificação, expressa de forma quantitativa pelo grau de substituição (GS) determinado por análise elemental. Os parâmetros investigados foram a adição ou não de catalisador (factor *A*), a quantidade de reagente AI (factor *B*), e o tempo de reacção (factor *C*). Os valores de GS obtidos foram já apresentados anteriormente nas Tabelas 3.7 e 3.8.

O *software* Design-Expert® v7.0.0 (Stat-Ease, Inc) foi utilizado para a avaliar a forma como os factores investigados influenciavam o GS obtido. Nas Figuras 3.25 e 3.26 encontram-se os gráficos de Pareto obtidos para a Pectina A e a Pectina C, respectivamente.

Num gráfico de Pareto os efeitos dos factores sobre uma determinada variável, estimados a partir dos dados experimentais, são ordenados de forma decrescente da sua magnitude. Nas Figuras 3.25 e 3.26, os factores com efeitos com valores *t* superiores ao valor *t* limite (valor *t* para $p=0.05$) são considerados como muito provavelmente significativos. Se o valor *t* for superior ao limite de Bonferroni (uma estimativa mais conservadora do valor *t* limite) os factores são considerados quase de certeza significativos. Os factores com efeitos com valores *t* inferiores ao valor *t* limite são considerados muito provavelmente não significativos.

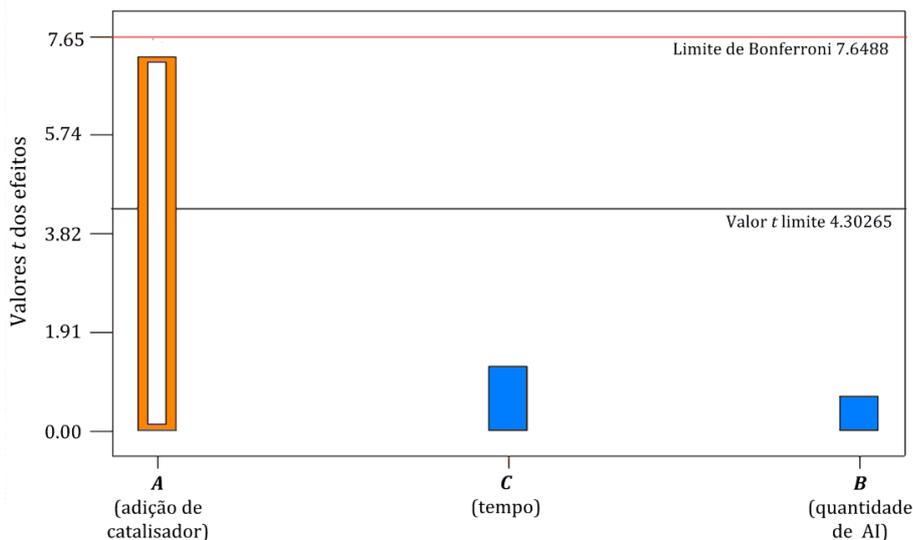


Figura 3.25 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores investigados sobre o GS da Pectina A. Efeitos positivos (laranja); Efeitos negativos (azul).

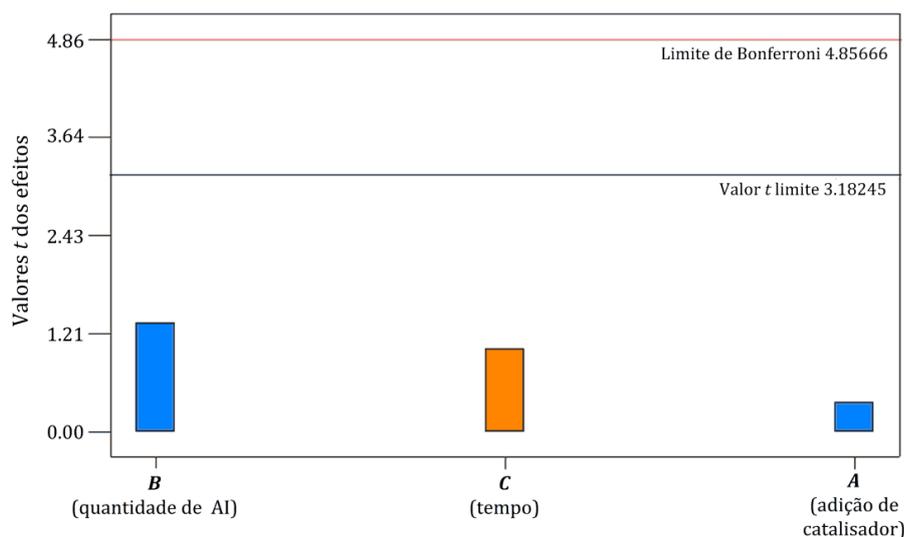


Figura 3.26 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores investigados sobre o GS da Pectina C. Efeitos positivos (laranja); Efeitos negativos (azul).

Considerando os gráficos de Pareto para a Pectina A e Pectina C, e o resultado de outros testes estatísticos dados pelo *software* Design-Expert®, chegou-se às seguintes conclusões:

- Nas reacções com a pectina A, apenas o factor qualitativo A (adição ou não de catalisador) apresenta um impacto (positivo) significativo no GS.

- Para a pectina C, nenhum dos factores investigados influencia significativamente o GS obtido.

Estes resultados têm de ser interpretados com alguma cautela pois o desenho de experiências que originou estes resultados tem um grau de resolução III, o que significa que os efeitos dos factores principais, embora não estejam confundidos uns com os outros, encontram-se confundidos com os efeitos das interacções entre dois factores ⁸⁵. Isto significa que este tipo de desenho pode conduzir a conclusões erradas se existirem interacções muito significativas entre os vários factores. Por outro lado, e por ser um desenho sem réplicas, não é possível obter uma estimativa do erro interno (o chamado erro puro). Apesar de tudo, os resultados obtidos podem ser úteis na elucidação de algumas questões, desde que interpretados com espírito crítico e enquadrados com o conhecimento que se tem sobre o fenómeno em investigação.

Assim, os dois factores que se revelaram estatisticamente insignificantes no GS obtido, para os dois tipos de pectinas, foram os factores quantitativos: tempo e quantidade de reagente AI.

Considerando o tempo, e os níveis a que este factor foi investigado, 24 e 72h, é razoável que este não tenha um efeito muito significativo no intervalo pesquisado, pois 24h (e tendo em consideração a temperatura reaccional utilizada) é um tempo consideravelmente longo para que a reacção ocorra na máxima extensão possível, mesmo sem a presença de um catalisador.

Por outro lado, os resultados estatísticos obtidos para o outro factor, a quantidade de reagente AI, nos níveis a que este foi investigado (0.5/1 e 1/1 (mol AI/mol AGlan)), também são plausíveis, considerando as condições heterogéneas em que a reacção ocorre. A pectina não se encontra dissolvida no solvente da reacção, mas sim em suspensão e na forma de partículas. Assim muitos dos grupos OH nas cadeias de pectina encontram-se inacessíveis para reagir. Dessa forma, e no intervalo dos níveis a que o factor foi investigado (que se traduziria num GS de 50% e 100%, se a eficiência da reacção fosse de 100%) é muito plausível admitir que este factor não influencie de forma significativa o GS, devido ao reagente se encontrar em excesso no intervalo das proporções investigadas. Isto implica admitir que o factor limitante, ou seja, a variável que afectará de forma sensível o GS obtido, será a acessibilidade dos grupos OH.

A assumpção de que as conclusões obtidas são verdadeiras, ou seja, que os factores quantitativos não influenciam significativamente o GS nos dois tipos de

pectina, permite, em termos estatísticos, projectar os dois desenhos de experiências executados de forma independente num único desenho factorial do tipo 2^2 , com duas réplicas em todos os pontos ⁸⁵, onde os factores em análise são o tipo de pectina (pectina C (-) ou pectina A (+)) e a adição ou não de catalisador à reacção (sem catalisador (-) ou com catalisador (+)). O esquema deste desenho encontra-se representado na Figura 3.27.

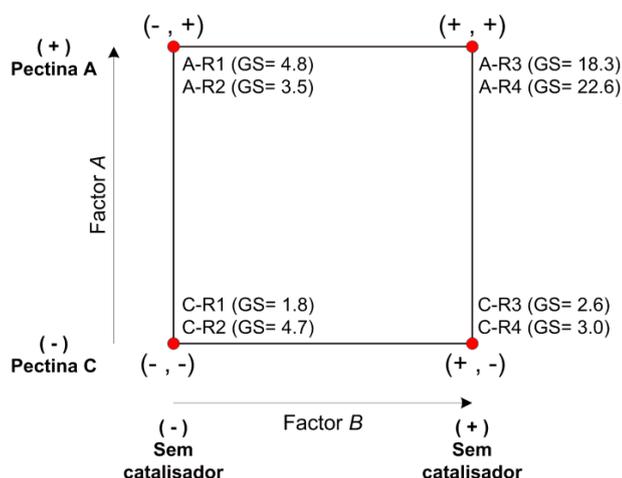


Figura 3.27 Desenho de experiências factorial 2^2 resultante da projecção dos dois desenhos do tipo factorial fraccionado 2^{3-1} implementados para a pectina A e pectina C.

Os gráficos de Pareto dos efeitos e os resultados da análise ANOVA obtidos com o *software* Design Expert® são apresentados nas Figura 3.28 e na Tabela 3.12, respectivamente. Estes revelam, claramente, a influência significativa que os dois factores qualitativos têm no GS, bem como a interacção entre os dois factores.

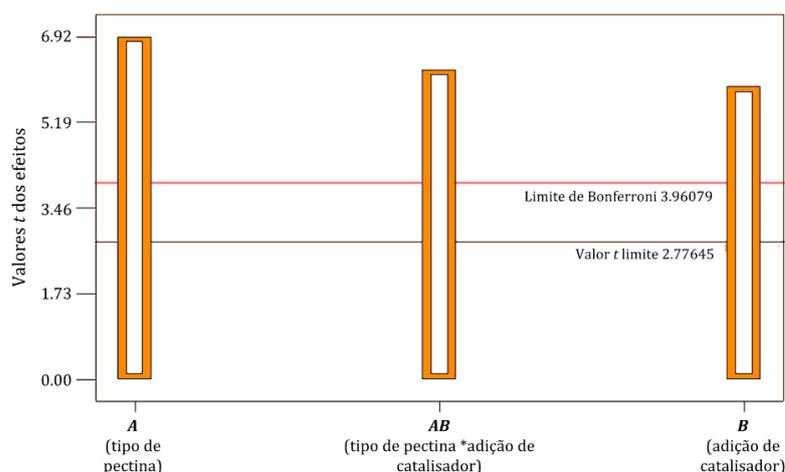


Figura 3.28 Gráfico de Pareto representando o efeito estimado dos factores tipo de pectina, adição de catalisador, e interacção entre eles, sobre o GS das pectinas. Efeitos positivos (laranja).

Ambos os factores afectam positivamente o GS o que significa que, para o factor tipo de pectina, e de acordo com os níveis atribuídos a cada tipo (nível inferior para a Pectina C e nível superior para a pectina A), o uso da pectina A conduz a GS mais elevados relativamente aos obtidos com a pectina C, ou por outras palavras, a pectina A é mais reactiva que a pectina C.

Tabela 3.12 Análise ANOVA para o grau de substituição, obtida a partir do desenho de experiências factorial 2².

Origem da variação	SQ	GL	QM	F	p Prob> F
Modelo	437.94	3	145.98	40.62	0.0019
A: tipo de pectina	172.05	1	172.05	47.88	0.0023
B: adição de catalisador	125.61	1	125.61	34.95	0.0041
AB	140.28	1	140.28	39.03	0.0033
Erro puro	14.37	4	3.59		
Total	452.32	7			

Efeitos significativos: $p < 0.01$.

Esta diferença de reactividade pode ter uma explicação no comportamento que os dois tipos de pectina apresentam no solvente reaccional (DMSO). Embora as duas pectinas se tenham revelado praticamente insolúveis em DMSO, observou-se, no decorrer das reacções, que as partículas de pectina A, quando em suspensão em DMSO, inchavam significativamente, transformando-se numa espécie de gel, e que, pelo contrário, as partículas de pectina C mantinham aproximadamente as suas dimensões originais. Estas observações foram registadas fotograficamente, com a ajuda de um microscópio óptico.

Na Figura 3.29 apresentam-se fotografias de partículas dos dois tipos de pectina, quer secas, quer suspensas em DMSO. Como se pode observar, quando secas as partículas dos dois tipos de pectina apresentam formas e dimensões semelhantes. Contrariamente, quando mergulhadas em DMSO, as partículas de pectina A tornam-se consideravelmente maiores do que as partículas de pectina C, devido a um grau de inchaço superior, o que reflecte a maior afinidade da pectina A para com o DMSO.

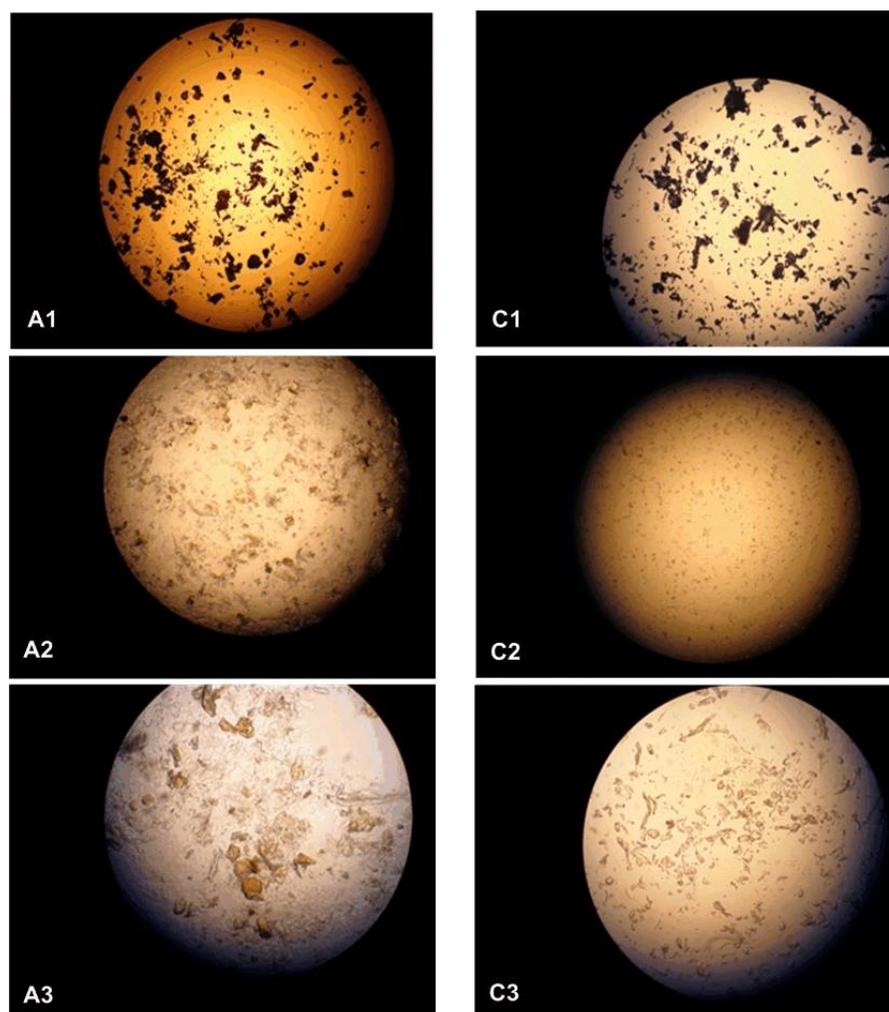


Figura 3.29 Partículas de pectina observadas ao microscópio óptico. A1 e C1: partículas secas de pectina A e pectina C, respectivamente (ampliação 10×). A2 e C2: partículas de pectina A e pectina C suspensas em DMSO (ampliação 10×). A3 e C3: partículas de pectina A e Pectina C suspensas em DMSO (ampliação 40×).

Uma vez que as curvas de distribuição de pesos moleculares da Pectina A e Pectina C são muito parecidas, o comportamento diferenciado que estas apresentam em DMSO deverá ser o resultado de diferenças químicas e estruturais, e não devido às diferenças dos pesos moleculares das duas pectinas. O mais óbvio, e que com certeza contribui para esta diferença de comportamento, é o diferente grau de esterificação. Relembre-se que a Pectina A apresenta um GE de 70% enquanto a pectina C tem um GE de 40%. Outra característica que poderá ser determinante neste comportamento é a quantidade de resíduos de açúcares neutros (presentes nas regiões ramificadas). Embora não seja possível comparar a percentagem de AGla presente nas duas pectinas, pois só foi possível obter esta informação para a Pectina C (ver Tabela 3.3), para a qual a percentagem referida pelo fornecedor é de cerca de

87%, é muito provável que, tendo em conta a composição típica dos extractos comerciais destes dois tipos de pectina (referidos na Tabela 3.1), a quantidade de AGla presente na pectina A seja inferior à presente na Pectina C. Isto significa que a Pectina A terá uma maior percentagem de açúcares neutros, o que, em conjunto com um grau de esterificação mais elevado poderão justificar a maior afinidade para com o solvente DMSO.

Devido ao elevado grau de inchaço das partículas de pectina A no solvente DMSO, os grupos OH desta pectina tornam-se mais acessíveis para reagir com o reagente Al, o que faz com que a extensão de modificação deste tipo de pectina seja superior à obtida com a pectina C, cuja menor acessibilidade aos grupos OH limita a extensão de modificação da mesma.

Por outro lado não se pode excluir que, e para além das questões de acessibilidade os grupos OH, outros factores possam contribuir para uma maior reactividade da pectina A, como por exemplo a hipótese de a reacção se dar preferencialmente nas unidades de AGla metil esterificadas ou nas unidades de açúcares neutros (basicamente L-ramnose, L-arabinose e D-galactose).

Voltando aos resultados do novo desenho de experiências, e analisando agora o outro factor qualitativo (a adição ou não de catalisador), verifica-se que este também tem uma influência positiva significativa no GS, ou seja, a presença do catalisador da reacção resulta em valores maiores de GS.

Este resultado não surpreende pois, e como já foi referido, o catalisador utilizado, o dilaurato de dibutilo de estanho (DBTDL), é conhecido por ser um catalisador muito eficaz na promoção da reacção entre os grupos isocianato e os grupos hidroxilo, sendo este efeito devido sobretudo à minimização da extensão de outras reacções em que os grupos isocianatos se envolvem, nomeadamente à reacção com a água. Pensa-se que o mecanismo da reacção de formação da ligação uretana na presença do DBTDL envolve a formação de um complexo de transição entre este, o isocianato e o grupo hidroxilo. Como o DBTDL activa preferencialmente o grupo hidroxilo, em detrimento da água, devido à maior nucleofilicidade do átomo de oxigénio do grupo hidroxilo, a extensão da reacção entre os isocianatos e a água é reduzida⁸⁶.

Os resultados do desenho de experiências indicam também que o efeito da interacção entre os dois factores é estatisticamente muito significativo,

apresentando uma contribuição positiva no GS obtido. Quando a interacção de dois factores é significativa isto quer dizer que o efeito que um factor apresenta na variável de resposta é dependente do nível a que o outro factor se encontra. Neste caso, ter um efeito significativo na interacção entre o tipo de pectina e a adição ou não de catalisador significa que a adição do catalisador na reacção da pectina A resulta em GS bastante mais elevados, comparativamente com os obtidos quando não é adicionado o catalisador e que, pelo contrário, a adição do catalisador na reacção da pectina C tem um efeito no GS praticamente nulo, comparativamente com os GS obtidos quando não se adiciona o catalisador. Isto pode ser observado graficamente na Figura 3.30, onde se encontra representado o efeito da interacção entre os dois factores.

O facto de esta interacção ser extremamente significativa corrobora a conclusão de que, dentro das condições reaccionais investigadas, a disponibilidade dos grupos OH é o factor limitante da extensão da modificação das pectinas, pois o catalisador só será eficaz a promover a reacção uretana se este tiver acesso, tal como o reagente AI, aos grupos OH. Visto que, pelas razões já expostas, a pectina A apresenta uma maior acessibilidade dos grupos OH, o impacto da presença do catalisador na reacção de modificação com a pectina A será muito mais significativo do que o observado quando este é adicionado à reacção de modificação da pectina C.

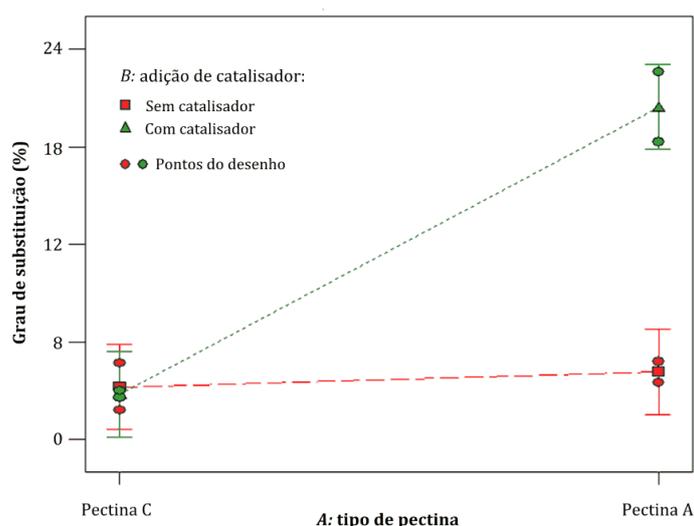


Figura 3.30 Representação gráfica do efeito da interacção entre os dois factores qualitativos investigados no GS das pectinas.

3.5.2 Caracterização dos hidrogéis de pectina modificada e hidrogéis híbridos de pectina modificada e macrómero PEGDA

As pectinas modificadas anteriormente foram depois, em meio aquoso, transformadas em hidrogéis, através de fotoreticulação radicalar dos grupos terminais reactivos (vinílicos ou metacrílicos) (Figura 3.31), um processo análogo à polimerização radicalar de compostos de baixo peso molecular ¹¹².

Este processo requer a utilização de fotoiniciadores. Estes são compostos que, quando expostos a uma luz com um comprimento de onda específico (UV ou visível), geram radicais livres que irão ser responsáveis pelo desencadeamento da reacção de reticulação. Neste trabalho foi utilizado o fotoiniciador Irgacure®2959, pertencente à família química das α -hidroxi-alquilfenonas e à classe de fotoiniciadores do tipo I (fotoiniciadores que sofrem uma fotofragmentação directa)¹¹³. Este fotoiniciador é muito utilizado na preparação de artigos com aplicações biomédicas, como hidrogéis e *scaffolds*, formados a partir de polímeros fotopolimerizáveis. Esta popularidade deve-se, sobretudo, à sua grande biocompatibilidade, já demonstrada para vários tipos de linhas celulares¹¹⁴, e ao facto de este poder ser utilizado em sistemas de base aquosa.

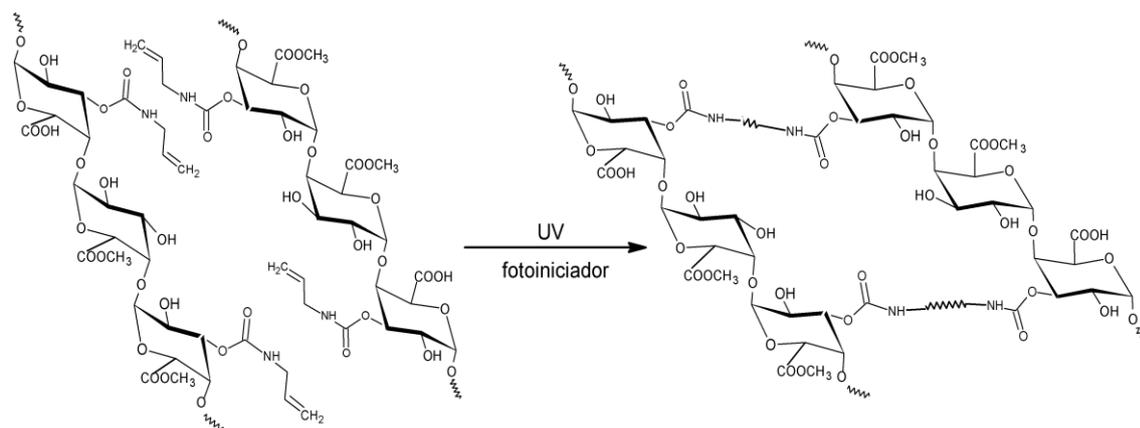


Figura 3.31 Esquema da preparação, por fotoreticulação, dos hidrogéis de pectina modificada com o reagente AI.

Para além da preparação de hidrogéis químicos de pectina prepararam-se ainda hidrogéis híbridos de pectina modificada com o macrómero poli(etileno glicol) diacrilato (PEGDA) (Figura 3.11), em várias proporções mássicas (25/75, 50/50,

75/25 pectina/PEGDA). Para fins comparativos, hidrogéis constituídos apenas por PEGDA foram também preparados

O poli(etileno glicol), PEG, é um polímero sintético não biodegradável com uma excelente biocompatibilidade e hidrofiliçidade. Estas e outras propriedades levaram a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) a aprovar a utilização destes 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*^{84, 115-118}. Os hidrogéis de PEG podem ser formados por vários métodos, sendo o mais comum o utilizado neste trabalho – a fotopolimerização de macrómeros de PEG com grupos terminais acrílicos (PEGDA) ou metacrílicos (PEGDMA)¹¹⁸.

A preparação de hidrogéis híbridos de PEG com vários polímeros de origem natural, nomeadamente polissacarídeos, tem sido também alvo de muita investigação. A conjugação do PEG com este tipo de polímeros permite aumentar a hidrofiliçidade destes sistemas e obter hidrogéis com propriedades mecânicas melhoradas relativamente aos hidrogéis preparados apenas com polissacarídeos. Alguns exemplos de polissacarídeos utilizados incluem o quitosano^{119, 120}, o dextrano¹²¹, o alginato¹²², o sulfato de condroitina¹²³ e o ácido hialurónico¹²⁴.

Hidrogéis híbridos de PEG e de gelatina também já foram preparados^{125, 126}. À semelhança da metodologia seguida neste trabalho, normalmente estes polímeros naturais são previamente funcionalizados, com grupos acrílicos ou metacrílicos, e posteriormente co-reticulados, por fotoreticulação, com os macrómeros PEGDA ou PEGMA.

Por definição, os materiais classificados como hidrogéis possuem a capacidade de absorver e de acomodar na sua estrutura tridimensional grandes quantidades de água e de soluções aquosas. Quando utilizados como sistemas de libertação, a forma como os hidrogéis (não degradáveis) absorvem água (incham), e a extensão com que a absorvem são, conjuntamente com as propriedades físico-químicas dos compostos bioactivos encapsulados e o próprio método de encapsulamento, os factores que determinam a forma como o composto bioactivo é libertado ao longo do tempo.

A forma e a extensão com que um hidrogel absorve água, quando mergulhado num meio aquoso, são determinadas pelas propriedades físico-químicas do polímero, a densidade de reticulação das cadeias poliméricas e a morfologia interna do hidrogel.

Assim, o conhecimento das características de inchaço do hidrogel são o primeiro passo para o entendimento da estrutura tridimensional das cadeias que formam o hidrogel e para perceber se este é ou não capaz de funcionar como um sistema de libertação controlada.

Na Figura 3.32 são apresentados os perfis do grau de inchaço ao longo do tempo de três hidrogéis, obtidos em dois meios aquosos com diferentes valores de pH (2.0 e 7.4). Um dos hidrogéis é composto por pectina A-AI (A-R4, GS= 22.6), e o outro é formado a partir da mistura de pectina A-R4 com o macrómero PEGDA, em proporções mássicas iguais. Por fim, o último hidrogel foi preparado pela fotoreticulação do macrómero PEGDA. Na formação destes três hidrogéis a concentração mássica das soluções precursoras foi fixada em 5% (w/v).

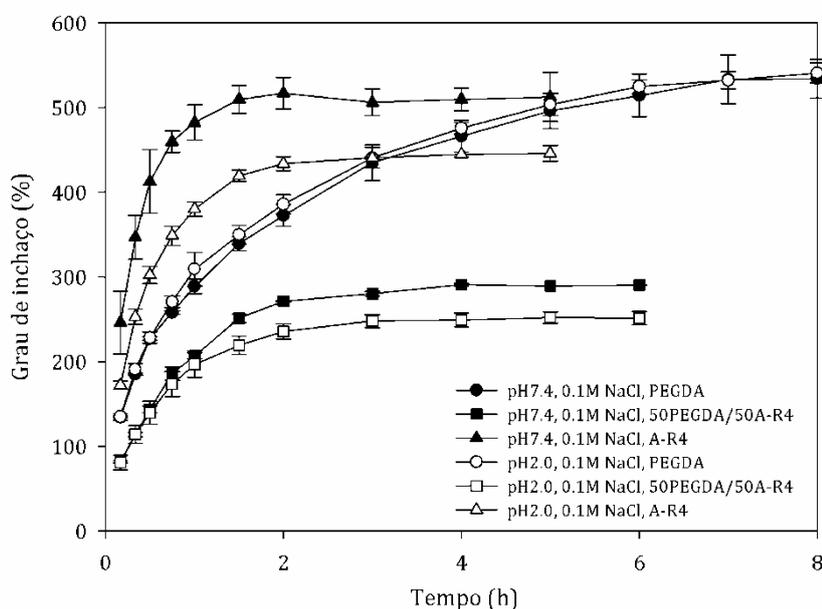


Figura 3.32 Perfis do grau de inchaço ao longo do tempo dos hidrogéis de PEGDA, da pectina modificada A-R4 (GS= 22.6), e do hidrogel híbrido de PEGDA e pectina A-R4 (50PEGDA/50A-R4); média \pm DP, n=3.

Como se pode observar pela Figura 3.32, cada tipo de hidrogel apresenta um comportamento distinto, quer em termos da cinética de absorção de solução tampão quer em termos do grau de inchaço em equilíbrio. Enquanto os hidrogéis A-R4 e

50PEGDA/50A-R4 atingem o grau de inchaço máximo (equilíbrio) passado sensivelmente duas horas, o hidrogel constituído apenas pelo macrómero PEGDA apresenta uma cinética de absorção de solução tampão mais lenta, aumentando de peso durante todas as oito horas investigadas. Relativamente ao grau de inchaço em equilíbrio, observa-se que o hidrogel híbrido apresenta um grau de inchaço consideravelmente inferior (sensivelmente 250%) aos apresentados pelos hidrogéis de pectina A-R4 e PEGDA, que apresentam graus de inchaço cerca de duas vezes maiores (aproximadamente 500%).

Como a pectina possui na sua estrutura grupos ácidos ionizáveis, o hidrogel A-R4 é sensível ao pH, apresentando um grau de inchaço significativamente maior em pH 7.4 (cerca de 500%) do que em pH 2 (cerca de 400%). O pH do meio em que o hidrogel está mergulhado vai determinar o estado dos grupos carboxílicos (se estes se encontram ionizados ou protonados), o que por sua vez vai alterar o grau de inchaço do hidrogel. A pH 7.4, acima do pKa da pectina (situado entre 3.5 e 4.5, segundo Rolin⁴), a totalidade dos grupos carboxílicos presentes no hidrogel encontra-se ionizada. A repulsão electrostática gerada entre estes grupos leva a uma expansão das cadeias do hidrogel, resultando num aumento de absorção de água. Contrariamente, e a pH 2, o efeito da repulsão electrostática não se manifesta pois, ao pH mencionado, praticamente todos os grupos carboxílicos se encontram protonados. Embora, e como se discutiu, os hidrogéis de pectina investigados apresentem sensibilidade ao pH, pode-se dizer que esta sensibilidade não é muito elevada, comparativamente com outros hidrogéis com grupos carboxílicos ionizáveis, como por exemplo hidrogéis sintetizados a partir de monómeros como o ácido acrílico, acrilamida e metacrilamida¹²⁷⁻¹²⁹, onde é possível observar diferenças drásticas do grau de inchaço em função do pH. Esta relativa falta de sensibilidade dos hidrogéis de pectina poderá ter várias causas entre as quais poderão estar a baixa densidade de grupos carboxílicos e a sua distribuição aleatória ao longo das cadeias do polímero. Para além disto, e devido ao elevado peso molecular que este polissacarídeo apresenta, é provável que as cadeias de pectina, para além de reticuladas quimicamente, se encontrem altamente emaranhadas, o que pode contribuir para restringir o efeito da expansão da estrutura do hidrogel devido ao efeito das repulsões electrostáticas geradas entre os grupos carboxílicos ionizados.

Ainda na Figura 3.32, pode-se observar que o grau de inchaço dos hidrogéis de PEGDA não é dependente do pH, uma vez que o PEG não possui grupos ionizáveis. Quanto ao hidrogel híbrido 50PEGDA/50A-R4 este apresenta, a pH 7.4, um grau de inchaço em equilíbrio, ligeiramente superior ao exibido em pH 2.

A forma como um hidrogel absorve água ao longo do tempo pode ser classificada em três categorias, determinadas pelo passo cinético limitante deste processo¹³⁰:

i) Caso I ou difusão Fickiana simples: Ocorre quando taxa de difusão do permeante (água) na matriz polimérica é muito mais lenta que o processo de relaxamento da matriz polimérica, induzido pela absorção de água. Neste caso a cinética de absorção de água segue a primeira lei de Fick.

ii) Caso II ou transporte controlado pelo relaxamento: Ocorre quando a difusão é muito mais rápida do que o processo de relaxamento das cadeias poliméricas. Este processo de relaxamento normalmente envolve uma transição de fase do estado vítreo para o estado amorfo. Esta transição de fase é induzida pela absorção de água: a água actua como plastificante, diminuindo a temperatura de transição vítreo do polímero (T_g). Quando esta temperatura se torna igual à temperatura a que se encontra o sistema, o polímero passa do estado vítreo, onde as cadeias de polímero têm uma mobilidade muito reduzida, para o estado amorfo, onde estas apresentam uma maior mobilidade e uma expansão do volume¹³¹.

iii) Difusão não Fickiana ou anormal: Ocorre quando a taxas de difusão da água e de relaxamento das cadeias poliméricas são comparáveis. Neste caso a absorção de água depende simultaneamente destes dois processos.

A determinação de qual destes mecanismos governa a absorção de água num determinado hidrogel é geralmente feita através do ajuste, à curva de inchaço dinâmico, da equação empírica proposta por Ritger & Peppas^{132, 133}:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Nesta equação, M_t , é o peso do hidrogel inchado num determinado tempo t , M_∞ , o peso do hidrogel inchado em equilíbrio, k , uma constante cinética estrutural/geométrica característica do sistema e, n , o expoente difusional, cujo valor depende do mecanismo de absorção de água. Esta expressão só é válida para

valores de M_t/M_∞ inferiores a 0.6, sendo por isso aplicada apenas aos pontos da curva de inchaço dinâmico que estão dentro deste limite.

Para um sistema com uma geometria plana, como é o caso dos hidrogéis preparados (onde o diâmetro é pelo menos 10 vezes superior à espessura), n assume o valor de 0.5, para o caso da absorção de água seguir o mecanismo da difusão Fickiana, e 1.0, se o mecanismo for do tipo Caso II. Valores de n entre 0.5 e 1 indicam uma difusão não Fickiana ou anormal^{130, 131}.

Analogamente ao descrito anteriormente, a cinética de libertação de compostos bioactivos a partir de um hidrogel não degradável pode também ser classificada de acordo com os mecanismos descritos. Neste caso, o que se encontra em consideração é a mecanismo de libertação do composto bioactivo ao longo do tempo.

Na Tabela 3.13 encontram-se os resultados da aplicação da equação de Ritger-Peppas aos perfis de inchaço dinâmico dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA/50A-R4 e A-R4, representados na Figura 3.32. Como se pode constatar, os valores obtidos para o expoente difusional n são inferiores a 0.5, para os três hidrogéis. Isto significa que nenhum dos mecanismos descritos acima governa a cinética de absorção de água destes hidrogéis. Valores de n inferiores a 0.5 são por vezes relatados na literatura, associados a hidrogéis altamente porosos¹³⁴. De acordo com Ritger & Peppas^{132, 133} valores de n inferiores a 0.5 podem ser obtidos para hidrogéis porosos e com poros de tamanho elevado, em que o inchaço do hidrogel é controlada pela preenchimento desses poros por moléculas de água. Este parece ser o caso dos hidrogéis produzidos, cuja estrutura parece ser altamente porosa.

Tabela 3.13 Resultados do ajuste da equação de Ritger-Peppas às curvas de inchaço dinâmico dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA/A-R4, e A-R4, nos dois meios aquosos investigados.

	pH= 7.4, 0.1M NaCl			pH= 2.0, 0.1M NaCl		
	PEGDA	50PEGDA/ 50A-R4	A-R4	PEGDA	50PEGDA/ 50A-R4	A-R4
n	0.28	0.27	0.36	0.31	0.26	0.35
$k (h^{-n})$	0.615	0.745	1.062	0.635	0.811	0.945
N^*	5	3	3	5	3	3
R_{adj}^2	0.9958	0.9849	0.9987	0.9994	0.9976	0.9967

* Número de pontos ajustados.

Não foi possível investigar o comportamento de inchaço dos hidrogéis de pectina C modificada com o reagente AI pois, devido aos baixos GS obtidos com esta

pectina (Tabela 3.8), os hidrogéis produzidos a partir dos derivados desta revelaram-se demasiado frágeis para serem manipulados. O mesmo se verificou com os hidrogéis produzidos a partir das pectinas A com um menor grau de substituição (A-R1 e A-R2, Tabela 3.8). Assim para investigar se existia alguma diferença de comportamento entre os hidrogéis produzidos com os dois tipos de pectina, determinou-se o grau de inchaço em equilíbrio dos hidrogéis de pectina/PEGDA produzidos com as pectinas A-R1 (GS= 4.8) ou C-R2 (GS= 4.7), com graus de substituição idênticos. Os resultados são apresentados na Figura 3.33. Se compararmos os hidrogéis de pectina A e Pectina C, preparados com as mesmas quantidades de PEGDA, observa-se que não existem diferenças muito significativas, o que indica que o tipo de pectina não é um factor determinante nas propriedades de inchaço dos hidrogéis híbridos obtidos. Se compararmos o grau de inchaço dos hidrogéis híbridos com diferentes proporções de PEGDA com o hidrogel produzido apenas com PEGDA, observa-se uma tendência para o aumento do grau de inchaço com o aumento da proporção de pectina na solução precursora, isto para os dois tipos de pectina. A justificação para este comportamento encontra-se no baixo GS das pectinas utilizadas. Por estas terem na sua estrutura poucos grupos funcionais disponíveis para sofrer reticulação, o aumento da proporção de pectina relativamente ao PEGDA implica uma diminuição da quantidade de grupos insaturados reactivos na solução precursora, originando por isso hidrogéis com uma menor densidade de reticulação, e assim com mais flexibilidade e volume livre para acomodar uma maior quantidade de água na sua estrutura.

O impacto do GS das pectinas no grau de inchaço dos hidrogéis híbridos produzidos pode ser verificado na Figura 3.34, onde se compara o grau de inchaço de dois hidrogéis, produzidos a partir de soluções com as mesmas proporções de pectina e de PEGDA, mas com pectinas com diferentes GS (pectina com elevado GS, A-R4 e pectina com um menor GS, A-R1). Como se pode observar, os hidrogéis produzidos com a pectina com um menor grau de substituição apresentam graus de inchaço consideravelmente mais altos (cerca de cinco vezes maiores).

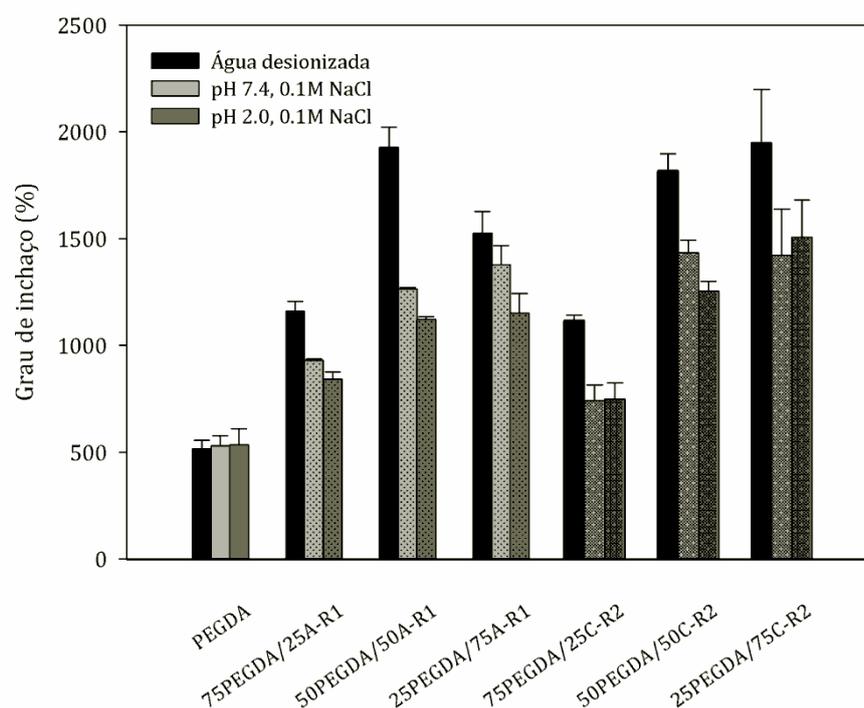


Figura 3.33 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4), e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis: PEGDA; hidrogéis compostos de PEGDA e pectina A-R1 (GS=4.8) em diferentes proporções; hidrogéis compostos de PEGDA e pectina C-R2 (GS=4.7) em diferentes proporções; média \pm DP, n=3.

Relativamente à influência que o meio aquoso tem no grau de inchaço dos hidrogéis, observa-se que os hidrogéis que contêm pectina absorvem uma maior quantidade de água quando mergulhados em água desionizada do que quando mergulhados nas duas soluções tampão, que têm uma força iónica (I) ligeiramente superior a 0.1M. A diminuição do grau de inchaço dos hidrogéis com o aumento da força iónica do meio em que se encontram mergulhados é um fenómeno bem estabelecido na literatura, devendo-se este à pressão osmótica originada devido à diferença de concentração de iões entre o meio no interior do hidrogel e o meio exterior^{121, 127}. Nos hidrogéis com carácter iónico, a diferença do grau de inchaço destes quando mergulhado em água destilada ou quando mergulhados em meios que contêm iões torna-se ainda mais significativa, pois nestes últimos os grupos ionizados presentes no hidrogel estabelecem interações com os iões de carga oposta, reduzindo dessa forma as repulsões electrostáticas entre esses grupos, o que diminuiu o fenómeno de expansão da estrutura polimérica e consequentemente, a absorção de água.

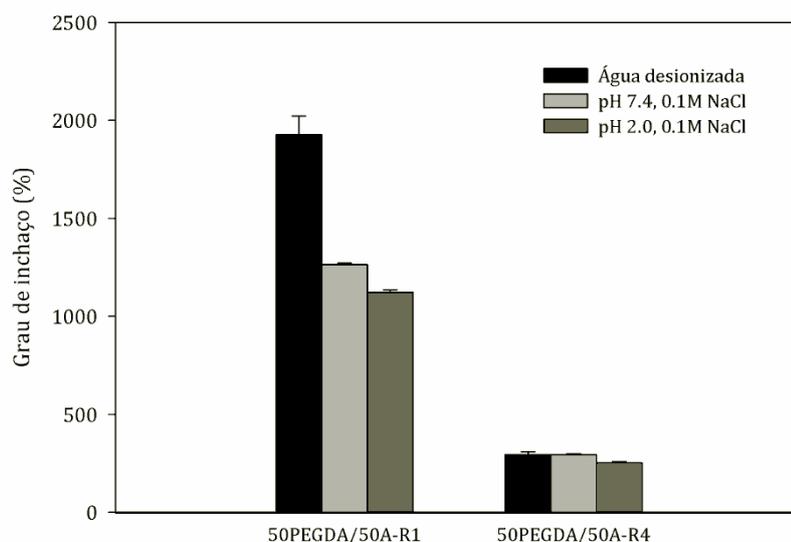


Figura 3.34 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4), e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis produzidos a partir de 50% PEGDA e 50% de pectina A-AI com diferentes graus de substituição: A-R1 (GS= 4.8) e A-R4 (GS= 22.6); média \pm DP, n=3.

A fracção solúvel da pectina A modificada com o reagente IMA foi também utilizada para produzir hidrogéis. Hidrogéis de PEGDA, PEGDA/A-IMA e A-IMA foram produzidos em condições idênticas às utilizadas para produzir os hidrogéis de pectina A e pectina C modificados com o reagente AI (5% (m/v) solução precursora, 2h de reticulação), diminuindo-se apenas a quantidade de fotoiniciador utilizado (de 5%, relativamente à massa dos precursores, para 1%). Este ajuste foi feito de forma a tentar minorar o impacto do fotoiniciador nos compostos bioactivos, durante o encapsulamento destes. Este aspecto será discutido mais adiante.

Para estes hidrogéis determinou-se a fracção de massa extractável (fracção Sol), ou seja, a quantidade de polímero presente no hidrogel que, por não ter sofrido reticulação ou estar fracamente reticulada, é solúvel numa solução aquosa. Para isso, e como se referiu no procedimento experimental, os hidrogéis produzidos foram secos, pesados e só posteriormente mergulhados em água destilada durante alguns dias, de forma a extrair as cadeias poliméricas não reticuladas. Depois deste processo os hidrogéis foram novamente secos e pesados. Através da diferença de peso antes e depois da extracção calculou-se a percentagem de massa do hidrogel susceptível de ser solubilizada. Estes resultados são apresentados na Figura 3.35, para os hidrogéis constituídos apenas pelo macrómero PEGDA, pela pectina

modificada A-IMA, e pela mistura dos dois em diferentes proporções. Como se pode observar, aos hidrogéis constituídos apenas por PEGDA corresponde a menor percentagem de fracção Sol (cerca de 14%), enquanto que os hidrogéis constituídos apenas por pectina A-IMA apresentam a maior fracção Sol (um pouco mais de 50%). Os hidrogéis híbridos de PEGDA/A-IMA apresentam fracções Sol intermédias, que aumentam com o aumento da proporção de pectina A-IMA na solução precursora.

No mesmo gráfico da Figura 3.35 encontra-se representado o número teórico de grupos reactivos, acrílicos e metacrílicos, presentes por cada grama de polímero precursor (ou mistura de polímeros precursores) dos diferentes hidrogéis. Como se pode ver, a uma diminuição do número de grupos reactivos corresponde um aumento da fracção Sol do hidrogel. Este resultado é lógico pois a diminuição dos grupos insaturados disponíveis implica uma menor densidade de reticulação, ou seja, uma estrutura tridimensional menos coesa e com um maior número de cadeias poliméricas “soltas”.

As elevadas fracções Sol obtidas, nomeadamente nos hidrogéis com pectina A-IMA, derivam também da baixa concentração das soluções precursoras dos hidrogéis (5% m/v). Uma baixa concentração da solução precursora implica uma baixa concentração de grupos reactivos e por isso uma maior dificuldade para os grupos insaturados pendentes das várias cadeias se “encontrarem” e reagirem. Assim, é provável que nem todos os grupos reactivos disponíveis estejam envolvidos em reacções de reticulação. Adicionalmente, e nos hidrogéis com pectina, e considerando o elevado peso molecular deste polímero e a baixa concentração de grupos funcionais, é também muito provável que alguns grupos reactivos se envolvam em ligações intramoleculares (reticulações entre grupos funcionais presentes numa mesma cadeia).

Infelizmente não foi possível preparar soluções precursoras de pectina superiores a 5% (m/v) pois este polímero, devido ao seu elevado peso molecular, origina soluções com elevada viscosidade. Assim, optou-se por fixar em 5% a concentração de todas as soluções precursoras dos diferentes hidrogéis, de forma a poder, no final, estabelecer uma relação entre as propriedades obtidas e as diferenças de composição das soluções precursoras.

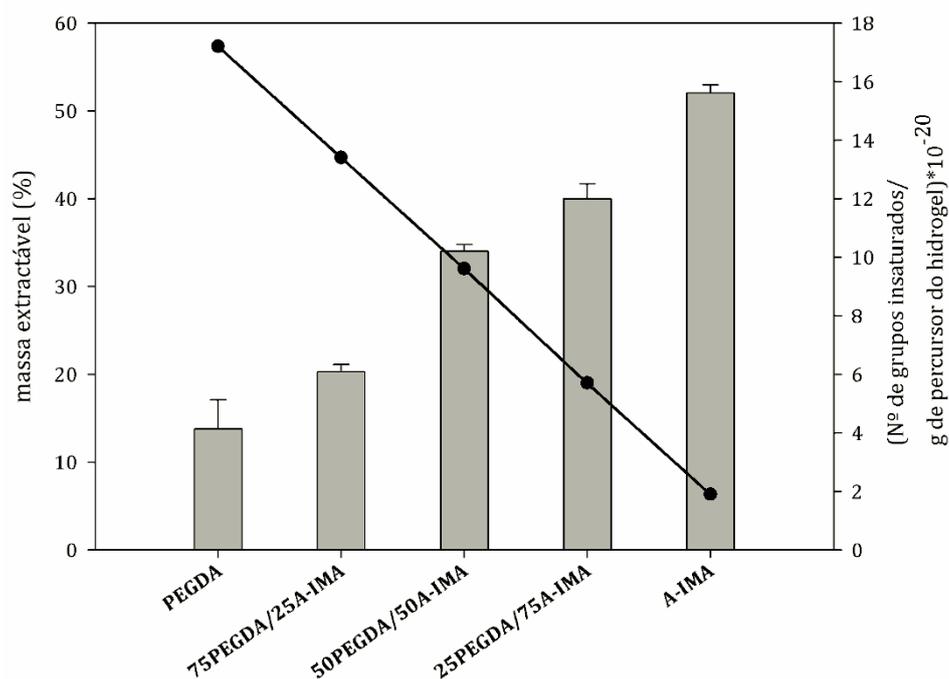


Figura 3.35 Percentagem mássica de polímero solúvel presente nos hidrogéis de PEGDA, A-IMA, e PEGDA/A-IMA em várias proporções. Comparação com a quantidade de grupos insaturados (acrílicos e metacrílicos) presentes nas soluções precursoras; média \pm DP, n=4.

Na Figura 3.36 pode-se observar os graus de inchaço em equilíbrio dos hidrogéis preparados com várias proporções da pectina A-IMA e PEGDA e dos hidrogéis preparados apenas com PEGDA ou apenas com pectina A-IMA. Como se pode ver os hidrogéis preparados apenas com o macrómero PEGDA ou a pectina modificada A-IMA apresentam um grau de inchaço mais elevado comparativamente com os hidrogéis híbridos. Relativamente aos hidrogéis de PEGDA (preparados com 1% de fotoiniciador), estes apresentam graus de inchaço superiores aos obtidos pelos hidrogéis de PEGDA sintetizados com 5% de fotoiniciador e cujos graus de inchaço foram comparados anteriormente com os hidrogéis produzidos com pectina A e pectina C modificadas com o reagente AI. Esta diferença pode ser observada na Figura 3.37. Estes resultados indicam que a concentração de fotoiniciador na solução precursora afecta as propriedades dos hidrogéis obtidos, pelo menos para os hidrogéis produzidos com o macrómero PEGDA.

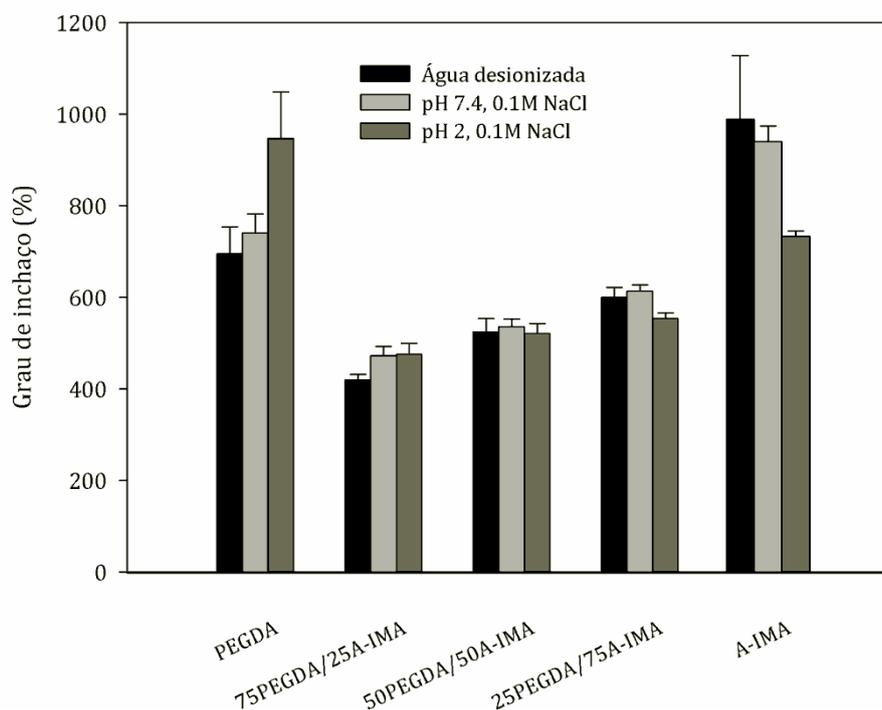


Figura 3.36 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina acidificada (pH 2.0), dos hidrogéis: PEGDA, 75PEGDA/25A-IMA, 50PEGDA/50A-IMA, 25PEGDA/75A-IMA e A-IMA (GS= 6.1); média \pm DP, n=3.

Relativamente aos hidrogéis híbridos, o grau de inchaço destes aumenta com o aumento da proporção de pectina A-IMA na solução precursora, tal como acontecia para os hidrogéis híbridos de pectina A e pectina C modificados com o reagente AI. No entanto, os hidrogéis híbridos com pectina A-IMA apresentam graus de inchaço mais reduzidos comparativamente com os hidrogéis híbridos produzidos com a pectina A-R1, embora os GS dos dois derivados não sejam muito diferentes (6.1 para a pectina A-IMA e 4.8 para a pectina A-R1). Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças químicas dos dois reagentes utilizados para modificar a pectina A (Figura 3.10): enquanto a pectina A modificada com o reagente AI está funcionalizada com grupos vinílicos, a pectina A-IMA apresenta grupos funcionais metacrílicos. Possivelmente estes grupos apresentam reactividades diferentes para com os grupos funcionais do macrómero PEGDA (grupos acrílicos). Se isto se verificar, o padrão de reticulação nos hidrogéis híbridos produzidos será forçosamente diferente, o que se reflectirá nas propriedades exibidas por estes.

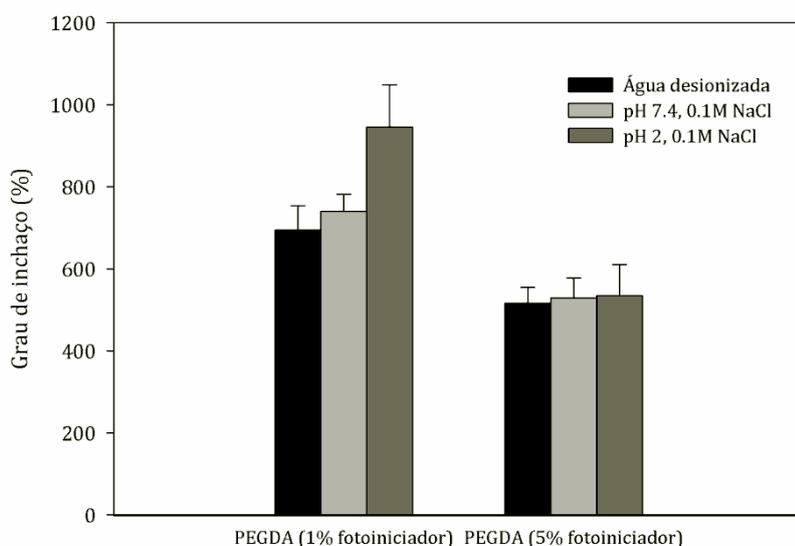


Figura 3.37 Grau de inchaço de equilíbrio, em água desionizada, solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina acidificada (pH 2.0), de dois hidrogéis PEGDA formados na presença de diferentes quantidades do fotoiniciador Irgacure®2959; média \pm DP, n=3.

Na Figura 3.38 é possível observar o aspecto dos hidrogéis A-IMA, 50A-IMA/50PEGDA e PEGDA, imediatamente depois de formados e depois de terem sido secos numa estufa de vácuo.

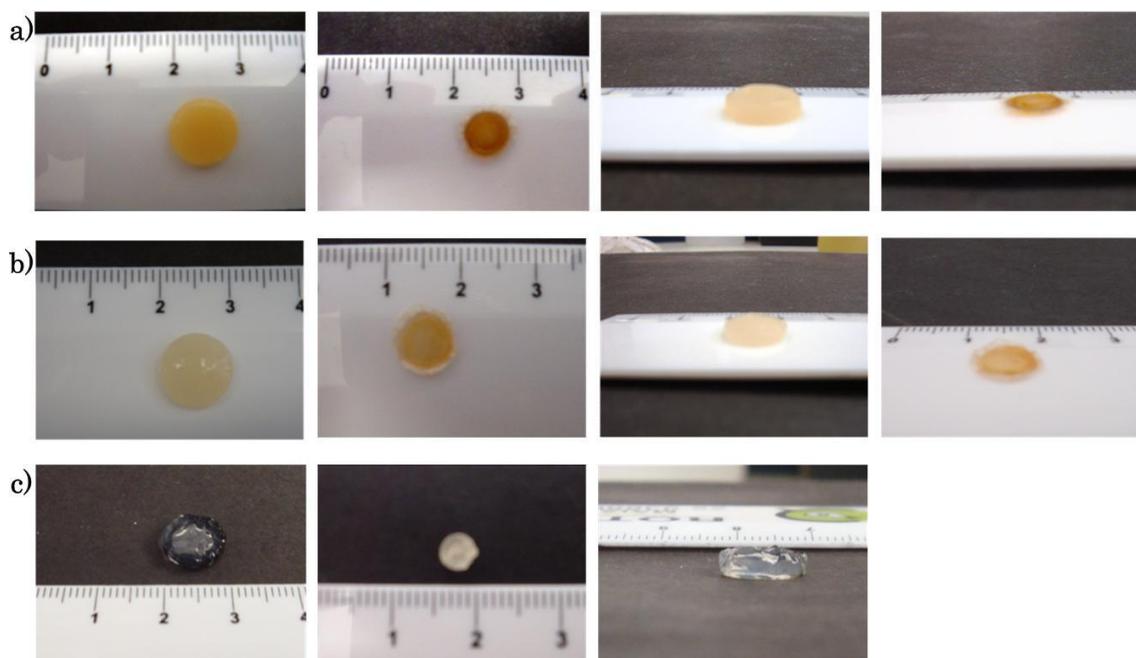


Figura 3.38 Fotografias dos hidrogéis preparados por fotoreticulação. a) A-IMA; b) 50A-IMA/50PEGDA; c) PEGDA. Da esquerda para a direita: vista superior dos hidrogéis acabados de formar; vista superior dos hidrogéis secos; vista lateral dos hidrogéis acabados de formar; vista lateral dos hidrogéis secos.

Como se pode ver pelas fotografias, os hidrogéis pectina A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA são opacos e com uma cor amarelada, enquanto os hidrogéis de PEGDA são translúcidos.

Como os hidrogéis são formados na presença de uma grande quantidade de água, devido à baixa concentração da solução precursora (5% m/v), estes sofrem uma grande deformação durante o processo de secagem, sendo que os hidrogéis A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA assumem uma forma distinta da dos hidrogéis de PEGDA. Enquanto a estrutura dos hidrogéis de A-IMA e 50A-IMA/50 PEGDA (e dos outros hidrogéis híbridos com diferentes proporções dos dois precursores, cujas imagens não são mostradas) colapsa durante a secagem, originando discos com uma espessura fina e um diâmetro semelhante ao exibido pelos hidrogéis antes de secos, os hidrogéis de PEGDA, por terem uma grande elasticidade, “encolhem” nas duas dimensões (espessura e diâmetro) à medida que a água evapora.

A morfologia destes hidrogéis, depois de rehidratados, foi observada por microscopia electrónica de varrimento – *scanning electronic microscopy* (SEM). Para preservar a morfologia dos hidrogéis no estado hidratado estes foram congelados e a água removida por liofilização. As imagens de SEM da superfície dos hidrogéis A-IMA, 75A-IMA/25PEGDA, 50A-IMA/50PEGDA, 25A-IMA/75PEGDA e PEGDA podem ser observadas na Figura 3.39. Como se pode observar, as superfícies de todos os hidrogéis são irregulares e apresentam grandes fissuras. Relativamente à morfologia do hidrogel PEGDA, esta não será a exibida quando este está hidratado pois, durante o processo de liofilização, verificou-se o colapso da estrutura deste hidrogel. Daí a estrutura completamente fracturada que as imagens de SEM evidenciam. Nas imagens do hidrogel A-IMA (Figura 3.39a) é possível observar uma série de estruturas filamentosas sobre a superfície deste, e um emaranhado desses filamentos situado entre uma larga fissura. Este tipo de estruturas foi observado nos hidrogéis de A-IMA e, em menor extensão, nos hidrogéis híbridos (Figura 3.39b, c e d), mas não nos hidrogéis de PEGDA. Isto conduz à conclusão que estes filamentos são provavelmente fragmentos de pectina não reticulada, que podem ser extraídos da estrutura tridimensional que constitui o hidrogel. A observação de uma grande quantidade destas estruturas à superfície dos hidrogéis compostos apenas por pectina A-IMA, coaduna-se com a elevada fracção de extractáveis obtida para este hidrogel (Figura 3.35).

A estrutura interna dos hidrogéis A-IMA e PEGDA pode ser observada na Figura 3.40. Como se pode ver, o hidrogel A-IMA apresenta uma enorme quantidade de poros de enormes dimensões. Novamente, é possível detectar as estruturas filamentosas observadas à superfície do hidrogel. Uma morfologia semelhante, embora ainda mais irregular, foi observada para os hidrogéis híbridos de pectina A-IMA/PEGDA.

Quanto ao hidrogel PEGDA, e por este estar colapsado, não se observa nenhuma estrutura porosa mas sim uma estrutura fracturada semelhante à morfologia exibida pela superfície deste hidrogel.

Uma das causas para obtenção de hidrogéis A-IMA e hidrogéis híbridos com estas estruturas irregulares deverá ser, como já se referiu, a presença de grandes quantidades de água durante a formação dos hidrogéis. A evaporação desta água durante o processo de secagem, particularmente num meio com pressão reduzida, como aconteceu com estes hidrogéis, parece ser o processo responsável pela determinação das morfologias obtidas.

Embora não se tenha procedido à análise por SEM dos hidrogéis preparados com as pectinas A e C modificadas com o reagente AI, é razoável admitir que a morfologia destes hidrogéis não seja muito diferente das observadas para os hidrogéis A-IMA, considerando que todos os hidrogéis foram formados em condições idênticas. Ou seja, é provável que os hidrogéis com pectina A-AI e pectina C-AI apresentem uma estrutura altamente porosa, o que justificaria os valores obtidos para o expoente difusional n da equação de Ritger-Peppas, quando esta equação foi aplicada aos perfis de absorção de água dos hidrogéis A-R4 e hidrogéis 50PEGDA/A-R4 (Tabela 3.13).

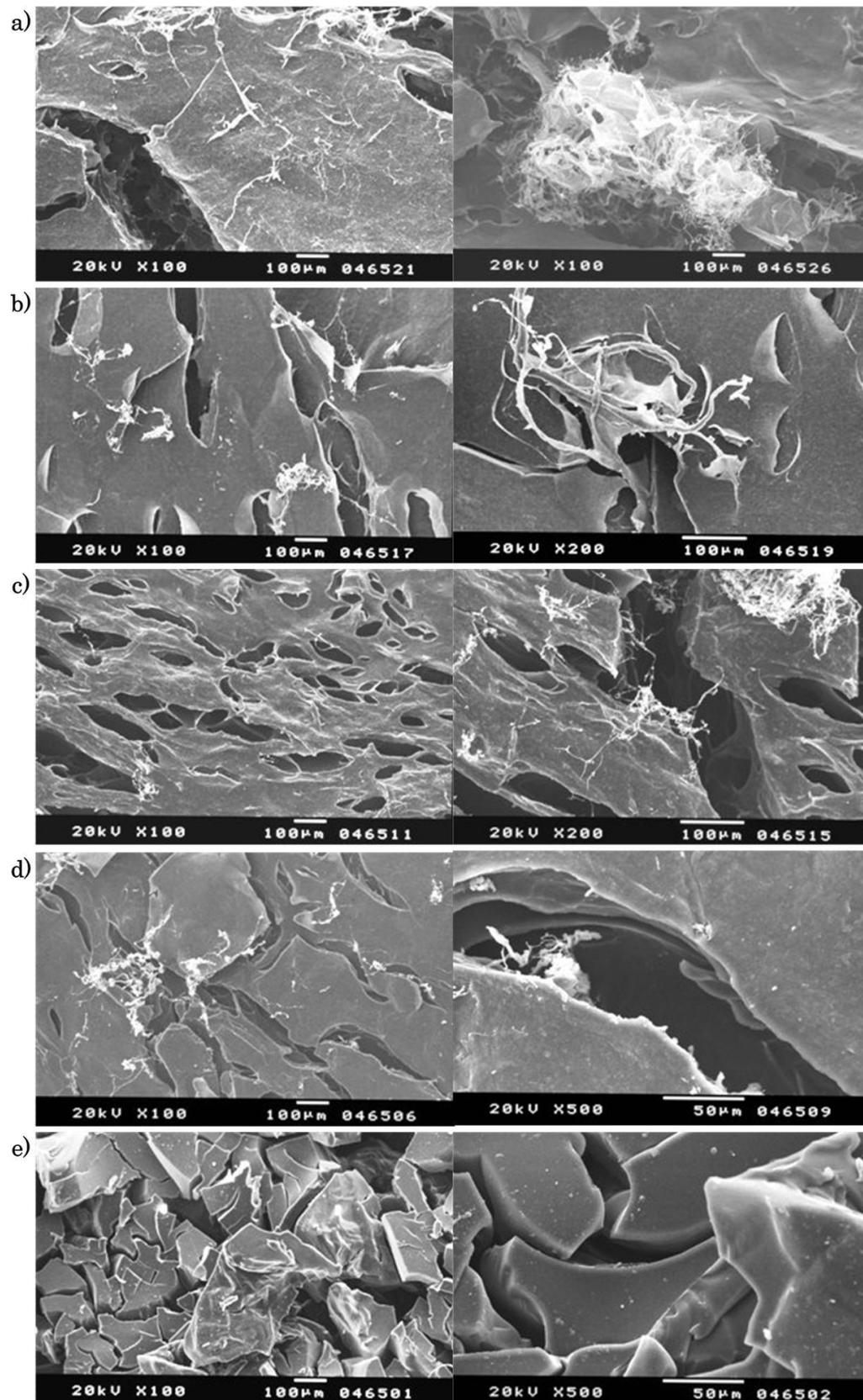


Figura 3.39 Imagens de microscopia electrónica de varrimento da superfície dos hidrogéis: a) A-IMA; b) 75A-IMA/25PEGDA; c) 50A-IMA/50PEGDA; d) 25A-IMA/75PEGDA; e) PEGDA.

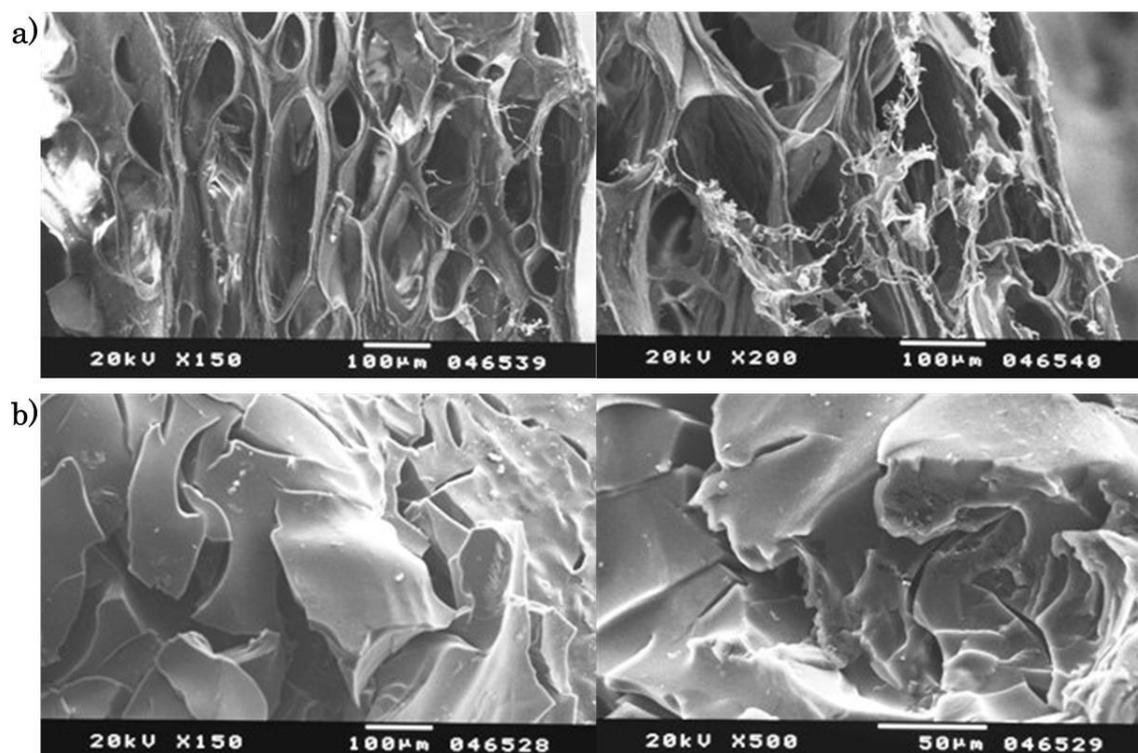


Figura 3.40. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de uma secção transversal dos hidrogéis: a) A-IMA; b) PEGDA.

3.5.3 Libertação *in vitro* de fármacos e proteínas modelo.

As propriedades dos hidrogéis PEGDA, A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA, enquanto sistemas de libertação controlada de compostos bioactivos, foram investigadas através de estudos de libertação *in vitro*. Com este objectivo, foram preparados hidrogéis com vários tipos de compostos bioactivos incorporados: dois fármacos hidrofílicos de baixo peso molecular - o anti-inflamatório não-esteróide flurbiprofeno sódico e o antibiótico sulfato de gentamicina (Figuras 3.12 e 3.13), bem como duas proteínas modelos - a lisozima e a albumina de soro bovino, BSA (Tabela 3.4). Estes compostos foram dissolvidos nas soluções precursoras dos hidrogéis numa quantidade equivalente a 10% da massa dos polímeros. As soluções precursoras com os fármacos dissolvidos foram fotopolimerizadas nas condições mencionadas na secção 3.4.3.6, originando assim hidrogéis com os compostos bioactivos imobilizados por oclusão.

Nas Figuras 3.41 e 3.42 encontram-se os perfis de libertação *in vitro*, em solução salina tampão fosfato (pH= 7.4; 0.01M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 0.137M NaCl; 0.0027M KCl; I= 0.16M), do flurbiprofeno sódico e do sulfato de gentamicina, respectivamente. A massa de fármaco libertada ao longo do tempo encontra-se representada em termos da fracção mássica libertada acumulada, tendo-se considerado, para efeitos de cálculos, que a massa total de fármaco presente no hidrogel corresponde a 10% da massa do hidrogel seco.

Para os três de hidrogéis investigados (PEGDA, 50PEGDA/50A-IMA, A-IMA) observa-se uma libertação rápida de ambos os fármacos. Em todos os hidrogéis, e para os dois fármacos investigados, verifica-se que em cerca de duas horas se liberta mais de 80% do fármaco, sendo que a libertação total é atingida, no máximo, passado quatro horas do início do ensaio. Este comportamento não é de todo inesperado, visto que os três hidrogéis apresentam graus de inchaço bastante elevados o que, aliado ao baixo peso molecular dos fármacos e à sua hidrofiliidade, resulta na rápida difusão das moléculas de fármacos por entre a matriz polimérica do hidrogel até ao meio exterior de libertação.

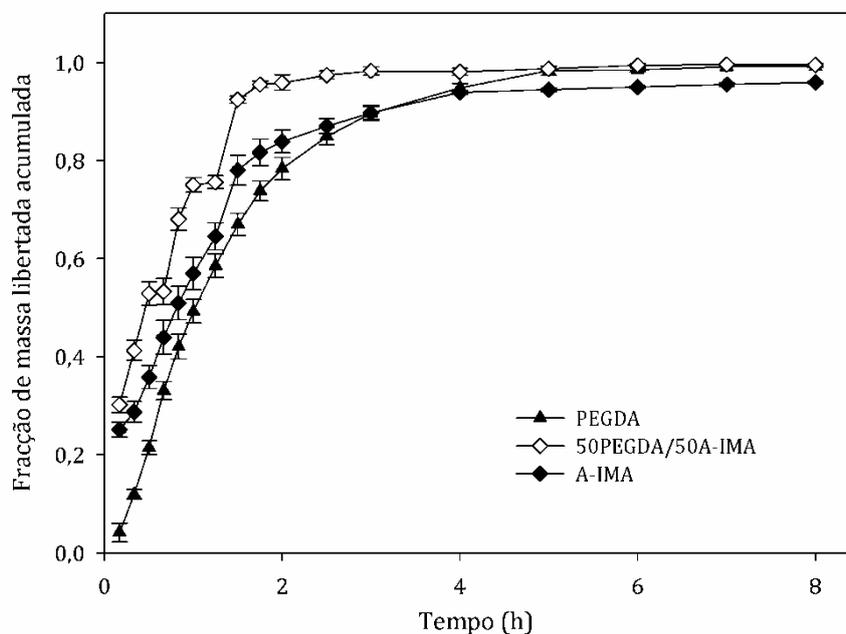


Figura 3.41 Curvas da libertação *in vitro* do flurbiprofeno sódico, a partir dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA /50A-IMA e A-IMA, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 7.4); média \pm DP, n=3.

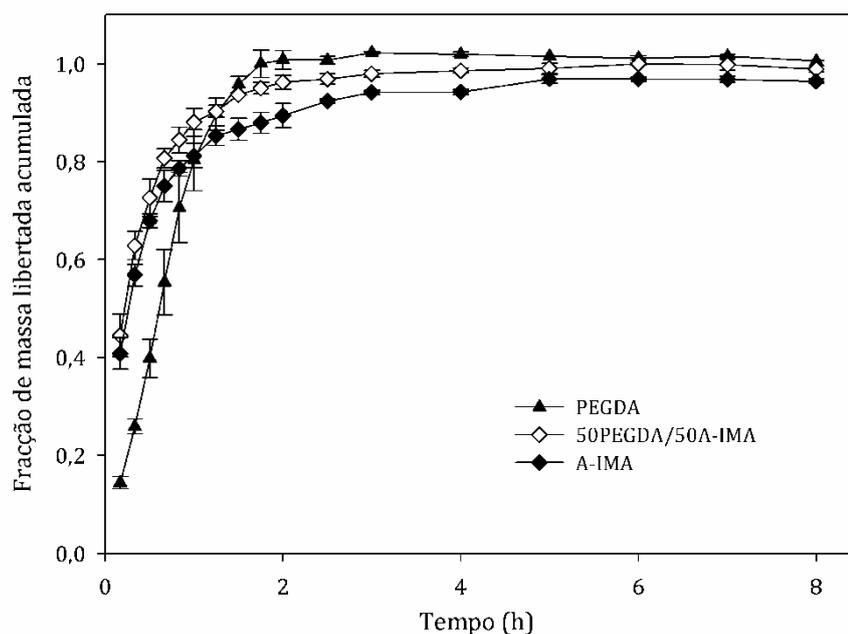


Figura 3.42 Curvas da libertação *in vitro* do sulfato de gentamicina, a partir dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA /50A-IMA e A-IMA, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 7.4); média \pm DP, n=3.

Nos perfis de libertação dos dois fármacos a partir dos hidrogéis A-IMA e 50A-IMA/50PEGA verifica-se o fenómeno de *burst release* – a libertação de uma percentagem significativa do fármaco encapsulado nos instantes seguintes ao sistema de libertação controlada ter sido mergulhado no meio de libertação. Neste caso, verifica-se que a percentagem de fármaco libertada nos primeiros 10 minutos, a partir dos hidrogéis A-IMA e 50A-IMA/50PEGA, é de cerca de 25 a 30%, para o flurbiprofeno sódico e cerca de 40 a 45% para o sulfato de gentamicina. Estas percentagens são bastante altas comparativamente às obtidas para os hidrogéis PEGDA (cerca de 4% para o flurbiprofeno sódico e 14% para o sulfato de gentamicina). O fenómeno de *burst release* é frequentemente observado em vários tipos de sistemas de libertação controlada formados por polímeros hidrofílicos ou hidrofóbicos ¹³⁵. Algumas das causas que podem explicar a ocorrência deste fenómeno em sistemas do tipo matriciais capazes de absorver uma quantidade significativa de água (hidrogéis) são, segundo Huang & Brazel¹³⁵: a migração dos compostos activos para a superfície dos hidrogéis durante o processo de secagem, o que origina uma distribuição heterogénea deste ao longo da matriz do hidrogel e com uma concentração mais elevada à superfície; a morfologia heterogénea e

estrutura porosa; as propriedades físico-químicas dos agentes bioactivos encapsulados. Considerando a morfologia dos hidrogéis de pectina A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA, discutida anteriormente, é muito provável que esta seja a principal causa do fenómeno de *burst release* observado na libertação a partir destes hidrogéis. Como são porosos e com a superfície fracturada, o meio em que se dá a libertação rapidamente preenche estes poros e dissolve o fármaco que se encontra à superfície destes. As moléculas de fármaco, uma vez dissolvidas nesse meio, rapidamente se difundirão pelos poros e fracturas até ao meio exterior. A restante quantidade de fármaco, que se encontra não à superfície dos poros mas sim aprisionada na parte não porosa da matriz polimérica, libertá-se-á depois de forma controlada, forma essa que será determinada pelo processo de absorção de água e pelo relaxamento das cadeias poliméricas e/ou pela taxa de difusão das moléculas de fármaco por entre essas mesmas cadeias.

Por detrás da escolha destes dois fármacos em particular encontram-se as propriedades físico-químicas destes. Ambos os fármacos têm carácter iónico, sendo que o flurbiprofeno sódico apresenta grupos carboxílicos, tendo por isso um carácter aniónico, enquanto o sulfato de gentamicina apresenta um carácter catiónico, conferido pelos grupos amina presentes na sua estrutura.

Como os hidrogéis compostos por pectina têm, eles próprios, um carácter aniónico, teoricamente as moléculas destes fármacos quando encapsuladas nestes hidrogéis estabelecem interacções de natureza iónica com a matriz polimérica, de natureza repulsiva, no caso do flurbiprofeno sódico, onde tanto o polímero como o fármaco apresentam um carácter aniónico, ou de natureza atractiva, no caso do sulfato de gentamicina, onde fármaco e polímero têm caracteres iónicos de natureza oposta.

Ao realizar-se a libertação *in vitro* destes dois fármacos tentou-se perceber de que forma estas interacções entre fármaco e polímero afectariam os perfis de libertação dos fármacos. Ao pH do meio de libertação, 7.4, os grupos carboxílicos presentes na pectina encontram-se totalmente ionizados. Para o flurbiprofeno sódico seria de esperar que, devido às forças repulsivas geradas entre o fármaco e a matriz de pectina, o fármaco libertar-se-ia mais rapidamente dos hidrogéis que tivessem pectina (A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA) na sua composição do que do hidrogel onde não se verificassem essas interacções entre fármaco e polímero (isto

é, o hidrogel PEGDA, composto por um polímero neutro). Realmente parece que a cinética de libertação do flurbiprofeno (e ignorando o *burst release*) é ligeiramente mais rápida nos hidrogéis com pectina do que no hidrogel com somente PEGDA. No entanto devido às diferentes morfologias dos hidrogéis, que afectam os perfis de libertação, não se pode atribuir esta observação somente à natureza repulsiva das interacções que se estabelecem entre a matriz polimérica do hidrogel e fármaco encapsulado. O mesmo se pode dizer para os perfis de libertação do sulfato de gentamicina, onde se esperaria que as interacções atractivas entre polímero e fármaco retardassem a libertação deste último nos hidrogéis com pectina. Nos perfis de libertação do sulfato de gentamicina (Figura 3.42) observa-se uma intersecção das curvas de libertação dos três hidrogéis: enquanto a taxa de libertação da gentamicina dos hidrogéis PEGDA parece manter-se constante durante quase todo o processo de libertação, nos hidrogéis A-IMA e 50A-IMA/50PEGDA verifica-se que existe um abrandamento da taxa de libertação a partir de cerca de 80% de fármaco libertado. Este abrandamento pode ter como causa as forças atractivas iónicas estabelecidas entre as restantes moléculas de fármaco e o polímero. Estas interacções não são suficientemente estáveis ou fortes para reter o fármaco infinitamente no interior da matriz polimérica. A libertação destas moléculas de fármaco acontecerá gradualmente à medida que as interacções iónicas entre fármaco e polímero vão sendo desmanteladas devido à acção dos contra-íões presentes em solução (nomeadamente Na^+ e Cl^-).

Analogamente ao realizado com os perfis de inchaço dinâmico, a equação empírica de Rigter-Peppas foi ajustada aos perfis de libertação dos fármacos. Neste caso, a fracção M_t/M_∞ corresponde à fracção de massa acumulada libertada no tempo t , representada em função do tempo nas Figuras 3.41 e 3.42. O ajuste da equação foi feita para os pontos das curvas de libertação com valores M_t/M_∞ sensivelmente inferiores a 0.6. Os resultados das regressões não lineares são apresentados na Tabela 3.14, para as curvas de libertação dos dois fármacos.

Para os hidrogéis PEGDA, o expoente difusional n , para os dois fármacos, assume o valor de 1.0. Este valor indica, para a geometria do hidrogel sobre investigação, que a libertação dos dois fármacos é controlada pelo relaxamento e inchaço da matriz polimérica (Caso II ou transporte controlado pelo relaxamento),

ou seja, o processo de libertação dos fármacos é limitado pelo inchaço do hidrogel ao longo do tempo e não pela taxa de difusão do fármaco.

Tabela 3.14 Resultados do ajuste da equação de Ritger-Peppas às curvas de libertação *in vitro*, numa solução salina tampão fosfato (pH= 7.4), dos fármacos flurbiprofeno sódico e sulfato de gentamicina.

	Flurbiprofeno Sódico			Sulfato de Gentamicina		
	PEGDA	50PEGDA/ 50A-IMA	A-IMA	PEGDA	50PEGDA/ 50A-IMA	A-IMA
<i>n</i>	1.01	0.48	0.55	1.00	0.42	0.40
<i>k</i> (h ⁻ⁿ)	0.465	0.709	0.562	0.820	0.966	0.869
<i>N</i> *	8	7	7	6	4	5
<i>R</i> _{adj} ²	0.9801	0.9546	0.9723	0.9952	0.9885	0.9812

* Número de pontos ajustados.

Comparando os perfis de libertação do flurbiprofeno sódico (Figura 3.41) e do sulfato de gentamicina (Figura 3.42) nos hidrogéis PEGDA com o perfil de inchaço dinâmico do mesmo hidrogel (Figura 3.32), verifica-se que a cinética de inchaço deste hidrogel é muito mais lenta que a cinética de libertação dos fármacos, logo o mecanismo limitante do processo de libertação é o inchaço do hidrogel, tal como os expoentes difusionais obtidos indicam.

Os expoentes difusionais para os hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA e A-IMA são próximos de 0.5, no caso da libertação do flurbiprofeno sódico, indicando um mecanismo de libertação controlado pela difusão do fármaco (Caso I ou difusão Fickiana simples). No caso da libertação do sulfato de gentamicina, os expoentes difusionais assumem valores inferiores a 0.5 (cerca de 0.4), indicando que neste caso a estrutura porosa dos hidrogéis afecta a cinética de libertação do fármaco.

Na Figura 3.43 encontram-se representados os perfis de libertação da proteína lisozima a partir dos hidrogéis PEGDA, 50PEGDA/50A-IMA e A-IMA, em dois meios de libertação: numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e numa solução salina tampão acidificada (pH 2.0). Observa-se um comportamento semelhante para todos os perfis de libertação: o fenómeno de *burst release* (cuja extensão varia muito conforme a natureza do hidrogel), seguido de um período de cerca de oito horas de libertação a uma taxa constante. A partir de 1 dia de libertação praticamente nenhuma proteína é libertada. Em todos os casos verifica-se que a libertação é incompleta, ou seja, existe uma fracção de proteína que permanece no interior dos hidrogéis.

Nos hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA verifica-se que cerca de metade da proteína presente no hidrogel é libertada nas primeiras duas horas de ensaio (41.2% na solução salina tampão fosfato e 51.1% na solução salina acidificada). Para os hidrogéis A-IMA e PEGDA o fenómeno de *burst release* é mais limitado. Nos hidrogéis A-IMA verifica-se a libertação, nas primeiras duas horas, de 11% e 30% da proteína, em solução tampão fosfato e em solução salina acidificada, respectivamente. Nos hidrogéis de PEGDA, 23% da proteína é libertada nas duas primeiras horas em solução salina tampão fosfato, e 6.5% em solução salina acidificada.

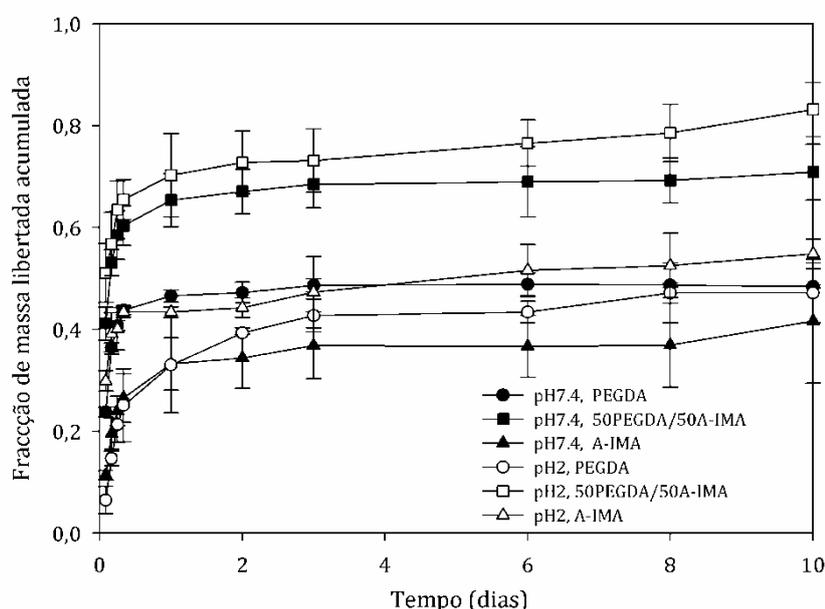


Figura 3.43 Curvas da libertação *in vitro* da proteína lisozima: em solução salina tampão fosfato, pH= 7.4 (símbolos a negro); em solução salina tampão acidificada, pH= 2 (símbolos sem preenchimento); média \pm DP, n=3.

A grande extensão do fenómeno de *burst release* observada nos hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA pode ser uma consequência das interações iónicas que se estabelecem entre proteína e pectina na solução precursora do hidrogel. O ponto isoelétrico da lisozima é notavelmente elevado (cerca de 11.1, Tabela 3.4), o que significa que, em água destilada, a lisozima apresenta carga positiva. Por sua vez, em água destilada a pectina apresenta carga negativa. Assim é provável que quando em solução, as moléculas de pectina e lisozima complexem entre si. Na presença do macrómero PEGDA é possível que surja uma separação de fases com um aparecimento de uma fase rica em PEGDA e outra rica em pectina e lisozima. A

fotoreticulação dos precursores nestas condições originará um hidrogel compósito, com domínios ricos em PEGDA reticulado e pobres em pectina e lisozima e outros domínios ricos em pectina e lisozima e pobres em PEGDA. Também devido à formação destes complexos, muitos dos grupos reactivos presentes na pectina podem encontrar-se inacessíveis para reagirem entre si, o que resultará numa fraca reticulação das cadeias de pectina. Nestas condições, os domínios do hidrogel fracamente reticulados, e ricos em pectina e lisozima, facilmente se dissolverão quando mergulhados no meio de libertação, originando a libertação de uma grande quantidade de enzima nos primeiros tempos do ensaio de libertação.

A libertação incompleta dos compostos bioactivos encapsulados, nomeadamente proteínas, é frequentemente assinalada na literatura, especialmente na situação em que estas se encontram presentes durante o processo de formação do hidrogel por reticulação radicalar.

Embora o processo de formação de hidrogéis através de fotoreticulação radicalar induzida por luz UV tenha inúmeras vantagens, e seja por isso mesmo comumente utilizado na produção de hidrogéis para aplicações biomédicas, este processo implica a formação de radicais livres extremamente reactivos que, para além de iniciarem as reacções de reticulação (ao atacarem as ligações C=C dos grupos terminais vinílicos ou metacrílicos, por exemplo) podem também reagir com os resíduos de aminoácidos das proteínas, originando alterações químicas e estruturais nas proteínas e a formação de ligações covalentes entre proteína e matriz polimérica. Assim, estas reacções entre radicais livres e proteína são responsáveis não apenas pela diminuição da biodisponibilidade da proteína encapsulada mas também pela diminuição da sua bioactividade, visto que esta se encontra intimamente relacionada com a estrutura tridimensional da proteína.

Vários autores investigaram o impacto que a geração de radicais livres tem na biodisponibilidade e bioactividade de várias proteínas encapsuladas em hidrogéis produzidos por fotoreticulação radicalar^{136, 137}.

Lin & Metters¹³⁶ investigaram a biodisponibilidade e bioactividade da lisozima quando encapsulada em hidrogéis preparados a partir da fotoreticulação de soluções do macrómero PEGMA (poli(etilenoglicol monoacrilato), PM ~3000) na presença do fotoiniciador Irgacure®2959, um sistema semelhante ao utilizado neste trabalho para encapsular a lisozima nos hidrogéis PEGDA.

A fracção de proteína libertada e a sua bioactividade foi analisada para várias condições de fotopolimerização (concentração de fotoiniciador, tempo de exposição à luz UV, concentração de macrómero, etc.) Os autores verificaram uma diminuição da bioactividade da enzima libertada com o aumento da concentração de iniciador presente na solução precursora do hidrogel (de 0.1 para 0.3% (m/m)). Esta perda de actividade foi relacionada com alterações nas estruturas secundárias da proteína, detectadas por espectroscopia de dicroísmo circular (*circular dichroism spectroscopy*). Verificaram também que um aumento da concentração do fotoiniciador e/ou um aumento de tempo de exposição à luz UV (de 10 para 20 min, $\sim 10 \text{ mW/cm}^2$) resultavam numa maior percentagem de proteína não libertada.

Considerando este exemplo, e as condições de fotopolimerização adoptadas neste trabalho, é provável que uma das causas para a libertação incompleta da lisozima seja a conjugação covalente desta com as cadeias poliméricas do hidrogel, induzida pelos radicais livres produzidos durante o processo de fotopolimerização. Para além desta imobilização química, é provável que exista, em alguma extensão, também uma imobilização física, resultante do estabelecimento de interacções físicas fortes (ligações iónicas, ligações por pontes de hidrogénio) entre proteína e polímero. Adicionalmente, e como se trata de macromoléculas, alguma molécula de proteína podem se encontrar fisicamente presas nas estruturas tridimensionais mais densas do hidrogel, onde o espaço entre as reticulações é menor que o tamanho das moléculas de proteína.

Claro que, para além das causas referidas acima, no final do processo de libertação a quantidade total de proteína libertada será também determinada pela extensão do fenómeno de *burst release*, cujas causas já foram discutidas anteriormente.

Os perfis de libertação *in vitro* da lisozima não parecem ser afectados de forma muito significativa pelo pH do meio de libertação. Contudo, e embora não se tenham realizado estudos de actividade enzimática, a actividade da lisozima libertada em meio ácido deve ser residual, em comparação com a actividade da proteína libertada na solução tampão fosfato, pois a gama de pH em que esta proteína se mantém activa encontra-se entre 6.0 e 9.0, sendo que atinge a actividade máxima a um pH de 6.2¹³⁸.

Na Figura 3.44 encontram-se os perfis de libertação *in vitro* da proteína BSA. Neste caso, observa-se que os perfis de libertação assumem um comportamento distinto nos dois meios de libertação.

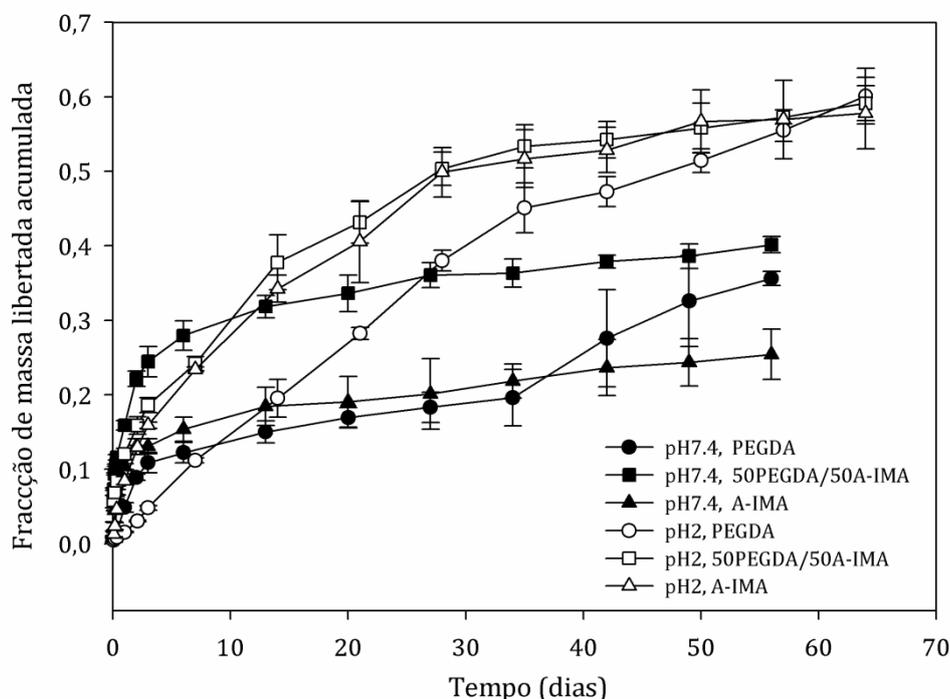


Figura 3.44 Curvas da libertação *in vitro* da proteína BSA: em solução salina tampão fosfato, pH= 7.4 (símbolos a negro); em solução salina tampão acidificada, pH= 2 (símbolos sem preenchimento); média \pm DP, n=3.

Em solução salina tampão fosfato (pH 7.4) observa-se uma libertação de BSA a uma taxa constante até cerca de 3 dias. A partir desse tempo, e até cerca de 60 dias de ensaio, apenas uma pequena quantidade de proteína é libertada. Neste caso não se verifica uma libertação substancial de proteína nas primeiras horas de libertação. Nos hidrogéis de PEGDA, apenas 0.54% da proteína encapsulada é libertada nas primeiras duas horas e, nos hidrogéis A-IMA, apenas cerca de 2% da proteína é libertada neste tempo. Tal como acontece na libertação da lisozima, nos hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA verifica-se uma maior quantidade de BSA libertada nos tempos iniciais – cerca de 7.4%. Ao fim de 3 dias, a percentagem de BSA libertada a partir dos hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA atinge os 25% e, nos hidrogéis PEGDA e A-IMA, cerca de 11 e 13%, respectivamente. A quantidade de BSA libertada pelos hidrogéis PEGDA e A-IMA correspondem a cerca de metade da quantidade de BSA libertada pelos hidrogéis 50PEGDA/50A-IMA, evidenciando que, também com esta proteína, a mistura da pectina com o macrómero PEGDA conduz a um hidrogel híbrido

susceptível de uma maior libertação de proteína nos tempos iniciais, comparativamente com os hidrogéis produzidos apenas com o macrómero ou apenas com a pectina modificada.

Relativamente aos perfis de libertação em meio salino acidificado (pH 2) verifica-se a libertação de uma menor quantidade de BSA nos primeiros dias de libertação, comparativamente com a libertação em solução salina tampão fosfato. Neste meio, a quantidade de proteína libertada aumenta gradualmente ao longo do tempo, ao contrário do que acontece na solução salina tampão fosfato, onde se verifica uma libertação muito limitada de BSA a partir do terceiro dia de ensaio. Enquanto nos hidrogéis PEGDA o perfil de libertação é praticamente linear durante os cerca de 60 dias de ensaio, nos hidrogéis A-IMA e 50PEGDA/50A-IMA verifica-se uma maior quantidade de proteína libertada no primeiro mês (cerca de 50%), verificando-se um abrandamento da taxa de libertação a partir do segundo mês.

Os diferentes perfis de libertação observados nos dois meios de libertação podem ser associados à instabilidade da BSA em meio ácido, que conduz muito rapidamente à desnaturação e degradação da proteína.

Estey *et al*¹³⁹ investigaram a degradação da BSA num meio salino acidificado (pH 2) durante um mês, em soluções com várias concentrações de proteína e diferentes forças iónicas, incubadas a 37°C. Os resultados obtidos por estes investigadores ajudam a elucidar os perfis de libertação da BSA em meio ácido obtidos neste trabalho. Através de SE-HPLC (*Size-exclusion high performance liquid chromatography*), e SDS-PAGE (electróforese do gel de poliacrilamida de sulfato de dodecilo de sódio), os autores verificaram que, nos primeiros dias de incubação a pH ácido, as moléculas de BSA formavam agregados solúveis, com pesos moleculares, estimados por SEC-HPLC, superiores a 500 kDa. A concentração destes agregados aumentava gradualmente durante a primeira semana de incubação. Depois desta fase inicial, a concentração dos agregados diminuía, verificando-se o aumento gradual da concentração de fragmentos de proteína, com pesos moleculares entre os 7 e 40 kDa. Segundo estes autores esta fragmentação é devida à hidrólise da ligação péptica entre os aminoácidos Asparagina e Prolina, ligação susceptível a degradação em meio ácido. Os resultados de SE-HPLC e SDS-PAGE publicados pelos autores são reproduzidos na Figura 3.45. Passado um mês de incubação, os cromatogramas SE-HPLC revelavam o desaparecimento completo do

pico de eluição correspondente ao monómero de BSA, iniciando a degradação completa da proteína em solução. Contrariamente, nas soluções de proteína incubadas em solução salina tampão fosfato (pH 7), a presença do monómero BSA, passado um mês, correspondia a cerca de 80% do monómero presente no tempo inicial de incubação. Em complemento das análises SEC-HPLC e SDS-PAGE os autores realizaram ainda estudos espectrofotométricos, onde a alteração das estruturas secundárias da proteína ao longo do tempo foram investigadas.

Esta investigação realizada por Estey *et al*¹³⁹ ajuda a esclarecer os perfis de libertação obtidos para a BSA em meio ácido. Assim, pode-se justificar a menor taxa de libertação de proteína nos primeiros dias de ensaio, comparativamente com o que acontece a pH 7, com a formação inicial de agregados de proteína que, devido ao seu elevado peso molecular, se difundem mais lentamente por entre a estrutura da matriz polimérica até ao exterior.

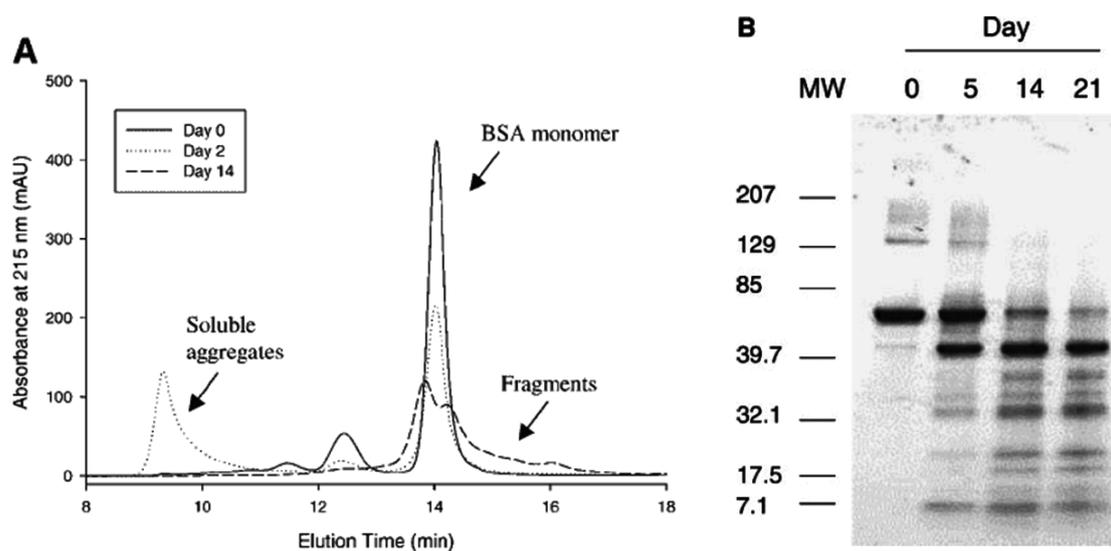


Figura 3.45 Resultados de SE-HPLC (A) e SDS -PAGE (B) representativos da degradação da BSA numa solução salina a pH 2 incubada a 37°C. Figuras reproduzidas de Estey *et al*¹³⁹ sem autorização.

Passados os dias iniciais, a libertação em meio ácido prossegue gradualmente, com a libertação de fragmentos de proteína. Ao contrário, e a pH 7, onde a degradação da proteína é muito mais limitada, a libertação desta torna-se muito reduzida, pois, tal como acontece com a lisozima, é muito provável que uma fracção

significativa da proteína encapsulada se encontre covalentemente ligada à matriz polimérica devido à acção dos radicais livres.

De facto, Lin & Metters¹³⁶, à semelhança do que fizeram com a lisozima, investigaram o processo de imobilização da BSA em hidrogéis de PEGDA durante a formação do hidrogel por fotoreticulação radicalar, na presença do fotoiniciador Irgacure®2959. Com estudos de libertação *in vitro* (em solução salina tampão fosfato), os autores verificaram que apenas uma fracção da proteína encapsulada (menos de 40%) era libertada, sendo que essa fracção diminuía com o aumento da concentração de fotoiniciador na solução precursora. Estudos de SDS-PAGE de soluções de proteína, PEGMA e Irgacure®2959, irradiadas com luz UV, revelaram a conjugação covalente da proteína com o macrómero PEGMA. Perante estes resultados, os autores apresentaram um método para proteger a BSA da acção dos radicais livres durante o processo de formação do hidrogel. Este consiste em adicionar à solução precursora ácido iminodiacético e iões divalentes de metais de transição (como Cu^{2+} e Ni^{2+}), pois este ácido, na presença destes iões, forma complexos que se ligam a alguns resíduos de aminoácidos das proteínas. Os autores puseram a hipótese que estas ligações protegeriam os resíduos reactivos da BSA da acção dos radicais livres. De facto, a libertação *in vitro* da BSA encapsulada em hidrogéis de PEGDA na presença destes complexos revelou um aumento significativo da percentagem de proteína libertada.

Por ser um polissacarídeo, a pectina é susceptível de sofrer degradação química (com quebra das ligações glicosídicas por hidrólise, a $\text{pH} < 4$, ou β -eliminação, a $\text{pH} > 7$, conforme se encontra descrito na Figura 3.4). Igualmente, os grupos uretana introduzidas na pectina, e presentes nas reticulações entre as várias cadeias, são susceptíveis de hidrólise, embora a uma taxa bastante lenta. Assim é provável que, para tempos de libertação longos, como é o caso da BSA, a degradação química da matriz polimérica dos hidrogéis com pectina afecte igualmente o perfil de libertação dos compostos bioactivos. Contudo este efeito não é muito evidente na libertação da BSA, e considerando os perfis de libertação da BSA a partir dos hidrogéis com pectina e os perfis de libertação partir dos hidrogéis PEGDA (que não são susceptíveis de degradação química).

Para os hidrogéis com pectina (A-IMA, 50PEGDA/50A-IMA), procedeu-se também à libertação *in vitro* da BSA em solução salina tampão fosfato na presença de enzimas pectinolíticas. Os resultados de libertação são apresentados na Figura 3.46 e comparados com os perfis de libertação *in vitro* obtidos em solução salina tampão fosfato. Embora o pH óptimo para a actividade das pectinases utilizadas (produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*) seja de cerca de 5.0, optou-se por realizar os ensaio a pH 7.4, de forma a poder comparar os perfis de libertação com e sem a presença da enzima. Ao pH do ensaio estas enzimas perdem entre 40 a 70% da sua actividade em duas horas. Por esta razão optou-se por utilizar uma concentração elevada de enzima (1mg/ml) e, durante os primeiros dias de ensaio, a solução de libertação foi sendo substituída frequentemente por uma solução fresca, preparada na hora.

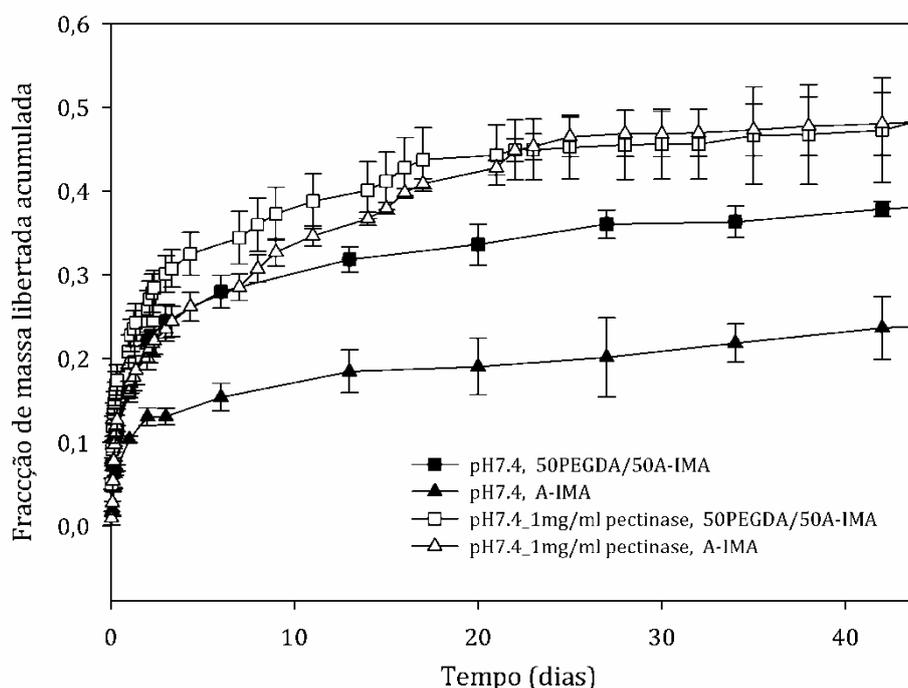


Figura 3.46 Curvas da libertação *in vitro* da proteína BSA em solução tampão salina fosfato (pH= 7.4): sem a presença de pectinase (símbolos a negro); na presença de pectinase na concentração de 1mg/ml (símbolos sem preenchimento); média \pm DP, n=3.

Como se pode ver na Figura 3.46, e embora as condições de pH não sejam as ideais para a actividade das enzimas pectinolíticas, a presença destas no meio de libertação origina um aumento da quantidade total de BSA libertada no final do ensaio, bem como uma taxa de libertação mais elevada nos primeiros dias de ensaio.

Obviamente este efeito é mais pronunciado nos hidrogéis constituídos apenas por pectina modificada (A-IMA) do que nos hidrogéis híbridos (50PEGDA/50A-IMA).

Estes resultados indiciam que as cadeias de pectina, mesmo reticuladas quimicamente, entre si ou entre outros polímeros, mantêm-se susceptíveis de serem degradadas por via enzimática.

3.6 Conclusões

Na primeira parte deste capítulo investigou-se a reacção de modificação química da pectina, um polissacarídeo de origem vegetal. A reacção, da qual resultaram derivados de pectina funcionalizados com grupos terminais vinílicos ou metacrílicos, envolvia a formação de ligações uretana entre os grupos hidroxilo do polissacarídeo e os grupos isocianato presentes na estrutura do agente modificante. Duas pectinas comerciais (provenientes de diferentes matérias-primas e com diferentes graus de esterificação), denominadas Pectina A e Pectina C, foram investigadas. Adicionalmente foram utilizados dois agentes de modificação - o isocianato de alilo (AI) e metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA).

Evidências da ocorrência da reacção química, nomeadamente da presença de ligações uretana, foram obtidas por meio de análise elemental e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). Adicionalmente, a análise de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (^1H -RMN), para os derivados de pectina A modificados com o reagente AI, revelou a presença, nestes derivados, de prótons ligados a átomos de carbono envolvidos em ligações duplas terminais.

Através da análise elemental foi possível quantificar o grau de substituição (GS) dos derivados obtidos, ou seja, o número de grupos insaturados terminais introduzidos por cada 100 unidades de ácido galacturónico anidro.

Através da implementação de um desenho de experiências investigou-se a influência de algumas condições reaccionais na extensão da reacção de modificação com o reagente AI (representada pelo GS). A interpretação estatística dos resultados revelou que o tempo de reacção e a proporção do reagente de modificação, nos intervalos investigados, não influenciavam significativamente o GS obtido. Contrariamente, verificou-se que o tipo de pectina utilizada na reacção (pectina A ou pectina C) influenciava significativamente o GS, constatando-se que a Pectina A apresentava uma maior reactividade (maiores GS) do que a Pectina C. Verificou-se também que a adição do catalisador dilaurato de dibutilo de estanho contribuía para o aumento da extensão da reacção, sobretudo na modificação da pectina A.

Estes resultados foram interpretados considerando as condições heterogéneas em que as reacções de modificação ocorreram. Nestas condições concluiu-se que o factor que limitava da extensão de modificação das pectinas era a

acessibilidade dos grupos OH do polissacarídeo para reagirem com o agente modificante. Relacionou-se ainda a maior reactividade da Pectina A, relativamente à exibida pela Pectina C, com a maior afinidade desta com o solvente da reacção, o DMSO, nomeadamente a sua maior capacidade de inchaço neste solvente.

Numa segunda fase deste trabalho as pectinas modificadas com grupos insaturados reactivos foram utilizadas na preparação de hidrogéis químicos, formados por fotoreticulação radicalar induzida por luz UV. Foram preparados hidrogéis somente com pectina modificada ou hidrogéis híbridos, preparados a partir de misturas de pectina modificada e do macrómero PEGDA, em várias proporções. Como termo de comparação foram também sintetizados hidrogéis compostos apenas pelo macrómero PEGDA. O grau de inchaço destes hidrogéis, em vários meios, foi investigado e relacionado com factores como o GS das pectinas e a composição da mistura precursora do hidrogel.

De forma a investigar o desempenho dos hidrogéis preparados enquanto sistemas de libertação controlada de compostos bioactivos, dois fármacos e duas proteínas modelos foram incorporados nos hidrogéis, em simultâneo com a sua formação. A pectina utilizada foi a pectina A modificada com o agente IMA (GS = 6.1).

Realizaram-se ensaios de libertação *in vitro* em soluções salinas acidificadas (pH 2) e soluções salinas tampão fosfato (pH 7.4) dos fármacos flurbiprofeno sódico e sulfato de gentamicina e das proteínas modelo lisozima e BSA, que foram libertados a partir de hidrogéis compostos apenas por pectina (A-IMA), a partir de hidrogéis híbridos, com pectina e o macrómero PEGDA (50PEGDA/50A-IMA) e a partir de hidrogéis formados apenas com o macrómero PEGDA.

Para os dois fármacos hidrofílicos e de baixo peso molecular verificou-se que estes se libertavam rapidamente de todos os hidrogéis, sendo a libertação total atingida, no máximo, passado quatro horas de ensaio. Nos hidrogéis A-IMA e 50PEGDA/50A-IMA observou-se uma libertação substancial do fármaco encapsulado nos primeiros instantes do ensaio, um fenómeno designado por *burst release*. Este fenómeno foi relacionado com a morfologia (da superfície e interna) dos hidrogéis A-IMA e 50PEGDA/50A-IMA, analisada por SEM. Estes hidrogéis revelaram ter um interior cheio de poros de grandes dimensões e uma superfície rasgada por grandes fracturas. Uma das causas para esta morfologia heterogénea

encontra-se na grande quantidade de água presente durante a formação dos hidrogéis, devido à baixa concentração da solução precursora (5% m/m).

A libertação das proteínas modelo revelou-se incompleta nos três hidrogéis estudados. Este fenómeno foi atribuído à conjugação entre as proteínas e os polímeros devido à acção dos radicais livres formados durante o processo de formação do hidrogel. Para além disto, a adsorção física das proteínas à matriz polimerica é outro factor que também deve contribuir para a libertação incompleta destas biomoléculas.

Verificou-se ainda que os perfis de libertação da proteína BSA eram influenciados pelo meio de libertação, tendo-se relacionado os diferentes perfis de libertação exibidos, em solução salina acidificada (pH 2) e solução salina tampão fosfato (pH 7.4), com instabilidade/degradação química da BSA em meio ácido e com a relativa estabilidade desta a pH 7.4.

Finalmente conclui-se, com estudos de libertação *in vitro* da BSA na presença de enzimas pectinolíticas, a partir de hidrogéis que continham pectina, que a pectina modificada, mesmo reticulada, entre si ou com o macrómero PEGDA, continua a ser susceptível de ser degradada por via enzimática.

Esta última evidência sugere que os hidrogéis preparados têm potencial para serem utilizados enquanto sistemas de libertação específica no cólon. Adicionalmente, e por serem hidrogéis químicos, estes têm a vantagem de serem bastante mais estáveis que os vários hidrogéis físicos de pectina que têm sido propostos como sistemas de libertação específica no cólon. No entanto, e com base nos estudos de libertação *in vitro* realizados, estes parecem ser mais promissores enquanto sistemas de libertação específica no cólon de biomacromoléculas, como por exemplo proteínas, do que na libertação de fármacos hidrofílicos de baixo peso molecular pois, como se viu, a libertação dos fármacos modelo representativos deste tipo de fármacos revelou ser bastante rápida e afectada de um *burst release* considerável.

3.7 Referências bibliográficas

1. Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohnen, D., Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **2001**, *57*, (6), 929-67.
2. Mohnen, D., Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **2008**, *11*, (3), 266-77.
3. Willats, W. G. T.; Knox, P.; Mikkelsen, J. D., Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **2006**, *17*, (3), 97-104.
4. Rolin, C., Commercial pectin preparations. In *Pectins and their manipulation*, Seymour, C.; Knox, P., Eds. Blackwell: Boca Raton, 2002; pp 222-241.
5. Liu, L.; Won, Y. J.; Cooke, P. H.; Coffin, D. R.; Fishman, M. L.; Hicks, K. B.; Ma, P. X., Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. *Biomaterials* **2004**, *25*, (16), 3201-10.
6. Nagel, M. D.; Verhoef, R.; Schols, H.; Morra, M.; Knox, J. P.; Ceccone, G.; Della Volpe, C.; Vigneron, P.; Bussy, C.; Gallet, M.; Velzenberger, E.; Vayssade, M.; Cascardo, G.; Cassinelli, C.; Haeger, A.; Gilliland, D.; Liakos, I.; Rodriguez-Valverde, M.; Siboni, S., Enzymatically-tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2008**, *1780*, (7-8), 995-1003.
7. Liu, L. S.; Fishman, M. L.; Hicks, K. B., Pectin in controlled drug delivery - a review. *Cellulose* **2007**, *14*, (1), 15-24.
8. Katav, T.; Liu, L.; Traitel, T.; Goldbart, R.; Wolfson, M.; Kost, J., Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course. *Journal of Controlled Release* **2008**, *130*, (2), 183-191.
9. Liu, L.; Fishman, M. L.; Kost, J.; Hicks, K. B., Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* **2003**, *24*, (19), 3333-43.
10. Chourasia, M. K.; Jain, S. K., Polysaccharides for colon targeted drug delivery. *Drug Delivery* **2004**, *11*, (2), 129-148.
11. Voragen, A. G. J.; Coenen, G. J.; Verhoef, R. P.; Schols, H. A., Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **2009**, *20*, (2), 263-275
195.
12. Vincken, J. P.; Schols, H. A.; Oomen, R. J.; McCann, M. C.; Ulvskov, P.; Voragen, A. G.; Visser, R. G., If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **2003**, *132*, (4), 1781-9.
13. Schols, H.; Voragen, A. G., The chemical structure of pectins. In *Pectins and Their Manipulation*, Seymour, C.; Knox, P., Eds. Blackwell Boca Raton, 2002; pp 1-29.
14. Kravtchenko, T. P.; Voragen, A. G. J.; Pilnik, W., Analytical Comparison of 3 Industrial Pectin Preparations. *Carbohydrate Polymers* **1992**, *18*, (1), 17-25.
15. Zachariassen, C. B. Process Analytical Chemistry and Technology in Pectin Production. Industrial PhD thesis, University of Copenhagen, Copenhagen, 2007.
16. Rinaudo, M., Polyelectrolyte properties of a plant and animal polysaccharide. *Structural Chemistry* **2009**, *20*, (2), 277-289
195.
17. Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P. J. C.; Thom, D., Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations - Egg-Box Model. *Febs Letters* **1973**, *32*, (1), 195-198.
18. Doublier, J. L.; Garnier, C.; Renard, D.; Sanchez, C., Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5*, (3-4), 202-214.
19. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L., Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* **1998**, *33*, (1), 21-28.
20. Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R., Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, (9), 2931-2944.
21. Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R., Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* **2001**, *77*, (3), 215-227.
22. Sriamornsak, P., Chemistry of Pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal* **2003**, *3*, (1-2), 206-228.
23. Glinsky, V. V.; Raz, A., Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research* **2009**, *344*, (14), 1788-1791.
24. Jackson, C. L.; Dreaden, T. M.; Theobald, L. K.; Tran, N. M.; Beal, T. L.; Eid, M.; Gao, M. Y.; Shirley, R. B.; Stoffel, M. T.; Kumar, M. V.; Mohnen, D., Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* **2007**, *17*, (8), 805-819.

25. Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A., Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med* **2002**, 8, (4), 187-92.
26. Wei, X. L.; Sun, N. Y.; Wu, B. J.; Yin, C. H.; Wu, W., Sigmoidal release of indomethacin from pectin matrix tablets: Effect of in situ crosslinking by calcium cations. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 318, (1-2), 132-138.
27. Sriamornsak, P., Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 169, (2), 213-220.
28. Rubinstein, A.; Radai, R., In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinated formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1995**, 41, (5), 291-295.
29. Rubinstein, A.; Radai, R.; Ezra, M.; Pathak, S.; Rokem, J. S., In vitro evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharm Res* **1993**, 10, (2), 258-63.
30. Maestrelli, F.; Cirri, M.; Corti, G.; Mennini, N.; Mura, P., Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 69, (2), 508-518.
31. Paharia, A.; Yadav, A. K.; Rai, G.; Jain, S. K.; Pancholi, S. S.; Agrawal, G. P., Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting. *Aaps Pharmscitech* **2007**, 8, (1), -.
32. Adkin, D. A.; Kenyon, C. J.; Lerner, E. I.; Landau, I.; Strauss, E.; Caron, D.; Penhasi, A.; Rubinstein, A.; Wilding, I. R., The use of scintigraphy to provide "proof of concept" for novel polysaccharide preparations designed for colonic drug delivery. *Pharm Res* **1997**, 14, (1), 103-7.
33. Kim, H.; Fassihi, R., Application of binary polymer system in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics. *J Pharm Sci* **1997**, 86, (3), 323-8.
34. Chang, K. L. B.; Lin, J., Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 43, (2), 163-169.
35. Bigucci, F.; Luppi, B.; Cerchiara, T.; Sorrenti, M.; Bettinetti, G.; Rodriguez, L.; Zecchi, V., Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci* **2008**, 35, (5), 435-41.
36. Wu, B. J.; Deng, D. Y.; Lu, Y.; Wu, W., Biphasic release of indomethacin from HPMC/pectin/calcium matrix tablet: II. Influencing variables, stability and pharmacokinetics in dogs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 69, (1), 294-302.
37. Bigucci, F.; Luppi, B.; Monaco, L.; Cerchiara, T.; Zecchi, V., Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *J Pharm Pharmacol* **2009**, 61, (1), 41-6.
38. Yu, C.-Y.; Yin, B.-C.; Zhang, W.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X., Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 68, (2), 245-249.
39. Mennini, N.; Furlanetto, S.; Maestrelli, F.; Pinzauti, S.; Mura, P., Response surface methodology in the optimization of chitosan-Ca pectinate bead formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 35, (4), 318-325.
40. Atyabi, F.; Majzoob, S.; Iman, M.; Salehi, M.; Dorkoosh, F., In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 61, (1), 39-51.
41. Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R. J.; Bodmeier, R., Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of Controlled Release* **2008**, 125, (1), 1-15.
42. Ashford, M.; Fell, J.; Attwood, D.; Sharma, H.; Woodhead, P., An Evaluation of Pectin as a Carrier for Drug Targeting to the Colon. *Journal of Controlled Release* **1993**, 26, (3), 213-220.
43. Fernandez-Hervas, M. J.; Fell, J. T., Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 169, (1), 115-119.
44. Hodges, L. A.; Connolly, S. M.; Band, J.; O'Mahony, B.; Ugurlu, T.; Turkoglu, M.; Wilson, C. G.; Stevens, H. N. E., Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin-HPMC tablets in healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 370, (1-2), 144-150.
45. Macleod, G. S.; Fell, J. T.; Collett, J. H., An in vitro investigation into the potential for bimodal drug release from pectin/chitosan/HPMC-coated tablets. *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, 188, (1), 11-18.
46. Ofori-Kwakye, K.; Fell, J. T., Biphasic drug release from film-coated tablets. *Int J Pharm* **2003**, 250, (2), 431-40.
47. Ofori-Kwakye, K.; Fell, J. T.; Sharma, H. L.; Smith, A. M., Gamma scintigraphic evaluation of film-coated tablets intended for colonic or biphasic release. *Int J Pharm* **2004**, 270, (1-2), 307-13.

48. Semdé, R.; Amighi, K.; Devleeschouwer, M. J.; Moës, A. J., Effect of pectinolytic enzymes on the theophylline release from pellets coated with water insoluble polymers containing pectin HM or calcium pectinate. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 197, (1-2), 169-179.
49. Semdé, R.; Amighi, K.; Devleeschouwer, M. J.; Moës, A. J., Studies of pectin HM/Eudragit® RL/Eudragit® NE film-coating formulations intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 197, (1-2), 181-192.
50. Turkoglu, M.; Ugurlu, T., In vitro evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2002**, 53, (1), 65-73.
51. Ugurlu, T.; Turkoglu, M.; Gurer, U. S.; Akarsu, B. G., Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 67, (1), 202-210.
52. Wakerly, Z.; Fell, J. T.; Attwood, D.; Parkins, D., Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery. *Pharmaceutical Research* **1996**, 13, (8), 1210-1212.
53. Gunsel, W. C.; Dusel, R., Compression-Coated and Layer Tablets. In *Pharmaceutical dosage forms- tablets*, 2 ed.; Herbert, L.; Lachman, L.; Schwartz, J. B., Eds. Marcel Dekker: N.Y., 1989; Vol. 1, pp 247-285.
54. Charlton, S.; Jones, N. S.; Davis, S. S.; Illum, L., Distribution and clearance of bioadhesive formulations from the olfactory region in man: Effect of polymer type and nasal delivery device. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 30, (3-4), 295-302.
55. Charlton, S. T.; Davis, S. S.; Illum, L., Nasal administration of an angiotensin antagonist in the rat model: effect of bioadhesive formulations on the distribution of drugs to the systemic and central nervous systems. *Int J Pharm* **2007**, 338, (1-2), 94-103.
56. Charlton, S. T.; Davis, S. S.; Illum, L., Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: In vitro characterisation studies. *Journal of Controlled Release* **2007**, 118, (2), 225-234.
57. Chelladurai, S.; Mishra, M.; Mishra, B., Design and evaluation of bioadhesive in-situ nasal gel of ketorolac tromethamine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2008**, 56, (11), 1596-9.
58. Giunchedi, P.; Conte, U.; Chetoni, P.; Saettone, M. F., Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. *Eur J Pharm Sci* **1999**, 9, (1), 1-7.
59. Sensoy, D.; Cevher, E.; Sarici, A.; Yilmaz, M.; Ozdamar, A.; Bergisadi, N., Bioadhesive sulfacetamide sodium microspheres: Evaluation of their effectiveness in the treatment of bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit model. *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, 72, (3), 487-95.
60. Thirawong, N.; Nunthanid, J.; Puttipipatkachorn, S.; Sriamornsak, P., Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 67, (1), 132-140.
61. Sriamornsak, P.; Wattanakorn, N.; Takeuchi, H., Study On The Mucoadhesion Mechanism Of Pectin By Atomic Force Microscopy And Mucin-Particle Method. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 79, (1), 54-59.
62. Hagesaether, E.; Sande, S. A., In vitro measurements of mucoadhesive properties of six types of pectin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2007**, 33, (4), 417-425.
63. Hagesaether, E.; Hiorth, M.; Sande, S. A., Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, 71, (2), 325-331.
64. Illum, L., Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release* **2003**, 87, (1-3), 187-198.
65. <http://www.archimedespharma.com/productArchiDevPectin.html> (consultado em 2010-03-19).
66. Watts, P.; Smith, A., PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2009**, 6, (5), 543-52.
67. Crescenzi, V.; Callegaro, L. Esters of pectic and pectinic acid. US patent 5384400, 1995.
68. Miralles-Houzelle, M. C.; Hubert, P.; Dellacherie, E., Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association. *Langmuir* **2001**, 17, (5), 1384-1391.
69. Morris, G. A.; Hromadkova, Z.; Ebringerova, A.; Malovikova, A.; Alföldi, J.; Harding, S. E., Modification of pectin with UV-absorbing substituents and its effect on the structural and

- hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 48, (4), 351-359.
70. Semde, R.; Moes, A. J.; Devleeschouwer, M. J.; Amighi, K., Synthesis and enzymatic degradation of epichlorohydrin cross-linked pectins. *Drug Dev Ind Pharm* **2003**, 29, (2), 203-13.
71. Sinitsya, A.; Copikova, J.; Prutyaynov, V.; Skoblyya, S.; Machovic, V., Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 42, (4), 359-368.
72. Synytsya, A.; Copikova, J.; Marounek, M.; Mlcochova, P.; Sihelnikova, L.; Skoblyya, S.; Havlatova, H.; Matejka, P.; Maryska, M.; Machovic, V., N-octadecylpectinamide, a hydrophobic sorbent based on modification of highly methoxylated citrus pectin. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 56, (2), 169-179.
73. Simkovic, I.; Synytsya, A.; Uhliarikova, I.; Copikova, J., Amidated pectin derivatives with n-propyl-, 3-aminopropyl-, 3-propanol- or 7-aminoheptyl-substituents. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 76, (4), 602-606.
74. Mishra, R. K.; Datt, M.; Pal, K.; Banthia, A. K., Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2008**, 19, (6), 2275-2280.
75. Yoshimura, T.; Sengoku, K.; Fujioka, R., Pectin-based superabsorbent hydrogels crosslinked by some chemicals: synthesis and characterization. *Polymer Bulletin* **2005**, 55, (1-2), 123-129.
76. Guilherme, M. R.; Moia, T. A.; Reis, A. V.; Paulino, A. T.; Rubira, A. F.; Mattoso, L. H.; Muniz, E. C.; Tambourgi, E. B., Synthesis and water absorption transport mechanism of a pH-sensitive polymer network structured on vinyl-functionalized pectin. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (1), 190-6.
77. Maior, J. F.; Reis, A. V.; Muniz, E. C.; Cavalcanti, O. A., Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. *Int J Pharm* **2008**, 355, (1-2), 184-94.
78. Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Paulino, A. T.; Muniz, E. C.; Mattoso, L. H.; Tambourgi, E. B., Synthesis of hollow-structured nano- and microspheres from pectin in a nanodroplet emulsion. *Langmuir* **2009**, 25, (4), 2473-8.
79. Mishra, R. K.; Sutar, P. B.; Singhal, J. P.; Banthia, A. K., Graft copolymerization of pectin with polyacrylamide. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2007**, 46, (10-12), 1079-1085.
80. Mishra, R. K.; Datt, M.; Banthia, A. K., Synthesis and characterization of pectin/PVP hydrogel membranes for drug delivery system. *AAPS PharmSciTech* **2008**, 9, (2), 395-403.
81. Sutar, P. B.; Mishra, R. K.; Pal, K.; Banthia, A. K., Development of pH sensitive polyacrylamide grafted pectin hydrogel for controlled drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med* **2008**, 19, (6), 2247-53.
82. Pourjavadi, A.; Barzegar, S., Smart Pectin-based Superabsorbent Hydrogel as a Matrix for Ibuprofen as an Oral Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Delivery. *Starch-Starke* **2009**, 61, (3-4), 173-187.
83. Pourjavadi, A.; Barzegar, S., Synthesis and Evaluation of pH and Thermosensitive Pectin-Based Superabsorbent Hydrogel for Oral Drug Delivery Systems. *Starch-Starke* **2009**, 61, (3-4), 161-172.
84. Lu, S. X.; Anseth, K. S., Release behavior of high molecular weight solutes from poly(ethylene glycol)-based degradable networks. *Macromolecules* **2000**, 33, (7), 2509-2515.
85. Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: NY, 2001.
86. Zhang, Y. L.; Won, C. Y.; Chu, C. C., Synthesis and characterization of biodegradable hydrophobic-hydrophilic hydrogel networks with a controlled swelling property. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2000**, 38, (13), 2392-2404.
87. Luo, S. G.; Tan, H. M.; Zhang, J. G.; Wu, Y. J.; Pei, F. K.; Meng, X. H., Catalytic mechanisms of triphenyl bismuth, dibutyltin dilaurate, and their combination in polyurethane-forming reaction. *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, 65, (6), 1217-1225.
88. Synytsya, A.; Copikova, J.; Matejka, P.; Machovic, V., Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers* **2003**, 54, (1), 97-106.
89. Kamnev, A. A.; Colina, M.; Rodriguez, J.; Ptitchkina, N. M.; Ignatov, V. V., Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. *Food Hydrocolloids* **1998**, 12, (3), 263-271.
90. Chatjigakis, A. K.; Pappas, C.; Proxenia, N.; Kalantzi, O.; Rodis, P.; Polissiou, M., FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37, (4), 395-408.
91. Zhang, C. X.; Ren, Z. Y.; Yin, Z. G.; Qian, H. Y.; Ma, D. Z., Amide II and amide III bands in polyurethane model soft and hard segments. *Polymer Bulletin* **2008**, 60, (1), 97-101.

92. Petrini, P.; Fare, S.; Piva, A.; Tanzi, M. C., Design, synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* **2003**, 14, (8), 683-6.
93. Rosenbohm, C.; Lundt, I.; Christensen, T. M. I. E.; Young, N. W. G., Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by H-1 NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research* **2003**, 338, (7), 637-649.
94. Tamaki, Y.; Konishi, T.; Fukuta, M.; Tako, M., Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of Citrus depressa. *Food Chemistry* **2008**, 107, (1), 352-361.
95. Winning, H.; Viereck, N.; Norgaard, L.; Larsen, J.; Engelsen, S. B., Quantification of the degree of blockiness in pectins using H-1 NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Hydrocolloids* **2007**, 21, (2), 256-266.
96. Mukhiddinov, Z. K.; Khalikov, D. K.; Abdusamiev, F. T.; Avloev, C. C., Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan. *Talanta* **2000**, 53, (1), 171-176.
97. Renard, C. M. G. C.; Jarvis, M. C., Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 39, (3), 201-207.
98. de Souza, J. R. R.; de Carvalho, J. I. X.; Trevisan, M. T. S.; de Paula, R. C. M.; Ricardo, N. M. P. S.; Feitosa, J. P. A., Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (8), 2278-2286.
99. Berth, G.; Dautzenberg, H.; Hartmann, J., Static Light-Scattering Technique Applied to Pectin in Dilute-Solution .3. The Tendency for Association. *Carbohydrate Polymers* **1994**, 25, (3), 197-202.
100. Berth, G.; Dautzenberg, H.; Rother, G., Static Light-Scattering Technique Applied to Pectin in Dilute-Solution .1. Reliability of Experiments and Model-Calculations. *Carbohydrate Polymers* **1994**, 25, (3), 177-185.
101. Berth, G.; Dautzenberg, H.; Rother, G., Static Light-Scattering Technique Applied to Pectin in Dilute-Solution .2. The Effects of Clarification. *Carbohydrate Polymers* **1994**, 25, (3), 187-195.
102. Buchholt, H. C.; Christensen, T. M. I. E.; Fallesen, B.; Ralet, M. C.; Thibault, J. F., Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 58, (2), 149-161.
103. Corredig, M.; Kerr, W.; Wicker, L., Molecular characterization of commercial pectins by separation with linear mix gel permeation columns in-line with multi-angle light scattering detection. *Food Hydrocolloids* **2000**, 14, (1), 41-47.
104. Fishman, M. L.; Chau, H. K.; Kolpak, F.; Brady, J., Solvent effects on the molecular properties of pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (9), 4494-4501.
105. Fishman, M. L.; Gillespie, D. T.; Sondey, S. M.; Barford, R. A., Characterization of Pectins by Size Exclusion Chromatography in Conjunction with Viscosity Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, 37, (3), 584-591.
106. Fishman, M. L.; Gillespie, D. T.; Sondey, S. M.; El-Atawy, Y. S., Intrinsic viscosity and molecular weight of pectin components. *Carbohydrate Research* **1991**, 215, (1), 91-104.
107. Fishman, M. L.; Pfeffer, P. E.; Barford, R. A.; Doner, L. W., Studies of pectin solution properties by high-performance size exclusion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 32, (2), 372-378.
108. Malovikova, A.; Rinaudo, M.; Milas, M., On the characterization of polygalacturonate salts in dilute solution. *Carbohydrate Polymers* **1993**, 22, (2), 87-92.
109. Ralet, M. C.; Bonnin, E.; Thibault, J. F., Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2001**, 753, (1), 157-166.
110. White, G. W.; Katona, T.; Zodda, J. P., The use of high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) as a molecular weight screening technique for polygalacturonic acid for use in pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, 20, (6), 905-912.
111. Zhang, W.; Gao, L.; Shi, X.; Zhang, Q., Determination of the Molecular Mass of Modified Citrus Pectin Using High-Performance Size Exclusion Chromatography. *Chinese Journal of Chromatography* **2007**, 25, (5), 711-714.
112. Schnabel, W., Light-induced chemical processes in polymers. In *Polymers and Light - Fundamentals and Technical Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 2007; p 186.
113. Segurola, J.; Allen, N.; Edge, M.; Roberts, I., Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of acrylated prepolymers by several commercial type I far UV photoinitiators. *Polymer Degradation and Stability* **1999**, 65, (1), 153-160.

114. Williams, C. G.; Malik, A. N.; Kim, T. K.; Manson, P. N.; Elisseeff, J. H., Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials* **2005**, *26*, (11), 1211-1218.
115. Peppas, N. A.; Keys, K. B.; Torres-Lugo, M.; Lowman, A. M., Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, *62*, (1-2), 81-87.
116. Scott, R. A.; Peppas, N. A., Highly crosslinked, PEG-containing copolymers for sustained solute delivery. *Biomaterials* **1999**, *20*, (15), 1371-1380.
117. Mellott, M. B.; Searcy, K.; Pishko, M. V., Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials* **2001**, *22*, (9), 929-941.
118. Lin, C. C.; Anseth, K. S., PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, (3), 631-643.
119. Tsai, B. H.; Lin, C. H.; Lin, J. C., Synthesis and property evaluations of photocrosslinkable chitosan derivative and its photocopolymerization with poly(ethylene glycol). *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *100*, (3), 1794-1801.
120. Li, Q. Z.; Yang, D. Z.; Ma, G. P.; Xu, Q.; Chen, X. M.; Lu, F. M.; Nie, J., Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* **2009**, *44*, (2), 121-127.
121. Sun, G. M.; Chu, C. C., Synthesis, characterization of biodegradable dextran-allyl isocyanate-ethylamine/polyethylene glycol-diacrylate hydrogels and their in vitro release of albumin. *Carbohydrate Polymers* **2006**, *65*, (3), 273-287.
122. Livnat, M.; Beyar, R.; Seliktar, D., Endoluminal hydrogel films made of alginate and polyethylene glycol: Physical characteristics and drug-eluting properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *75A*, (3), 710-722.
123. Wang, S. C.; Chen, B. H.; Wang, L. F.; Chen, J. S., Characterization of chondroitin sulfate and its interpenetrating polymer network hydrogels for sustained-drug release. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329*, (1-2), 103-109.
124. Park, Y. D.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **2003**, *24*, (6), 893-900.
125. Bader, R. A.; Herzog, K. T.; Kao, W. J., A study of diffusion in poly(ethyleneglycol)-gelatin based semi-interpenetrating networks for use in wound healing. *Polymer Bulletin* **2009**, *62*, (3), 381-389.
126. Fu, Y.; Kao, W. J., Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms from Semi-interpenetrating Networks of Gelatin and Poly(ethylene glycol) diacrylate. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, (9), 2115-2124.
127. Soppimath, K. S.; Kulkarni, A. R.; Aminabhavi, T. M., Chemically modified polyacrylamide-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery systems: preparation and characterization. *Journal of Controlled Release* **2001**, *75*, (3), 331-345.
128. Dubey, S.; Bajpai, S. K., Poly(methacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels for gastrointestinal delivery of theophylline. I. Swelling characterization. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *101*, (5), 2995-3008.
129. Zohuriaan-Mehr, M. J.; Motazedi, Z.; Kabiri, K.; Ershad-Langroudi, A.; Allahdadi, I., Gum arabic-acrylic superabsorbing hydrogel hybrids: Studies on swelling rate and environmental responsiveness. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *102*, (6), 5667-5674.
130. Lin, C. C.; Metters, A. T., Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, (12-13), 1379-1408.
131. Siepmann, J.; Peppas, N. A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *48*, (2-3), 139-157.
132. Ritger, P. L.; Peppas, N. A., A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* **1987**, *5*, (1), 37-42.
133. Ritger, P. L.; Peppas, N. A., A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* **1987**, *5*, (1), 23-36.
134. Kabiri, K.; Omidian, H.; Hashemi, S. A.; Zohuriaan-Mehr, M. J., Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: effect of crosslinker type and concentration on porosity and absorption rate. *European Polymer Journal* **2003**, *39*, (7), 1341-1348.
135. Huang, X.; Brazel, C. S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2001**, *73*, (2-3), 121-136.

136. Lin, C. C.; Metters, A. T., Enhanced protein delivery from photopolymerized hydrogels using a pseudospecific metal chelating ligand. *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, (3), 614-622.
137. Lin, C. C.; Sawicki, S. M.; Metters, A. T., Free-radical-mediated protein inactivation and recovery during protein photoencapsulation. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (1), 75-83.
138. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/7/l7651dat.Par.0001.File.tmp/l7651dat.pdf> (consultado em 2010-03-23).
139. Estey, T.; Kang, J.; Schwendeman, S. P.; Carpenter, J. F., BSA degradation under acidic conditions: A model for protein instability during release from PLGA delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 95, (7), 1626-1639.

Capítulo 4

Esponjas de Pectina e Quitosano Formadas por Complexação Polieletrólítica: Preparação e Caracterização

Com base no trabalho apresentado neste Capítulo encontram-se em preparação um artigo que será submetido para publicação na revista *International Journal of Biological Macromolecules*:

P. Coimbra, H.C. de Sousa, M.H. Gil, Pectin/chitosan polyelectrolyte complexes based sponges: preparation and characterization.

Ao longo deste capítulo descreve-se a preparação e caracterização de esponjas biodegradáveis produzidas através da liofilização dos complexos polielectrolíticos formados entre os polissacarídeos pectina e quitosano.

Adicionalmente, a viabilidade das matrizes produzidas enquanto sistemas de libertação controlada/sustentada de proteínas é discutida, com base num estudo preliminar que envolveu a imobilização da proteína modelo BSA nas esponjas produzidas e a sua subsequente libertação *in vitro*.

4.1 Introdução

4.1.1 Polielectrólitos e complexos polielectrolíticos

Os polielectrólitos (PELs) são macromoléculas ou polímeros solúveis em água com uma grande quantidade de grupos ionizáveis. De acordo com a sua origem, estes são classificados de naturais (ex: DNA, proteínas, alguns polissacarídeos), derivados de polímeros naturais (ex: carboximetilcelulose), ou sintéticos (ex: poli(ácido acrílico), poli(ácido estirenosulfónico)). Em termos da natureza da carga eléctrica estes são classificados de polianiões, policatiões ou polianfotéricos. Dependendo da densidade da carga eléctrica e do grau de acidez ou basicidade dos grupos funcionais, os PELs podem ser classificados de polielectrólitos de baixa ou alta densidade de carga eléctrica e de polielectrólitos fortes ou fracos¹.

As principais forças envolvidas na formação dos complexos polielectrolíticos (PECs) são as forças electrostáticas de Coulomb, desenvolvidas entre PELs carregados com cargas opostas, e que conduzem à condensação iónica interpolimérica. A libertação concomitante de contra-íões é a principal *driving force* para esta reacção, pois isto corresponde a um aumento da entropia do sistema^{1,2}.

A formação dos PECs pode ser dividida em 3 etapas (Figura 4.1): a primeira corresponde à formação de complexos entre as cadeias de dois polielectrólitos de cargas opostas, determinada pelas forças de Coulomb (Figura 4.1(a)). Numa segunda fase, e dependendo da natureza dos polielectrólitos, pode ocorrer a reestruturação destes complexos, com a formação de estruturas mais ordenadas (Figura 4.1 (b)). A terceira etapa corresponde ao processo de agregação entre complexos (Figura 4.1 (c)), o qual é determinado por interacções intermoleculares como ligações por

pontes de hidrogénio, forças de van der Waals, e interações hidrofóbicas e de dispersão^{1,2}.

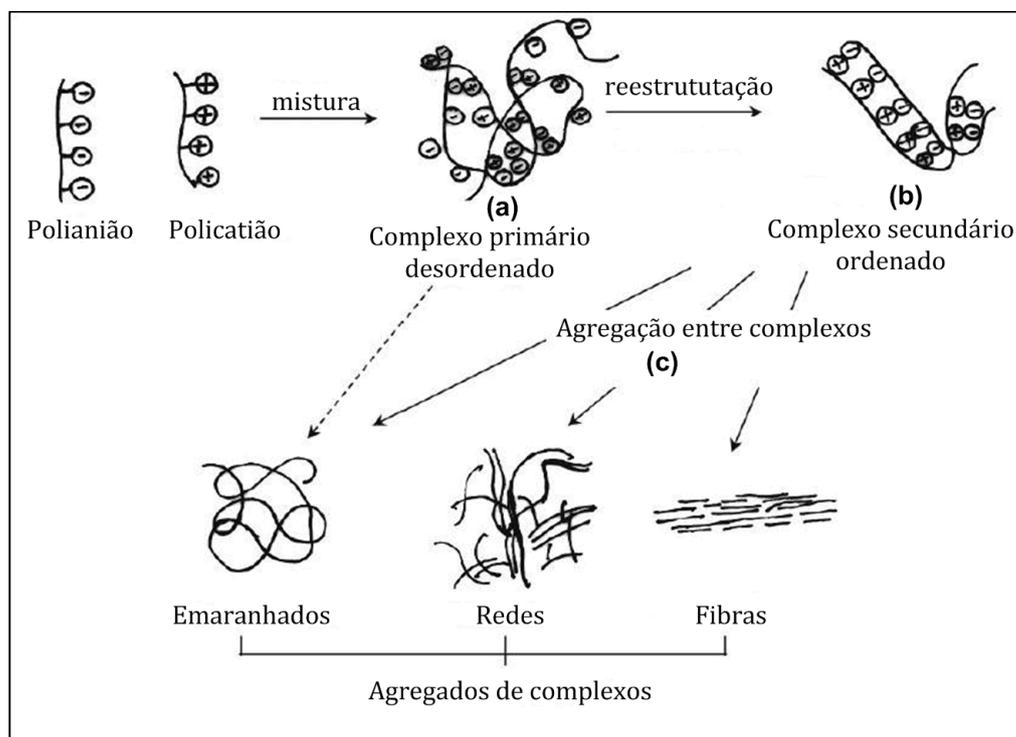


Figura 4.1 Representação esquemática da formação dos PECs e seus agregados (figura adaptada de Tsuchida²).

Em última análise, as estruturas e propriedades dos PECs obtidos serão sempre determinadas pelas propriedades físico-químicas dos componentes polieletrólitos (grau de acidez e basicidade, densidade de carga, peso molecular, estrutura dos grupos iónicos, hidrofiliicidade e hidrofobicidade, etc.) e as condições reaccionais presentes durante a sua formação (proporções dos PELs, concentração, força iónica, pH, temperatura, agitação, etc.)

Da mesma forma, estes dois aspectos determinam o comportamento em solução dos agregados de PECs. Complexos solúveis em água podem ser obtidos entre policatiões e polianiões com baixa densidade de carga eléctrica e com grandes diferenças de pesos moleculares, quando estes são misturados em razões não estequiométricas. Pelo contrário, complexos insolúveis com um elevado grau de agregação são formados quando se misturam polieletrólitos com uma grande densidade de carga eléctrica e/ou com pesos moleculares elevados e semelhantes.

Com concentrações baixas é possível obter dispersões coloidais com dimensões submicrométricas^{1,2}.

4.1.2 Aplicações farmacêuticas e biomédicas dos complexos polielectrolíticos

Os PEL e PECs encontram diversas aplicações em várias áreas tecnológicas, como por exemplo, em processos de separação de proteínas ou como suportes para a imobilização de enzimas³. Nas áreas farmacêutica e biomédica estes têm sido largamente investigados no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos e também na preparação de *scaffolds*. Nesta última aplicação os PELs e PECs de origem natural (como PECs entre polissacarídeos ou PECs de polissacarídeos e proteínas) têm um particular interesse, pois, do ponto de vista estrutural e químico, estes apresentam semelhanças com vários complexos macromoleculares presentes em sistemas vivos⁴. Adicionalmente, estes apresentam normalmente uma boa biocompatibilidade e, alguns sistemas, apresentam mesmo actividades biológicas favoráveis como a promoção da proliferação e da diferenciação celular⁴.

4.1.3 Complexos polielectrolíticos com quitosano

O polímero natural mais investigado nas áreas biomédicas e farmacêuticas é o quitosano. As razões para esta popularidade advêm das propriedades exibidas por este polissacarídeo, as quais já foram referidas na introdução.

Uma dessas propriedades é o seu carácter de polielectrólito, sendo este classificado como uma polibase fraca devido à presença de grupos amina. Talvez a aplicação mais conhecida, e directamente relacionada com as propriedades do quitosano enquanto polielectrólito, é a utilização deste como veículo na entrega de material genético por via da sua complexação com alguns fragmentos de DNA⁵.

Uma grande diversidade de PECs, constituídos por quitosano e: proteínas^{6,7}, poliaminoácidos⁸, polissacarídeos⁹⁻¹⁵, polissacarídeos modificados^{16,17} e polielectrólitos sintéticos^{18,19}, já foram produzidos e investigados. Estes PECs foram processados nas formas de membranas^{11,18}, partículas^{10,16}, micro- e nanopartículas^{9,16,20}, fibras¹⁵ e esponjas^{12,13}, e propostos para as mais diversas aplicações enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos^{10,16,15,20}, *scaffolds*^{7,14,17,21}, ou *wound*

*dressings*¹¹⁻¹³. Na literatura encontram-se alguns artigos de revisão dedicados a este tema^{4,22}.

Apesar do grande número de artigos publicados onde os PECs com quitosano são sugeridos para as mais diversas aplicações, existem poucos estudos fundamentais dedicados à investigação das reacções de complexação que dão origem a estes PECs e à forma como as várias condições reaccionais afectam a formação dos PECs e as propriedades por eles exibidas. Uma das excepções tem sido o trabalho desenvolvido por Argüelles-Monal, que tem vindo a investigar as reacções de complexação entre o quitosano e vários polissacarídeos através de técnicas como a condutimetria e a turbidimetria²³⁻²⁵.

Os PECs podem ser visto como hidrogéis físicos que são formados devido às ligações iónicas estabelecidas entre as cadeias de polianiões e policatiões, e onde outras interacções físicas (como pontes de hidrogénio e hidrofóbicas) desempenham um papel cooperativo na estabilização dos complexos.

A formação de PECs com quitosano necessita apenas, e para além de uma parte dos grupos amina ionizados, de um polianião ionizado ou semi-ionizado, não requerendo assim a adição de iniciadores, de catalisadores ou de solventes orgânicos, os quais são normalmente necessários para produzir estruturas hidrofílicas covalentemente reticuladas (hidrogéis químicos). Este aspecto constitui uma das grandes vantagens dos PECs, pois isto favorece a biocompatibilidade deste tipo de materiais²². Adicionalmente, os processos de purificação podem ser dispensados.

Os hidrogéis de PECs são conhecidos por apresentarem um comportamento de inchaço dependente do pH do meio e, numa menor extensão, da força iónica desse mesmo meio. Esta característica possibilita o desenvolvimento de sistemas de libertação sensíveis ao pH. Por outro lado, estudos indicam ainda que as propriedades do quitosano, enquanto material biocompatível e promotor do tratamento de feridas, não se perdem com a formação dos PECs. Adicionalmente, e dependendo do polianião utilizado, os PECs com quitosano são geralmente considerados biodegradáveis⁴.

Por vezes a estrutura dos PECs é reforçada com a introdução de reticulações covalentes entre as várias cadeias poliméricas como, por exemplo, através da reacção entre os grupos funcionais OH, como acontece quando os PECs de

polissacarídeos são tratados com glutaraldeído. Contudo, embora algumas propriedades funcionais e mecânicas possam ser melhoradas com este processo, este tem normalmente um impacto negativo na biocompatibilidade dos PECs²².

Uma das desvantagens na produção deste tipo de sistemas é a grande sensibilidade destes às condições reaccionais (nomeadamente ao pH e força iónica) e às propriedades físico-químicas dos PELs envolvidos o que, aliado à inerente variabilidade dos polímeros naturais, dificulta a reprodutibilidade das propriedades dos PECs de *batch* para *batch* e a sua produção em grande escala.

4.1.4 Complexos polielectrolíticos com quitosano e pectina

A estequiometria da reacção de complexação entre uma polibase fraca e um poliácido fraco, como é o caso do quitosano e da pectina, respectivamente, é determinada essencialmente pelo pH da solução de mistura dos dois PELs, uma vez que o grau de ionização destes é uma função do pH^{4, 22, 24}. De facto, e para que a reacção de complexação possa ocorrer, ambos os PELs têm de apresentar grupos ionizados. Isto significa que a formação de PECs insolúveis é apenas possível em meios com um pH intermédio entre os pK_a 's dos dois polímeros (Figura 4.2), região de pH's onde mais de 50% dos grupos iónicos dos dois PELs se encontram ionizados. Para além do pH, a temperatura, a força iónica, a proporção dos PELs, a agitação e a ordem de adição são factores adicionais que afectam a reacção de complexação. Além disto, as propriedades dos dois PELs, nomeadamente o peso molecular, o grau de acetilação (GA) do quitosano e o grau de esterificação (GE) da pectina, influenciam também a reacção e as propriedades finais dos PECs obtidos.

Variando o pH da reacção (ou seja, o grau de ionização dos dois PELs), é possível obter PECs com diferentes proporções dos dois polímeros. Assim, se os PECs forem formados a valores de pH próximos do pK_a da pectina é possível obter PECs ricos em pectina, com uma carga eléctrica total negativa (com grupos COOH livres, não complexados com grupos NH_3^+). Contrariamente, e se reacção ocorrer a um pH próximo do pK_a do quitosano, obter-se-ão PECs com uma carga total positiva.

As propriedades exibidas por estes PECs serão forçosamente diferentes, nomeadamente o comportamento de inchaço destes com a variação do pH. Desta

forma, variando o pH a que ocorre a reacção é possível produzir PECs com as propriedades mais adequadas para uma determinada utilização.

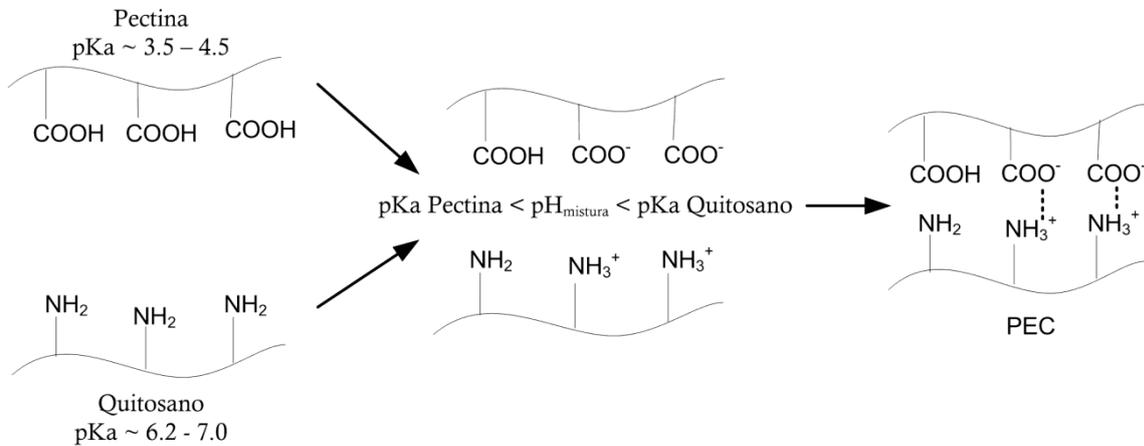


Figura 4.2 Esquema da formação dos complexos polieletrólíticos entre a pectina e o quitosano.

Como já se referiu no Capítulo 3, a maioria dos trabalhos publicados na literatura sobre PECs de pectina e quitosano exploram a utilização destes enquanto possíveis veículos para a libertação específica de substâncias bioactivas no cólon²⁶⁻³¹. Este tipo de sistemas e as suas aplicações foram discutidos no capítulo anterior, na secção dedicada à revisão bibliográfica das aplicações da pectina na formulação de sistemas de libertação de substâncias bioactivas (secção 3.2.1.1).

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados no trabalho desenvolvido neste capítulo, bem como o seu grau de pureza, fornecedor, e número de registo do *Chemical Abstracts Services* (CAS), são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Lista dos reagentes utilizados.

Reagente	Pureza	Marca	CAS
Ácido acético	96%	Merk	64-19-7
Ácido clorídrico	37%	PRONALAB	7647-01-0
Tampão fosfato salino (<i>tablets</i>)	-	Sigma	-
Cloreto de sódio	99.5%	Panreac Química SA	7647-14-15
Acetato de sódio	>99%	SigmaUltra	127-09-3
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCL (EDC)	?	Sigma-Aldrich	25952-53-8
N-Hidroxisuccinimida (NHS)	?	Fluka	6066-82-6
Ácido 2-N-(<i>morfolino</i>) etano sulfónico (MES)	?	Boehringer Mannheim GmbH	4432-31-9
2-N-[<i>morfolino</i>] etano sulfonato de sódio (MESNa)	> 99%	Sigma	71119-23-8
Azida de sódio	99.0%	Aldrich	26628-22-8
Etanol de lavagem	> 96%	Vaz Pereira	64-17-5
Etanol absoluto	> 99.5%	Panreac	64-17-5
Pectina de citrinos	-	Sigma	900-69-5
Quitosano	-	Aldrich	9012-76-4

4.2.2 Especificações dos polissacarídeos utilizados

As principais características dos polissacarídeos utilizados neste trabalho, nomeadamente o grau de esterificação (GE) da pectina e o grau de acetilação (GA) do quitosano, são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Especificações da pectina e quitosano utilizados.

Pectina		Quitosano	
Descrição	Pectina de baixo grau de esterificação, extraída de frutos cítricos	Descrição	Quitosano de peso molecular médio; extraído do exoesqueleto de caranguejos
AGIa (%)	98.0*	GA (%)	23.3 ± 1.2#
GE (%)	41.7**		

* Dado do fornecedor.

** Calculado a partir dos dados do fornecedor.

Calculado a partir da análise elemental.

O grau de de acetilação (GA) do quitosano foi determinado a partir das percentagens de Azoto e Carbono presentes na sua constituição, obtidas por análise elemental. O GA foi calculado pela seguinte fórmula³²:

$$GA(\%) = \frac{C/N - 5.145}{6.861 - 5.145} \times 100$$

Nesta fórmula, C/N representa a razão entre a percentagem de carbono e a percentagem de azoto presentes na amostra de quitosano. O valor 6.861 representa o valor de C/N numa amostra de quitina totalmente acetilada enquanto 5.145 é o valor de C/N numa amostra de quitosano completamente desacetilada.

Os valores de GE, da pectina, e de GA, do quitosano, apresentados na Tabela 4.2, foram utilizados para estimar a quantidade de grupos COOH presentes por grama de pectina e a quantidade de grupos NH₂ por grama de quitosano, valores estes que foram depois utilizados nos cálculos efectuados ao longo deste capítulo. Considerou-se a pectina como sendo apenas constituída por unidades de ácido galacturónico (AGIa) parcialmente metil esterificadas. Isto é uma boa aproximação da realidade pois, e segundo os dados do fornecedor da pectina, esta tem uma percentagem de AGIa de 98.0% (Tabela 4.2).

4.2.3 Procedimento experimental

4.2.3.1 Lavagem e purificação da pectina comercial

Antes de ser utilizada a pectina comercial foi sujeita a um processo de lavagem, para remover eventuais impurezas, cadeias de baixo peso molecular e, simultaneamente, converter os grupos carboxílicos presentes na forma de sais de potássio ou sódio na forma protonada. Neste passo adoptou-se o procedimento descrito por Synytsya *et al*³³.

A pectina comercial foi lavada com 0.1 mol/l de HCl dissolvido numa mistura de etanol /água (1:1, v/v). Seguidamente foi lavada diversas vezes com uma mistura água/etanol (1:1, v/v) e, finalmente, com etanol 96%, sendo filtrada com papel de filtro em cada lavagem. Por fim a pectina purificada foi seca numa estufa de vácuo a 60°C durante 5 dias.

4.2.3.2 *Preparação dos complexos de pectina/quitosano*

A pectina lavada e seca foi dissolvida em água destilada numa concentração de 1% (m/v). O quitosano, tal como fornecido, foi dissolvido numa solução de ácido acético 0.1M, também numa concentração de 1%. Ambas as soluções foram filtradas por um funil com placa de vidro porosa, de forma a remover resíduos de material insolúvel. O pH das duas soluções foi medido com papel indicador de pH, e situava-se entre 3.0 e 3.5, para as soluções de pectina, e entre 3.0 e 4.0, para as soluções de quitosano.

Os PECs de pectina/quitosano foram formados a partir de diferentes proporções iniciais dos dois polissacarídeos (% m/m): 75pectina/25quitosano, 50pectina/50quitosano, 25pectina/75quitosano.

As reacções de complexação processaram-se da seguinte forma: a solução de quitosano (com maior viscosidade) foi vertida para um copo e colocada sobre agitação mecânica (200 a 400 rpm). Seguidamente, adicionou-se rapidamente a solução de pectina a esta solução. Verificou-se imediatamente o aparecimento de zonas opacas, indicando a formação dos complexos entre os dois polímeros. A mistura das duas soluções foi deixada a agitar durante cerca de 20 minutos. Seguidamente, a agitação foi desligada e a mistura, com os PECs em suspensão, foi deixada em repouso durante 24 horas. Passado esse tempo, o sobrenadante foi separado dos PECs por decantação. Isolados os PECs, estes foram sucessivamente lavados com água desionizada. Finalmente, estes foram filtrados com a ajuda de papel de filtro. Depois deste passo, os PECs recolhidos foram colocados em tubos de *Falcon*, congelados a cerca de -20°C, e liofilizados durante 48 horas. Depois de liofilizados, os PECs, já na forma de esponjas, foram guardados num excicador até futura utilização.

4.2.3.3 *Preparação de esponjas de pectina e esponjas de quitosano por tratamento com uma carbodiimida solúvel em água*

Esponjas constituídas apenas por pectina, ou apenas por quitosano, foram também preparadas, através do tratamento destes polímeros com uma carbodiimida solúvel em água, a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCL (EDC).

As esponjas foram preparadas da seguinte forma: soluções de pectina, ou soluções de quitosano, preparadas da mesma forma que as soluções utilizadas na formação dos PECs, foram congeladas e liofilizadas. As esponjas assim obtidas foram

então tratadas com a EDC, numa mistura constituída por 50% etanol e por 50% de solução tampão MES (Ácido 2-N-(morfolino) etano sulfónico (MES)/2-N-(morfolino) etano sulfonato de Sódio (MESNa), C=0.05M, pH= 5.5).

A carbodiimida e o agente nucleofílico *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) foram dissolvidos nesta mistura apenas imediatamente antes de mergulhar as esponjas na mesma. Adicionou-se 5 mmol de EDC por grama de polímero, o que corresponde, para a pectina, a cerca de 1.6 moles de EDC para cada mole de grupos COOH e, para o quitosano, a 1.1 moles de EDC para cada mole de grupos NH₂. As esponjas foram deixadas mergulhadas nesta mistura durante cerca de 24 h, sob agitação magnética. No final da reacção as esponjas foram mergulhadas em água desionizada e colocadas numa membrana de diálise (membrana de celulose, *cut-off* ~ 14 000Da), onde foram dialisadas contra água desionizada durante cerca de 5 dias. Passado este tempo foram congeladas e novamente liofilizadas.

4.2.3.4 Tratamento dos PECs de pectina/quitosano com uma carbodiimida solúvel em água

À semelhança das esponjas de pectina e de quitosano, também alguns PECs de pectina/quitosano foram sujeitos a um tratamento com EDC. Neste caso a reacção deu-se apenas em meio aquoso, numa solução tampão MES, à qual se adicionou EDC e NHS nas proporções já mencionadas anteriormente. Depois de preparados conforme descrito na secção 4.2.3.2, e antes de serem congelados e liofilizados, os PECs foram mergulhados na solução tampão MES e deixados sobre agitação mecânica durante 24h. Estes foram então dialisados contra água destilada durante cerca de 5 dias. No final foram congelados e liofilizados.

Um esquema do procedimento utilizado na obtenção das várias esponjas é apresentado na Figura 4.3.

4.2.3.5 Incorporação da proteína modelo BSA nas esponjas de PECs

Um sistema de libertação à base das esponjas de PECs produzidas foi preparado através da incorporação da proteína modelo BSA nessas mesmas esponjas.

A proteína BSA foi adicionada às esponjas de PECs numa razão de cerca de 10% (massa de BSA/massa de esponja). Para isso preparou-se uma solução de BSA com uma concentração de 25 mg/ml. Dessa solução retirou-se 200 µl e adicionou-se

4.2.3.6 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água, das esponjas produzidas, foi analisada em diferentes meios aquosos: água desionizada; solução salina tampão acidificada (0.01 M HCl, I= 0.1M, pH ~ 2); solução salina tampão acetato (0.01M, I= 0.1M, pH= 4.5); solução salina tampão fosfato (0.01M, I= 0.1M, pH= 7.4). A força iônica das três soluções tampão foi ajustada para 0.1M, utilizando cloreto de sódio.

Pedaços de esponjas, previamente pesados, foram submersos em água desionizada ou nas diferentes soluções tampão usadas e colocados numa estufa a 37°C durante 24 de horas, de forma a atingirem o equilíbrio. Passado esse tempo as esponjas foram removidas dos meios e pesadas logo de seguida.

A quantidade de água ou solução tampão absorvida pelas esponjas foi quantificada pela seguinte fórmula:

$$\text{Absorção de água: (\%)} = \frac{W_{eq} - W_s}{W_s} \times 100$$

Onde, W_{eq} , representa a massa da esponja em equilíbrio e, W_s , a massa da esponja seca.

4.2.3.7 Estudos de perda de massa

De forma a investigar a degradação e/ou dissolução das esponjas produzidas, a perda de massa destas foi registada ao longo do tempo quando mergulhadas numa solução salina tampão fosfato ou numa solução salina tampão acidificada.

Uma série de pedaços de esponjas, previamente pesados, foram colocados em poços de cultura e cobertos com solução salina tampão fosfato (C=0.01 M, I= 0.16M, pH= 7.4) ou solução salina tampão acidificada (0.01 M HCl, I= 0.16M, pH ~ 2). Às soluções tampão adicionou-se previamente azida de sódio na concentração de 0.025% (m/v), de forma a evitar a proliferação de microrganismos.

As placas de poços de cultura com as esponjas foram colocadas numa estufa a 37°C. Regularmente, os meios eram renovados com soluções tampão frescas. Em tempos pré-determinados (0.5, 1, 2, 4 e 6 semanas), algumas esponjas eram retiradas e lavadas cuidadosamente com água desionizada. Depois eram colocadas em *ependorfs*, liofilizadas, e posteriormente pesadas. A perda de massa foi quantificada da seguinte forma:

$$\text{Perda de massa: (\%)} = \frac{W_0 - W_t}{W_t} \times 100$$

Onde, W_0 , é a massa da esponja original e, W_t , a massa da esponja depois de ter estado mergulhada na solução tampão durante o tempo t .

4.2.3.8 *Análise elemental*

As quantidades de Hidrogénio, Carbono, Azoto e Enxofre presentes nas amostras de pectina, de quitosano e nas esponjas produzidas, foi determinada por análise elemental (modelo EA 1108 CHNS-O, Fisons Instruments).

4.2.3.9 *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)*

Os espectros na zona de infravermelhos da pectina, do quitosano e das diferentes esponjas produzidas foram registados pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), num espectrofotometro Magma-IR Spectrometer 750 (Nicolet Instrument Corp.). Os espectros foram registados a 32 scans e a uma resolução de 4 cm^{-1} , entre os números de onda de 4000 e 400 cm^{-1}

4.2.3.10 *Microscopia electrónica de varrimento (SEM)*

A morfologia das diferentes esponjas foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (*scanning electronic microscopy* - SEM). Pedacos das várias esponjas liofilizadas foram colocados em suportes metálicos por meio de fita de carbono adesiva e revestidos com ouro. As análises foram realizadas num espectrómetro electrónico de varrimento JSM-5310 (JEOL, Japão). A diferença de potencial aplicada foi de 20 kV.

4.2.3.11 *Análise térmica: termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varrimento (DSC)*

As propriedades térmicas das esponjas obtidas foram investigadas através das técnicas de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).

As análises de TGA e de DSC foram realizadas simultaneamente num aparelho da TA Instruments (modelo SDT Q600), a funcionar no modo DSC-TGA. As amostras, com pesos entre 3.0 e 4.5 mg, foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas,

a uma taxa de 10°C/min, desde a temperatura ambiente (cerca de 25 °C) até 450°C, sobre uma atmosfera de azoto.

4.2.3.12 Estudos de libertação *in vitro* da proteína BSA

A libertação *in vitro* da BSA a partir das esponjas em forma de disco, cuja preparação foi descrita na secção 4.2.3.5, foi realizada em dois meios: uma solução salina tampão acidificada (pH~ 2.0; 0.01M HCl; 0.15M NaCl, I= 0.16M) e uma solução salina tampão fosfato (pH= 7.4; 0.01M KH₂PO₄/Na₂HPO₄; 0.137M NaCl; 0.0027M KCl; I= 0.16M).

Os discos foram mergulhados em 10 ml de meio de libertação, em tubos de ensaio selados, e colocados numa incubadora a 37± 0.1°C sob agitação orbital de 100 rpm. Uma amostra do meio de libertação (0.5 ml) era retirada em tempos pré-determinados e substituída por um volume igual de meio de libertação fresco.

A proteína libertada ao longo do tempo foi quantificada por espectroscopia UV/VIS, por meio da reacção com o reagente de Bradford e utilizando um protocolo semelhante ao utilizado nos estudos de libertação *in vitro* da BSA a partir dos hidrogéis químicos de pectina (Anexo 3.1)

4.3 Resultados e discussão

Na Figura 4.4 é possível observar o aspecto geral das esponjas de pectina /quitosano preparadas através da complexação polielectrolítica dos dois polissacarídeos. As esponjas, obtidas por liofilização, eram flexíveis e compressíveis.



Figura 4.4 Aspecto das esponjas de pectina/quitosano preparadas por complexação polielectrolítica.

Como foi referido no procedimento experimental, três PECs de pectina/quitosano foram formados a partir de diferentes proporções iniciais dos dois polissacarídeos (% m/m): 75%pectina/25%quitosano, 50%pectina/50%quitosano, 25%pectina/75%quitosano, cujas respectivas esponjas são designadas neste trabalho como pec75/quit25, pec50/quit50, pec25/quit75.

Através dos dados obtidos por análise elemental (apresentados no Anexo 4.1), e nomeadamente a partir da percentagem de azoto presente nas esponjas, na pectina e no quitosano, foi possível calcular a percentagem mássica de quitosano e de pectina presentes nos diferentes PECs (esponjas). Com base nas percentagens obtidas, e tendo em conta o GE da pectina e o GA do quitosano, estimou-se igualmente o número de moles de grupos carboxílicos, $n[\text{COOH}]$, e de grupos amina, $n[\text{NH}_2]$, presentes nos complexos formados. Estes resultados, para os PECs preparados a partir das 3 diferentes proporções dos dois polissacarídeos, são apresentados na Figura 4.5, onde se representa a percentagem mássica de pectina presente nos complexos e a respectiva razão $n[\text{COOH}]/n[\text{NH}_2]$. Ainda na Figura 4.5 estes valores são comparados com os valores teóricos da % mássica de pectina que

os PECs teriam se, durante a reacção de complexação, tanto os grupos carboxílicos da pectina como os grupos amina do quitosano se encontrassem totalmente ionizados, e considerando uma estequiometria reaccional de 1:1, ou seja, cada grupo carboxílico ionizado reage com um grupo amina ionizado ($n[\text{COOH}]/n[\text{NH}_2]=1$).

Como se pode ver pela Figura 4.5, a percentagem mássica de pectina nos três complexos é semelhante, apresentando os valores de $74.3\pm 0.4\%$, $78.0\pm 0.9\%$ e $76.6\pm 1.8\%$, para os PECs pec25/quit75, pec50/quit50 e pec75/quit25, respectivamente. Estes valores correspondem a uma razão $n[\text{COOH}]/n[\text{NH}_2]$ sensivelmente entre 2 e 2.6 (2.05 ± 0.05 , para pec25/quit75; 2.58 ± 0.14 para pec50/quit75; 2.33 ± 0.22 para pec75/quit25).

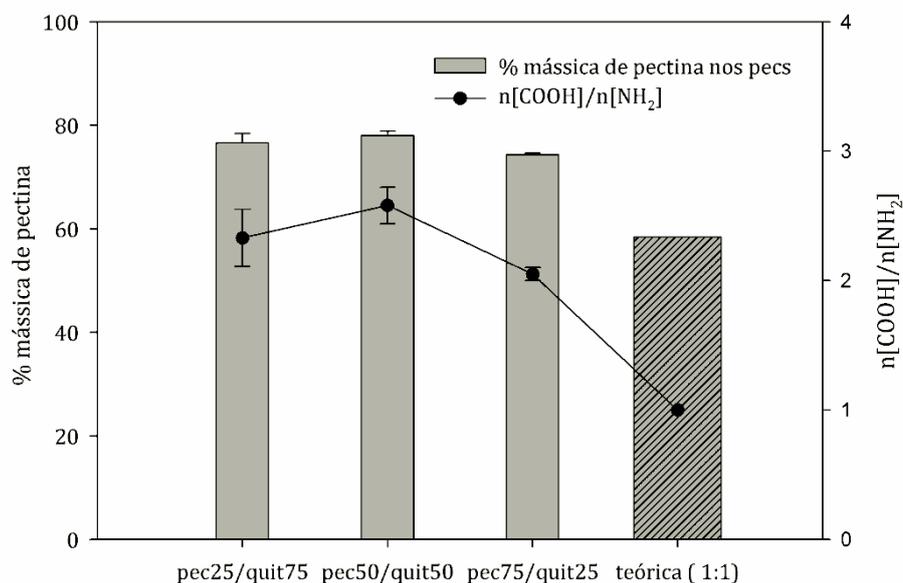


Figura 4.5 Razão entre a quantidade de grupos carboxílicos e amina (pontos), e percentagem mássica de pectina (barras), nos três PECs preparados a partir de diferentes proporções dos três polissacarídeos. Comparação com os valores teóricos que seria esperado obter se o grau de ionização de ambos os polissacarídeos fosse de 100% e a estequiometria da reacção fosse de 1:1.

Estes resultados indicam que a proporção inicial entre os dois polissacarídeos, pelo menos dentro da gama investigada, não afecta grandemente a composição dos PECs obtidos.

A percentagem de pectina nos PECs é superior à esperada (58.4%). Isto e as razões $n[\text{COOH}]/n[\text{NH}_2]$ indicam que o grau de dissociação dos grupos carboxílicos da pectina é inferior a 1. De facto, e embora o pH final das misturas reaccionais dos

PECs não tenha sido determinado exactamente, as medições feitas com papel indicador de pH indicaram que o pH final, nas três reacções, era aproximadamente igual a 4. Como o pKa da pectina se situa entre 3.5 e 4.5 ³⁴, isto significa que numa solução a pH 4 a pectina se encontra apenas parcialmente ionizada. Relativamente ao quitosano, o pKa deste varia entre 6.2 e 7.0 ³⁵, logo a pH 4 praticamente todos os grupos amina do quitosano estão ionizados.

De acordo com Peniche *et al*²⁴ a composição de um PEC entre um políácido fraco [PA] e uma polibase fraca [PB] pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\alpha_{PA} [PA] = \alpha_{PB} [PB]$$

Aqui, [PA] e [PB] são as concentrações molares do políácido e da polibase e, α_{PA} e α_{PB} , são os respectivos graus de dissociação. A partir dos valores de $n[\text{COOH}]/n[\text{NH}_2]$, e considerando que o grau de dissociação do quitosano é igual a um 1, é possível estimar o grau de dissociação da pectina, α_{PA} :

$$\alpha_{PA} = \frac{[PB]}{[PA]} = 1 / \frac{n[\text{COOH}]}{n[\text{NH}_2]}$$

Ou seja, α_{PA} , situa-se entre:

$$\frac{1}{2.58} \leq \alpha_{PA} \leq \frac{1}{2.05}$$

$$0.39 \leq \alpha_{PA} \leq 0.49$$

Estes graus de dissociação, obtidos para um pH sensivelmente igual a 4, são concordantes para um pKa da pectina também sensivelmente ou ligeiramente superior a 4, ou seja, dentro da gama de valores indicada na literatura para o pKa da pectina³⁴.

Na Figura 4.6 encontram-se representados os espectros FTIR-ATR da pectina, do quitosano, a soma ponderada dos espectros dos dois polímeros, e os espectros do PEC pec50/quit50. A região mais informativa destes espectros encontra-se na gama entre os 1800 e 1400 cm^{-1} , pois é nela que aparecem algumas das vibrações atribuídas aos grupos carboxílico e amina. A ampliação desta região encontra-se representada no lado direito da Figura 4.6. Nesta região é possível observar, no espectro da pectina (Figura 4.6a), a vibração de alongamento do grupo C=O nos

grupos carboxílicos não ionizados e esterificados com o grupo metilo (1732 cm^{-1}) e, a cerca de 1625 cm^{-1} , a vibração de alongamento assimétrica do grupo C=O nos grupos carboxílicos ionizados^{36, 37}. A presença desta última banda indica que uma parte dos grupos carboxílicos se encontra ainda na forma de sal (de iões Na^+ ou K^+), apesar de a pectina ter sido lavada com uma solução etanólica de HCl. No espectro do quitosano são também visíveis duas bandas nesta região (Figura 4.6b). A primeira, a cerca de 1640 cm^{-1} , é atribuída à vibração de alongamento do grupo carbonilo dos grupos amida (Amida I), presentes nas unidades acetiladas deste polímero. A segunda banda, centrada a cerca de 1543 cm^{-1} , é o resultado da sobreposição de duas vibrações: as vibrações das ligações N-H e C-N do grupo amida (designada por Amida II), e a vibração de deformação da ligação N-H das amins primárias presentes nas unidades desacetiladas^{38, 39}. Na Tabela 4.3 encontram-se resumidas a atribuição destas bandas.

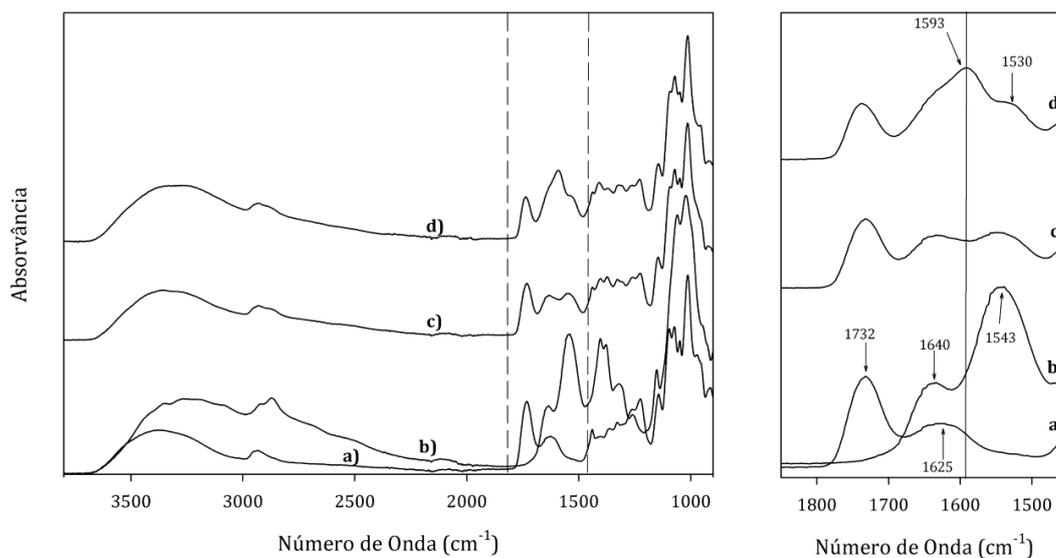


Figura 4.6. Espectros FTIR-ATR de: a) Pectina; b) Quitosano; c) Soma ponderada dos espectros de pectina e quitosano ($0.75\text{pectina} + 0.25\text{quitosano}$); c) PECs de pectina e quitosano (pec50/quit50). Lado direito: ampliação da região dos espectros entre 1450 e 1850 cm^{-1} .

Ainda na Figura 4.6 é possível observar o espectro resultante da soma ponderada dos espectros de pectina e quitosano. Atribuiu-se um peso de 0.75 ao espectro de pectina e 0.25 ao espectro de quitosano de forma a simular, aproximadamente, as proporções mássicas de pectina e quitosano presentes nos PECs, tal como se viu anteriormente. No espectro resultante (Figura 4.6c), e na

região entre 1800 e 1400 cm^{-1} , encontram-se três bandas: a primeira provém do espectro da pectina e é atribuída à vibração ν C=O dos grupos carboxílicos não ionizados e esterificados com o grupo metilo. A segunda banda nesta região resulta da soma das bandas atribuídas à vibração Amida I, do quitosano, e à vibração ν_{as} C=O dos grupos carboxílicos ionizados da pectina. A terceira banda provém do espectro do quitosano, correspondendo às vibrações Amida II e δ (N-H) dos grupos amina.

Tabela 4.3 Atribuição das bandas nos espectros de FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs.

n.o (cm^{-1})	Atribuição	Referências
Pectina		
1732	ν C=O (COOH e COOCH ₃)	37
1625	ν_{as} C=O (COO ⁻)	36
Quitosano		
1640	ν C=O grupo amida (Amida I)	38, 39
1543	δ (N-H) + ν (C-N) grupo amida (Amida II) δ (N-H) grupos amina (NH ₂)	
PECs		
1593	δ_{as} (N-H) grupos amina protonados (NH ₃ ⁺)	38, 40, 41
1530	δ (N-H) + ν (C-N) grupo amida (Amida II) δ_s (N-H) grupos amida protonados (NH ₃ ⁺) δ (N-H) grupos amina (NH ₂)	

ν -elongamento; δ -deformação; *s* -simétrico; *as* - assimétrico.

O espectro dos PECs de pectina/quitosano (Figura 4.6d) difere do espectro resultante da soma dos espectros dos dois polissacarídeos. No espectro dos PECs é possível observar o aparecimento de uma banda com uma forte intensidade, com um pico a cerca de 1593 cm^{-1} , que se sobrepõe a todas as bandas presentes nessa região. De acordo com a literatura, esta vibração pode ser atribuída à deformação assimétrica da ligação N-H dos grupos amina protonados (NH₃⁺), δ_{as} (N-H), a qual está situada entre 1625 e 1560 cm^{-1} 38, 40. Esta vibração encontra-se sobreposta com a vibração ν_{as} C=O dos grupos COO⁻ da pectina e a vibração Amida I do quitosano. Ainda de acordo com a literatura, o “ombro” que aparece a cerca de 1530 cm^{-1} pode ser atribuído à deformação simétrica da ligação N-H dos grupos amina protonados (NH₃⁺), δ_s (N-H), situada entre 1550 e 1505 cm^{-1} 38, 40. Esta vibração encontra-se sobreposta com a vibração Amida II do quitosano e, possivelmente, com as vibrações δ (N-H) de alguns grupos amina não protonados.

Vários autores têm referido o aparecimento de diferentes bandas nesta região como prova da formação de PECs (ou seja, do estabelecimento de ligações iônicas entre os grupos COO^- e os grupos NH_3^+). No entanto, tal como nota Lawrie *et al*³⁸, o aparecimento de bandas associadas às vibrações dos grupos COO^- e NH_3^+ não prova, por si só, a formação de ligações iônicas entre estes dois grupos.

Na Figura 4.7 é possível observar os espectros FTIR-ATR dos três PECs preparados a partir de diferentes proporções iniciais dos dois polissacarídeos. Verifica-se que os três espectros são idênticos, não existindo nenhuma diferença identificável. As proporções entre as bandas, nomeadamente entre as atribuídas à pectina e as atribuídas ao quitosano, mantêm-se constantes nos três espectros. Esta observação corrobora os resultados obtidos por análise elemental que, e como já se viu, revelaram que a composição dos três PECs é muito semelhante.

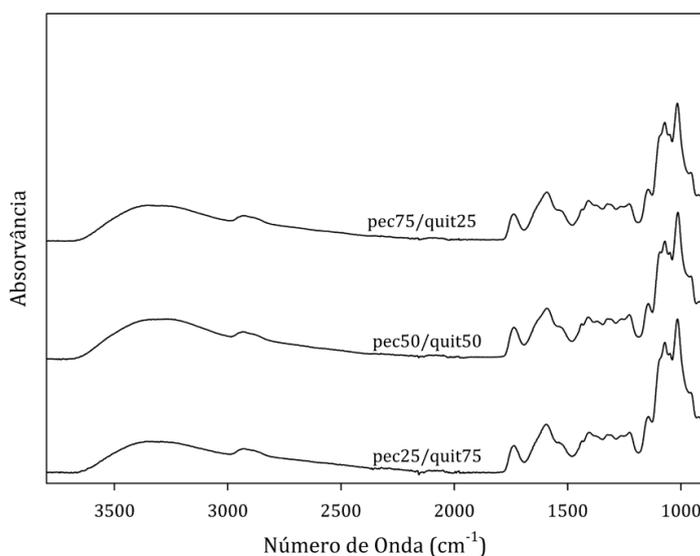


Figura 4.7 Espectros FTIR-ATR das esponjas dos PECs de pectina/quitosano produzidos.

Como se referiu, algumas esponjas de PECs foram sujeitas a um tratamento adicional com uma carbodiimida solúvel em água, a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCL (EDC).

As carbodiimidas solúveis em água, especialmente a EDC, são frequentemente utilizadas em química orgânica como agentes reticulantes de ordem zero na síntese de péptidos ou na imobilização de diferentes moléculas em suportes sólidos⁴². Numa reacção típica, a carbodiimida reage com os grupos carboxílicos de outras moléculas, dando origem a uma espécie intermediária altamente reactiva – a *O*-acilisoureia.

Esta por sua vez reage com grupos nucleófilos, especialmente com aminas primárias, formando dessa forma uma ligação amida. Para além de grupos amina este intermediária reage com outros grupos nucleófilos como grupos sulfídrico (SH) e hidroxilo (OH).

A EDC tem sido utilizada também para preparar filmes e hidrogéis de vários polissacarídeos com grupos carboxílicos, por auto-reticulação destes através da formação de ligações éster entre grupos COOH e OH. Exemplos disto são a preparação de filmes de ácido hialurónico^{43, 44}, de poli(ácido galacturónico)⁴⁵ ou de misturas de ácido hialurónico com alguns derivados de celulose^{46, 47}. Normalmente, e à semelhança do procedimento adoptado neste trabalho, os polissacarídeos são primeiramente dissolvidos numa solução aquosa e processados na forma de filmes ou esponjas através de secagem ou liofilização. Estes filmes ou esponjas são então tratados com EDC numa mistura etanólica/aquosa. No final do processo obtêm-se filmes ou esponjas insolúveis em água.

Como foi concluído anteriormente, os PECs obtidos apresentavam grupos carboxílicos livres, ou seja, que não estabeleceram ligações iónicas com os grupos amina protonados do quitosano, devido a não se encontrarem ionizados durante a ocorrência da reacção de complexação. Assim seria de esperar que, e devido ao tratamento com EDC, ocorre-se um processo de reticulação entre os grupos carboxílicos livres da pectina e os grupos OH, da pectina ou do quitosano.

Na Figura 4.8 encontra-se um esquema do possível mecanismo de reacção da pectina com a EDC, baseado no esquema proposto por Nakajima & Ikada⁴⁸ para a reacção entre as carbodiimidas e os grupos carboxílicos em meio aquoso.

No mecanismo proposto por Nakajima & Ikada⁴⁸, a reacção em meio aquoso entre uma carbodiimida e um grupo carboxílico requer que este último se encontre ionizado e, adicionalmente, que existam protões em solução (i.e., um meio ácido), pois a carbodiimida tem de reagir com um protão para formar um carbocatião (2). Este carbocatião reagirá então com um grupo carboxílico ionizado para formar o intermediário altamente reactivo *O*-acilisourea (3). Na presença de grupos nucleófilos, neste caso os grupos OH da pectina, o intermediário (3) reage com estes dando origem à pectina reticulada por uma ligação éster (4) e a uma molécula de ureia (5). Porque o intermediário *O*-acilisourea é extremamente instável, mesmo na presença de grupos nucleófilos este facilmente se rearranja dando origem ao

derivado estável *N*-acilureia (7). Para minorar a extensão desta reacção secundária indesejada é normalmente adicionado à mistura reaccional um agente nucleófilo, como o *N*-Hidroxisuccinimida (NHS), que actua como estabilizante do composto (3). Por outro lado, a *O*-acilisoureira pode reagir também com outro grupo carboxílico originando uma molécula de ureia e um anidrido carboxílico (6) que, por sua vez, pode reagir com um grupo OH e originar o produto desejado (pectina reticulada).

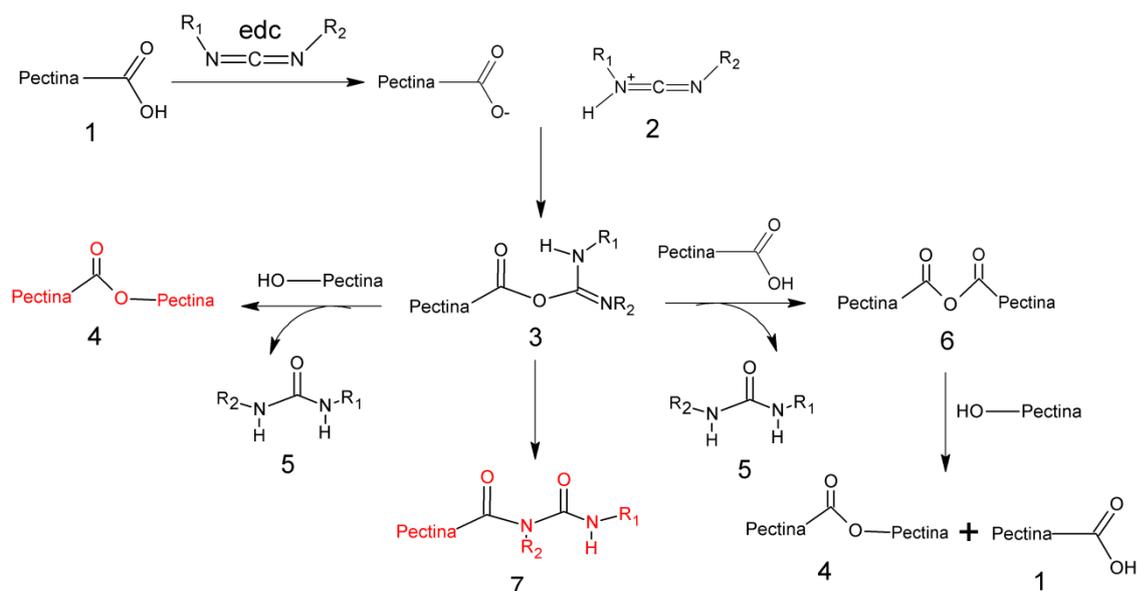


Figura 4.8 Esquema das possíveis reacções da pectina com a carbodiimida solúvel em água EDC. (1) pectina; (2) carbocatião (3) *O*-acilisoureira; (4) pectina auto-reticulada através de uma ligação éster; (5) ureia; (6) anidrido carboxílico; (7) pectina ligada a grupos *N*-acilureia estáveis.

Os espectros FTIR-ATR dos PECs tratados com EDC são apresentados na Figura 4.9, onde podem ser comparados com os espectros dos respectivos PECs não tratados com EDC. Como se pode observar, os espectros dos PECs tratados são em tudo semelhantes aos espectros dos PECs não tratados, o que sugere que o tratamento com EDC não resultou em modificações químicas significativas (modificações que, e de acordo com o esquema reaccional proposto na Fig.4.8, poderiam ser a formação de grupos ésteres, resultantes da reacção entre os grupos COOH e o grupos OH, ou introdução de grupos *N*-acilureia, devido ao rearranjo do intermediário da reacção *O*-acilisoureira).

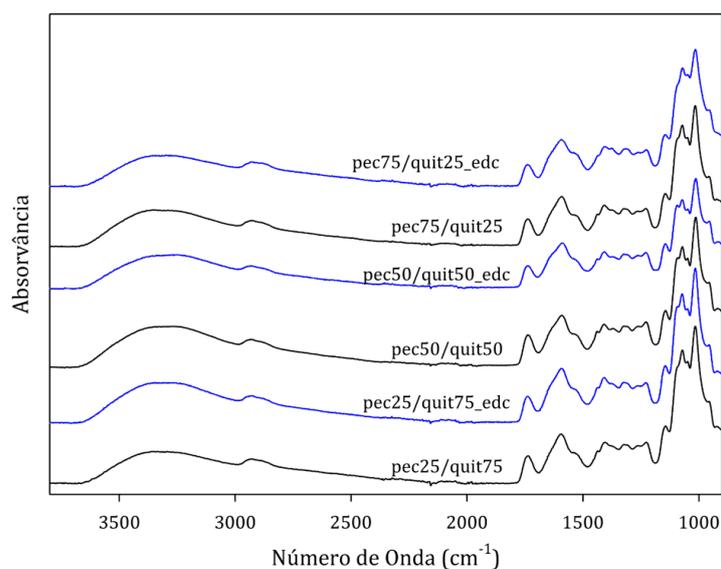


Figura 4.9 Espectros FTIR-ATR dos PECs de pectina/quitosano (linhas a preto) e dos PECs de pectina/quitosano tratados com a carbodiimida EDC (linhas a azul).

Contudo, e apenas com base nos espectros FTIR, não se pode concluir que não tenha ocorrido, pelo menos numa pequena extensão, uma modificação dos PECs, pois as bandas da pectina e do quitosano, situadas na região entre os 1400-1800 cm^{-1} , encobrem as possíveis bandas correspondentes à modificação dos PECs com EDC (ν C=O das ligações éster ou as bandas Amida I e Amida II dos grupos amida da N-acilureia).

Relativamente aos resultados da análise elemental estes revelam um pequeno aumento da percentagem de azoto nos PECs tratados com EDC relativamente aos PECs não tratados (Tabelas A.4.1.3 e A.4.1.4, Anexo 4.1). Contudo também não se pode afirmar com certeza que este aumento é devido à introdução de alguns grupos N-acilureia nos PECs tratados com EDC. Isto porque este aumento também pode ser atribuído ao aumento relativo da percentagem de quitosano nos PECs, devido à perda de alguma pectina durante o processo reaccional e o processo de diálise.

Adicionalmente às esponjas de PECs foram produzidas esponjas constituídas apenas por pectina ou apenas por quitosano, as quais foram preparadas através do tratamento com EDC de amostras de pectina ou de quitosano liofilizados.

Na Figura 4.10 são comparados os espectros FTIR-ATR da pectina original e das esponjas de pectina obtidas através do tratamento com EDC (Pectina-edc). Como se pode ver, no espectro correspondente à pectina-edc surge uma terceira banda na

região entre os 1800-1400 cm^{-1} . Esta banda, com um pico a cerca de 1540 cm^{-1} , encontra-se situada na região correspondente à vibração Amida II dos grupos amida. Adicionalmente nota-se um aumento da intensidade da banda situada entre 1620 - 1650 cm^{-1} atribuída, na pectina original, à vibração de alongamento assimétrica do grupo C=O nos grupos carboxílicos protonados ($\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{O}$). Considerando que nesta mesma zona do espectro se manifesta a vibração Amida I, o aumento da intensidade desta banda resulta provavelmente da sobreposição das vibrações $\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{O}$ e Amida I. O aparecimento destas novas vibrações sugere a presença de grupos amida na pectina-edc o que, e de acordo com esquema reaccional apresentado na Figura 4.8, indica presença de cadeias de pectina ligadas covalentemente a grupos *N*-acilureia (produto reaccional (7), Figura 4.8), resultantes do rearranjo do intermediário *O*-acilisoureira. Este resultado é corroborado pelos dados de análise elemental (Anexo 4.1, Tabela A.4.1.2), onde se detectou uma percentagem de 2.317% de azoto nas amostras de pectina_edc. Considerando que a pectina apresenta apenas uma percentagem residual de azoto (0.696 ± 0.023 , Tabela A.4.1.1, Anexo 4.1), este aumento pode ser atribuído ao grupo *N*-acilureia.

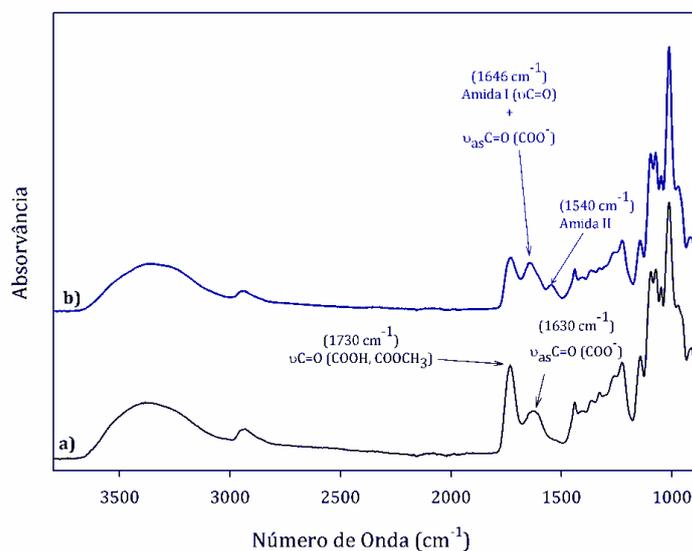


Figura 4.10 Espectros FTIR-ATR de: a) pectina; b) pectina tratada com EDC.

Infelizmente através dos espectros FTIR-ATR não é possível identificar evidências da ocorrência da reacção pretendida, isto é, da auto-reticulação da pectina através da formação de ligações ésteres intra e intermoleculares. Isto porque a pectina apresenta uma forte banda a cerca de 1730 cm^{-1} , correspondente

precisamente à vibração $\nu_{C=O}$ dos grupos carboxílicos metil esterificados e dos grupos carboxílicos não ionizados, a qual se sobrepõe a uma possível banda que possa surgir na pectina_edc devido às ligações ésteres.

Assim, os resultados de FTIR-ATR e da análise elemental parecem indicar que a reacção que ocorreu em maior extensão foi a transformação do intermediário *O*-acilisoureira numa *N*-acilureia estável covalentemente ligada à pectina. A grande extensão desta reacção, que não era a pretendida, tem provavelmente várias causas. Uma delas pode ser as condições heterogéneas em que ocorre a reacção. Como a EDC reage com o polissacarídeo em estado sólido, as cadeias de pectina apresentam uma mobilidade reduzida. Devido a isto, a probabilidade dos grupos *O*-acilisoureira formados “encontrarem” grupos OH para reagirem também é reduzida. Não encontrando um grupo nucleófilico com quem reagir este intermediário instável transformá-se-à, mais cedo ou mais tarde, numa outra espécie mais estável, neste caso a *N*-acilureia.

Igualmente, o quitosano liofilizado foi sujeito a um tratamento com EDC, em condições reaccionais semelhantes às realizadas com a pectina.

Uma das reacções conhecidas das carbodiimidias é a reacção destas com grupos amina primários dando origem a guanidinas^{49, 50}. Assim, como o quitosano apresenta grupos amina primários, uma das possíveis reacções deste com a EDC é a introdução na estrutura do quitosano de grupos guanidina (Figura 4.11). Berrada⁴⁹ preparou hidrogéis de quitosano guanidinizado, precisamente através da reacção entre os grupos amina do quitosano e a carbodiimida EDC. A reacção ocorreu em meio homogéneo, a valores de pH perto da neutralidade (6.3- 7.1), à temperatura ambiente e na presença do agente nucleófilico NHS que, segundo Berrada⁴⁹ actua como catalisador da reacção.

Refira-se que o quitosano guanidinizado, bem como outros polissacarídeos guanidinizados, são materiais com características muito interessantes, conferidas pelas propriedades dos grupos guanidina. Estes encontram-se carregados positivamente a pH fisiológico, o que é um propriedade interessante para muitas aplicações biomédicas. Adicionalmente estes materiais apresentam uma enorme capacidade de absorção de água, sendo utilizados em diversas aplicações enquanto materiais superabsorventes⁴⁹.

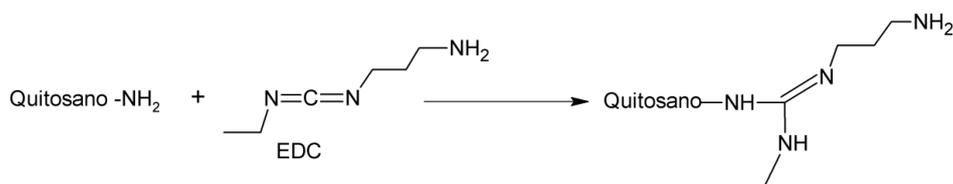


Figura 4.11 Esquema da possível reacção do quitosano com a carbodiimida EDC.

Na Figura 4.12 apresentam-se os espectros FTIR-ATR do quitosano e das esponjas de quitosano tratadas com EDC (quitosano-edc). Observa-se que existem diferenças significativas entre os dois espectros.

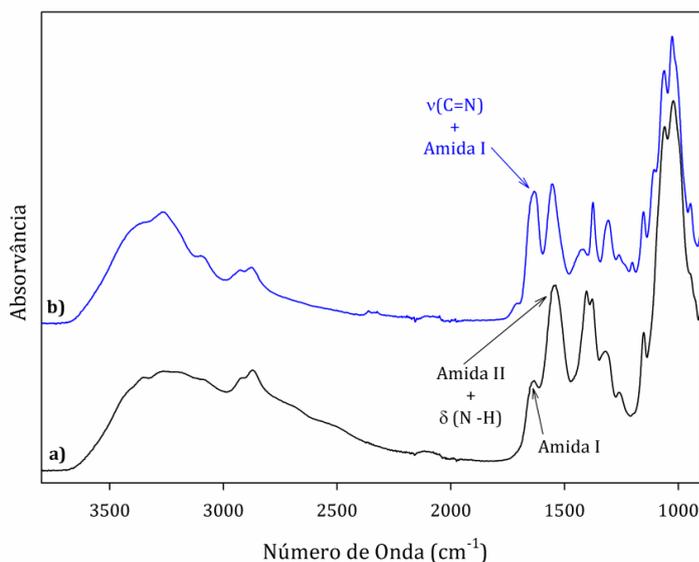


Figura 4.12 Espectros FTIR-ATR de: a) quitosano; b) quitosano tratado com EDC.

Uma das alterações que pode evidenciar a introdução de grupos guanidina no quitosano é o aumento da intensidade da banda situada a cerca de 1640 cm^{-1} , que, no quitosano não modificado, corresponde à banda Amida I. A intensificação desta banda pode ser atribuída à vibração de alongamento do grupo C=N da guanidina que, e de acordo com a literatura, aparece entre 1690 e 1640 cm^{-1} ⁵⁰. Contudo, a percentagem de azoto nestas esponjas, determinada por análise elemental (resultados apresentados na Tabela A.4.1.2, Anexo 4.1) é igual à apresentada pelo quitosano original (Tabela A.4.1.1, Anexo 4.1). Este resultado contraria a hipótese da introdução de grupos guanidina nas esponjas quitosano_edc. No entanto apenas através dos espectros FTIR-ATR e de análise elemental é impossível concluir com certeza se esta reacção ocorreu ou não. Contudo, os espectros FTIR indicam claramente que ocorreu uma modificação química da estrutura do quitosano devido

ao tratamento deste com a EDC. É provável que possam ter ocorrido outras reacções, envolvendo a EDC, os grupos amina do quitosano e, possivelmente, também os grupos OH deste. Infelizmente não se encontrou na literatura qualquer informação elucidativa sobre que tipo de reacções em meio aquoso as carbodiimididas se podem envolver com compostos que apresentem grupos amina e grupos OH.

Na Figura 4.13 encontram-se os resultados dos testes de absorção de água realizados com as esponjas dos PECs de pectina/quitosano (pec75/quit25). Observa-se que as capacidades de absorção de água são bastante idênticas para todos os meios, excepto para o meio a pH 2, onde se obteve uma percentagem de absorção de água ligeiramente superior às restantes. Curiosamente, e considerando que os PECs formados possuem grupos carboxílicos livres, seria de esperar que, a este valor de pH, a capacidade de absorção de água fosse mais reduzida, pois neste meio os grupos COOH não se encontram ionizados, ao contrário do que acontece a pH 7.4, onde estes se encontram completamente ionizados. No entanto, e globalmente, os resultados indicam que a absorção de água por parte das esponjas é pouco sensível às variações de pH, pelo menos na gama de pHs investigada.

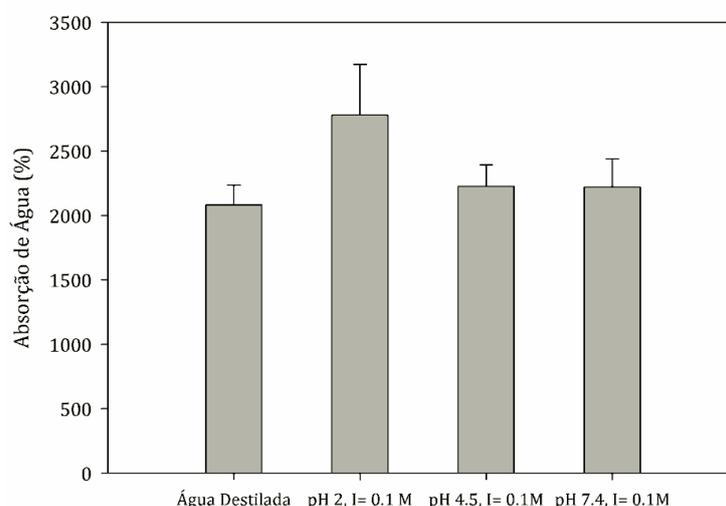


Figura 4.13 Capacidade de absorção de água das esponjas de pectina/quitosano (pec75/quit25) em água destilada, solução salina tampão acidificada (pH 2), solução salina tampão acetato (pH 4.5), e solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP; n=3.

Na Figura 4.14 apresentam-se os resultados de absorção de água das esponjas de pectina e das esponjas de quitosano tratadas com a carbodiimida EDC (Pectina-edc e Quitosano-edc). Contrariamente às esponjas dos PECs formados por

estes dois polissacarídeos, a absorção de água destas esponjas parece ser mais sensível ao pH do meio, especialmente no caso das esponjas Quitosano-edc.

As esponjas Pectina-edc são menos sensíveis ao pH pois, comparativamente com o quitosano, apresentam uma menor densidade de grupos iónicos. Contudo observa-se que estas absorvem uma quantidade de água ligeiramente maior quando mergulhadas em água destilada e em solução salina tampão fosfato (pH 7.4), do que quando mergulhadas nas soluções salinas tampão acidificada (pH 2) e soluções salinas tampão acetato (pH 4.5). Este comportamento é esperado para uma esponja com um carácter aniónico como é o caso da Pectina-edc, sendo este semelhante ao observado com os graus de inchaço dos hidrogéis químicos de pectina desenvolvidos no capítulo anterior. As razões para este comportamento foram já discutidas na secção dos Resultados e Discussão do Capítulo 3.

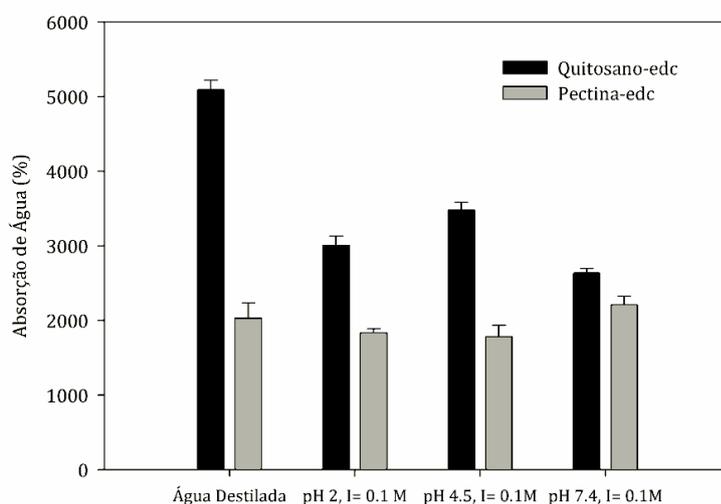


Figura 4.14 Capacidade de absorção de água das esponjas Quitosano-edc e Pectina-edc em água destilada, solução salina tampão acidificada (pH 2), solução salina tampão acetato (pH 4.5), e solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP; n=3.

Relativamente ao comportamento de absorção de água das esponjas Quitosano-edc observa-se que estas absorvem uma maior quantidade de água nos meios ácidos e em água destilada do que na solução tampão fosfato. Este comportamento pode ser interpretado considerando apenas as características dos grupos amina presentes no quitosano. Como o pKa destes se situa entre 6.3 e 7.4, a quase totalidades destes encontra-se no estado ionizado a pH 2 e pH 4.5. Isto origina forças de repulsão electrostáticas, que conduzem à absorção de uma maior quantidade de água, como forma de minimizar essas mesmas forças.

Contrariamente, a pH 7.4, a maior parte dos grupos amina não se encontra ionizado, o que significa que as repulsões electrostáticas são menos intensas, conduzindo a que as esponjas mergulhadas neste meio absorvam uma menor quantidade de água.

A perda de massa das esponjas PECs (pec50/quit50), e dos PECs tratados com EDC (pec50/quit50_edc), quando mergulhadas numa solução salina acidificada (pH 2), ou numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4), foi monitorizada ao longo do tempo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.15.

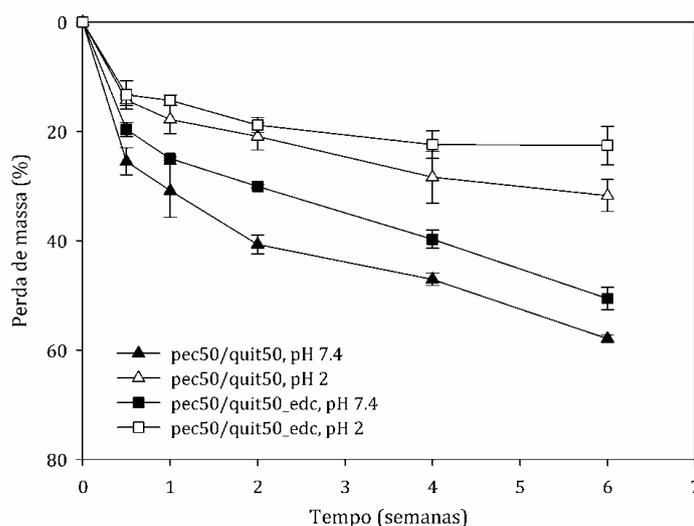


Figura 4.15 Perda de massa ao longo do tempo dos PECs (pec50/quit50) e dos PECs tratados com EDC (pec50/quit50_edc) quando mergulhados numa solução salina tampão acidificada (pH 2) ou numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP, n=3.

Para todas as esponjas observa-se uma perda de massa significativa nos primeiros três dias (0.5 semanas) e que provavelmente é causada pela dissolução da fracção dos polissacarídeos fracamente complexados. A partir da meia-semana, e até às 6 semanas de duração do ensaio, os PECs perdem massa a uma taxa sensivelmente constante, sendo essa taxa maior para as esponjas mergulhadas na solução tampão fosfato do que na solução acidificada.

Esta perda de massa é o resultado de dois fenómenos: a dissolução das cadeias dos dois polissacarídeos e a degradação química das mesmas. Devido à natureza lábil das ligações iónicas, as ligações estabelecidas entre os grupos COO⁻ da pectina e NH₃⁺ do quitosano vão sendo perdidas, originando cadeias livres dos dois polissacarídeos, que se dissolvem no meio aquoso. Por outro lado, as ligações glicosídicas dos polissacarídeos são susceptíveis de degradação química, originando

fracções de polissacarídeos de baixo peso molecular, que mais facilmente se dissolvem no meio aquoso. Infelizmente, só com estudos de perda de massa é impossível determinar qual o peso da degradação química nos resultados da perda de massa dos complexos. Para isso teria sido necessário monitorizar as alterações dos pesos moleculares dos dois polissacarídeos ao longo do tempo na fracção de massa solubilizada, por exemplo, através de cromatografia de exclusão de tamanhos.

Apesar desta limitação, é possível tirar algumas conclusões importantes a partir dos estudos de perda de massa. Neste estudo verifica-se que, no final das 6 semanas, as esponjas dos PECs (não tratados e tratados) perdem entre 20 a 30% da sua massa inicial, quando mergulhadas na solução salina acidificada. Quando mergulhadas em soluções salinas tampão fosfato este valor aumenta para 50 a 60%, o que é uma indicação de que os PECs são mais estáveis a pH 2 do que a pH 7.4.

Os espectros FTIR-ATR das esponjas nos diferentes tempos de degradação, a pH 2 e pH 7.4, foram registados. Os resultados, para o pec50/quit50, são apresentados na Figura 4.16.

Como se pode ver pela Figura 4.16b, os espectros das esponjas mergulhadas na solução tampão salina acidificada mantêm-se idênticos ao longo de todo o tempo de degradação. Contrariamente, os espectros FTIR-ATR das esponjas mergulhadas em solução tampão salina fosfato alteram-se com o tempo. A região entre 1200 e 1500 cm^{-1} , onde o espectro é o resultado da soma de uma série de bandas atribuídas à pectina e ao quitosano, altera-se com o tempo devido à diminuição da intensidade das bandas associadas à pectina (ver Figura 4.6).

Ainda nos espectros a pH 7.4 observa-se, com o aumento do tempo, a diminuição da intensidade da banda situada a 1737cm^{-1} , associada às vibrações do grupo C=O da pectina. A razão, ao longo do tempo, entre a intensidade desta banda e a banda associada à vibração de deformação assimétrica dos grupos amina protonados (NH_3^+) do quitosano ($\delta_{\text{as}}(\text{N-H})$; 1593 cm^{-1}) é representada na Figura 4.17a). Neste gráfico observa-se que, para as esponjas mergulhadas em solução salina tampão fosfato, esta razão diminuiu com o tempo. Contrariamente, e para as esponjas mergulhadas na solução tampão acidificada, esta razão mantém-se sensivelmente constante.

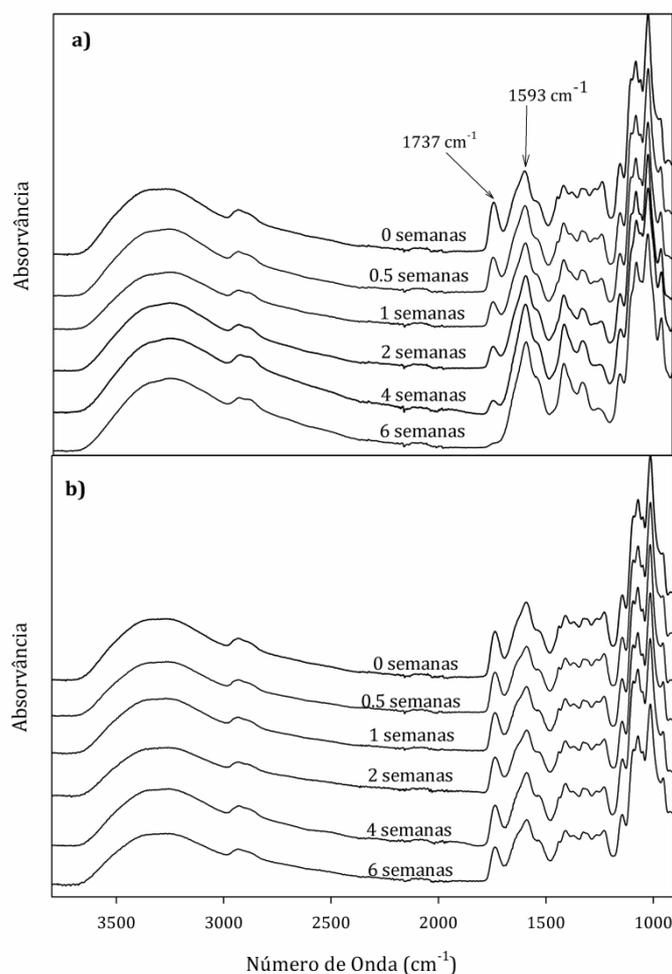


Figura 4.16 Espectros FTIR-ATR dos PECs (pec50/quit50) após se terem encontrado mergulhados, durante 0, 0.5, 1, 2, 4 e 6 semanas, em: a) Solução salina tampão fosfato (pH 7.4); b) Solução salina tampão acidificada (pH 2).

Assim, estes resultados de FTIR-ATR indicam que, a pH 2, a composição dos PECs se mantém sensivelmente constante ao longo do tempo de degradação, ou seja, que a perda de massa que ocorre se deve tanto à perda de cadeias de pectina como de quitosano, ao contrário do que acontece a pH 7.4, onde a perda de pectina é superior à perda de quitosano. Este comportamento é ainda confirmado com os resultados de análise elemental, apresentados na Figura 4.17b), onde a razão entre a percentagem de azoto e carbono nas esponjas, %N/C, é representada em função do tempo de degradação. Neste gráfico observa-se que, a pH 2, a razão %N/C aumenta apenas ligeiramente durante as 6 semanas, indicando que as proporções de pectina e quitosano nas esponjas não se alteram grandemente. Pelo contrário, a pH 7.4 observa-se um aumento significativo da razão %N/C com o tempo, reflectindo o aumento, na composição dos PECs, da proporção de quitosano. Estes valores

correspondem a uma diminuição de cerca de 5% na composição de pectina nos PECs a pH 2 (de $78.5 \pm 1.0\%$ (m/m) na semana 0, para $73.7 \pm 1.3\%$ na semana 6), e uma diminuição de cerca de 20% em pH 7.4 (de $78.5 \pm 1.0\%$ (m/m) na semana 0, para $59.8 \pm 2.9\%$ na semana 6).

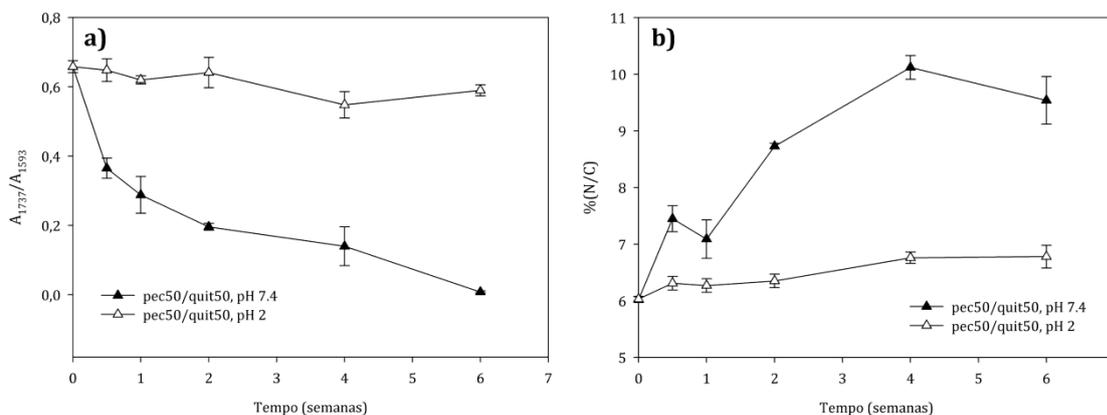


Figura 4.17 a) Razão entre a intensidade das bandas 1737 e 1593 cm^{-1} , nos espectros FTIR-ATR das esponjas pec50/quit50, em função do tempo de degradação, a pH2 e pH 7.4. b) Razão entre a quantidade de azoto e carbono presente nas esponjas pec50/quit50 em função do tempo de degradação, a pH 2 e pH 7.4.

Estes diferentes comportamentos podem ser explicados considerando o estado de dissociação dos grupos COOH da pectina e dos grupos NH_2 do quitosano nos diferentes meios. Como se concluiu anteriormente, os PECs produzidos apresentam ainda grupos COOH livres que não estão envolvidos em ligações iónicas com os grupos amina do quitosano. A pH 2 estes grupos não se encontram ionizados, encontrando-se envolvidos em ligações por pontes de hidrogénio com os grupos OH da própria pectina ou do quitosano. Estas ligações reforçam e estabilizam as ligações das cadeias de pectina às cadeias de quitosano. Por outro lado, e a pH 7.4, os grupos COOH da pectina encontram-se completamente ionizados, o que implica a perda das ligações por pontes de hidrogénio. Nestas condições, as cadeias de pectina encontram-se mais livres o que, associado à menor densidade de reticulação iónica destas relativamente às cadeias de quitosano, conduz a que as cadeias de pectina se libertem mais facilmente das ligações estabelecidas com o quitosano e que, conseqüentemente, se dissolvam no meio aquoso. Adicionalmente, a pH 7.4, os grupos amina do quitosano que se libertam das ligações iónicas estabelecidas com os grupos carboxílicos evoluem para o estado não protonado, limitando a solubilidade do quitosano no meio aquoso. Assim, estes dois factores combinados

podem ser a causa porque a perda de massa dos PECs a pH 7.4 se deva maioritariamente à perda de pectina.

Note-se que, a pH 7.4, mesmo que a composição dos PECs não se alterasse, seria de esperar, nos espectros FTIR-ATR, que a intensidade da banda a 1737cm^{-1} diminuísse até um certo limite, devido à alteração do estado dos grupos carboxílicos de não ionizados para ionizados pois, como já se referiu, esta banda corresponde à vibração de alongamento do grupo C=O nos grupos carboxílicos não ionizados e esterificados com o grupo metilo. No entanto, como se pode ver nos espectros FTIR-ATR a pH 7.4, esta banda quase que desaparece, no final da sexta semana, o que parece indicar que quase não existe pectina nos complexos, ou que a grande maioria das unidades de AGIa metilesterificadas sofreu um processo de deesterificação. No entanto é pouco provável que isto tenha acontecido, pois esta reacção dá-se sobretudo em meio ácido (ver secção 3.1.4.3 do capítulo 3). Por outro lado, os resultados de análise elemental indicam que, embora exista uma diminuição da proporção de pectina nos complexos, no final das 6 de semanas a pectina continua a estar presente nos complexos em cerca de 60%. Assim, torna-se plausível atribuir o quase desaparecimento da banda a 1737cm^{-1} ao surgimento de variações espaciais da composição de pectina nos complexos, ou seja, com o tempo, o interior das esponjas apresentará uma maior quantidade de pectina do que as zonas superficiais destas. Isto porque, à superfície, as cadeias de pectina que se libertam das ligações iónicas rapidamente se dissolvem no meio aquoso enquanto que, no interior das esponjas, estas têm de se difundir até à superfície de forma a serem libertadas. Isto, e o facto de o quitosano ser praticamente insolúvel a pH 7.4, pode originar a que as regiões superficiais das esponjas sejam constituídas maioritariamente por quitosano. Desta forma, e devido ao modo ATR de aquisição dos espectros FTIR, justifica-se a acentuada atenuação com o tempo da intensidade das vibrações correspondentes à pectina, nomeadamente a vibração a 1737cm^{-1} .

Em relação às esponjas de PECs tratadas com EDC, o comportamento de perda de massa destas ao longo do tempo, tanto em solução salina tampão acidificada como em solução salina tampão fosfato, é semelhante ao exibido pelas esponjas não tratadas (ver Figura 4.15), embora neste caso a percentagem de massa perdida ao longo do tempo seja ligeiramente inferior. Igualmente, os espectros de FTIR-ATR destas esponjas ao longo do tempo de degradação, a pH 2 e pH 7.4

(representados na Figura 4.18), são idênticos aos observados para as esponjas formadas pelos complexos não tratados. Estes resultados são mais uma indicação de que o tratamento com EDC não modificou ou reticulou de forma significativa os complexos.

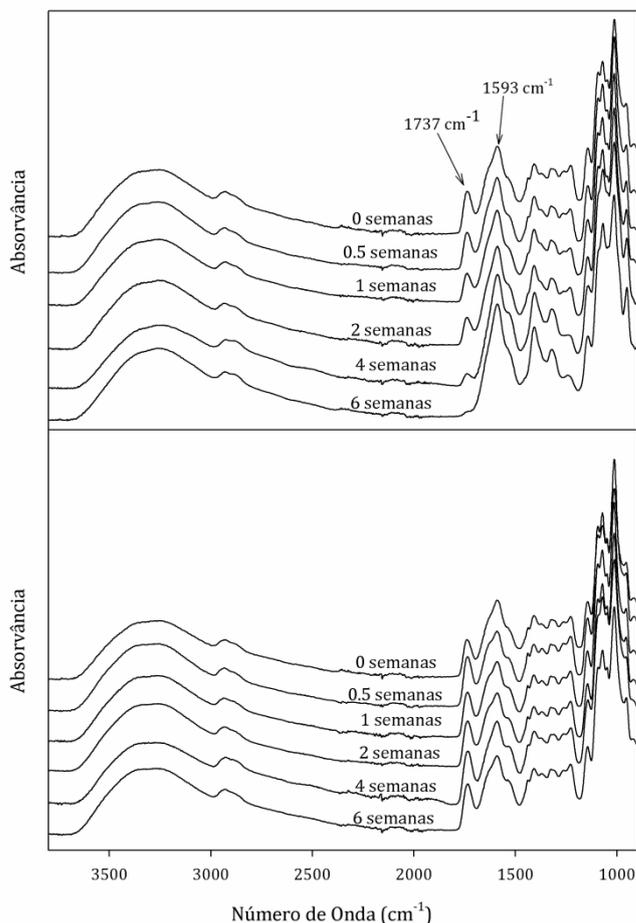


Figura 4.18 Espectros FTIR-ATR dos PECs tratados com EDC (pec50/quit50_edc) após se terem encontrado mergulhados, durante 0, 0.5, 1, 2, 4 e 6 semanas, em: a) Solução salina tampão fosfato (pH 7.4); b) Solução salina tampão acidificada (pH 2).

A perda de massa das esponjas de pectina tratadas com EDC (pectina-edc), e de quitosano tratado com EDC (quitosano-edc), foi também investigada. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.19. Ao contrário do comportamento dos perfis de perda de massa exibidos pelas esponjas de PECs, onde se observava uma perda de massa sensivelmente constante ao longo do tempo, com as esponjas de pectina-edc e quitosano-edc observa-se uma tendência para a estabilização dos valores de perda de massa, passadas as duas semanas iniciais e até ao final do ensaio, indicando uma maior estabilidade destas esponjas, ou seja, a

menor labilidade das ligações intermoleculares estabelecidas entre as cadeias dos polissacarídeos.

Refira-se que, tanto para as esponjas de pectina-edc como quitosano-edc, foram utilizados controlos negativo correspondentes a esponjas de pectina e esponjas de quitosano não tratadas com EDC, obtidas apenas por liofilização das soluções dos dois polissacarídeos.

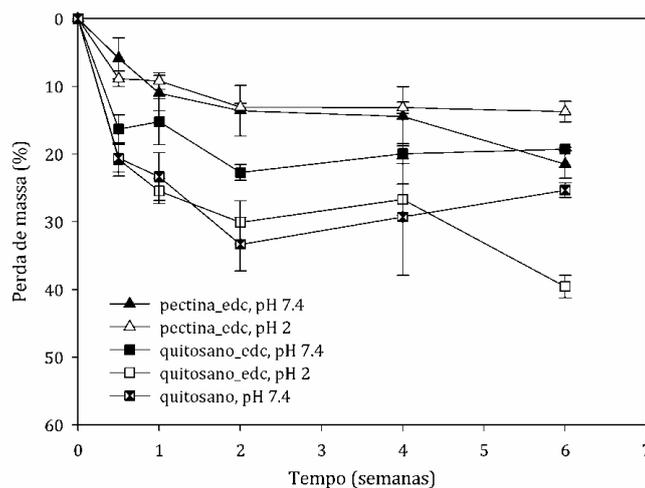


Figura 4.19 Perda de massa ao longo do tempo das esponjas pectina-edc e quitosano-edc quando mergulhados numa solução salina tampão acidificada (pH 2) ou numa solução salina tampão fosfato (pH 7.4); média \pm DP, n=3.

No caso da pectina, observou-se a completa dissolução destes controlos passado um dia de incubação, tanto a pH 2 como a pH 7.4. Pelo contrário, verificou-se que as esponjas Pectina-edc perderam apenas pouco mais de 10% da sua massa ao longo de todo o tempo do ensaio, apresentando, para os dois meios estudados, perfis de perda de massa bastante semelhantes. Pelo que foi concluído anteriormente acerca da reacção de pectina com a EDC, esta resistência à dissolução em meios aquosos exibida pelas esponjas Pectina-edc será mais uma consequência da hidrofobização das cadeias deste polissacarídeo, devido à introdução de grupos N-acilureia, do que às reticulações intra e intermoleculares estabelecidas entre os grupos COOH e OH, uma vez que as evidências apontam para que a primeira modificação tenha ocorrido numa maior extensão.

Quanto às esponjas quitosano-edc, estas apresentam uma maior perda de massa no final das seis semanas do que as esponjas pectina-edc, com valores próximos dos 20%, no meio a pH 7.4, e de cerca de 40% no meio a pH 2. Neste caso a

perda de massa nas esponjas incubadas a pH ácido é superior à verificada nas esponjas incubadas a pH 7.4, pois a este pH o quitosano torna-se insolúvel no meio aquoso. De facto, os controlos negativos de quitosano incubados a pH 7.4 (cuja perda de massa ao longo do tempo é também representada na Figura 4.19), mantiveram-se parcialmente insolúveis ao longo do ensaio. Pelo contrário, quando mergulhados na solução acidificada, verificou-se a completa dissolução destes após um dia de incubação.

Também para estas esponjas foram registados os espectros FTIR-ATR nos diferentes tempos de degradação, a pH 7.4 e pH 2. Ao contrário dos PECs, verificou-se, tanto para as esponjas Pectina-edc como para as esponjas Quitosano-edc, que os espectros eram idênticos ao espectro adquirido no tempo inicial (Figura 4.10b, para a Pectina-edc e Figura 4.12b para o Quitosano-edc), isto para ambos os meios.

A morfologia das diferentes esponjas foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (*scanning electronic microscopy* - SEM). Na Figura 4.20 apresentam-se as imagens obtidas para as diferentes esponjas. Como se pode ver nas menores ampliações, as esponjas de PECs (Figura 4.20a) e b)) são estruturas pouco densas e altamente porosas. Os PECs assumem a estrutura de folhas finas, rendilhadas e emaranhadas entre si. Observadas em maiores ampliações estas folhas apresentam uma textura rugosa, dando a sensação de que estas resultam da condensação de uma série estruturas filamentosas. As esponjas de Pectina-edc e Quitosano-edc, Figura 4.20c) e d), também parecem ser constituídas por emaranhado de folhas mas, ao contrário dos PECs, a superfície destas é completamente lisa.

A morfologia das esponjas PECs obtidas é o resultado da influência e da interacção de uma série de factores, como a concentração dos polímeros iniciais, a quantidade de água presente nos complexos no momento da congelação, a temperatura de congelação, e as próprias condições de liofilização. Numa forma semelhante à realizada neste trabalho, Verma *et al*²¹ produziram *scaffolds* através da liofilização de suspensões de PECs de quitosano e de ácido (poligalacturónico). Os autores analisaram a morfologia dos *scaffolds* obtidos em função da concentração das soluções iniciais dos dois polissacarídeos e da temperatura de congelação dos PECs. Através da variação destes dois parâmetros, os autores conseguiram obter

scaffolds com diferentes morfologias, desde *scaffolds* altamente porosos, constituídos por fibras interconectadas, até *scaffolds* constituídos por estruturas na forma de folhas finas. Os autores verificaram que a diminuição da concentração dos biopolímeros (de 1% até 0.1% (m/v)), e a diminuição da temperatura de congelamento (de -20 até -196 °C), originava a formação de estruturas fibrosas enquanto o aumento da concentração dos biopolímeros e o aumento da temperatura de congelamento promovia o aparecimento de estruturas do tipo de folhas.

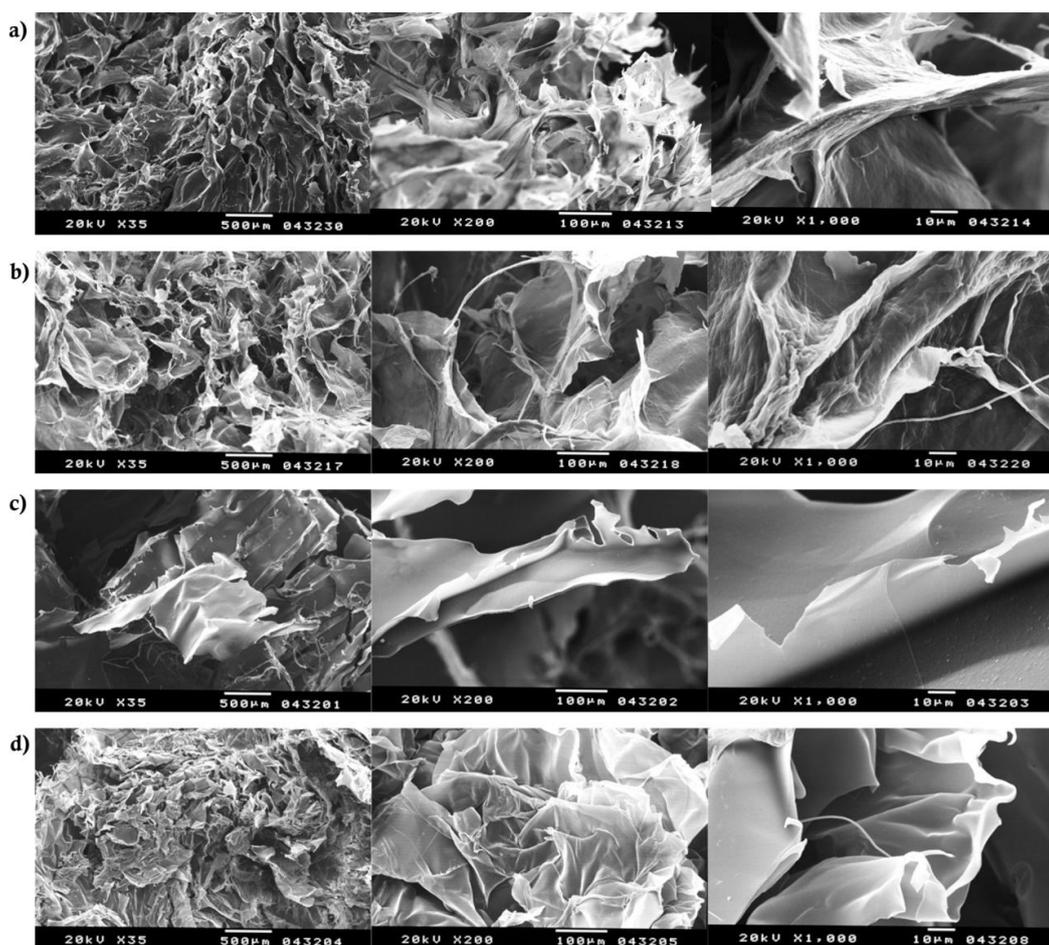


Figura 4.20 Imagens de microscopia electrónica de varrimento de: a) Esponjas de PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50); b) Esponjas de PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (pec50/quit50_edc); c) Esponjas Pectina-edc; d) Esponjas Quitosano-edc. Ampliações (da esquerda para a direita): $\times 35$; $\times 200$; $\times 1000$.

As imagens de SEM dos *scaffolds* obtidos a partir de uma concentração inicial dos dois polissacarídeos de 1% e uma temperatura de congelamento de -20°C, condições semelhantes às utilizadas na preparação das esponjas de PECs apresentadas neste trabalho, revelaram uma estrutura na forma de folhas finas,

estrutura essa bastante semelhante à observada nas imagens de SEM das esponjas de PECs apresentadas na Figura 4.20.

Tentou-se também registrar as alterações na morfologia dos esponjas com o tempo de degradação, através da análise de SEM de esponjas de PECs com diferentes tempos de degradação (0, 2, 4 e 6 semanas), em pH 7.4 e pH 2. Os resultados são apresentados na Figura 4.21. Contudo, e porque as esponjas exibem intrinsecamente uma estrutura desorganizada e heterogênea, é difícil detectar alterações evidentes na morfologia ao longo do tempo de degradação.

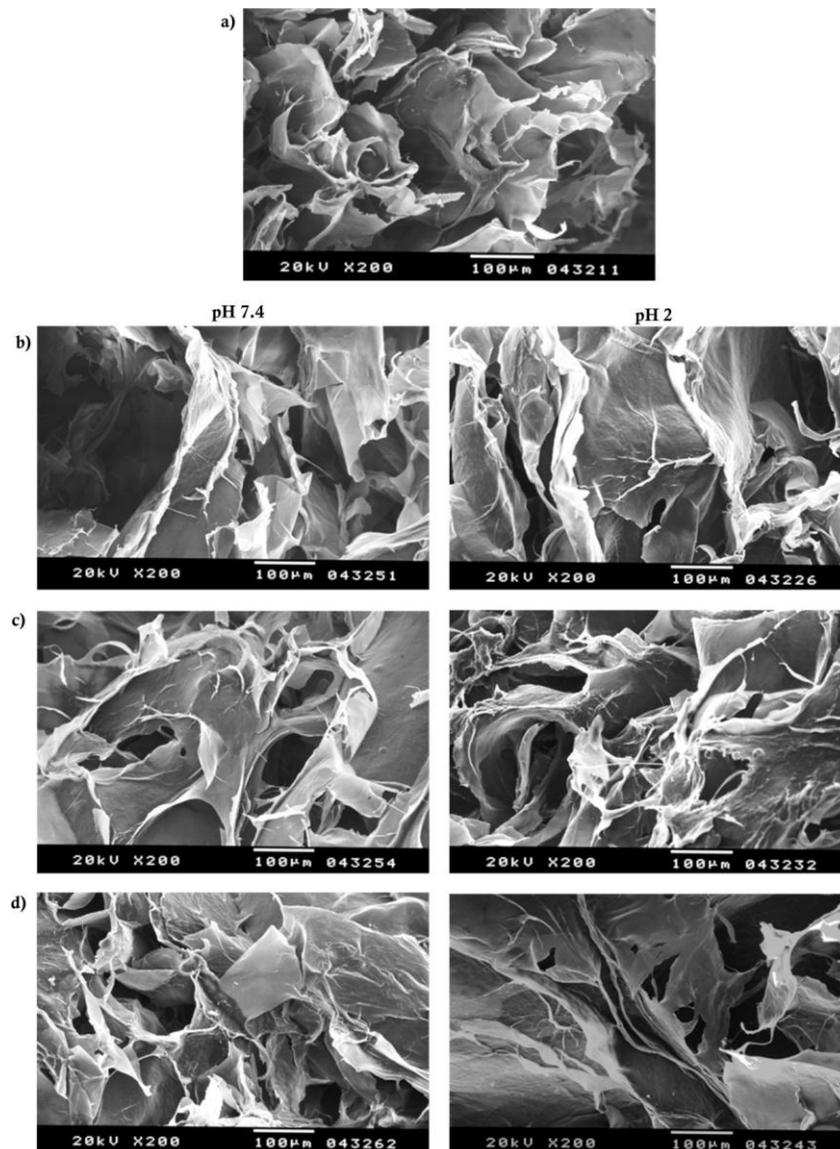


Figura 4.21 Imagens de microscopia electrónica de varrimento das esponjas de PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50) em diferentes tempos de degradação: a) Esponja antes do ensaio de degradação (semana 0); b) 2 semanas; c) 4 semanas; d) 6 semanas. Coluna da esquerda: esponjas mergulhadas em solução tampão fosfato (pH 7.4). Coluna da direita: esponjas mergulhadas em solução tampão acidificada (pH 2). Ampliação: $\times 200$.

As propriedades térmicas das esponjas produzidas foram investigadas pelas técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varrimento (DSC). As curvas termogravimétricas e de DSC obtidas foram analisadas com o *software* Universal Analysis 2000, da TA Instruments, com o qual se obteve os parâmetros associados às principais transições térmicas observadas nestas curvas.

Nas Figuras 4.22 e 4.23 encontram-se representadas as curvas termogravimétricas obtidas para as diferentes esponjas preparadas. Em todas as curvas observa-se, desde o seu início e até cerca de 100°C, uma perda de massa, correspondente à evaporação da água presente nas esponjas. A percentagem de água presente nas diversas esponjas foi calculada através da diferença entre a massa inicial das esponjas e a massa restante após esta primeira transição. Os resultados são apresentados na Tabela 4.4. A percentagem de água varia entre os 7 e os 11%.

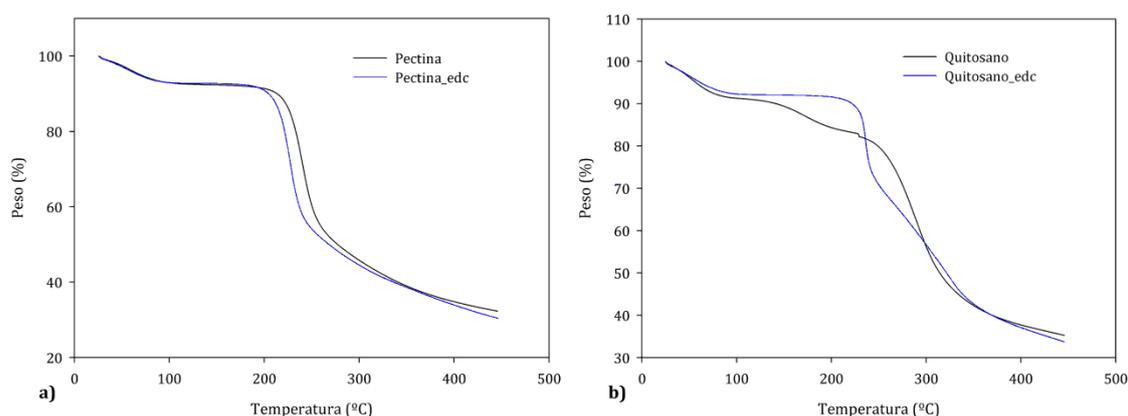


Figura 4.22 Curvas termogravimétricas de: a) Esponjas de pectina e pectina-edc. b) Esponjas de quitosano e quitosano-edc.

Na Figura 4.22a) comparam-se as curvas termogravimétricas das esponjas de pectina, obtidas apenas por liofilização, e as esponjas de pectina que sofreram um tratamento com EDC (pectina-edc). Como se pode observar, a temperatura à qual as esponjas pectina-edc começam a perder massa devido à decomposição química do polissacarídeo (214.1 °C) é ligeiramente inferior à observada para as esponjas de pectina (226.9 °C), indicando que as esponjas tratadas com EDC são termicamente menos estáveis que as esponjas não tratadas. Os valores desta temperatura inicial de decomposição são apresentados na Tabela 4.4.

Na Figura 4.22b) são comparados os termogramas das esponjas de quitosano e as esponjas de quitosano tratadas com EDC (quitosano-edc). Nas esponjas de

quitosano, antes da transição correspondente à degradação do polímero, observa-se um passo de perda de massa, que começa a cerca de 147.9 °C (Tabela 4.4). Esta transição deve-se provavelmente à degradação do ácido acético e dos iões acetato presentes nestas esponjas, pois estas foram preparadas a partir da liofilização do quitosano dissolvido numa solução de 0.1M de ácido acético. Nas esponjas quitosano-edc esta transição desaparece porque o ácido acético e os iões acetato, inicialmente presentes nestas esponjas, são extraídos durante o tratamento com a EDC e o subsequente processo de diálise.

A temperatura inicial de decomposição das esponjas quitosano-edc (231.7°C) é igualmente inferior à temperatura inicial de decomposição das esponjas de quitosano não tratada (264.9 °C), o que indica, à semelhança do que se verifica com as esponjas de pectina, que o tratamento com a EDC origina esponjas termicamente menos estáveis.

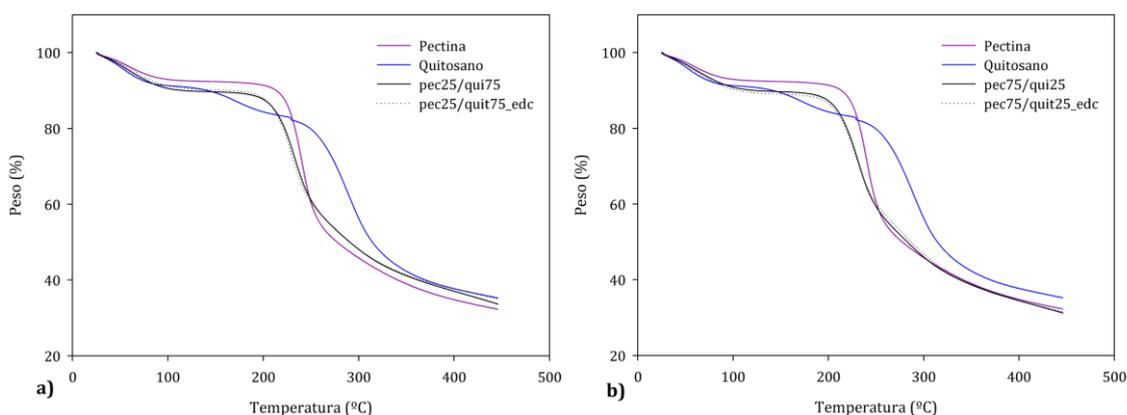


Figura 4.23 Curvas termogravimétricas de: a) Esponjas dos complexos pec25/quit75 e pec25/quit75_edc. b) Esponjas dos complexos pec75/quit25 e pec75/quit25_edc. Comparação com as curvas termogravimétricas das esponjas de pectina e esponjas de quitosano (não tratadas com EDC).

Na Figura 4.23 as curvas termogravimétricas das esponjas dos PECs pec25/quit75 e pec25/quit75_edc (Figura 4.23a), e dos PECs pec75/quit25 e pec75/quit25_edc (Figura 4.23b), são comparadas com as curvas termogravimétricas das esponjas de pectina e quitosano. Observa-se que, nos dois gráficos, as curvas dos PECs não tratados e tratados com EDC se sobrepõem quase completamente, o que é mais uma indicação de que o tratamento dos PECs com a carbodiimida não teve como resultado uma modificação química significativa destes.

Tabela 4.4 Características das curvas termogravimétricas das várias esponjas.

Esponja	% Água*	Temperatura inicial de decomposição (°C)	% massa remanescente (a 450 °C)
Pectina	7.3	226.0	32.0
Quitosano	8.7	147.9 264.9	35.0
Pectina_edc	7.5	214.1	30.3
Quitosano_edc	7.7	231.7	33.6
Pec25/quit75	9.9	213.3	33.5
Pec25/quit75_edc	9.6	210.6	34.8
Pec75/quit25	10.4	210.9	31.1
Pec75/quit25_edc	10.8	209.9	31.2

* Calculada a partir da perda de massa do primeiro degrau de degradação.

Igualmente muito semelhantes são as curvas termogravimétricas que foram obtidas para as esponjas dos dois PECs preparados a partir de diferentes proporções iniciais dos dois polissacarídeos (pec25/quit75 e pec75/quit25), nomeadamente as temperaturas iniciais de decomposição (Tabela 4.4). Este resultado também reforça a conclusão feita anteriormente de que a proporção inicial dos dois polissacarídeos, pelo menos na gama investigada, tem um impacto pouco significativo na composição e propriedades dos PECs obtidos.

Comparativamente com as esponjas de pectina e de quitosano, as esponjas dos PECs apresentam uma temperatura inicial de degradação inferior, o que significa que estas são termicamente menos estáveis.

As várias curvas termogravimétricas indicam ainda que percentagem de massa remanescente no final do ensaio, a 450 °C, é semelhante para todas as esponjas, com valores entre 30 e 35% (Tabela 4.4).

Nas Figuras 4.24, 4.25 e 4.26 podem ser observadas as curvas de DSC das várias esponjas analisadas. Na Tabela 4.5 encontram-se os parâmetros associados às transições detectadas nestas curvas, nomeadamente a temperatura inicial, a temperatura do pico, e a temperatura final da transição, bem como a variação de entalpia (ΔH) associada à mesma.

Em todas as curvas é possível observar, no seu início, uma larga transição endotérmica, situada entre os 30 e os 120 °C, correspondente à evaporação da água associada aos grupos hidrofílicos dos dois polissacarídeos. Esta transição é normalmente observada nas curvas de DSC dos polissacarídeos, mesmo em amostras sujeitas a um pré-aquecimento prévio^{51, 52}.

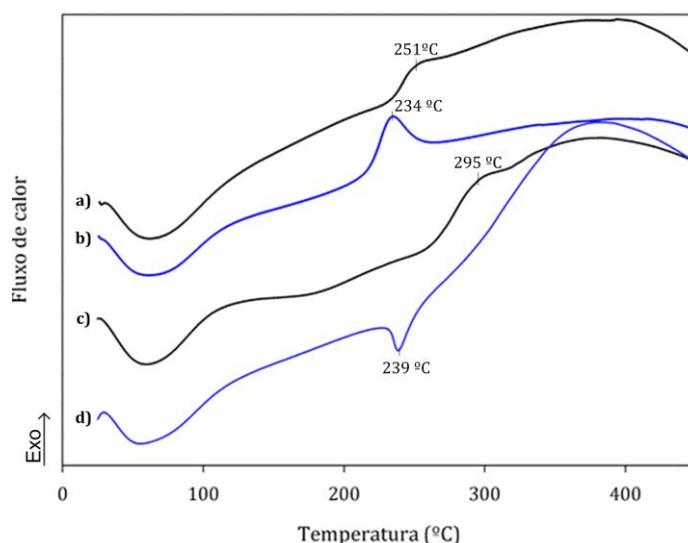


Figura 4.24 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas de pectina-edc. c) Esponjas de quitosano. d) Esponjas de quitosano-edc.

Tabela 4.5 Parâmetros das transições de primeira ordem, exotérmicas e endotérmicas, observadas nas curvas de DSC das esponjas produzidas.

Esponja	Transição	Temperatura (°C)			ΔH (J/g)
		Início	Pico	Fim	
Pectina	Endotérmica	33.5	61.5	99.2	130.9
	Exotérmica	236.8	251.8	278.1	-33.5
Quitosano	Endotérmica	29.2	60.5	115.3	247.1
	Exotérmica	270.2	295.5	320.0	-59.57
Pectina_edc	Endotérmica	29.9	63.4	110.3	183.8
	Exotérmica	218.7	234.0	263.7	-94.0
Quitosano_edc	Endotérmica	33.5	59.5	110.7	176.0
	Endotérmica	232.7	239.0	254.3	33.9
Pec25/quit75	Endotérmica	36.7	64.4	102.2	64.4
	Endotérmica	201.0	218.4	229.8	15.5
	Exotérmica	229.8	242.1	262.4	-15.4
Pec25/quit75_edc	Endotérmica	32.9	69.1	107.7	154.4
	Endotérmica	193.6	216.2	228.6	24.9
	Exotérmica	228.6	240.1	262.4	-24.5
Pec75/quit25	Endotérmica	30.0	70.2	110.7	202.8
	Endotérmica	197.4	218.3	231.5	32.1
	Exotérmica	231.5	242.5	260.7	-19.6
Pec75/quit25_edc	Endotérmica	30.4	69.9	121.3	240.2
	Endotérmica	190.7	216.9	230.2	31.2
	Exotérmica	230.2	241.7	261.6	-21.5

Na Figura 4.24 pode-se observar as curvas de DSC das esponjas de pectina e de quitosano e as respectivas esponjas tratadas com EDC (pectina-edc e quitosano-edc). Na curva correspondente à pectina (curva a), observa-se uma transição

exotérmica com o pico a cerca de 251 °C, sendo esta atribuída à degradação da pectina. Na literatura esta transição é reportada por vários autores na gama de temperaturas entre 210° e 270°C, conforme o grau de esterificação, o grau de amidação e peso molecular da pectina⁵¹.

A curva b) da Figura 4.24 corresponde à curva de DSC das esponjas de pectina tratadas com EDC. Comparativamente com a curva de DSC das esponjas de pectina não tratadas esta apresenta uma transição exotérmica a uma temperatura mais baixa (com o pico a 234 °C) e com uma maior variação de entalpia (-94 J/g vs -33 J/g). Isto significa, como já foi verificado nas curvas de termogravimetria, que a degradação das esponjas pectina-edc se dá a temperaturas mais baixas e com a libertação de mais energia.

Na curva c) da Figura 4.24 é apresentada a curva de DSC das esponjas de quitosano não tratadas. Para além da transição endotérmica inicial, relacionada com a evaporação de água, é possível distinguir uma transição exotérmica, com um pico a cerca de 295°C. Na literatura esta transição é atribuída à degradação das unidades desacetiladas do quitosano⁵³. Em contraste, esta transição desaparece na curva de DSC correspondente às esponjas quitosano-edc (curva d da Figura 4.24), surgindo, por sua vez, uma transição endotérmica a 239°C, temperatura muito próxima da temperatura inicial de decomposição (231.7°C) determinada a partir da curva de termogravimetria. Contudo esta transição não pode ser atribuída com certeza ao fenómeno de decomposição do polímero, pois esta pode ser uma consequência de outros fenómenos sofridos pela amostra, como por exemplo, a fusão antes da subsequente degradação.

Estas diferenças de comportamento térmico, tanto na pectina como como no quitosano, são mais um indício de que o tratamento com a EDC modificou marcadamente a estrutura química das esponjas destes dois polissacarídeos.

Nas Figuras 4.25 e 4.26, as curvas de DSC das esponjas dos PECs pec25/quit75 e pec25/quit75_edc (Figura 4.25), e dos PECs pec75/quit25 e pec75/quit25_edc (Figura 4.26), são comparadas com as curvas de DSC das esponjas de pectina e das esponjas de quitosano. À semelhança do verificado com as curvas de termogravimetria, as curvas de DSC dos complexos preparados a partir de diferentes proporções dos dois polissacarídeos, e dos complexos tratados com EDC, são bastante semelhantes. Estas diferem das curvas correspondentes à pectina e ao

quitosano, apresentando duas transições consecutivas, entre os 200 e os 250 °C. A primeira é uma transição endotérmica, com um pico a cerca dos 218°C. Logo de seguida observa-se uma transição exotérmica, centrada a cerca de 240°C. Segundo Smitha *et al* ⁵⁴, a transição endotérmica pode ser devida à formação de ligações amida, promovidas pela temperatura, a partir dos pares de iões complexados (-COO⁻+H₃N⁺). A transição exotérmica que se segue apresenta uma variação de entalpia praticamente simétrica à verificada na transição endotérmica, o que levanta a hipótese desta segunda transição corresponder à destruição das ligações amidas formadas anteriormente

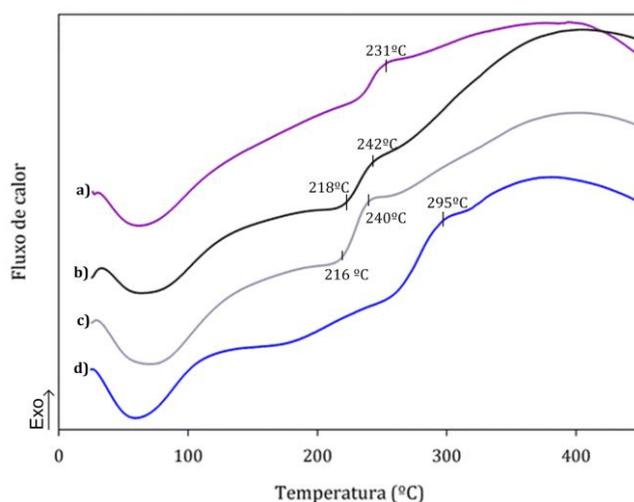


Figura 4.25 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas dos PECs pec25/quit75. c) Esponjas dos PECs pec25/quit75_edc. d) Esponjas de quitosano.

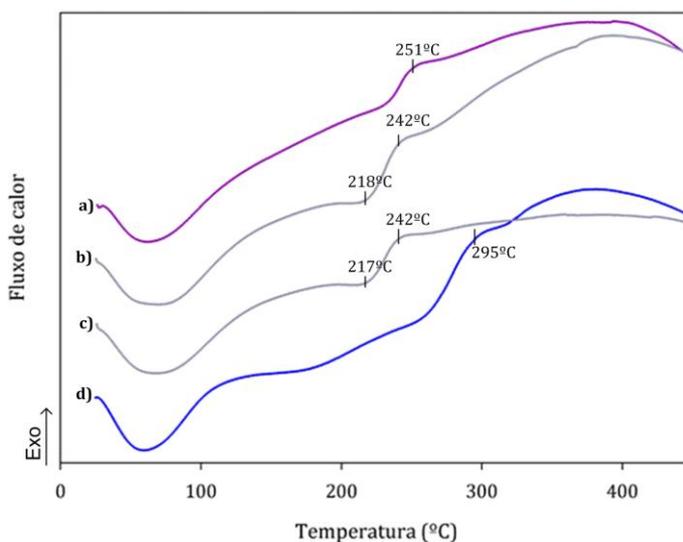


Figura 4.26 Curvas de DSC de: a) Esponjas de pectina. b) Esponjas dos PECs pec75/quit25. c) Esponjas dos PECs pec75/quit25_edc. d) Esponjas de quitosano.

Uma primeira avaliação do comportamento das esponjas de PECs enquanto matrizes para a preparação de sistemas de libertação controlada de biomoléculas foi realizada, através de ensaios de libertação *in vitro* da proteína albumina de soro bovino (BSA).

A proteína foi incorporada nas esponjas pela absorção de uma solução de proteína. As esponjas foram comprimidas em forma de disco numa prensa hidráulica. Contudo, quando mergulhados na solução de libertação, as esponjas rapidamente perdiam a forma de disco e adquiriam a forma original que tinham antes da compressão.

Os perfis de libertação *in vitro* da proteína, em meio salino acidificado (pH ~2) e em solução salina tampão fosfato (pH 7.4), são apresentados na Figura 4.27. Durante as primeiras nove horas de ensaio as esponjas libertaram cerca de 20% da proteína incorporada (17.5% a pH 7.4 e 24.3% a pH 2). Nas horas seguintes, e até ao final do ensaio, a taxa de libertação diminuiu, verificando-se no final de 24 horas a libertação de 25.5% da BSA em solução tampão fosfato e 28.6% em meio ácido.

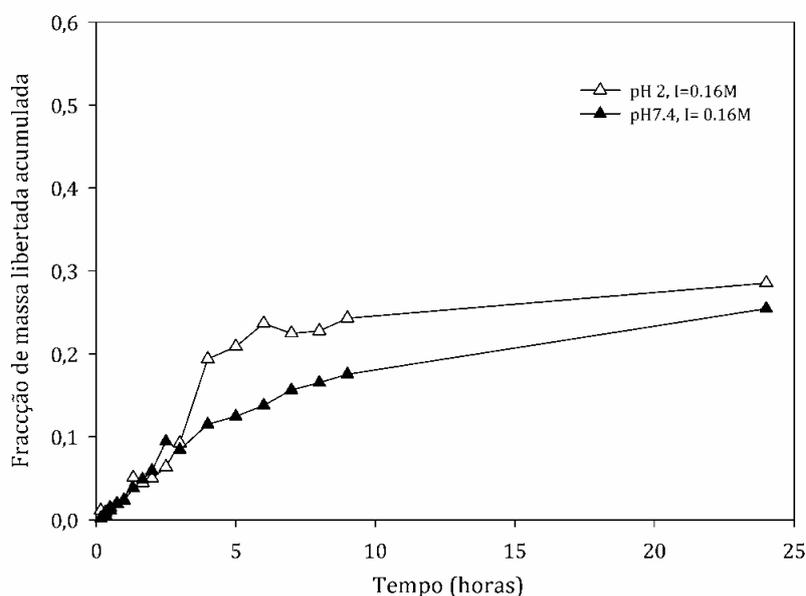


Figura 4.27 Curvas da libertação *in vitro* da proteína BSA a partir das esponjas pec75/quit25_edc: em solução salina tampão fosfato, pH= 7.4; em solução salina tampão acidificada, pH ~2.

Neste sistema, devido à natureza química da BSA e da matriz polimérica, a proteína encontra-se provavelmente imobilizada nas esponjas por meio de interações físicas estabelecidas entre esta e a pectina e o quitosano

(nomeadamente através de ligações iónicas e ligações por pontes de hidrogénio). Assim, o mecanismo responsável pelos perfis de libertação obtidos não é nem difusão da BSA através das cadeias da matriz polimérica, nem o processo de absorção de água por parte das esponjas, mas sim o processo de desorção da proteína, que envolve a quebra das interacções físicas estabelecidas entre a proteína e matriz polimérica. O pH do meio, por afectar directamente o estado dos grupos ionizáveis da proteína e dos polissacarídeos, é também um factor que afectará os perfis de libertação obtidos.

A quantidade de BSA libertada nas primeiras horas de ensaio corresponderá à fracção de proteína “livre”, ou seja, a fracção de proteína não adsorvida ou fracamente adsorvida à matriz polimérica. Depois da dissolução desta fracção, a proteína libertada será controlada pela cinética de desorção.

4.4 Conclusões

Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas esponjas produzidas através da liofilização dos complexos polielectrolíticos (PECs) formados entre a pectina e quitosano. Algumas propriedades destas esponjas foram analisadas, tendo-se procedido a uma avaliação preliminar acerca do comportamento destas enquanto possíveis sistemas de libertação controlada de proteínas.

Adicionalmente, as esponjas produzidas, de PECs ou de pectina e quitosano isolados, foram tratadas com a carbodiimida EDC, tendo-se tentado caracterizar as modificações químicas resultantes deste tratamento, bem como algumas das propriedades exibidas por estas esponjas.

Os resultados da análise elemental revelaram que, as três esponjas de PECs, produzidas a partir de diferentes proporções dos dois polissacarídeos, apresentavam uma composição aproximadamente semelhante, sendo constituídas maioritariamente por pectina (entre 74 e 78%, percentagem mássica).

Observou-se ainda que as esponjas, quando mergulhadas em meios aquosos, a pH 2 ou pH 7.4, sofriam uma perda de massa gradual, devido à progressiva quebra das ligações iónicas e consequente libertação/dissolução das cadeias poliméricas. As esponjas mergulhadas em soluções a pH 7.4 perdiam uma maior percentagem de massa ao longo do tempo que as esponjas mergulhadas em soluções a pH 2. A análise da composição das esponjas ao longo do tempo de degradação, e o registo dos espectros de FTIR-ATR, revelou que, nas esponjas mergulhadas a pH 2, a perda de massa resultava tanto da perda de pectina como de quitosano, enquanto a pH 7.4 a perda de massa podia ser maioritariamente atribuída à dissolução das cadeias de pectina.

Aparentemente, as esponjas de PECs tratadas com a EDC mantiveram-se idênticas às esponjas de PECs não tratadas, em termos da estrutura química e propriedades exibidas. Já o tratamento com a EDC da pectina liofilizada e do quitosano liofilizado resultou em alterações químicas na estrutura destes dois polissacarídeos, que foram identificadas nos espectros de FTIR e reflectidas em algumas das propriedades exibidas pelas esponjas resultantes. Embora não se tenha identificado inequivocamente que modificações químicas foram introduzidas nestes dois polissacarídeos, apresentaram-se e discutiram-se algumas das modificações que possivelmente ocorreram.

A análise de SEM das esponjas de PECs revelou que estas são estruturas pouco densas, altamente porosas, formadas por estruturas com aspecto de folha finas e rendilhadas, emaranhadas entre si.

Finalmente, a proteína modelo BSA foi incorporada nas esponjas de PECs e, uma avaliação preliminar destas, enquanto sistemas de libertação controlada de proteínas, foi realizada, através da libertação *in vitro*, a pH 2 e pH 7.4, da BSA. Os resultados obtidos indicam o estabelecimento de fortes interações físicas entre a matriz polimérica e a proteína, que resultam na imobilização física desta última e, por conseguinte, na limitação e sustentação da sua libertação.

Este resultado preliminar indicia que os PECs de pectina e quitosano são um material com potencial para a imobilização de proteínas, sugerindo que este pode ser utilizado como matriz para a preparação de sistemas de libertação controlada deste tipo de biomacromoléculas. Devido à susceptibilidade dos polissacarídeos que constituem estes PECs de serem degradados por uma série de enzimas produzidas por alguns microorganismos presentes na microflora intestinal, os PECs produzidos poderão ser utilizados para desenvolver sistemas de libertação específica de proteínas no cólon.

4.5 Referências bibliográficas

1. Koetz, J.; Kosmella, S., Eds. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer: Berlin, 2007.
2. Tsuchida, E., Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **1994**, A31, (1), 1-15.
3. Dumitriu, S.; Chornet, E., Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 31, (3), 223-246.
4. Kubota, N.; Shimoda, K., Macromolecular Complexes of Chitosan. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2nd edition ed.; Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker, Inc: NY, 2005; pp 679 - 706.
5. Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T., Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (1), 12-27.
6. Wang, Y.; Qiu, D.; Cosgrove, T.; Denbow, M. L., A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of chitosan and gelatin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, 70, (2), 254-258.
7. She, Z. D.; Liu, W. Q.; Feng, Q. L., Self-assembly model, hepatocytes attachment and inflammatory response for silk fibroin/chitosan scaffolds. *Biomedical Materials* **2009**, 4, (4), -.
8. Kang, H. S.; Park, S. H.; Lee, Y. G.; Son, T. I., Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(gamma-glutamic acid) for biological application: Preparation, physical properties, and cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 103, (1), 386-394.
9. Argin-Soysal, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. M., Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (1), 202-209.
10. Naidu, V. G. M.; Madhusudhana, K.; Sashidhar, R. B.; Ramakrishna, S.; Khar, R. K.; Ahmed, F. J.; Diwan, P. V., Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 76, (3), 464-471.
11. Wang, L. H.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L. Y., Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 63, (5), 610-618.
12. Ozturk, E.; Agalar, C.; Kecici, K.; Denkbaz, E. B., Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 101, (3), 1602-1609.
13. Yu, S. H.; Mi, F. L.; Wu, Y. B.; Peng, C. K.; Shyu, S. S.; Huang, R. N., Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 98, (2), 538-549.
14. Li, Z. S.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D. M.; Zhang, M. Q., Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, 26, (18), 3919-3928.
15. Liao, I. C.; Wan, A. C. A.; Yim, E. K. F.; Leong, K. W., Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. *Journal of Controlled Release* **2005**, 104, (2), 347-358.
16. Xiao, C. M.; Fang, F., Ionic Self-Assembly and Characterization of a Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex of Maleic Starch Half-Ester Acid with Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, 112, (4), 2255-2260.
17. Li, Q. L.; Chen, Z. Q.; Darvell, B. W.; Liu, L. K.; Jiang, H. B.; Zen, Q.; Peng, Q.; Ou, G. M., Chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel as an osteoblast carrier. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2007**, 82B, (2), 481-486.
18. Silva, C. L.; Pereira, J. C.; Ramalho, A.; Pais, A. A. C. C.; Sousa, J. J. S., Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science* **2008**, 320, (1-2), 268-279.
19. Son, T.; Kim, D.; Kim, B.; Koo, K.; Park, Y.; Kim, J.; Lim, H., Stoichiometric and nonstoichiometric polyelectrolyte complex of chitosan and polyethyleneglycol-monosuccinate: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 104, (5), 3057-3070.
20. Sarmiento, B.; Martins, S.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Neufeld, R.; Ferreira, D., Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2006**, 12, (2), 131-138.
21. Verma, D.; Katti, K. S.; Katti, D. R., Polyelectrolyte-complex nanostructured fibrous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2009**, 29, (7), 2079-2084.

22. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R., Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, (1), 35-52.
23. Arguelles-Monal, W.; Cabrera, G.; Peniche, C.; Rinaudo, M., Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid. *Polymer* **2000**, 41, (7), 2373-2378.
24. Peniche, C.; Arguelles-Monal, W., Chitosan based polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia* **2001**, 168, 103-116.
25. Becheran-Maron, L.; Peniche, C.; Arguelles-Monal, W., Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* **2004**, 34, (1-2), 127-133.
26. Yu, C.-Y.; Yin, B.-C.; Zhang, W.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X., Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 68, (2), 245-249.
27. Bigucci, F.; Luppi, B.; Monaco, L.; Cerchiara, T.; Zecchi, V., Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *J Pharm Pharmacol* **2009**, 61, (1), 41-6.
28. Mennini, N.; Furlanetto, S.; Maestrelli, F.; Pinzauti, S.; Mura, P., Response surface methodology in the optimization of chitosan-Ca pectinate bead formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 35, (4), 318-325.
29. Bigucci, F.; Luppi, B.; Cerchiara, T.; Sorrenti, M.; Bettinetti, G.; Rodriguez, L.; Zecchi, V., Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci* **2008**, 35, (5), 435-41.
30. Atyabi, F.; Majzoob, S.; Iman, M.; Salehi, M.; Dorkoosh, F., In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 61, (1), 39-51.
31. Chang, K. L. B.; Lin, J., Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 43, (2), 163-169.
32. Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, C., Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2000**, 38, (19), 2591-2598.
33. Synytsya, A.; Copikova, J.; Marounek, M.; Mlcochova, P.; Sihelnikova, L.; Skoblya, S.; Havlatova, H.; Matejka, P.; Maryska, M.; Machovic, V., N-octadecylpectinamide, a hydrophobic sorbent based on modification of highly methoxylated citrus pectin. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 56, (2), 169-179.
34. Rolin, C., Commercial pectin preparations. In *Pectins and their manipulation*, Seymour, C.; Knox, P., Eds. Blackwell: Boca Raton, 2002; pp 222-241.
35. Vaarum, K. M.; Smidsrod, O., Structure-property relationship on chitosans. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2nd edition ed.; Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker, Inc: NY, 2005; pp 625-660.
36. Chatjigakis, A. K.; Pappas, C.; Proxenia, N.; Kalantzi, O.; Rodis, P.; Polissiou, M., FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37, (4), 395-408.
37. Synytsya, A.; Copikova, J.; Matejka, P.; Machovic, V., Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers* **2003**, 54, (1), 97-106.
38. Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grondahl, L., Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (8), 2533-2541.
39. de Souza, J. R. R.; de Carvalho, J. I. X.; Trevisan, M. T. S.; de Paula, R. C. M.; Ricardo, N. M. P. S.; Feitosa, J. P. A., Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (8), 2278-2286.
40. 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, (12), 1575-1593.
41. Hess, M.; Meier, H.; Zeeh, B., Infrared and Raman Spectroscopy. In *Spectroscopic methods in organic chemistry* Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1997; pp 29-67.
42. Wrobel, N.; Schinking, M.; Mirsky, V. M., A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides. *Analytical Biochemistry* **2002**, 305, (2), 135-138.
43. Jackson, J. K.; Skinner, K. C.; Burgess, L.; Sun, T.; Hunter, W. L.; Burt, H. M., Paclitaxel-loaded crosslinked hyaluronic acid films for the prevention of postsurgical adhesions. *Pharmaceutical Research* **2002**, 19, (4), 411-417.

44. Young, J. J.; Cheng, K. M.; Tsou, T. L.; Liu, H. W.; Wang, H. J., Preparation of cross-linked hyaluronic acid film using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide or water-soluble 1-ethyl-(3,3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2004**, 15, (6), 767-780.
45. Lee, M.-W.; Hung, C.-L.; Cheng, J.-C.; Wang, Y.-J., A new anti-adhesion film synthesized from polygalacturonic acid with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide crosslinker. *Biomaterials* **2005**, 26, (18), 3793-3799.
46. Sannino, A.; Pappada, S.; Madaghiele, M.; Maffezzoli, A.; Ambrosio, L.; Nicolais, L., Crosslinking of cellulose derivatives and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Polymer* **2005**, 46, (25), 11206-11212.
47. Sannino, A.; Madaghiele, M.; Lionetto, M. G.; Schettino, T.; Maffezzoli, A., A cellulose-based hydrogel as a potential bulking agent for hypocaloric diets: An in vitro biocompatibility study on rat intestine. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 102, (2), 1524-1530.
48. Nakajima, N.; Ikada, Y., Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous-Media. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6, (1), 123-130.
49. Berrada, M. Guanidinated Polysaccharides, Their use as absorbents and process for producing the same. WO2006/029519A1, 2006.
50. Kurzer, F.; Douraghi, K., Advances in Chemistry of Carbodiimides. *Chemical Reviews* **1967**, 67, (2), 107-&.
51. Einhorn-Stoll, U.; Kunzek, H.; Dongowski, G., Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids* **2007**, 21, (7), 1101-1112.
52. Zohuriaan, M. J.; Shokrolahi, F., Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing* **2004**, 23, (5), 575-579.
53. Guinesi, L. S.; Cavalheiro, E. T. G., The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta* **2006**, 444, (2), 128-133.
54. Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A. A., Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal* **2005**, 41, (8), 1859-1866.

Capítulo 5

Considerações Finais e Sugestões para Trabalho Futuro

Ao longo deste trabalho produziram-se e caracterizaram-se potenciais sistemas de libertação controlada de fármacos, fabricados à base de polímeros naturais.

No Capítulo 2 descreveu-se uma tentativa de imobilizar um fármaco hidrofóbico em micropartículas de PHBV pelo método de extracção/evaporação do solvente (EES) numa emulsão óleo/água (O/W). No Capítulo 3 procedeu-se à modificação química da pectina e à utilização dos seus derivados na preparação de hidrogéis químicos. Nestes hidrogéis foram incorporados fármacos e proteínas modelo, tendo-se estudado o seu comportamento enquanto sistemas de libertação controlada através de estudos de libertação *in vitro*. Finalmente, no Capítulo 4, preparam-se e caracterizaram-se esponjas obtidas por liofilização dos complexos polielectrolíticos formados entre a pectina e o quitosano.

Reconhece-se que, em grande parte devido à dispersão do esforço investigativo entre os três trabalhos, de natureza bastante diferente, nenhum deles resultou num estudo aprofundado, em que resultasse um sistema de libertação controlada totalmente caracterizado e optimizado para uma aplicação específica.

Contudo, em cada um dos três trabalhos, foi possível obter conclusões significativas, que poderão ser utilizadas como bases sólidas para a continuação do trabalho de desenvolvimento dos diferentes sistemas de libertação propostos.

Em seguida, e como término deste trabalho, fazem-se algumas considerações sobre os trabalhos realizados e, com base nas conclusões obtidas, apresentam-se várias sugestões para continuar a investigar e a desenvolver os sistemas de libertação apresentados.

5.1 Imobilização de um fármaco hidrofóbico em micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

Neste trabalho tornou-se evidente, pelos perfis de libertação *in vitro* obtidos, que as formulações utilizadas originaram micropartículas em que o flurbiprofeno não se encontra efectivamente imobilizado na matriz polimérica, mas sim essencialmente disperso à superfície destas ou nas cavidades presentes nas micropartículas. Desta forma, a libertação do fármaco a partir das micropartículas não é controlada pela difusão deste através da matriz polimérica, ou pela

degradação da matriz polimérica, mas sim pela taxa de dissolução do fármaco. Observou-se mesmo que o flurbiprofeno se dissolvia mais rapidamente quando formulado nas micropartículas do que quando no seu estado puro original, isto provavelmente devido às diferentes propriedades exibidas pelas partículas do fármaco original e pelas partículas de fármaco formadas pela precipitação deste durante o processo de produção das micropartículas.

Estes resultados devem-se, provavelmente, à elevada razão fármaco /polímero utilizada em todas as formulações, estipulada em 30% (m/m). Assim, de forma a obter micropartículas de PHBV com flurbiprofeno efectivamente imobilizado, que permitam verdadeiramente a libertação controlada deste, a percentagem teórica de fármaco encapsulada deve ser uma variável cuidadosamente investigada e otimizada. Nesta tarefa, o conhecimento da solubilidade do fármaco no polímero no estado sólido pode-se revelar bastante útil¹. Esta pode ser determinada experimentalmente, por exemplo por DSC ou XRD (*X-ray powder diffractometry*). Outra estratégia a considerar para modelar os perfis de libertação é a mistura do PHBV com outros poliésteres sintéticos, como a PCL, ou a utilização de PHBV's com diferentes proporções de HB e HV.

No trabalho apresentado, tentou-se otimizar o tamanho médio e a distribuição de tamanhos das partículas, através da investigação das variáveis concentração do polímero na fase orgânica, [PHBV], e concentração de surfactante na fase aquosa, [PVA]. Concluiu-se que estas duas variáveis influenciavam de forma significativa o tamanho médio das partículas e a sua distribuição de tamanhos. No entanto, o factor que, de forma mais directa e profunda, afecta o tamanho das partículas produzidas pelo método da EES numa emulsão O/W é o tipo de agitação utilizada e a potência empregue na formação da emulsão. Assim, a escolha do tipo de agitação e a manipulação da potência/velocidade de agitação será a forma mais directa e adequada de obter micropartículas com o tamanho médio desejável.

Seguindo as sugestões apresentadas, e com o apoio das conclusões obtidas neste trabalho, nomeadamente sobre o impacto da [PHBV] e [PVA] sobre a eficiência de encapsulação do fármaco e distribuição de tamanhos das partículas, crê-se ser possível desenvolver um sistema de libertação controlada do flurbiprofeno, com base na imobilização deste em micropartículas de PHBV.

Claro que o desenvolvimento e a optimização do sistema de libertação terá de ter como base uma aplicação final em particular, pois só com objectivos finais bem definidos fará sentido desenvolver e optimizar um SLC. A aplicação mais apropriada para este sistema será a libertação controlada do flurbiprofeno, prolongada e localizada, em sítios do organismo sujeitos a processos inflamatórios crónicos, manifestados em doenças como a artrite reumatóide ou as doenças periodontais.

5.2 Preparação e caracterização de hidrogéis de base pectina. Sua utilização na libertação de moléculas bioactivas

Neste trabalho a pectina foi funcionalizada com grupos terminais vinílicos ou metacrílicos e posteriormente transformada num hidrogel químico por meio de reticulação radicalar induzida por luz UV.

A funcionalização da pectina foi realizada através da formação de ligações uretana entre os grupos hidroxilo do polissacarídeo e os grupos isocianato dos agentes de modificação isocianato de alilo (AI) ou metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA). Os derivados obtidos foram caracterizados por SEC, FTIR, ¹H-RMN e análise elemental, tendo-se, através desta última técnica, determinado a extensão da modificação dos vários derivados preparados, expressa pelo parâmetro grau de substituição (GS).

Dois tipos de pectina, Pectina A e Pectina C, extraídas de diferentes matérias-primas e com diferentes graus de esterificação, foram alvo desta modificação. Através da implementação de um desenho de experiências investigou-se a influência de algumas condições reaccionais na extensão da reacção de modificação com o reagente AI (representada pelo GS). A interpretação estatística dos resultados revelou que o tempo de reacção e a proporção do reagente de modificação, nos intervalos investigados, não influenciavam significativamente o GS obtido. Pelo contrário, na presença do catalisador da reacção uretana dilaurato de dibutilo de estanho, a extensão de modificação pectina A revelou ser significativamente maior do que a obtida com a pectina C.

Concluiu-se, com base nestes resultados, e tendo em conta as condições heterogéneas em que ocorreu a reacção, que a acessibilidade dos grupos OH, directamente relacionada com o grau de inchaço das partículas do polissacarídeo no

solvente reaccional, era o factor que controlava e limitava a extensão da reacção. Desta forma, a maior reactividade da pectina A relativamente à pectina C foi atribuída ao maior grau de inchaço no solvente reaccional exibido por as partículas de pectina A.

A reacção de modificação da pectina, em meio heterogéneo, apresenta várias limitações, nomeadamente a dificuldade em controlar o GS e a não homogeneidade dos derivados obtidos (a distribuição não uniforme, ao longo das cadeias do polissacarídeo, dos grupos funcionais introduzidos). Estas limitações seriam suprimidas se a reacção ocorresse num meio heterogéneo.

Como esta reacção específica não pode ocorrer na presença de água, e uma vez que a pectina é insolúvel nos solventes orgânicos comuns, a solubilização da pectina implicaria a utilização de solventes não convencionais, como por exemplo líquidos iónicos. Estes novos solventes já são utilizados em várias reacções de funcionalização da celulose, precisamente porque proporcionam condições homogéneas de modificação². Uma alternativa, mais trabalhosa, seria a pré-derivatização da pectina numa forma solúvel nos solventes orgânicos tradicionais, como por exemplo, na forma de sais de tetrabutylamónio³.

Num meio reaccional homogéneo a extensão da reacção poderia ser facilmente controlada pela manipulação da razão molar entre o agente modificante e os grupos OH do polissacarídeo. Isto possibilitaria a obtenção de derivados de pectina com toda uma gama de GS, o que permitiria investigar o impacto deste factor nas propriedades dos hidrogéis químicos produzidos, bem como no desempenho destes enquanto sistemas de libertação controlado, o que, em última análise, possibilitaria definir o GS mais adequado para produzir os hidrogéis químicos com as propriedades desejadas. Adicionalmente, os derivados obtidos numa reacção de modificação em meio homogéneo apresentariam uma distribuição uniforme dos grupos funcionais ao longo das cadeias poliméricas, o que proporcionaria a obtenção de hidrogéis mais homogéneos e com propriedades mais previsíveis/controláveis.

Como se viu anteriormente, os hidrogéis produzidos a partir do derivado da pectina A-IMA, por si só, ou em conjunto com o macrómero PEGDA, apresentavam uma morfologia interna bastante heterogénea e porosa. A formação da matriz tridimensional na presença de uma grande quantidade de água, devido à baixa concentração da solução precursora, é um dos factores que contribui para a

formação deste tipo de morfologia. A utilização de soluções precursoras com concentrações mais elevadas conduziria provavelmente à formação de matrizes mais densas e homogêneas. Contudo, isto não foi exequível, devido à elevada viscosidade apresentada pelas soluções de pectina, viscosidade essa derivada do elevado peso molecular das pectinas utilizadas. Adicionalmente, os estudos de SEC revelaram que os dois tipos de pectina apresentavam uma distribuição de pesos moleculares altamente polidispersa.

Uma das possíveis aplicações para este tipo de hidrogéis de pectina é a sua utilização enquanto sistemas de libertação específica no cólon. Como ficou patente na revisão bibliográfica apresentada no Capítulo 3, a pectina tem sido bastante utilizada e investigada no desenvolvimento deste tipo de sistemas, isto devido à susceptibilidade deste polissacarídeo de ser degradado por enzimas produzidas por uma grande variedade de microorganismos presentes no cólon.

Embora se tenha verificado, com os estudos de inchaço realizados neste trabalho, que os hidrogéis químicos de pectina produzidos apresentam pouca sensibilidade ao pH, os estudos de libertação, na presença de pectinases, evidenciaram que as matrizes dos hidrogéis químicos de pectina produzidos mantêm a susceptibilidade à acção das enzimas pectinolíticas.

Uma das vantagens dos hidrogéis produzidos é a estabilidade da sua estrutura tridimensional. Por ser um hidrogel químico, este é bastante mais estável que os hidrogéis físicos de pectina, normalmente investigados como sistemas de libertação específica no cólon. Assim sendo, com estes hidrogéis, será mais fácil desenhar um sistema onde a libertação antecipada dos compostos bioactivos (antes do hidrogel atingir o cólon) seja minimizada e a libertação no cólon maximizada.

No entanto, as propriedades do sistema obtido serão em grande parte determinadas pelas propriedades da pectina original e dos derivados obtidos. Como se constatou, as pectinas comerciais disponíveis no mercado são bastante heterogêneas, a nível de composição química e distribuição de pesos moleculares. Como ficou patente neste trabalho, estas características dificultam a caracterização dos derivados de pectina, como também afectam negativamente as propriedades dos hidrogéis obtidos.

Assim, de forma a ser possível desenvolver um hidrogel químico de pectina que actue de forma eficiente, enquanto sistema de libertação controlada, e apresente

propriedades reprodutíveis, será essencial ter à disposição matérias-primas (pectinas) menos polidispersas e com propriedades bem definidas e caracterizadas. Igualmente fundamental, para o sucesso destes hidrogéis, será a capacidade de obter derivados da pectina uniformes e com características específicas e controláveis (nomeadamente o GS), o que, como se discutir anteriormente, poderá ser alcançável através da modificação da pectina num meio reaccional homogéneo.

5.3 Esponjas de pectina e quitosano formadas por complexação polielectrolítica: preparação e caracterização

Este trabalho centrou-se na preparação e caracterização de esponjas preparadas pela liofilização dos complexos polielectrolíticos (PECs) insolúveis formados entre o quitosano e a pectina. Constatou-se que as esponjas obtidas eram compostas maioritariamente por pectina, sendo que as proporções iniciais dos dois polissacarídeos tinham pouca influência nessa composição.

Como o pH em que ocorre a reacção de complexação é a variável que mais impacto tem na composição e propriedades dos PECs obtidos, e como esta variável não foi alvo de atenção no trabalho realizado, sugere-se que, em futuros trabalhos, esta variável seja alvo de investigação.

Os PECs obtidos foram processados na forma de esponjas, por meio de liofilização. No entanto, estes podem ser processados em várias formas, como partículas, filmes ou fibras, formas mais interessantes para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada.

Este material tem o potencial para ser utilizado em várias aplicações. Enquanto sistemas de libertação controlada, uma das aplicações mais promissoras, devido às propriedades dos polissacarídeos que o compõem, será a sua utilização enquanto matriz para o desenvolvimento de sistemas de libertação específica no cólon. Esta aplicação já foi alvo de investigação, podendo-se encontrar na literatura alguns trabalhos dedicados ao desenvolvimento e formulação de sistemas de libertação específica no cólon à base de complexos polielectrolíticos de pectina e quitosano^{4,5}.

Os PECs, na forma de esponjas, podem ainda encontrar várias aplicações enquanto *scaffolds* capazes de actuar como suporte e promotores da regeneração de

tecidos. As propriedades biológicas exibidas pela pectina e, sobretudo pelo quitosano, podem-se revelar bastante vantajosas neste tipo de aplicação. Outra vantagem deste tipo de material encontra-se no seu processo de preparação: a formação dos PECs é feita num meio totalmente aquoso, não envolvendo a utilização de solventes orgânicos ou outro tipo de compostos potencialmente tóxicos, com agentes reticulantes, iniciadores ou catalisadores. Isto faz com que estes materiais apresentem normalmente uma excelente biocompatibilidade.

No seguimento deste trabalho, as esponjas de PECs de pectina e quitosano, produzidas pelo método apresentado, já foram avaliadas acerca da sua biocompatibilidade *in vitro*. Com o intuito de utilizar as esponjas na regeneração de tecido ósseo, a biocompatibilidade deste material foi testada com osteoblastos humanos. A partir deste estudo concluiu-se que as esponjas não apresentam toxicidade para as células testadas e que as células aderem e proliferam à superfície deste material.

5.4 Referências bibliográficas

1. Panyam, J.; Williams, D.; Dash, A.; Leslie-Pelecky, D.; Labhasetwar, V., Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 93, (7), 1804-1814.
2. Heinze, T., Chemical Functionalization of Cellulose. In *Polysaccharides - Structural diversity and functional versatility*, Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker: NY, 2005.
3. Crescenzi, V.; Callegaro, L. Esters of pectic and pectinic acid. US5384400, 1995.
4. Bigucci, F.; Luppi, B.; Cerchiara, T.; Sorrenti, M.; Bettinetti, G.; Rodriguez, L.; Zecchi, V., Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci* **2008**, 35, (5), 435-41.
5. Bigucci, F.; Luppi, B.; Monaco, L.; Cerchiara, T.; Zecchi, V., Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *J Pharm Pharmacol* **2009**, 61, (1), 41.

Anexo 3.1

Quantificação dos fármacos e proteínas por espectroscopia UV/VIS.

A quantificação dos fármacos e proteínas libertados *in vitro* foi realizada recorrendo a métodos espectrofotométricos, utilizando um espectrofotómetro UV/VIS JASCO 530 ou um espectrofotómetro UV/VIS JASCO 550.

Flurbiprofeno sódico

A quantificação deste fármaco foi obtida através da medida das absorvâncias das amostras do meio de libertação recolhidas ao longo do tempo. As medidas foram realizadas a um comprimento de onda de 247 nm em *cuvettes* de quartzo. Quando necessário, as amostras foram diluídas para uma concentração conveniente. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de flurbiprofeno sódico dissolvido numa solução salina tampão fosfato, numa gama de concentrações entre 2 e 16 µg/ml.

Sulfato de Gentamicina

Como a gentamicina não absorve radiação ultra-violeta ou visível, foi necessário recorrer a um método indirecto de forma a quantificar este composto por espectrofotometria UV/VIS. O método utilizado baseia-se na reacção entre o agente o-ftaldialdeído e os grupos amina da gentamicina, cujos produtos são cromóforos. O procedimento experimental adoptado foi desenvolvido por Cabanillas *et al*¹.

Preparação do reagente o-ftaldialdeído (reagente OPA):

- 2.5 g de o-ftaldialdeído
- 62.5 ml de metanol
- 560 ml de solução de borato de sódio (0.04M)
- 3 ml de 2-mercaptoetanol

O reagente OPA foi preparado misturando as quantidades dos reagentes acima listados. A solução resultante foi armazenada no escuro durante pelo menos 24 h e utilizada até três dias depois de preparada.

Em *cuvettes* de poliestireno descartáveis, adicionou-se e misturou-se, em partes iguais, a solução de gentamicina, a solução de reagente OPA e álcool isopropílico (para evitar a precipitação dos produtos), deixando-se repousar a solução resultante durante 30 min, à temperatura ambiente. Passado esse tempo a absorvância das amostras foi medida a um comprimento de onda de 332 nm contra um branco preparado da mesma forma mas utilizando, em vez da solução de gentamicina, a solução tampão utilizada como meio de libertação. A quantificação do fármaco foi obtida mediante a construção de uma curva de calibração com soluções de gentamicina numa gama de concentrações entre 10 e 100 µg/ml.

Albumina de soro bovino (BSA)

A quantificação da proteína BSA foi feita utilizando o reagente de *Bradford* e de acordo com um dos protocolos indicados pelo fabricante deste². Este método de quantificação baseia-se na formação de um complexo entre o corante Azul Brillhante G (*Brilliant Blue G*) e os resíduos de arginina e lisina da proteína em solução.

As soluções para análise foram preparadas misturando, em *cuvettes* de poliestireno descartáveis, 1 ml de solução de BSA e 1 ml de reagente de *Bradford*. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente entre 5 a 45 minutos e a sua absorvância medida a 595 nm contra um branco preparado com solução tampão. As curvas de calibração da BSA nos dois meios de libertação investigados (tampão salino fosfato, 0.01M pH= 7.4; solução salina acidificada, HCl 0.01 M, pH~ 2.0) foram construídas nas gamas de concentrações de 1.3 a 12.6µg/ml, para o tampão fosfato, e 1.3 a 31.0 µg/ml, para o tampão ácido.

O mesmo método descrito acima foi utilizado para determinar a quantidade de BSA libertada num meio composto por uma solução tampão salina fosfato com uma concentração de pectinase de 1mg/ml. Neste caso as curvas de calibração foram construídas com soluções tampão com uma concentração fixa de pectinase de 1mg/ml e concentrações de BSA entre 0 e 13 µg/ml.

Lisozima de clara de ovo

A quantificação desta proteína foi realizada pelo mesmo método descrito acima para a quantificação da BSA. De forma a garantir a linearidade das curvas de calibração, prepararam-se uma série de solução de lisozima com concentrações numa gama alargada. A absorvância destas amostras foi medida várias vezes, em tempos diferentes, e os valores obtidos foram representados contra os valores de concentração, de forma a identificar a gama de concentrações que apresentava uma correlação linear com as absorvâncias. Para ambos os meios de libertação utilizados verificou-se que essa gama de concentrações se situava entre os 0 e 15 µg/ml.

Referências Bibliográficas

1. Cabanillas, P. F.; Pena, E. D.; Barrales-Rienda, J. M.; Frutos, G., Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 209, (1-2), 15-26.
2. Sigma, Boletim técnico do produto número B6916.
<http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.Par.0001.File.tmp/b6916bul.pdf>.

Anexo 3.2

Resultados da análise elemental

Tabela A.3.2.1 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes na Pectina A e nas pectinas modificados com o reagente isocianato de alilo (AI) nas diferentes condições reaccionais referidas na Tabela 3.7 (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pectina A	0.466 \pm 0.046	39.924 \pm 0.626	6.524 \pm 0.409	\leq 100 ppm
A-R1	0.840 \pm 0.035	37.720 \pm 0.847	6.551 \pm 0.536	\leq 100 ppm
A-R2	0.743 \pm 0.042	39.270 \pm 0.316	6.493 \pm 0.277	\leq 100 ppm
A-R3	1.803 \pm 0.032	39.574 \pm 0.194	6.660 \pm 0.287	\leq 100 ppm
A-R4	2.087 \pm 0.046	39.593 \pm 0.413	6.532 \pm 0.285	\leq 100 ppm

Tabela A.3.2.2 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes na Pectina C e nas pectinas modificados com o reagente isocianato de alilo (AI) nas diferentes condições reaccionais referidas na Tabela 3.8 (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pectina C	0.560 \pm 0.026	38.781 \pm 0.899	6.287 \pm 0.244	\leq 100 ppm
C-R1	0.703 \pm 0.016	38.116 \pm 1.168	6.174 \pm 0.162	\leq 100 ppm
C-R2	0.833 \pm 0.004	37.851 \pm 1.000	5.705 \pm 0.107	\leq 100 ppm
C-R3	0.665 \pm 0.013	38.576 \pm 0.794	6.108 \pm 0.344	\leq 100 ppm
C-R4	0.703 \pm 0.053	38.409 \pm 0.732	6.062 \pm 0.183	\leq 100 ppm

Tabela A.3.2.3 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes na Pectina A e nos derivados modificados com o reagente metacrilato de 2-isocianoetilo (IMA) (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pectina A	0.550 \pm 0.026	38.781 \pm 0.899	6.287 \pm 0.244	\leq 100 ppm
A-IMA-Sol	0.998 \pm 0.036	39.045 \pm 0.462	5.447 \pm 0.282	0.196 \pm 0.039*
A-IMA-Ins	2.943 \pm 0.061	43.793 \pm 0.271	6.386 \pm 0.144	\leq 100 ppm

* Enxofre proveniente dos resíduos do solvente dimetil sulfóxido. A percentagem mássica deste solvente na amostra foi determinada e as % N, C e H recalculados, de forma a expressarem apenas a composição correspondente à pectina modificada. A %N recalculada foi utilizada para determinar o grau de substituição desta fracção de pectina.

Anexo 4.1

Resultados da análise elemental

Tabela A.4.1.1 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes na pectina e quitosano utilizados na preparação das esponjas (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pectina	0.696 \pm 0.023	38.877 \pm 0.658	6.043 \pm 0.077	\leq 100 ppm
Quitosano	6.589 \pm 0.103	39.608 \pm 0.385	7.340 \pm 0.119	\leq 100 ppm

Tabela A.4.1.2 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre presentes nas esponjas pectina-edc e quitosano-edc.

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pectina-edc	2.317	40.257	6.560	\leq 100 ppm
Quitosano-edc	6.504	39.879	6.793	\leq 100 ppm

Tabela A.4.1.3 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre nos PECs de pectina/quitosano (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pec25/Quit75	2.485 \pm 0.138	37.648 \pm 0.791	6.779 \pm 0.371	\leq 100 ppm
Pec50/Quit50	2.345 \pm 0.070	38.896 \pm 0.915	6.703 \pm 0.111	\leq 100 ppm
Pec75/Quit25	2.659 \pm 0.033	36.876 \pm 0.258	6.859 \pm 0.166	\leq 100 ppm

Tabela A.4.1.4 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono, Hidrogénio e Enxofre nos PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (média \pm DP; n= 3).

Amostra	% N	% C	% H	% S
Pec25/Quit75_edc	2.878 \pm 0.004	41.109 \pm 0.774	7.924 \pm 0.331	\leq 100 ppm
Pec50/Quit50_edc	3.158 \pm 0.101	41.479 \pm 0.768	7.016 \pm 0.297	\leq 100 ppm
Pec75/Quit25_edc	3.402 \pm 0.389	40.702 \pm 0.349	6.648 \pm 0.202	\leq 100 ppm

Tabela A.4.1.5 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono e Hidrogénio nos PECs de pectina/quitosano (pec50/quit50) para os diferentes tempos de degradação, em solução tampão salina fosfato (pH 7.4) e solução salina tampão acidificada (pH 2), (média \pm DP; n= 3).

Tempo (semanas)	pH 7			pH 2		
	% N	% C	% H	% N	%C	% H
0	2.345	38.896	6.703	2.345	38.896	6.703
	± 0.074	± 0.915	± 0.111	± 0.074	± 0.915	± 0.111
0.5	2.944	39.503	6.585	2.681	42.491	6.843
	± 0.045	± 0.665	± 0.142	± 0.041	± 1.118	± 0.132
1	2.783	39.257	6.625	2.609	41.581	6.590
	± 0.125	± 0.216	± 0.033	± 0.081	± 0.473	± 0.392
2	3.544	40.616	6.908	2.681	42.226	6.775
	± 0.052	± 0.394	± 0.253	± 0.020	± 1.076	± 0.150
4	4.050	40.023	6.792	2.742	40.585	6.572
	± 0.060	± 0.230	± 0.675	± 0.025	± 0.283	± 0.233
6	3.763	39.442	6.791	2.701	39.844	6.280
	± 0.225	± 0.611	± 0.163	± 0.097	± 0.839	± 0.399

Tabela A.4.1.6 Percentagem (m/m) de Azoto, Carbono e Hidrogénio nos PECs de pectina/quitosano tratados com EDC (pec50/quit50_edc) para os diferentes tempos de degradação, em solução salina tampão fosfato (pH 7.4) e solução salina tampão acidificada (pH 2), (média \pm DP; n= 3).

Tempo (semanas)	pH 7			pH 2		
	% N	% C	% H	% N	%C	% H
0	3.158	41.479	7.016	3.158	41.479	7.016
	± 0.101	± 0.768	± 0.297	± 0.101	± 0.768	± 0.297
0.5	2.793 \pm	40.111	6.625	2.849	41.406	6.809
	0.052	± 0.442	± 0.126	± 0.178	± 0.290	± 0.098
1	3.085 \pm	41.741	6.876	2.433	40.070	6.835
	0.036	± 0.059	± 0.064	± 0.019	± 0.495	± 0.101
2	2.964	40.868	6.825	2.652	41.650	6.653
	± 0.079	± 0.240	± 0.123	± 0.017	± 0.245	± 0.144
4	3.163	41.899	7.916	2.497	40.028	7.404
	± 0.037	± 0.372	± 0.741	± 0.000	± 0.272	± 0.330
6	3.945	39.836	6.482	2.220	41.121	6.888
	± 0.065	± 0.381	± 0.210	± 0.120	± 0.088	± 0.258