



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mariana Marinho Caires Monteiro

Síntese de hidrogéis biocompatíveis para encapsulamento de fármacos

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientador(es):

Professor Doutor Jorge Coelho (DEQ)

Professor Doutor Arménio Serra (DEQ)

Coimbra, 2014

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

Agradecimentos

Por detrás das nossas realizações pessoais e para além de um notável esforço próprio, esconde-se sempre um contributo indispensável vindo de muitas pessoas, cuja importância é digna de referir.

O meu primeiro agradecimento é dirigido, indiscutivelmente, aos meus pais que para além de todo o apoio, sempre me acompanharam e disponibilizaram o necessário para que os meus objectivos, quer a nível pessoal, quer a nível académico, fossem alcançados.

De seguida quero agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Jorge Coelho e, em especial, Professor Doutor Arménio Serra, que para além da constante e permanente disponibilidade, sempre me ajudaram e incentivaram ao longo desta etapa académica.

Quero deixar um agradecimento ao grupo de investigação, principalmente ao Francisco, à Inês, à Cátia e à Andreia que sempre se mostraram disponíveis e me ajudaram em todos os momentos, desde o primeiro dia.

Não poderei, nunca, deixar de agradecer ao meu namorado Nuno, a paciência e o carinho que suportaram todos os momentos menos bons.

Por último, mas não em último, as minhas palavras de agradecimento são para o meu irmão Jó e para todos os meus amigos que, felizmente, fazem parte da minha vida.

Nota Introdutória

Esta tese visou o desenvolvimento de materiais biodegradáveis para a libertação controlada de fármacos baseados no dextrano. Com o avanço do trabalho percebeu-se que o método desenvolvido, embora ainda necessitando de alguma melhorias, seria uma solução muito interessante para aplicações muito específicas. Da pesquisa que foi efectuada não foi encontrado nada semelhante, pelo que a solução encontrada é inovadora. Por falta de tempo, não foi explorada, ainda mais, esta vertente de aplicação prática, mas os primeiros resultados de libertação apontam para que aquilo que foi desenvolvido possa realmente ter muito interesse. Não conhecendo ainda o valor completo deste trabalho sob o ponto de vista de exploração de resultados, e para permitir que de futuro, com as necessárias melhorias, ele possa originar algum processo de protecção intelectual do que foi desenvolvido, decidiu-se que as partes mais críticas do trabalho ficassem propositadamente sem explicação detalhada. São estas as partes que introduzem a diferença para aquilo que se encontra descrito. Para a análise de resultados crê-se que essas partes em nada prejudicam a análise crítica que deverá ser feita sobre os erros e imprecisões que um trabalho deste tipo sempre apresenta.

Abstract

This project has as theme *Synthesis of biocompatible hydrogels for drugs encapsulation* and aim the production of a biocompatible material, namely a biopolymeric hydrogel, with specific characteristics that may promote the encapsulation of 5-fluorouracil (5-Fu).

Biopolymeric materials are very attractive for biomedical applications, since they can combine the degradability *in vivo* with good biocompatibility and, thus, can be used as encapsulating agents for the release of bioactive compounds. Within the group of biopolymers, polysaccharides have important advantages, such as high stability, security, hydrophilicity, biodegradability and still exist in abundant resources in nature. An example of a promising polysaccharide is dextran, that has been commonly used for several medical applications since it presents properties like biodegradability, biocompatibility and interaction with drugs, and so it was the most commonly polymer used throughout this work.

As the polysaccharides are a group of water-soluble polymers, they have been widely used for the preparation of hydrogels, because of their ability to form gels under well defined conditions. Hydrogels are three-dimensional crosslinked networks which are able to absorb high amounts of water without suffering dissolution and therefore, could act as a controlled drug delivery systems.

The experimental work started with the production of different hydrogels, which then synthesized and precipitated, were subjected to a press in order to understand if their characteristics allow the formation of a film. While hydrogels that did not allow the formation of a film were discarded, hydrogels which allow the formation of a film were submitted to several tests in order to analyze their characteristics. After different behaviors of several films were studied, there were chosen the films that expressed the most appropriate characteristics for an efficient encapsulation of the drug.

The drug release process was analyzed by two different methods with the same objective which is the 5-Fu controlled release.

Key words: Dextran; Hydrogel; Encapsulation; 5-fluorouracil; Controlled release.

Resumo

Este projecto tem como tema a *Síntese de hidrogéis biocompatíveis para encapsulamento de fármacos* e como objectivo produzir um material biocompatível, mais propriamente um hidrogel biopolimérico, com características específicas capazes de promover o encapsulamento do fármaco 5-fluorouracilo (5-Fu).

Os materiais biopoliméricos são bastante atraentes para aplicações biomédicas, uma vez que podem combinar a degradabilidade *in vivo* com a boa biocompatibilidade e, desta forma, podem ser usados como agentes encapsulantes com o objectivo de libertarem compostos bioactivos. Dentro do grupo dos biopolímeros, os polissacarídeos apresentam vantagens importantes como, alta estabilidade, segurança, hidrofiliidade e biodegradabilidade. Um exemplo de um polissacarídeo bastante promissor é o dextrano, que tem sido comumente utilizado para várias aplicações biomédicas e, uma vez que apresenta propriedades de biodegradabilidade, de biocompatibilidade e de interacção com os fármacos, foi este o biopolímero utilizado com maior destaque.

Como os polissacarídeos são um grupo de biopolímeros solúveis em água, têm sido bastante utilizados para preparar hidrogéis graças à sua capacidade de formar géis sob condições bem definidas. Os hidrogéis são redes reticuladas tridimensionais, que são capazes de absorver grandes quantidades de água sem sofrerem dissolução, podendo consequentemente funcionar como sistemas de libertação controlada de fármacos.

O trabalho experimental teve início com a reprodução de diferentes hidrogéis, que depois de sintetizados e precipitados foram utilizados para formarem filmes. Enquanto que os hidrogéis que não permitiram a formação de um filme foram postos de parte, os que permitiam foram submetidos a uma série de testes de forma a ser possível analisar as suas características. Após terem sido estudados os distintos comportamentos dos vários filmes, foram escolhidos os que manifestaram as características mais apropriadas para se proceder ao encapsulamento do fármaco 5-Fu.

O processo de libertação do fármaco foi estudado através de dois métodos distintos, os quais tinham como igual objectivo proporcionar uma libertação controlada do 5-Fu.

Palavras chave: Biopolímero; Dextrano; Hidrogel; Encapsulamento; 5-fluorouracilo; Libertação controlada.

Lista de Acrónimos

ATR - Reflexão Total Atenuada

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

RNA - Ácido ribonucleico

5-Fu - 5-fluorouracilo

Índice

Agradecimentos	v
Nota Introdutória	vii
Abstract.....	ix
Resumo	xi
Lista de Acrónimos.....	xiii
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxi
1. Introdução.....	2
1.1 Polímeros	2
1.1.1 Biopolímeros	4
1.1.2 Polissacarídeos	5
1.1.3 Dextrano	6
1.2 Hidrogéis.....	8
1.2.1 Classificação de hidrogéis.....	9
1.2.2 Síntese de hidrogéis.....	10
1.2.3 Aplicações biomédicas.....	11
1.2.4 Sistemas de libertação controlada de fármacos.....	11
1.3 5-fluorouracilo	13
1.4 Caracterização.....	15
1.4.1 Caracterização química	15
1.4.2 Quantificação da quantidade de fármaco libertada	16
2. Trabalho experimental.....	20
2.1 Materiais	20
2.2 Equipamentos.....	20
2.3 Procedimentos.....	21

2.3.1	Preparação dos hidrogéis, respectivos sólidos e filmes.....	21
2.3.2	Encapsulamento do fármaco 5-Fu.....	27
2.3.3	Curva de calibração do fármaco 5-Fu	31
3.	Resultados e discussão dos resultados.....	34
3.1	Síntese dos hidrogéis	34
3.2	Amostras cuja reacção não originou a formação de um produto de reacção gelificado	39
3.3	Amostras cuja reacção originou a formação de um produto de reacção gelificado, mas não foi possível a formação de um filme a partir do produto sólido final.....	41
3.4	Amostras cuja reacção originou a formação de um produto de reacção gelificado e foi possível a formação de um filme a partir do produto sólido final.....	42
3.4.1	Grau de inchaço médio à temperatura ambiente	42
3.4.2	Processo de aquecimento a 50° C.....	43
3.4.3	Grau de inchaço médio a 37° C.....	44
3.4.4	Estudos da libertação do 5-Fu através dos filmes	52
4.	Conclusões e perspectivas futuras	64
4.1	Conclusões	64
4.2	Perspectivas futuras	65
Anexo A	- Análises FTIR.....	72

Lista de Figuras

Figura 1. 1 - Classificação dos copolímeros quanto ao arranjo dos monómeros A e B, adaptada [1].	3
Figura 1. 2 - Classificação dos polímeros quanto à estrutura, adaptada [3].	3
Figura 1. 3 - Diferentes grupos de biopolímeros, adaptada [4].	4
Figura 1. 4 - Estrutura do dextrano, adaptada [12].	7
Figura 1. 5 - Estrutura do fármaco 5-fluorouracilo.	13
Figura 1. 6 - Esquema ilustrativo da atenuação de um feixe de radiação quando passa através de uma solução absorvente, adaptada [39].	16
Figura 2. 1 - Curva de calibração referente ao fármaco 5-Fu.	31
Figura 3. 1 - Reacção <i>Tipo I</i> : Reacção de reticulação entre o dextrano e o agente reticulante AR.	34
Figura 3. 2 - Reacção <i>Tipo II</i> : Reacção de reticulação entre o agente reticulante AR e o dextrano.	35
Figura 3. 3 - Reacção <i>Tipo III</i> : Reacção de reticulação entre o dextrano, o agente reticulante pentaeritritol e o agente reticulante AR.	36
Figura 3. 4 - Reacção <i>Tipo IV</i> : Reacção de reticulação entre o amido e o agente reticulante AR.	37
Figura 3. 5 - Reacção <i>Tipo V</i> : Reacção de reticulação entre o hidroxietilamido e o agente reticulante AR.	37
Figura 3. 6 - Reacção <i>Tipo VI</i> : Reacção de reticulação entre o hidroxietilamido, o agente reticulante pentaeritritol e o agente reticulante AR.	38
Figura 3. 7 - Representação o grau de inchaço médio dos filmes Dex4 (2 filmes) durante 41 dias, à temperatura ambiente.	43
Figura 3. 8 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex3 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.	45
Figura 3. 9 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex4 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.	45
Figura 3. 10 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex10 (4 filmes) durante 8 dias, a 37° C.	47
Figura 3. 11 - Espectros FTIR das amostras Dex3 e Dex11.	49
Figura 3. 12 - Espectros FTIR das amostras Dex4 e Dex12.	49

Figura 3. 13 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex11 (4 filmes) durante 19 dias, a 37° C.....	50
Figura 3. 14 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex12 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.....	50
Figura 3. 15 - Comparação do grau de inchaço médio dos filmes Dex3 e Dex4 (4 + 4 filmes) com os filmes Dex11 e Dex12 (4 + 4 filmes) respectivamente.	51
Figura 3. 16 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Hea3 (2 filmes) durante 3 dias, a 37° C.....	52
Figura 3. 17 - Libertação dos 1,5 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (4 filmes).....	53
Figura 3. 18 - Libertação dos 1,5 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).....	54
Figura 3. 19 - Libertação dos 3,0 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (2 filmes).....	55
Figura 3. 20 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (2 filmes).....	55
Figura 3. 21 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (4 filmes).....	57
Figura 3. 22 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).....	57
Figura 3. 23 - Libertação dos 6,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).....	58
Figura 3. 24 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4, com reposição dos volume de soro fisiológico (4 filmes). .	60
Figura A. 1 - Espectro FTIR referente à amostra Dex1.....	72
Figura A. 2 - Espectro FTIR referente à amostra Dex2.....	73
Figura A. 3 - Espectro FTIR referente à amostra Dex3.....	73
Figura A. 4 - Espectro FTIR referente à amostra Dex4.....	74
Figura A. 5 - Espectro FTIR referente à amostra Dex5.....	74
Figura A. 6 - Espectro FTIR referente à amostra Dex6.....	75
Figura A. 7 - Espectro FTIR referente à amostra Dex7.....	75
Figura A. 8 - Espectro FTIR referente à amostra Dex8.....	76
Figura A. 9 - Espectro FTIR referente à amostra Dex9.....	76

Figura A. 10 - Espectro FTIR referente à amostra Dex10.....	77
Figura A. 11 - Espectro FTIR referente à amostra Ami1.	78
Figura A. 12 - Espectro FTIR referente à amostra Hea1.....	79
Figura A. 13 - Espectro FTIR referente à amostra Hea2.....	79
Figura A. 14 - Espectro FTIR referente à amostra Hea3.....	80
Figura A. 15 - Espectros FTIR referentes às amostras Hea1, Hea2 e Hea3.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 2. 1 – Quantidades dos reagentes e produtos das reacções <i>Tipo I</i>	22
Tabela 2. 2 - Alterações provocadas na síntese dos hidrogéis de dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol.	23
Tabela 2. 3 - Adição de um segundo agente reticulante na síntese dos hidrogéis de dextrano: reacções <i>Tipo III</i>	24
Tabela 2. 4 - Quantidades dos reagentes utilizados nas reacções que proporcionaram a síntese dos hidrogéis de amido e hidroxietilamido.	25
Tabela 2. 5 - Adição do agente reticulante pentaeritritol na síntese dos hidrogéis de hidroxietilamido.	26
Tabela 2. 6 - Resumo dos dois métodos de encapsulamento utilizados.	30
Tabela 3. 1 – Capacidade de formação de produtos de reacção sob a forma de gel e de filmes a partir dos produtos sólidos finais.	39

Capítulo I

1. Introdução

1.1 Polímeros

A palavra *polymer* deriva da palavra grega *poly* que significa *muitas* e da palavra *meres* que significa *partes*. Quimicamente, os polímeros são moléculas constituídas por um grande número de unidades estruturais (monómeros) repetidas ao longo de uma cadeia [1].

O termo *macromoléculas* é frequentemente utilizado para se fazer referência aos materiais poliméricos e estes podem ser classificados de acordo com alguns parâmetros. Em relação à origem, os polímeros podem ser, quer de origem natural, quer de origem sintética. Enquanto que os ácidos nucleicos e as proteínas são exemplos de polímeros de origem biológica com estruturas normalmente complexas, os polissacarídeos por outro lado, são também exemplos de polímeros de origem vegetal, mas cujas estruturas são relativamente mais simples. Há, também, um grande número de exemplos de polímeros feitos pelo Homem - sintéticos - que é o caso do *nylon*, do poli(cloreto de vinil), do poliestireno, entre outros [1, 2].

Em relação à composição, os polímeros podem ser classificados como homopolímeros ou como copolímeros. Os polímeros compostos somente por uma unidade de repetição ao longo de toda a cadeia polimérica são designados de homopolímeros e os polímeros constituídos por duas ou mais unidades de repetição diferentes ao longo da sua cadeia são definidos como copolímeros [1].

As unidades de repetição na cadeia de um copolímero podem estar orientadas de maneiras diferentes. Assim, dependendo da distribuição dos monómeros A e B, o copolímero pode apresentar diferentes cadeias, como mostra a Figura 1.1.

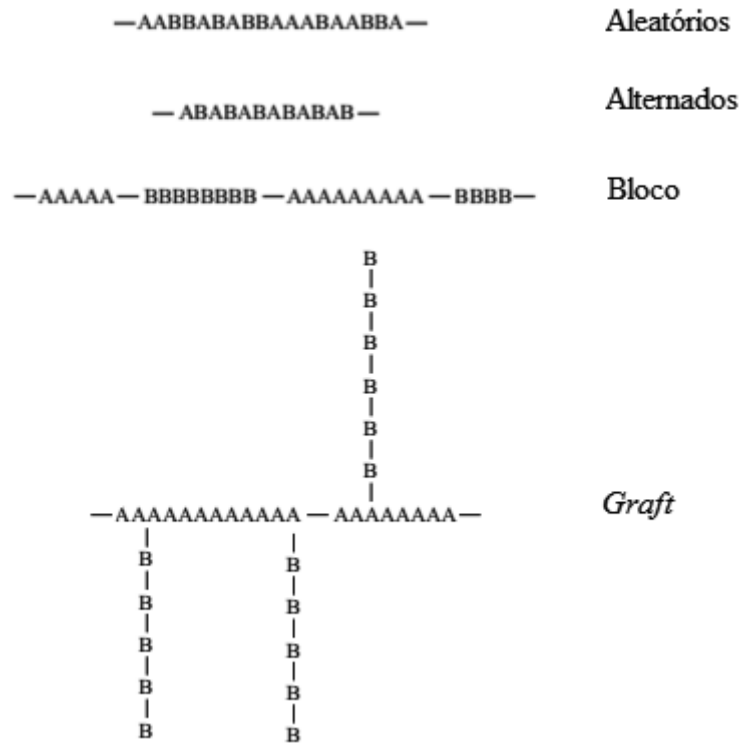


Figura 1. 1 - Classificação dos copolímeros quanto ao arranjo dos monómeros A e B, adaptada [1].

Em relação à estrutura, os polímeros podem ser classificados como lineares (a), ramificados (b), em estrela (c) ou em rede (d). A Figura 1.2 identifica estas quatro estruturas.

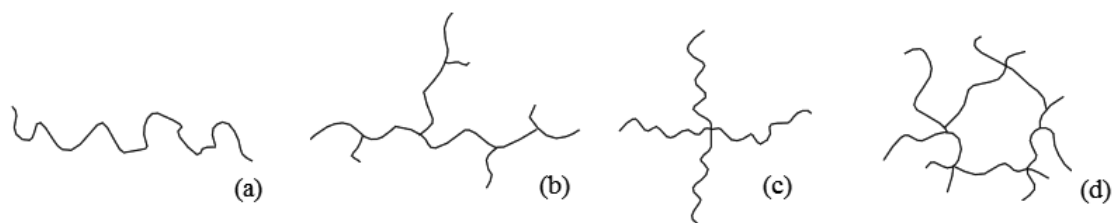


Figura 1. 2 - Classificação dos polímeros quanto à estrutura, adaptada [3].

A forma mais simples que a estrutura de um polímero pode apresentar é uma cadeia linear constituída apenas por uma única cadeia principal. A estrutura ramificada é composta por uma cadeia principal com uma ou mais cadeias laterais a ela ligadas e uma estrutura especial nos polímeros ramificados inclui a estrutura em estrela. No entanto, se o polímero contém uma cadeia lateral que apresenta uma composição ou configuração diferente da cadeia principal, o polímero é estruturalmente reticulado e possui ligações cruzadas. Neste sentido, um polímero que possua um elevado grau de ligações cruzadas apresenta uma estrutura em rede [3].

1.1.1 Biopolímeros

Existe, ainda, uma grande discordância em relação aos termos *biopolímero*, *bioplástico*, *polímero biodegradável* e *polímero formado a partir de recursos renováveis*, porque os polímeros biodegradáveis tanto podem ser de base biológica como de base fóssil [4].

Assim, a melhor e mais actual definição para o conceito de biopolímeros descreve um material polimérico que satisfaça pelo menos uma das seguintes características [4]:

- ✓ consista (parcialmente) numa base biológica (renovável) de matérias-primas;
- ✓ seja de alguma forma biodegradável.

Desta forma, podem-se distinguir três grupos básicos de biopolímeros: biopolímeros biodegradáveis de base fóssil; biopolímeros (maioritariamente) biodegradáveis de base biológica e biopolímeros não biodegradáveis de base biológica [4, 5].

Percebe-se assim que os biopolímeros não têm que ter origem exclusivamente nos recursos renováveis. Os biopolímeros biodegradáveis também podem ser fabricados a partir de matérias-primas petroquímicas. Por outro lado, nem todos os biopolímeros formados a partir de recursos renováveis são necessariamente biodegradáveis, como se pode verificar através da Figura 1.3 [4].

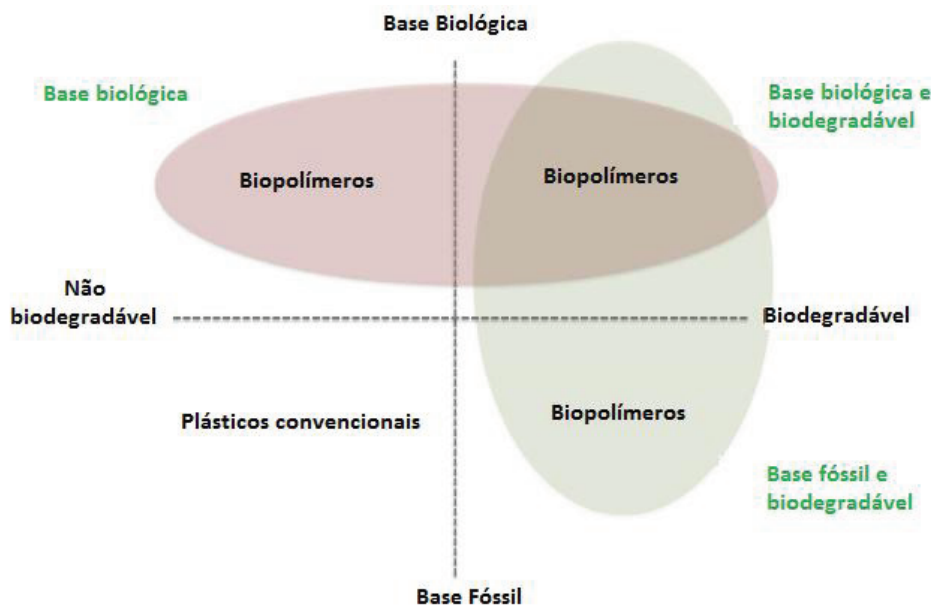


Figura 1. 3 - Diferentes grupos de biopolímeros, adaptada [4].

Desde a época industrial que os materiais de origem fóssil, como o petróleo, são a maior fonte no desenvolvimento e na fabricação de quase todos os produtos comerciais, como o plástico. No entanto, esses materiais não são recursos ilimitados e as preocupações ambientais sobre todos os aspectos da sua utilização devem ser tidas em conta, sendo portanto importante agir de forma sustentável. Os recursos devem, então, ser consumidos a um ritmo tal que possam ser restaurados por ciclos naturais do nosso planeta. Assim, o desenvolvimento de novos biopolímeros a partir de matérias-primas renováveis deve ser levado a cabo e estes biopolímeros devem ter a capacidade de competir com polímeros derivados de materiais fósseis, não só por causa das suas propriedades funcionais, mas também em termos de custo [6].

A biodegradabilidade de alguns biopolímeros confere-lhes uma vantagem específica no que diz respeito não só a questões ambientais, mas também a questões fisiológicas. O termo *biodegradabilidade* pode ser aplicado aos polímeros que são capazes de se decomporem em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa, em que o mecanismo predominante é a acção enzimática de microorganismos num ambiente e período de tempo específicos [5].

Os materiais biopoliméricos, tal como os materiais poliméricos, podem ser de ocorrência natural ou sintética. Apesar de ambos serem bastante utilizados, neste trabalho serão apenas abordados os biopolímeros de origem natural, os quais englobam os polissacarídeos [6].

1.1.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são estruturas poliméricas de hidratos de carbono, que contém vários graus de ramificação e que são formadas por unidades de repetição ligadas através de ligações glicosídicas. Os polissacarídeos têm uma fórmula geral $C_x(H_2O)_y$, onde y é normalmente um grande número entre 200 e 2500 e corresponde, geralmente, a $x-1$ [7].

A classificação dos polissacarídeos é baseada nos monossacarídeos presentes e na sequência das ligações entre eles. No entanto, a classificação dos polissacarídeos também depende da configuração anomérica das ligações (α ou β), do tamanho do anel (furanose ou piranose), da configuração absoluta (D ou L) e de outros substituintes presentes [7].

Os polissacarídeos são relativamente estáveis a uma temperatura até cerca de 200° C por um período de tempo curto e as elevadas forças de coesão entre as cadeias conferem-lhes um elevado ponto de fusão. São quebradiços e têm um elevado grau de

cristalinidade. Os grupos hidroxilo dos polissacarídeos que ocorrem naturalmente, proporcionam sítios reactivos para eventuais modificações e, conseqüentemente podem ser obtidos materiais com novas propriedades. Em relação à hidrofobicidade, é afectada pelo grau de hidratação do polissacarídeo, isto é, a uma maior natureza hidrofóbica do polissacarídeos corresponde uma diminuição da sua interacção com as moléculas de água. Os polissacarídeos contêm vários grupos hidroxilo que interagem com duas moléculas de água cada um, caso não estejam a interagir com outros grupos hidroxilo na molécula. Assim, a interacção entre os grupos hidroxilo no mesmo polissacarídeo ou em polissacarídeos vizinhos reduz o estado de hidratação [7, 8].

Os polissacarídeos são então, considerados os principais componentes para a produção de materiais de base biológica. A não-toxicidade, a biodegradabilidade e a biocompatibilidade destes biopolímeros, juntamente com a grande variedade de funcionalidades químicas que englobam, torna-os veículos bastante promissores para sistemas de libertação controlada de fármacos [9].

A diversidade de polissacarídeos sintetizados na natureza pode ser surpreendente para aqueles que não estão familiarizados com o assunto. Do ponto de vista químico, as estruturas dos polissacarídeos modificadas com determinadas propriedades promissoras fornecem um argumento adicional e importante para o estudo destas macromoléculas como um recurso renovável e valioso para o futuro. Desta forma, tem havido recentemente um interesse crescente na utilização de polímeros naturais, tais como os polissacarídeos, para inúmeras aplicações biomédicas. Nesta classe de polímeros inclui-se o alginato, a amilose, a celulose, a quitina, o quitosano, o amido e o dextrano [10, 11].

1.1.3 Dextrano

O polissacarídeo mais importante para aplicações médicas e industriais, produzido por bactérias, é o dextrano. O dextrano pertence a uma família de polímeros de origem natural que apresenta um elevado peso molecular e uma elevada polidispersividade, uma vez que esta aumenta com o peso molecular como resultado do aumento da densidade da ramificação [12].

O dextrano é um homopolissacarídeo ramificado que não possui carga e é produzido através da fermentação da sacarose por várias bactérias do ácido láctico, principalmente *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Apesar do presente estado da arte oferecer

métodos alternativos para a produção industrial do dextrano, a maioria dos produtores ainda estão a operar com o procedimento introduzido há alguns anos atrás, isto é, o processo de produção de dextrano baseado na fermentação por *Leuconostoc mesenteroides* na presença de sacarose, a uma temperatura óptima de 25° C e com um pH situado entre 5 e 6 valores. Estes factores em conjunto com a concentração de sacarose, influenciam o grau de ramificação e o peso molecular médio do dextrano produzido [12].

O dextrano é constituído principalmente por ligações α -1,6 que ligam resíduos de D-glicopiranosose na cadeia principal e ainda, por uma baixa percentagem de ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,4 que ligam cadeias laterais à cadeia principal, resultando num certo grau de ramificação que depende da estirpe produtora. Assim, diferentes microorganismos resultam na produção de diferentes dextransos, variando a quantidade produzida, o comprimento das cadeias, o grau e a natureza da ramificação [12-14].

O dextrano é essencialmente amorfo, não-tóxico e a sua simetria molecular aumenta com o peso molecular. A estrutura química deste polímero encontra-se representada na Figura 1.4 [15, 16].

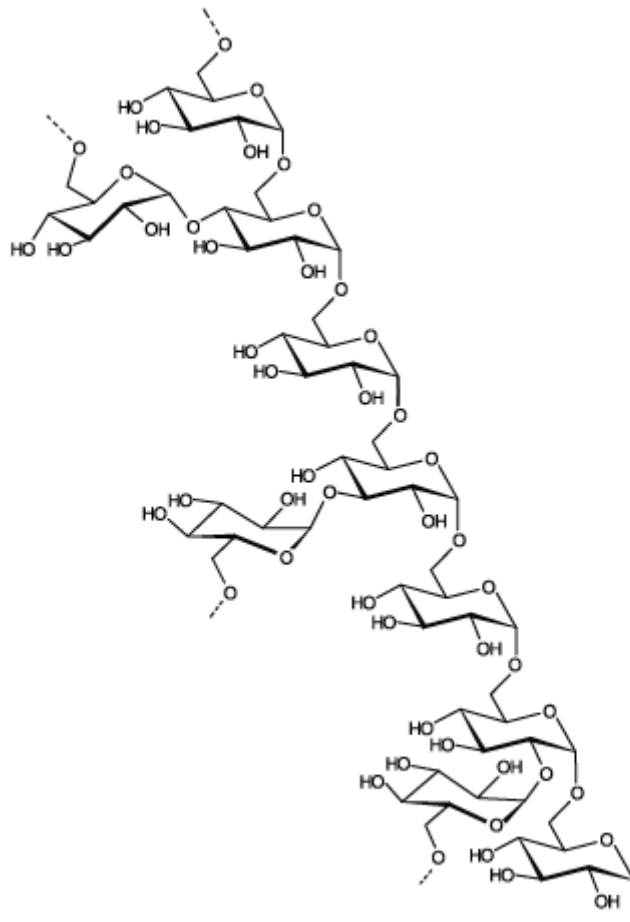


Figura 1. 4 - Estrutura do dextrano, adaptada [12].

O dextrano já é aplicado com êxito no campo da medicina e da engenharia biomédica graças à sua solubilidade em água e em outros solventes, como por exemplo o dimetilsulfóxido (DMSO), à sua biocompatibilidade e à sua capacidade de se degradar em certos ambientes físicos. Assim, para interesses médicos, científicos e industriais, uma variedade de amostras de dextrano de diferentes origens estão disponíveis comercialmente, dado que, como já foi referido anteriormente, dependendo das condições de fermentação, podem ser produzidos dextranos com características específicas [12, 17].

Uma vez que o dextrano é um biopolímero fisiologicamente inativo, devido à sua biodegradabilidade, às suas propriedades não imunogénicas e à sua elevada percentagem de ligações glicosídicas α -1,6 responsáveis pela estabilidade biológica no sangue humano, mais recentemente, têm sido alvo de investigação hidrogéis com base neste polissacarídeo [12, 18].

1.2 Hidrogéis

Por definição, um hidrogel é uma rede reticulada de polímero que apresenta propriedades hidrofílicas e apesar da preparação dos hidrogéis ser geralmente à base de monómeros hidrofílicos, monómeros hidrofóbicos são também, por vezes, utilizados com a finalidade de regular as propriedades para determinadas aplicações específicas [19].

Os hidrogéis são sistemas constituídos por uma rede tridimensional que interagem com grandes quantidades de solvente (sobretudo água), mas que, no entanto, não manifestam solubilidade. A quantidade de água na matriz polimérica é, pelo menos, 20% e pode atingir valores de 99% do peso. Os hidrogéis que contêm mais do que 95% de água são denominados superabsorventes e têm uma elevada biocompatibilidade, graças à sua capacidade para a retenção de água e à sua semelhança físico-química com a matriz extracelular nativa. Esta semelhança verifica-se não só em termos de composição, como também em termos mecânicos. Quanto à capacidade de inchaço, esta deve-se às reticulações ou às ligações entre as cadeias de polímero [7, 13, 20].

Para além das propriedades mecânicas, químicas e físicas apropriadas, a degradação do hidrogel é, também, essencial para muitas aplicações. A maioria dos hidrogéis, formados pela reticulação de cadeias poliméricas, exibem uma forte dependência da densidade das ligações cruzadas, das propriedades mecânicas e da taxa de degradação. É importante conhecer e controlar o mecanismo e a velocidade, através dos

quais cada material é degradado. Em relação aos hidrogéis, a cinética de degradação depende em grande parte da estrutura do hidrogel e existem três mecanismos básicos de degradação: a hidrólise, a clivagem enzimática e a dissolução [21].

Entre as propriedades referidas, os hidrogéis possuem ainda um elevado grau de flexibilidade comparável à de um tecido natural, um ambiente interior muito aquoso, uma baixa tensão interfacial e uma estrutura porosa. Estas características fazem dos hidrogéis, materiais excepcionalmente promissores para várias aplicações biomédicas nomeadamente no campo biológico [22].

1.2.1 Classificação de hidrogéis

Dependendo do tipo de unidades monoméricas envolvidas, da sua carga iónica e da sua estrutura física, os hidrogéis podem ser classificados em várias categorias.

Com base no tipo de unidades monoméricas envolvidas, os hidrogéis podem ser classificados como hidrogéis de homopolímeros, hidrogéis de copolímeros ou hidrogéis poliméricos interpenetrados. Os hidrogéis de homopolímeros são redes constituídas por apenas um tipo de unidade monomérica hidrofílica, nos quais as redes poliméricas são formadas através de ligações cruzadas na presença ou na ausência de um agente reticulação. Os hidrogéis de copolímeros, por sua vez, contém duas ou mais unidades monoméricas em que, pelo menos, um dos monómeros é hidrofílico. Finalmente, os hidrogéis poliméricos interpenetrantes são hidrogéis que envolvem duas redes reticuladas independentes. Estas redes reticuladas interagem uma com a outra graças à presença de um agente de reticulação [7, 20, 21].

Com base nas cargas iónicas, os hidrogéis podem ser classificados como: hidrogéis neutros, iónicos, ou ainda anfóliticos. Os hidrogéis neutros podem ser de natureza homopolimérica ou copolimérica e são formados a partir de unidades monoméricas neutras que reticulam para formar redes tridimensionais. Os hidrogéis iónicos contém espécies monoméricas carregadas, aniónicas ou catiónicas. Estes hidrogéis podem ser homopoliméricos envolvendo uma rede de polímero apenas iónico ou podem ser copoliméricos envolvendo uma rede polimérica iónica e neutra. Por último, os hidrogéis anfóliticos apresentam redes poliméricas que têm espécies monoméricas carregadas positivamente e negativamente. As propriedades destes três diferentes tipos de

hidrogéis dependem da presença das espécies iônicas ao longo da cadeia do polímero [7, 20, 21].

Por último, com base na sua estrutura física, os hidrogéis podem ser classificados como hidrogéis amorfos, quando as cadeias macromoleculares estão dispostas aleatoriamente ou como hidrogéis semi-cristalinos, que são caracterizados por regiões densas de cadeias macromoleculares ordenadas, onde são formados cristalitos [7, 20, 21].

1.2.2 Síntese de hidrogéis

A síntese de hidrogéis envolve a ligação das cadeias macromoleculares que, progressivamente e em conjunto resultam no desenvolvimento de redes tridimensionais. A formação da estrutura de rede abrange a formação de um polímero ramificado na fase inicial que vai aumentando gradualmente de tamanho. A reticulação pode realizar-se ao mesmo tempo ou depois da polimerização e pode ser alcançada por diversas técnicas, dependendo do tipo de reticulação envolvida, física ou química. Para além disso, dependendo do tipo de reticulação, podem estar em causa ligações covalentes ou não covalentes e, conseqüentemente, as estruturas tridimensionais formadas terão características mecânicas e químicas distintas [7, 13].

A reticulação física resulta na formação de hidrogéis nos quais as redes são mantidas unidas através de forças secundárias, tais como interações iônicas, interações hidrofóbicas, ou ligações através de pontes de hidrogénio. A síntese de hidrogéis que envolve a reticulação física não necessita de qualquer agente de reticulação. Assim, os hidrogéis polisacarídicos reticulados fisicamente podem ser sintetizados por diferentes técnicas tais como, aquecimento/arrefecimento de uma solução de polímero, agregação induzida pelo calor, secagem por congelamento, entre outras [7].

A reticulação química, por sua vez, resulta na formação de hidrogéis permanentes ou químicos constituídos por ligações covalentes. Nestes hidrogéis, o equilíbrio do estado de inchaço depende da densidade da reticulação e da intensidade da interação do polímero com a água. A reticulação química pode ocorrer graças à polimerização dos grupos funcionais presentes, à reticulação perante a presença de um agente de reticulação, ou à reticulação polímero-polímero [7].

Os hidrogéis quimicamente reticulados podem ser sintetizados com o auxílio de diferentes técnicas. Uma das técnicas consiste na presença de um agente de reticulação, e

neste caso, a reticulação envolve a presença sítios de activos como grupos OH na cadeia principal do polissacarídeo [7].

1.2.3 Aplicações biomédicas

Os hidrogéis de polissacarídeos, devido às suas propriedades estruturais dinâmicas têm sido aplicados em diferentes campos da biomédica como revestimentos ou como sistemas de libertação controlada de fármacos, mas também em aplicações agrícolas, como por exemplo grânulos de armazenamento de água e sistemas de libertação controlada de pesticidas. Estes hidrogéis também são usados em campos industriais importantes, como materiais para electroforese, cromatografia e protecção de instrumentos técnicos e electrónicos, na indústria alimentar e na indústria de cosméticos [21].

Mais propriamente em relação às aplicações biomédicas, os hidrogéis de polissacarídeos têm sido empregues numa variedade de aplicações. O sucesso destes hidrogéis como biomateriais deve-se principalmente ao seu satisfatório desempenho nas transplantações *in vivo* e à sua capacidade de fabricar uma ampla variedade de morfologias. A utilização deste tipo de hidrogéis está relacionada com a sua biocompatibilidade, a sua baixa toxicidade, a sua capacidade de armazenar uma grande quantidade de água e, ainda, com a sua capacidade de imitar o ambiente tecidual. São estas propriedades que tornam os hidrogéis de polissacarídeos candidatos adequados para diversas aplicações biomédicas, nomeadamente para sistemas de libertação controlada de fármacos [21].

1.2.4 Sistemas de libertação controlada de fármacos

Um sistema de libertação controlada de fármacos pode ser visto como um dispositivo que permite a introdução de um fármaco no corpo humano, onde é controlada a taxa, o tempo e o local da sua libertação no interior do organismo. Assim, este processo inclui o encapsulamento de uma substância terapêutica numa matriz, a libertação dessa mesma substância terapêutica e em alguns casos, o seu transporte através das membranas biológicas até ao sítio de acção [23].

A libertação controlada tem como objectivos entregar os fármacos a uma taxa específica, por um período de tempo definido, independentemente do ambiente local, e, ainda, minimizar a exposição dos fármacos noutras partes do corpo, evitar sua sobredosagem e protege-los da sua eliminação precoce [23].

Como já foi referido, existem várias motivações para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos. O desenvolvimento de um determinado sistema de libertação controlada depende tanto da aplicação em particular, como do fármaco em questão e ainda do alcance da libertação controlada tendo em conta mecanismos físicos, como o inchaço com *burst* ou acções químicas, tais como a degradação via hidrolítica ou enzimática. A degradação dos sistemas de libertação controlada de fármacos é um aspecto também bastante importante e deve ser tido em conta, uma vez que estes sistemas têm sido muito utilizados em matrizes implantáveis dado que não requerem a recuperação da sua forma após o fármaco em questão ter sido totalmente libertado [23, 24].

Por último, é de notar que os perfis de libertação são bastante imprevisíveis e que as formulações desenvolvidas são normalmente caracterizadas por estudos de libertação. Os resultados dependem de uma série de parâmetros, tais como a forma de dosagem, a capacidade de inchaço e o tipo e a quantidade do meio de libertação. É ainda de realçar que, os estudos de libertação são bastante demorados e exigem elevadas quantidades de fármacos [25].

1.2.4.1 Hidrogéis como sistemas de libertação controlada de fármacos

Por questões ambientais, a utilização comercial de biopolímeros tornou-se uma área de pesquisa bastante activa nas últimas décadas. Como os biopolímeros são um tipo de material com boa biocompatibilidade e como os hidrogéis apresentam muitas semelhanças com o tecido vivo, a síntese de hidrogéis com base em biopolímeros tem permitido a sua utilização como matrizes encapsulantes de fármacos [26].

Os fármacos podem ser encapsulados nos hidrogéis por uma série de métodos: podem ser adicionados à solução de monómero antes da reacção de polimerização; ou à solução de polímero antes da reacção de reticulação. Nestes casos, podem ser adicionadas elevadas concentrações do fármaco em questão, no entanto, como os hidrogéis preparados podem ter de ser purificados para remover iniciadores, monómeros residuais, ou agentes

de reticulação, este passo de lavagem pode remover, por consequência, também o fármaco. De forma a evitar esta situação, os fármacos podem ainda ser incorporados nos hidrogéis após estes serem purificados. Neste caso, a concentração do fármaco incorporado é limitada pela solubilidade do fármaco na solução. Um exemplo deste tipo de encapsulamento é uma imersão dos hidrogéis em soluções aquosas saturadas com moléculas de fármaco [26].

A cinética de inchaço dos hidrogéis contribui de forma significativa para o controlo da cinética de libertação do fármaco. É durante o processo de inchaço que se verifica a absorção de água pelo hidrogel, desencadeando a sua lenta expansão e, consequentemente, provocando a libertação do fármaco nele encapsulado no meio líquido por um processo de difusão. Assim, os processos de difusão ou os processos de difusão simultaneamente com a degradação hidrolítica são o principal mecanismo de libertação neste tipo de redes de poliméricas [26, 27].

Os hidrogéis à base de polímeros são únicos na medida em que apresentam um aspecto vítreo no estado seco, mas que, na presença de água, apresentam uma capacidade de inchaço bastante significativa, formando um gel elástico. A taxa de libertação de fármacos em matrizes de hidrogel pode ser ajustada por alteração da densidade da rede, isto é, através de uma simples variação dos parâmetros de reticulação. Em geral, a quantidade de fármaco encapsulado pode variar desde 0,01 a 10% do peso [27, 28].

1.3 5-fluorouracilo

O fármaco modelo escolhido foi o 5-fluorouracilo (5-Fu). Este fármaco citotóxico foi sintetizado e patenteado por Charles Heidelberger em 1957 e trata-se de um fármaco anticancerígeno muito utilizado no tratamento de uma variedade de carcinomas, cuja estrutura é apresentada na Figura 1.5 [29, 30].

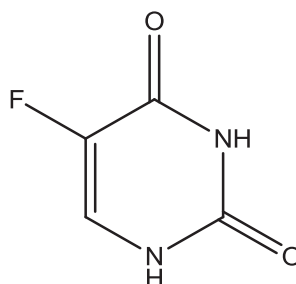


Figura 1. 5 - Estrutura do fármaco 5-fluorouracilo.

O modo de acção do 5-Fu no interior da célula consiste na sua transformação em diferentes metabólitos citotóxicos que são posteriormente incorporados no DNA e RNA, induzindo a paragem do ciclo celular e desencadeando, conseqüentemente, a apoptose celular através da inibição da capacidade das células para sintetizar DNA [29].

Quimicamente, o 5-Fu comporta-se como um ácido, com um valor de pK_a igual a 8 e cuja solubilidade é 12,2 mg/ml em água, à temperatura ambiente. Após a administração oral, o 5-Fu é fracamente absorvido e após a administração endovenosa é rapidamente eliminado, com aparente semi-vida terminal entre os oito e os vinte minutos. Para além destas desvantagens, a administração endovenosa deste fármaco produz efeitos tóxicos a nível sistémico, sendo portanto o encapsulamento do 5-Fu nos sistemas de libertação controlada de fármacos poliméricos bastante promissor [31, 32].

A libertação localizada e controlada dos fármacos quimioterapêuticos é reconhecida como um método potencial especialmente no tratamento de um tumor cerebral bastante específico: o glioma maligno de alto grau [33].

Os gliomas representam os tumores malignos que se desenvolvem nas células gliais e estão divididos em quatro tipos histológicos com base no grau de malignidade, sendo o grau III e o grau IV característicos dos gliomas de alto grau [34].

O glioma de alto grau acredita-se ser resultado da agregação de várias mutações que conduzem à desregulação de muitas vias de sinalização e ao contrário da maioria dos outros tumores que criam metástases até órgãos distantes, através dos sistemas linfático e vascular, este glioma maligno muito raramente migra para fora do sistema nervoso central [34].

Embora seja considerado um tumor localizado, a cirurgia raramente é curativa e a reincidência do tumor é quase inevitável. A excisão tumoral completa, apesar de poder eliminar praticamente todas as células tumorais e de aumentar o benefício da sobrevivência, torna-se praticamente impossível uma vez que pode provocar uma disfunção neurológica e pode também pôr em causa a qualidade de vida do paciente. Desta forma, há uma necessidade urgente de novos procedimentos que possam eliminar as células carcinomatosas residuais [35].

Para além da cirurgia, da radioterapia e das estratégias biológicas terapêuticas actualmente utilizadas na prática clínica, os fármacos citotóxicos têm sido a escolha promissora para o tratamento do glioma de alto grau, uma vez que são tóxicos para as células que estão em constante crescimento e proliferação, provocando conseqüentemente

a sua morte. A terapia com o auxílio de sistemas de libertação controlada de 5-Fu pode promover a acumulação específica deste fármaco anticancerígeno e a sua exposição prolongada apenas nas regiões infectadas, evitando a sua distribuição sistémica. Neste sentido, a associação do 5-Fu a sistemas de libertação controlada tem sido uma abordagem bastante atraente e que possibilita a entrega do fármaco de forma selectiva e, ao mesmo tempo, a redução da sua toxicidade [35].

1.4 Caracterização

1.4.1 Caracterização química

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

De forma a se obter uma informação detalhada a nível estrutural de cada amostra, recorreu-se a uma técnica de caracterização química.

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica que permite identificar e caracterizar os grupos funcionais presentes na amostra de um determinado material [36, 37].

Na espectroscopia de infravermelho existem diferentes técnicas, onde a mais utilizada é chamada de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*. As ligações químicas dos materiais têm propriedades fundamentais como frequências de vibração e de alongação específicas, às quais correspondem níveis energéticos específicos da molécula. Deste modo, quando a radiação infravermelha incide sobre o material e o atravessa, a molécula absorve-a. No entanto, como cada grupo funcional apresenta valores diferentes e característicos para a absorção, a leitura do espectro e as suas bandas permitem a verificação dos tipos de grupos que constituem cada composto [36-38].

O sinal de saída proveniente de um espectrómetro FTIR é um espectro onde o número de onda é representado no eixo horizontal e o eixo vertical é representado pela percentagem de transmitância, com 100% na parte superior do espectro. A transmitância é tradicionalmente utilizada para a interpretação espectral [37].

1.4.2 Quantificação da quantidade de fármaco libertada

Espectrofotometria de absorção de luz

O conhecimento da absorção de luz pelo material é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes numa solução [39].

No espectrofotómetro de feixe simples, um único feixe de luz (P_0) passa através do compartimento da amostra a ser medida. De acordo com a lei de Beer-Lambert, a absorvância é directamente proporcional à concentração da substância absorvente, desde que o coeficiente de absorção seja constante e o comprimento do caminho óptico (b) seja sempre o mesmo. A Figura 1.6 apresenta a atenuação de um feixe de radiação incidente P_0 cujo poder radiante, depois de atravessar a solução, diminui para P . A absorvância medida pelo espectrofotómetro pode ser obtida através da seguinte equação 1.1 [39]:

$$A = \log \frac{P_0}{P}. \quad (1.1)$$

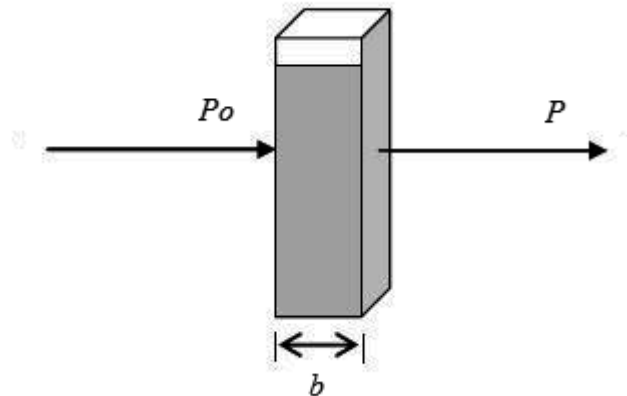


Figura 1. 6 - Esquema ilustrativo da atenuação de um feixe de radiação quando passa através de uma solução absorvente, adaptada [39].

A espectrofotometria na região do ultravioleta foi o método utilizado para determinar a concentração do fármaco libertado através dos diferentes filmes. Com o comprimento de onda igual a 265 nm, fizeram-se as medidas das absorvâncias de uma série de concentrações padrão do fármaco em questão. Com os vários valores das concentrações usadas e dos respectivos valores da absorvância obtidos pelo espectrofotómetro, construiu-se o gráfico da curva de calibração (apresentado no Capítulo II, Figura 2.1). Através da recta linear do gráfico da curva de calibração foram calculados

os valores das concentrações desconhecidas através dos valores de absorvância medidos [39].

Capítulo II

2. Trabalho experimental

2.1 Materiais

Os polímeros utilizados para a preparação dos hidrogéis foram: o dextrano produzido por *Leuconostoc*, com variados pesos moleculares – 15.000 a 30.000 g/mol, 70.000 g/mol, 450.000 a 650.000 g/mol, 2.000.000 g/mol e 5.000.000 a 40.000.000 g/mol; o amido, cujo peso molecular do monómero é 342 g/mol e, ainda, o hidroxietilamido, cujo peso molecular do monómero é 580,6 g/mol. Todos os reagentes referidos foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

O solvente usado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) (99%), previamente seco com hidreto de cálcio e destilado antes da utilização, adquirido na Arcos Organics.

Os agentes reticulantes mais utilizados foram dois: o primeiro será referido como agente reticulante AR por motivos de confidencialidade e o segundo agente reticulante utilizado, em combinação o agente reticulante AR, foi o pentaeritritol (98%), adquirido na Sigma-Aldrich cujo peso molecular é igual a 136 g/mol. Ainda, foi feito um pequeno estudo com o ácido cítrico (95%), adquirido na Sigma-Aldrich cujo peso molecular é igual a 192 g/mol.

A precipitação dos hidrogéis foi realizada com o auxílio do 2-propanol (99%), obtido através da Fisher Scientific.

Por último, o fármaco utilizado no encapsulamento foi o 5-Fu (99%) cujo peso molecular é 130 g/mol, adquirido na Sigma-Aldrich.

Para testar a capacidade de inchaço, a capacidade de degradação e a capacidade e a rapidez da libertação do fármaco em questão foi utilizado soro fisiológico adquirido na B. Braun.

2.2 Equipamentos

Os espectros FTIR foram realizados num espectrofotómetro FTIR-4200 - *Jasco* registado num comprimento de onda compreendido entre 550 e 4000 cm^{-1} . O espectrofotómetro apresenta uma resolução igual a 4 cm^{-1} e foi utilizado o modo de Reflexão Total Atenuada (ATR) para a obtenção dos espectros.

O estudo através da espectroscopia UV-Vis foi possível com recurso a um espectrofotómetro *Jasco V-530*, com lâmpadas de deutério e de tungstênio-halogénio,

com a finalidade de medir o valor da absorvância apresentada, que através da curva de calibração do fármaco poderá ser relacionada com a concentração de fármaco libertada através dos filmes. Estas medições foram realizadas num comprimento de onda igual a 265 nm.

Os filmes foram produzidos através de um método que por motivos de confidencialidade não serão descritos os pormenores.

2.3 Procedimentos

2.3.1 Preparação dos hidrogéis, respectivos sólidos e filmes

O trabalho experimental partiu de um estudo anteriormente realizado pelo grupo de trabalho e foram, inicialmente, testados cinco diferentes pesos moleculares do dextrano iguais a: 15.000 - 30.000 g/mol; 70.000 g/mol; 450.000 - 650.000 g/mol; 2.000.000 g/mol; e, ainda, 5.000.000 - 40.000.000 g/mol para a síntese dos hidrogéis.

A reacção de síntese (*Tipo I*) teve início com a dissolução do polímero no solvente, o DMSO, a uma temperatura igual a 40° C. Ocorrida a dissolução, que demorou, no máximo, cerca de uma hora, a solução foi borbulhada com azoto durante cerca de dez minutos e o agente reticulante AR foi, posteriormente, adicionado. A reacção de reticulação ficou a ocorrer durante a noite, a 40° C, com formação ou não de um produto de reacção sob a forma de um gel.

É de notar que o dextrano de 5.000.000 a 40.000.000 g/mol não apresentou uma boa solubilidade no solvente em questão e como tal foi necessário adicionar mais 20 ml de solvente, em relação à quantidade estipulada, para que a dissolução ocorresse.

Através deste método foram realizadas cinco reacções (*Tipo I*) que decorreram conforme as quantidades apresentadas na Tabela 2.1 e formaram cinco produtos: as amostras Dex1; Dex2; Dex3; Dex4 e Dex5.

Tabela 2. 1 – Quantidades dos reagentes e produtos das reacções *Tipo I*.

Amostra	Tipo de polímero e peso molecular (g/mol)	Quantidade de polímero (mg)	Quantidade de DMSO seco e destilado (ml)	Quantidade do agente reticulante AR (mg)	Formação de um produto gelificado (Sim/Não) e temperatura da reacção	Tempo e tipo de precipitação	Peso final (mg)
Dex1	Dextrano 15.000-30.000	510,7	10,0	x	Não T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	667,6
Dex2	Dextrano 70.000	501,6	10,0	x	Não T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	739,0
Dex3	Dextrano 450.000-650.000	501,1	10,0	x	Sim T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	508,4
Dex4	Dextrano 2.000.000	509,0	10,0	x	Sim T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	638,8
Dex5	Dextrano 5.000.000-40.000.000	501,2	10,0 + 20,0	x	Não T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	637,8

O estudo experimental prosseguiu com a alteração da quantidade dos reagentes e com a alteração da ordem dos reagentes na reacção.

A alteração da quantidade dos reagentes levou, através do mesmo tipo de reacção (*Tipo I*), à formação de quatro produtos: as amostras Dex7, Dex8, Dex9 e Dex10. Nestes casos, os passos experimentais referentes à síntese das várias amostras decorreram conforme já foi descrito, sem alterações, uma vez que apenas foi alterada a quantidade do agente reticulante AR.

Na reacção (*Tipo II*) que deu origem ao produto Dex6 houve a alteração da ordem dos reagentes na reacção, isto é, neste caso, o agente reticulante AR foi dissolvido no DMSO, a 40° C, e só posteriormente é que foi adicionado o polímero. A dissolução do agente reticulante AR no solvente em questão não foi fácil, uma vez que foi necessário adicionar mais 1 ml de solvente para que a dissolução ocorresse. Ocorrida a dissolução, a solução foi borbulhada com azoto, durante cerca de dez minutos, e o polímero foi adicionado. A reacção de reticulação ficou a ocorrer durante a noite, a 40° C, com formação ou não de um produto de reacção sob a forma de um gel.

Estas reacções foram apenas realizadas com o dextrano de 2.000.000 g/mol e a Tabela 2.2 apresenta as modificações induzidas na síntese dos hidrogéis.

Tabela 2. 2 - Alterações provocadas na síntese dos hidrogéis de dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol.

Amostra	Quantidade de polímero (mg)	Quantidade de DMSO seco e destilado (ml)	Quantidade do agente reticulante AR (mg)	Formação de um produto gelificado (Sim/Não) e temperatura da reacção	Tempo e tipo de precipitação	Peso final (mg)
Dex6	496,3 ⁽¹⁾	10,0 + 1,0	x	Sim T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	521,8
Dex7	500,6	10,0	$\frac{x}{4}$	Sim T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	632,9
Dex8	497,6	10,0	$\frac{x}{2}$	Sim T = 40° C	De 3h a 4h 2-propanol	416,5
Dex9	500,8	10,0	$x - \frac{x}{4}$	Sim T = 40° C	Toda a noite 2-propanol	631,0
Dex10	500,2	10,0	$x + \frac{x}{4}$	Sim T = 40° C	Toda a noite 2-propanol	592,2

(1) Nesta reacção não foi possível adicionar os 496,3 mg de polímero previstos inicialmente uma vez que, quando o polímero foi adicionado, a reacção de reticulação ocorreu instantaneamente.

Para além do dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol, o dextrano com peso molecular entre 450.000 e 650.000 g/mol também foi alvo de estudos mais aprofundados.

A etapa seguinte consistiu na utilização um segundo agente reticulante, o pentaeritritol, na reacção de síntese dos hidrogéis. A quantidade do agente reticulante pentaeritritol foi dissolvida juntamente com o polímero no DMSO. A dissolução ocorreu a uma temperatura igual a 40° C, durante aproximadamente uma hora e, de seguida, a solução foi borbulhada, durante cerca de dez minutos, com azoto. O agente reticulante AR foi adicionado posteriormente. A reacção de reticulação ficou a ocorrer durante a noite, a 40° C, com formação ou não de um produto de reacção sob a forma de um gel.

As quantidades dos reagentes utilizados nestas duas reacções de síntese (*Tipo III*) e as quantidades dos respectivos produtos (amostras Dex11 e Dex12) formados encontram-se apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3 - Adição de um segundo agente reticulante na síntese dos hidrogéis de dextrano: reacções *Tipo III*.

Amostra	Dex11	Dex12
Tipo de polímero e peso molecular (g/mol)	Dextrano 450.000-650.000	Dextrano 2.000.000
Quantidade de polímero (mg)	500,3	500,7
Quantidade do agente reticulante pentaeritritol (mg)	103,2	100,1
Quantidade de DMSO seco e destilado (ml)	10,0	10,0
Quantidade do agente reticulante AR (mg)	x	x
Formação de um produto gelificado (Sim/Não) e temperatura da reacção	Sim T = 40° C	Sim T = 40° C
Tempo e tipo de precipitação	De 3h a 4h 2-propanol	De 3h a 4h 2-propanol
Peso final (mg)	513,8	569,3

Apesar do polímero mais utilizado em todo este trabalho experimental ter sido o dextrano, o amido e o hidroxietilamido tiveram um papel secundário no estudo da síntese de hidrogéis biocompatíveis.

O trabalho experimental realizado com estes polímeros foi exactamente igual ao trabalho executado com o polímero anterior. As reacções (*Tipo IV* e *Tipo V*) tiveram início com a dissolução dos polímeros amido e hidroxietilamido no solvente, o DMSO, a uma temperatura igual a 40° C e 55° C, respectivamente. Ocorridas as respectivas dissoluções, cada solução foi borbulhada, durante cerca de dez minutos, com azoto e o agente reticulante AR foi adicionado. As reacções de reticulação ficaram a ocorrer durante toda a noite, a 40° C e a 55° C respectivamente, havendo ou não a formação de produtos de reacção sob a forma de gel.

Uma vez que a dissolução do amido no DMSO foi bastante difícil e demorada, foi necessário adicionar o dobro da quantidade de solvente estipulada.

A Tabela 2.4 apresenta das quantidades dos reagentes utilizados nestas duas reacções e as quantidades dos produtos (amostras Ami1 e Hea1) formados.

Tabela 2. 4 - Quantidades dos reagentes utilizados nas reacções que proporcionaram a síntese dos hidrogéis de amido e hidroxietilamido.

Amostra	Ami1	Hea1
Tipo de polímero e peso molecular do monómero (g/mol)	Amido 342,3	Hidroxietilamido 580,6
Quantidade de polímero (mg)	501,1	501,6
Quantidade de DMSO seco e destilado (ml)	10,0 + 10,0	10,0
Quantidade do agente reticulante AR (mg)	x	x
Formação de um produto gelificado (Sim/Não) e temperatura da reacção	Sim T = 40° C	Sim T = 55° C
Tempo e tipo de precipitação	Toda a noite 2-propanol	De 3h a 4h 2-propanol
Peso final (mg)	237,4	578,0

A última etapa deste trabalho experimental foi realizada apenas com o polímero hidroxietilamido e, como no caso do dextrano, consistiu na adição de um segundo agente reticulante: o pentaeritritol.

A quantidade do agente reticulante pentaeritritol foi adicionada juntamente com o hidroxietilamido ao solvente DMSO, para que fosse possível a dissolução a 55° C. O agente reticulante AR foi apenas adicionado depois do polímero e do agente reticulante pentaeritritol se dissolverem na totalidade no solvente em questão e da solução ter sido borbulhada, durante cerca de dez minutos, com azoto. A reacção de reticulação ficou a ocorrer durante a noite, a 55 ° C, com formação ou não de um produto de reacção sob a forma de um gel.

As quantidades de reagentes utilizadas nas duas reacções de síntese (*Tipo VI*) e a quantidade dos respectivos produtos (amostras Hea2 e Hea3) encontram-se apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2. 5 - Adição do agente reticulante pentaeritritol na síntese dos hidrogéis de hidroxietilamido.

Amostra	Hea2	Hea3
Tipo de polímero e peso molecular do monómero (g/mol)	Hidroxietilamido 580,6	Hidroxietilamido 580,6
Quantidade de polímero (mg)	501,3	500,1
Quantidade do agente reticulante pentaeritritol (mg)	101,8	250,8
Quantidade de DMSO seco e destilado (ml)	10,0	10,0
Quantidade do agente reticulante AR (mg)	<i>x</i>	<i>x</i>
Formação de um produto gelificado (Sim/Não) e temperatura da reacção	Sim T = 55° C	Sim T = 55° C
Tempo e tipo de precipitação	De 3h a 4h 2-propanol	De 3h a 4h 2-propanol
Peso final (mg)	594,7	485,8

Para além do agente reticulante pentaeritritol, também foi estudado o comportamento de um outro agente reticulante: o ácido cítrico.

O ácido cítrico (250,8 mg) foi dissolvido juntamente com o hidroxietilamido (500,0 mg) no DMSO (10,0 ml). Ocorrida a dissolução a 55° C, durante cerca de uma hora, e após a solução ter sido borbulhada durante dez minutos com azoto, o agente reticulante AR (*x* mg) foi adicionado. À medida que o agente reticulante AR ia sendo adicionado, a solução ia ficando cada vez mais amarelada até que atingiu uma tonalidade vermelha após ter sido adicionada a quantidade total do agente reticulante AR. A solução permaneceu a 55° C durante algum tempo e não se verificaram alterações na tonalidade, nem na textura líquida da solução.

É de notar que em todas as reacções mencionadas, a devida quantidade do agente reticulante AR teve de ser adicionada muito lentamente, uma vez que se fosse depositada de uma só vez os resultados eram comprometidos.

Precipitação com auxílio do 2-propanol

Depois de concretizadas todas as reacções que proporcionaram a síntese dos vários hidrogéis, os produtos sintetizados que se apresentaram sob a forma de gel foram lavados com 2-propanol de modo a garantir que o solvente, ou seja, que o DMSO fosse eliminado. A lavagem demorou, em praticamente todos os casos, cerca de quatro horas e depois desse tempo, todas as amostras foram filtradas em vácuo, obtendo-se no final um produto sólido. É de notar que, sensivelmente, passadas duas horas da lavagem dos produtos, a quantidade de 2-propanol era trocada por uma nova de maneira a garantir a eficácia da eliminação do DMSO.

O último passo consistiu em colocar as amostras sólidas no evaporador rotativo de modo a eliminar os vestígios de 2-propanol que poderiam ter ficado nas várias amostras, mesmo após estas terem sido lavadas e filtradas em vácuo.

Formação de filmes com base nos sólidos sintetizados

Utilizando os produtos sólidos até então produzidos, este passo experimental consistiu em perceber quais tinham a capacidade de formar um filme, de modo a ser possível, posteriormente, proceder ao encapsulamento do fármaco. Os resultados referentes a esta etapa serão apresentados no Capítulo III, na Tabela 3.1.

2.3.2 Encapsulamento do fármaco 5-Fu

Já com os produtos sólidos sob a forma de filme, procedeu-se ao encapsulamento do fármaco 5-Fu. Assim, foram encapsulados nos vários filmes, com cerca de 100 mg de sólido, respectivamente 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg de fármaco.

Método de encapsulamento I

Inicialmente, foram pipetados 0,15 ml da solução fármaco de concentração igual a 10 mg/ml e foram depositados em cima de vários filmes referentes às amostras Dex3 e Dex4. Desta forma, foram encapsulados 1,5 mg de 5-Fu em cada um dos filmes e de seguida, estes foram colocados numa estufa a 37° C durante aproximadamente três dias, de modo a absorverem a quantidade de fármaco neles depositado. Depois de terem

absorvido o fármaco, um dos filmes foi seco num liofilizador. Contudo, como a extrema diminuição da temperatura utilizada neste processo provocou a sua ruptura, este método de secagem foi posto de parte e optou-se por secar os restantes filmes num exsiccador em vácuo durante aproximadamente dois dias.

Passados os dois dias de secagem no exsiccador, os filmes foram colocados em 5 ml de soro fisiológico (pH neutro), numa estufa com temperatura igual a 37° C de modo a simular a temperatura do corpo humano e foi medida a absorvância no próprio dia e nos dias seguintes, de forma a ser possível, através do seu valor, calcular a quantidade de fármaco libertada através dos filmes ao longo do tempo.

O seguinte objectivo consistiu em encapsular 3,0 mg de 5-Fu em cada um dos vários filmes referentes às amostras Dex3 e Dex4. Assim sendo, nesta etapa, o trabalho experimental acima descrito foi repetido duas vezes, de modo a ser encapsulado nos filmes o dobro da quantidade de fármaco.

Os filmes foram colocados em 8 ml de soro fisiológico, de maneira a ser possível efectuar mais medições da absorvância através do espectrofotómetro, uma vez que a quantidade de soro retirada dos 8 ml para medir a absorvância não era repostada. Apesar da quantidade de soro fisiológico onde foram colocados os filmes ter sido adaptada, a temperatura da estufa onde se encontravam manteve-se a mesma, 37° C.

Método de encapsulamento II

O desenvolvimento do trabalho experimental consistiu em recorrer a outra estratégia de encapsulamento do fármaco. Nesta fase, foram pesadas várias amostras de aproximadamente 100 mg dos dois tipos de sólidos referentes às amostras Dex3 e Dex4 e o material encapsulante, juntamente com o fármaco (3,0 e 6,0 mg) originaram os filmes. Assim, os filmes preparados nesta etapa já continham o fármaco 5-Fu e deste modo, não foi necessário proceder ao encapsulamento do fármaco através da deposição da solução de fármaco nos diferentes filmes, como aconteceu no método anterior.

Depois de sintetizados os filmes, já com 3,0 mg de fármaco cada um, estes foram colocados em 8 ml de soro fisiológico, numa estufa a 37° C, e foi estudada a libertação do fármaco através dos vários filmes ao longo de vários dias.

O penúltimo passo experimental consistiu em utilizar apenas o sólido referente à amostra Dex4 e, da mesma forma, foram pesadas várias amostras do sólido com

aproximadamente 100 mg, mas desta vez juntamente com 6,0 mg de fármaco cada amostra para a formação dos filmes.

Estes filmes sintetizados foram colocados em 8 ml de soro fisiológico, foram submetidos a uma temperatura de 37° C e foi estudada a libertação do fármaco 5-Fu através dos vários filmes ao longo de vários dias.

A actividade experimental terminou com a repetição do passo experimental anterior, ou seja, foi utilizado apenas o sólido referente à amostra Dex4 e, da mesma forma, foram pesadas várias amostras do sólido com aproximadamente 100 mg, mas neste caso juntamente com 3,0 mg de fármaco cada amostra para a formação dos filmes.

Uma vez formados os filmes com o fármaco já encapsulado, estes foram posteriormente colocados em 4 ml de soro fisiológico e foram submetidos a uma temperatura igual a 37° C. A diferença deste estudo em relação aos anteriores, para além da quantidade de soro fisiológico em que foram colocados os filmes, foi que soro onde os filmes se encontravam imersos, sempre que se efectuava uma medição no espectrofotómetro era trocado, isto é, os filmes eram colocados em 4 ml de soro fisiológico novos. Da mesma forma, foi estudada a libertação do fármaco 5-Fu através dos vários filmes ao longo de vários dias.

A Tabela 2.6 apresenta resumidamente todas as etapas inerentes ao processo de encapsulamento do fármaco 5-Fu nos filmes das amostras Dex3 e Dex4.

Tabela 2. 6 - Resumo dos dois métodos de encapsulamento utilizados.

<i>Método de encapsulamento I</i>			
Condições de encapsulamento	Amostra	Quantidade de 5-Fu encapsulado (mg)	Condições de libertação
O encapsulamento deu-se através da deposição da solução de fármaco nos vários filmes. Posteriormente estes foram colocados numa estufa a 37° C de modo a que o fármaco fosse absorvido (3 dias), seguindo-se um processo de secagem num exsiccador em vácuo (2 dias).	Dex3 (dextrano com peso molecular igual a 450.000-650.000 g/mol)	1,5	Volume de soro fisiológico igual a 5 ml e uma temperatura igual a 37° C durante alguns dias.
	Dex4 (dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol)		
	Dex3 (dextrano com peso molecular igual a 450.000-650.000 g/mol)	3,0	Volume de soro fisiológico igual a 8 ml e uma temperatura igual a 37° C durante alguns dias.
	Dex4 (dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol)		
<i>Método de encapsulamento II</i>			
Condições de encapsulamento	Amostra	Quantidade de 5-Fu encapsulado (mg)	Condições de libertação
As amostras juntamente com a respectiva quantidade do fármaco 5-Fu deram origem aos vários filmes.	Dex3 (dextrano com peso molecular igual a 450.000-650.000 g/mol)	3,0	Volume de soro fisiológico (pH neutro) igual a 8 ml e uma temperatura igual a 37° C durante alguns dias.
		3,0	Volume de soro fisiológico (pH neutro) igual a 8 ml e uma temperatura igual a 37° C durante alguns dias.
		6,0	Volume de soro fisiológico (pH neutro) igual a 8 ml e uma temperatura igual a 37° C durante alguns dias.
	Dex4 (dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol)	3,0	Volume de soro fisiológico (pH neutro) igual a 4 ml. Esta quantidade de soro onde os filmes se encontravam imersos, sempre que se efectuava uma medição no espectrofotómetro era trocada, isto é, os filmes eram colocados em 4 ml de soro fisiológico novos. Temperatura igual a 37° C durante alguns dias.

Os valores da quantidade de fármaco libertada através dos filmes em todas estas etapas experimentais serão apresentados no Capítulo III.

2.3.3 Curva de calibração do fármaco 5-Fu

A Figura 2.1 apresenta a curva de calibração referente ao fármaco 5-Fu. Curva de calibração é o nome dado à recta que relaciona a absorvância medida no espectrofotómetro com a concentração de fármaco libertada.

Uma vez que a solubilidade deste fármaco em água e à temperatura ambiente é 12,2 mg/ml, foram preparadas quatro soluções iniciais de concentrações iguais a: 10 mg/ml; 5 mg/ml; 1 mg/ml e 0,5 mg/ml. A partir das soluções de 1 mg/ml e a 0,5 mg/ml foram feitas várias diluições, tendo-se obtido as seguintes concentrações: 0,04 mg/ml (1:25) e 0,02 mg/ml (1:50) em relação à solução de 1 mg/ml e 0,25 mg/ml (1:2) e 0,1 mg/ml (1:5) em relação à solução de concentração igual a 0,5 mg/ml. Uma vez que, estas últimas soluções de 0,25 mg/ml e a 0,1 mg/ml correspondiam a valores de absorvância bastante elevados, voltaram a ser diluídas (1:10) e foram obtidas as seguintes concentrações: 0,025 mg/ml e 0,01 mg/ml, respectivamente. Desta forma, os valores de concentração utilizados para traçar a curva de calibração foram os seguintes: 0,01 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,025 mg/ml e 0,04 mg/ml.

A recta da curva de calibração é dada pela seguinte equação 2.1:

$$y = 46,001x, \quad (2.1)$$

onde o y se refere à absorvância medida e o x à concentração de fármaco.

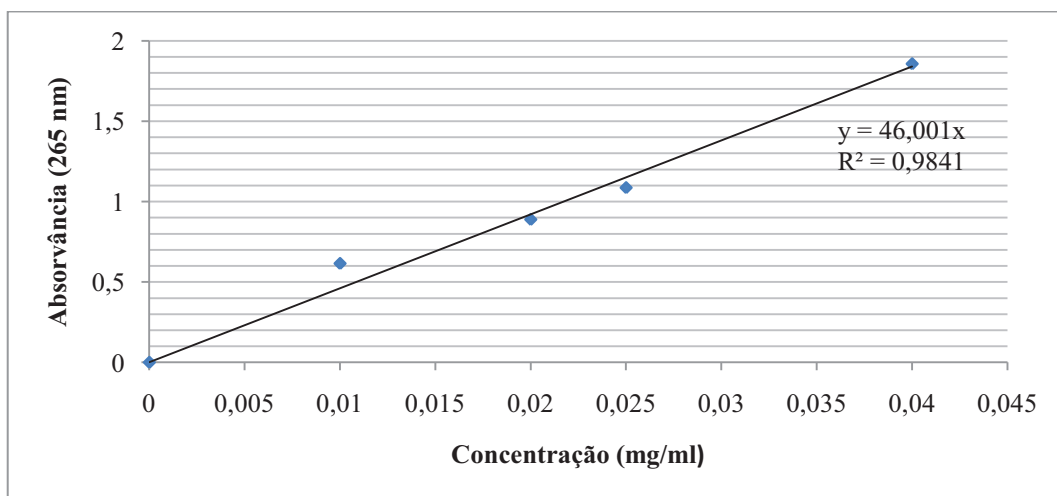


Figura 2. 1 - Curva de calibração referente ao fármaco 5-Fu.

Capítulo III

3. Resultados e discussão dos resultados

3.1 Síntese dos hidrogéis

Reacção do dextrano com os agentes reticulantes

O dextrano é uma substância coloidal, hidrofílica e solúvel em água. Para além destas propriedades, o dextrano é biocompatível e possui vários grupos funcionais hidroxilo pendentes, tornando-se passível a ocorrência de modificações químicas [12, 19].

Assim, foram testados, como já foi referido no Capítulo II, cinco diferentes pesos moleculares do dextrano, onde apenas dois manifestaram as características adequadas para serem utilizados nos passos experimentais seguintes. Enquanto que os dextransos com pesos moleculares de 450.000 - 650.000 g/mol (amostra Dex3) e de 2.000.000 g/mol (amostra Dex4) depois de reagidos com o agente reticulante AR revelaram apresentar características bastante promissoras para os próximos passos experimentais, os outros três dextransos testados, de 15.000 - 30.000 g/mol (amostra Dex1), de 70.000 g/mol (amostra Dex2) e de 5.000.000 - 40.000.000 g/mol (amostra Dex5) depois de reagidos com o agente reticulante AR não foram capazes de produzir um produto de reacção sob a forma de um gel. Por estes motivos, os dextransos com estes três últimos pesos moleculares referidos não foram novamente utilizadas nos estudos seguintes.

Assim sendo, os diferentes dextransos acima mencionados foram inicialmente dissolvidos em DMSO e posteriormente, foi adicionado o agente reticulante AR (Figura 3.1). Esta reacção *Tipo I* caracteriza-se maioritariamente pela reacção de reticulação entre os grupos funcionais hidroxilo do dextrano e os grupos do agente reticulante AR, cujo produto de reacção é preferencialmente um produto gelificado.

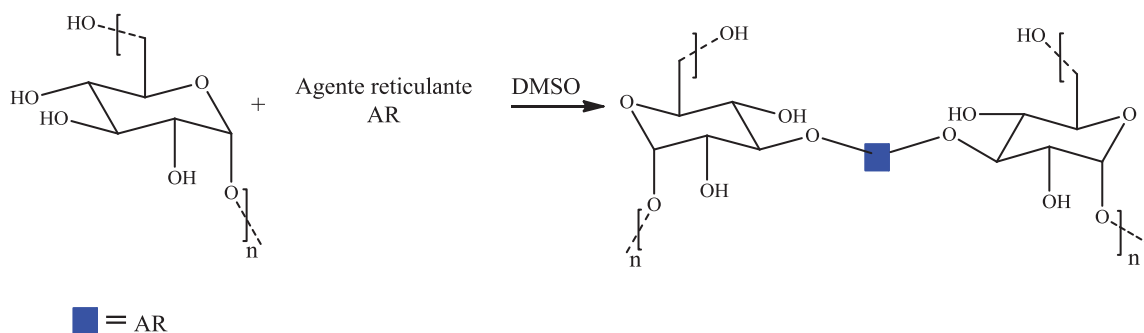


Figura 3. 1 - Reacção *Tipo I*: Reacção de reticulação entre o dextrano e o agente reticulante AR.

O estudo experimental prosseguiu com a alteração da quantidade dos reagentes e com a alteração da ordem dos reagentes na reacção de síntese dos hidrogéis de dextrano de peso molecular igual a 2.000.000 g/ mol. Estas alterações visaram perceber se a quantidade e a ordem dos reagentes na reacção influenciavam as características dos produtos finais.

Enquanto que a alteração da quantidade dos reagentes não levou à alteração do tipo de reacção, permanecendo do *Tipo I*, a alteração da ordem dos reagentes na reacção levou a que ocorresse outro tipo de reacção: reacção *Tipo II*.

Nas reacções que deram origem à formação dos produtos Dex7, Dex8, Dex9 e Dex10 houve apenas uma alteração na quantidade dos reagentes, mais propriamente na quantidade do agente reticulante AR. No entanto, na reacção que deu origem ao produto Dex6 houve a alteração da ordem dos reagentes na reacção, isto é, neste caso, o agente reticulante AR foi dissolvido no DMSO e só posteriormente é que foi adicionado o polímero.

A reacção *Tipo II*, na presença de uma grande quantidade de agente reticulante AR, não ocorreu conforme as anteriores, já que, uma vez colocado o polímero na solução constituída pelo agente reticulante AR dissolvido no DMSO, a reticulação ocorreu de forma instantânea. A Figura 3.2. apresenta esta reacção.

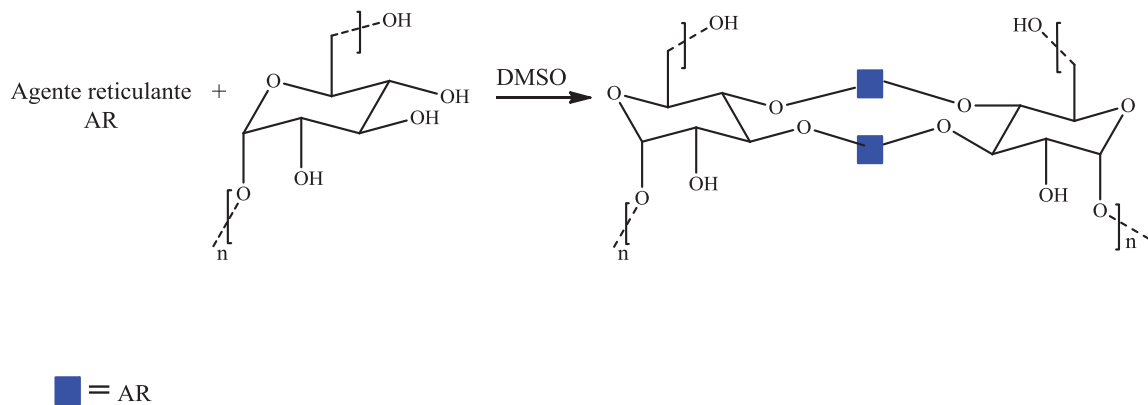


Figura 3. 2 - Reacção *Tipo II*: Reacção de reticulação entre o agente reticulante AR e o dextrano.

A etapa seguinte consistiu em tentar melhorar as características dos hidrogéis de dextrano com peso molecular entre 450.000 e 650.000 g/mol e, novamente, dos hidrogéis de dextrano com peso molecular igual a 2.000.000 g/mol, de modo a ser possível sintetizar novos produtos sólidos ainda mais favoráveis para a aplicação pretendida, o

encapsulamento e a libertação controlada de fármacos. Deste modo, foi adicionado um segundo agente reticulante, o pentaeritritol. A nova reacção, *Tipo III*, é apresentada na Figura 3.3 e caracteriza-se maioritariamente pela reacção de reticulação entre os grupos funcionais hidroxilo do dextrano e os grupos funcionais dos agentes reticulantes AR e pentaeritritol.

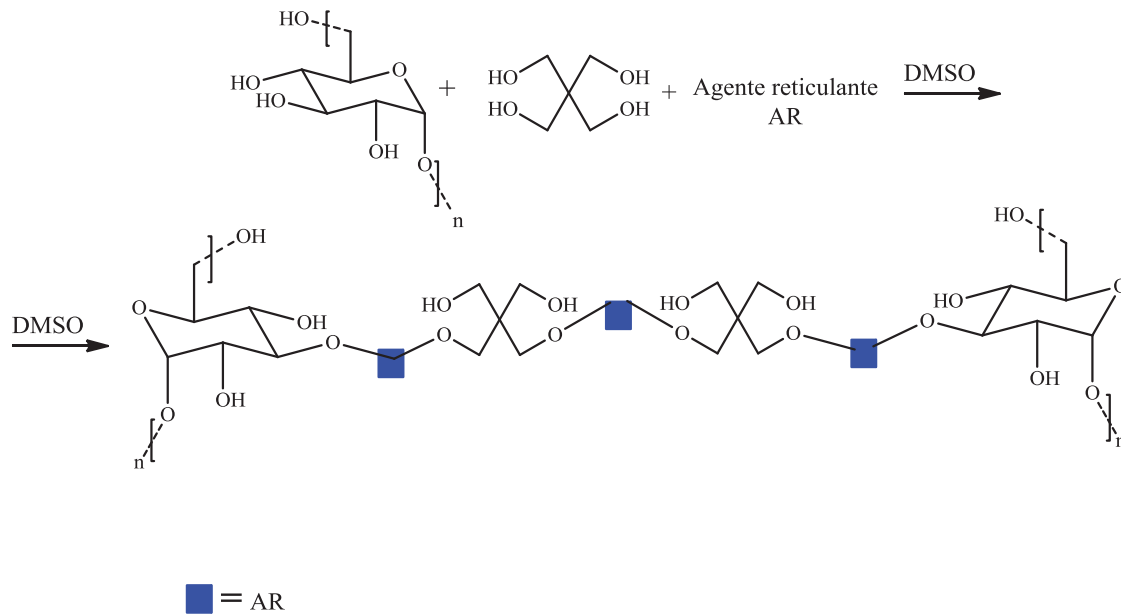


Figura 3.3 - Reacção *Tipo III*: Reacção de reticulação entre o dextrano, o agente reticulante pentaeritritol e o agente reticulante AR.

Reacção do amido e do hidroxietilamido com os agentes reticulantes

Apesar do polímero mais utilizado em todo este trabalho experimental ter sido o dextrano, o amido e o hidroxietilamido tiveram um papel secundário no estudo da síntese de hidrogéis biocompatíveis. Uma vez que, tal como o dextrano, o amido é um polissacarídeo de glicose e o hidroxietilamido é um polímero biodegradável derivado do amido, houve a tentativa de implementar estes métodos estudados também nestes polímeros [40].

Apesar de o trabalho experimental realizado com estes polímeros ter sido exactamente igual ao trabalho executado com o polímero anterior, como se tratam de polímeros diferentes, os tipos de reacções de reticulação que originam a síntese dos hidrogéis de amido e de hidroxietilamido são, também, diferentes e apresentadas respectivamente na Figura 3.4 e na Figura 3.5.

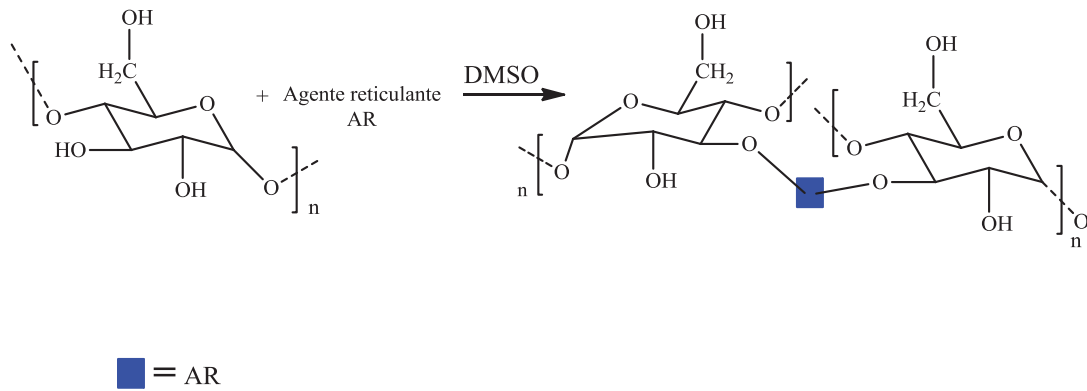


Figura 3. 4 - Reacção *Tipo IV*: Reacção de reticulação entre o amido e o agente reticulante AR.

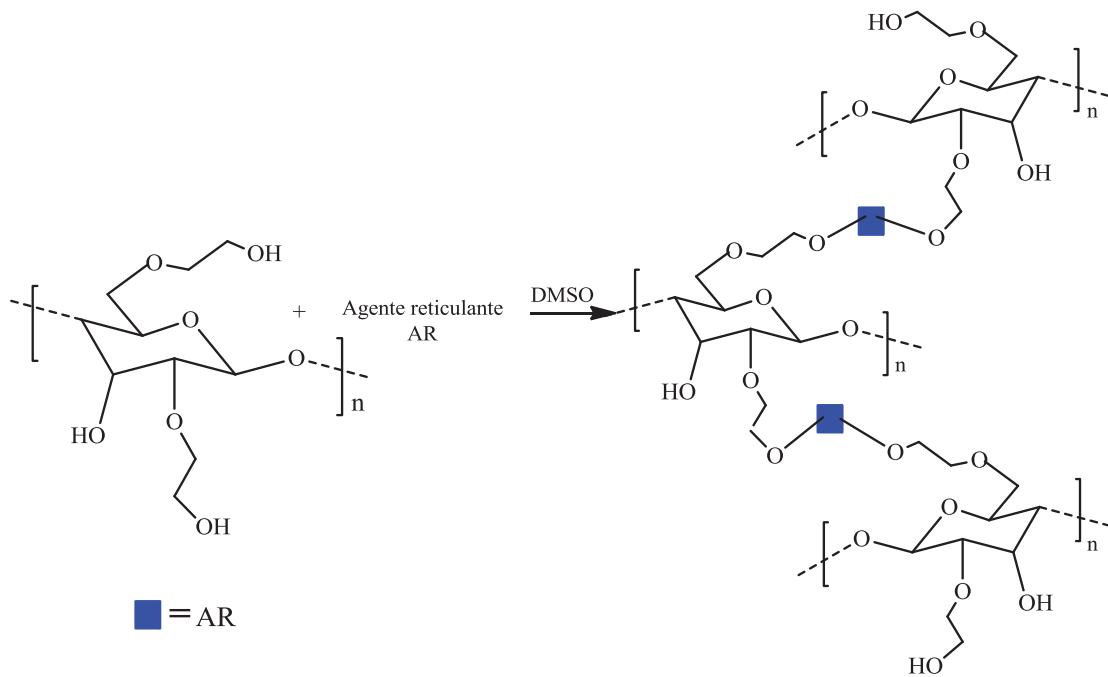


Figura 3. 5 - Reacção *Tipo V*: Reacção de reticulação entre o hidroxietilamido e o agente reticulante AR.

Ao contrário da reacção *Tipo V* que originou um produto de reacção sob a forma de gel, o produto da reacção *Tipo IV* não apresentava a forma gelificada e assim sendo, os testes na próxima e última etapa experimental foram apenas realizados com o polímero hidroxietilamido.

A última etapa deste trabalho experimental consistiu, como no caso do dextrano, na adição de um segundo agente reticulante: o pentaeritritol. A reacção originou uma reacção *Tipo VI*, que é apresentada na Figura 3.6.

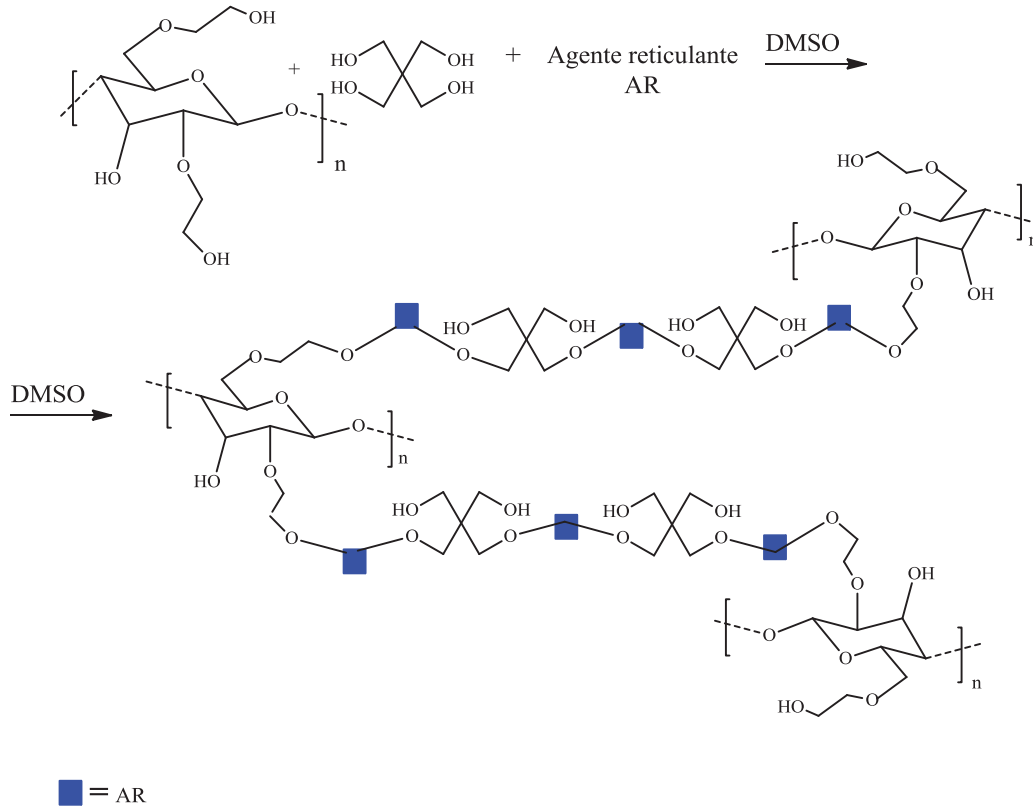


Figura 3. 6 - Reacção *Tipo VI*: Reacção de reticulação entre o hidroxietilamido, o agente reticulante pentaeritritol e o agente reticulante AR.

Depois de apresentadas todas as reacções descritas no Capítulo II, de conhecer as amostras que formaram produto de reacção gelificado e que, posteriormente, originaram produtos sólidos que permitiram ou não a formação de filmes (Tabela 3.1), o trabalho experimental prosseguiu com o estudo da capacidade de inchaço e da capacidade de degradação destes mesmos filmes. No entanto é importante conhecer as razões que não permitiram a formação de um produto de reacção gelificado no casos das amostras Dex1, Dex2, Dex5 e Ami1 e as razões que, apesar de permitirem a formação de um produto de reacção gelificado, não permitiram a formação de um filme a partir dos produtos sólidos finais no caso das amostras Dex7, Hea1 e Hea2.

Tabela 3. 1 – Capacidade de formação de produtos de reacção sob a forma de gel e de filmes a partir dos produtos sólidos finais.

Amostra	Formação de um produto de reacção gelificado	Formação de filme a partir do produto sólido final
Dex1	Não	-
Dex2	Não	-
Dex3	Sim	Sim
Dex4	Sim	Sim
Dex5	Não	-
Dex6	Sim	Sim
Dex7	Sim	Não
Dex8	Sim	Sim
Dex9	Sim	Sim
Dex10	Sim	Sim
Dex11	Sim	Sim
Dex12	Sim	Sim
Ami1	Não	-
Hea1	Sim	Não
Hea2	Sim	Não
Hea3	Sim	Sim

3.2 Amostras cuja reacção não originou a formação de um produto de reacção gelificado

Amostras Dex1 e Dex2

As amostras Dex1 e Dex2 são formadas a partir do polímero dextrano, mas com pesos moleculares diferentes. Enquanto que a amostra Dex1 é formada pelo dextrano com peso molecular de 15.000-30.000 g/mol, a amostra Dex2 é formada pelo dextrano com peso molecular de 70.000 g/mol. Apesar dos pesos moleculares do mesmo polímero serem diferentes, ambos revelaram apresentar um valor inferior ao necessário para que reacção de reticulação originasse a formação de um produto de reacção sob a forma de um gel.

A análise FTIR permite avaliar o nível de conversão das reacções químicas. Neste caso, é a presença de grupos carboxílicos que se localizam a, sensivelmente, 1750 cm⁻¹ que confirmam se houve a alteração na estrutura do polímero, isto é, que verificam a

ocorrência da reacção de reticulação entre o polímero e o(s) agente(s) reticulante(s). Assim, apesar de o produto da reacção formado não apresentar a forma de um gel, os espectros FTIR destas duas amostras apresentados no Anexo A (Figuras A.1 e A.2) confirmam ter ocorrido uma reacção de reticulação entre o polímero e o agente reticulante AR, uma vez que se verifica um pico aos $1748,3\text{ cm}^{-1}$ em ambas as amostras.

Amostra Dex5

Em relação à amostra Dex5, também constituída pelo polímero dextrano e com um peso molecular entre 5.000.000 e 40.000.000 g/mol, o motivo que causou a não formação de um produto sob a forma de um gel no final da reacção do polímero com o agente reticulante AR, deveu-se ao facto de nesta reacção a quantidade de solvente adicionada ter sido o triplo da utilizada nos ensaios com formação de gel, uma vez que o polímero demonstrou bastantes dificuldades em se dissolver no solvente em questão.

No caso da amostra Dex5, tal com nas duas amostras anteriores, apesar do produto da reacção formado não se apresentar a forma de um gel, o espectro FTIR referente a esta amostra e apresentado no Anexo A (Figura A.5) confirma ter ocorrido uma reacção de reticulação entre o polímero e o agente reticulante AR, verificando-se um pico aos $1748,3\text{ cm}^{-1}$.

Amostra Ami1

A amostra Ami1 foi a quarta e última amostra das dezasseis sintetizadas cuja reacção não permitiu a formação de um produto de reacção gelificado. A amostra Ami1 foi a única formada pelo polímero amido e a sua reacção com o agente reticulante AR não ocorreu de forma eficiente o suficiente para permitir a formação de um produto sob a forma de gel.

O espectro FTIR referente a esta amostra encontra-se apresentado no Anexo A (Figura A.11) e verifica, também, a ocorrência de uma reacção de reticulação, sendo visualizado um pico aos $1748,3\text{ cm}^{-1}$.

3.3 Amostras cuja reacção originou a formação de um produto de reacção gelificado, mas não foi possível a formação de um filme a partir do produto sólido final

Amostra Dex7

São três as amostras que correspondem a estas características. A amostra Dex7 foi sintetizada a partir da reacção do polímero dextrano (2.000.000 g/mol) com uma quantidade muito pequena do agente reticulante AR em relação às amostras que possibilitaram a formação de um filme a partir do produto sólido final. Apesar da pequena quantidade do agente reticulante ter sido suficiente para possibilitar a ocorrência de um produto de reacção sob a forma de um gel, não foi suficiente para possibilitar a formação de um filme com base no produto sólido formado após a precipitação em 2-propanol do produto da reacção gelificado.

O espectro FTIR referente a esta amostra encontra-se apresentado no Anexo A (Figura A.7) e pode-se observar um pico aos 1748,3 cm⁻¹ relativo à ocorrência da reacção de reticulação entre o polímero e o agente reticulante.

Amostras Hea1 e Hea2

Uma vez que o polímero utilizado nestas duas amostras, o hidroxietilamido, apresenta um peso molecular elevado, juntamente com o agente reticulante AR possibilitou a ocorrência de uma reacção de reticulação, confirmada mais uma vez através da observação dos espectros FTIR, e a formação de produtos de reacção sob a forma de gel. No entanto, a reacção de reticulação não ocorreu de maneira eficiente o suficiente para permitir a formação de um filme a partir da amostra Hea1.

A amostra Hea2 foi sintetizada a partir de uma reacção de reticulação que levou, como já foi referido, à formação de um produto de reacção sob a forma de um gel. Como tentativa de formar um filme a partir do produto sólido, para a síntese desta amostra foi utilizado para além do agente reticulante AR, o agente reticulante pentaeritritol. Mesmo com a utilização do agente reticulante pentaeritritol, a sua quantidade não foi suficiente para permitir, também neste caso, a formação de um filme.

Os espectros FTIR referentes a estas duas amostras encontram-se apresentados no Anexo A (Figuras A.12 e A.13) e as informações referentes à constituição de todas as amostras referidas encontram-se apresentadas nas Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4 do Capítulo II.

3.4 Amostras cuja reacção originou a formação de um produto de reacção gelificado e foi possível a formação de um filme a partir do produto sólido final

Apesar de terem havido amostras cujos resultados não foram favoráveis para o desenvolvimento dos seguintes passos da actividade experimental, houve amostras cujas características para além de permitirem a formação de um produto gelificado no final da reacção, possibilitaram, também, a formação de um filme a partir do produto sólido formado após o processo de precipitação do gel. Assim sendo, com os filmes formados a partir de algumas destas amostras, foram realizados estudos acerca da sua capacidade de inchaço e do tempo que demoraria até à sua total degradação.

3.4.1 Grau de inchaço médio à temperatura ambiente

Esta etapa teve como objectivo verificar se os filmes apresentavam capacidade de inchaço à temperatura ambiente e a amostra Dex4 foi a única a ser estudada. Depois de terem sido feitos vários filmes com cerca de 100 mg de amostra cada um, estes foram colocados numa pequena quantidade de soro fisiológico (8 ml) e foi estudado o grau de inchaço médio dos filmes Dex4 ao longo de alguns dias, à temperatura ambiente e a um pH neutro.

A quantidade de soro fisiológico absorvida pelos filmes foi quantificada pelo grau de inchaço, definido através da seguinte equação 3.1[41]:

$$\text{Grau de inchaço (\%)} = \frac{M_t - M_s}{M_s} \times 100, \quad (3.1)$$

onde M_t representa a massa do filme no tempo t e M_s a massa do filme seco.

A Figura 3.7 apresenta os resultados obtidos.

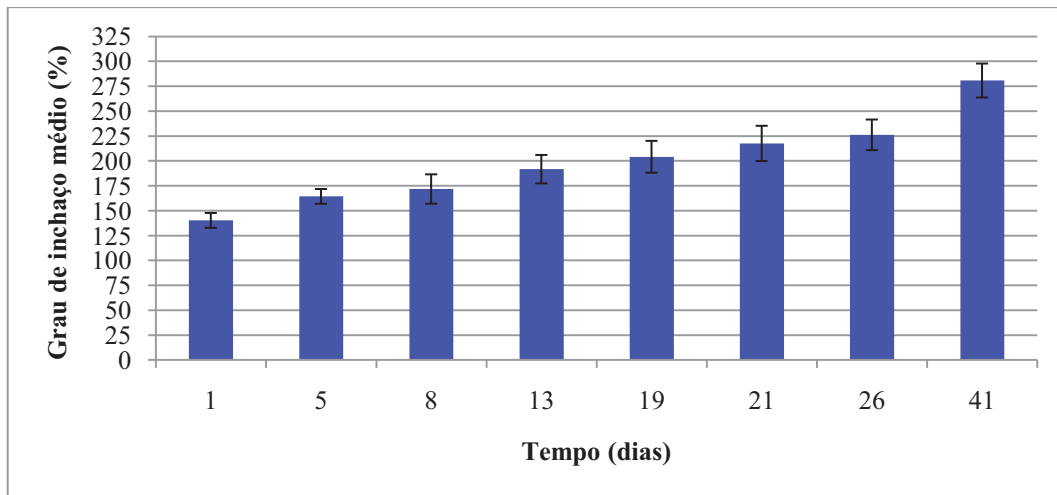


Figura 3. 7 - Representação o grau de inchaço médio dos filmes Dex4 (2 filmes) durante 41 dias, à temperatura ambiente.

Através da análise da Figura 3.7, compreende-se que os filmes referentes à amostra Dex4 conseguiram permanecer no soro fisiológico, à temperatura ambiente, sem se degradarem durante aproximadamente quarenta e um dias.

É de notar que o grau de inchaço médio dos filmes referentes à amostra Dex4 apenas passado um dia é de $140,2 \pm 7,5\%$. Percebe-se, assim, que logo após a imersão no soro fisiológico os filmes absorveram uma grande quantidade de soro e que demoram cerca de quarenta dias para atingir o dobro do valor atingido ao 1º dia: $280,8 \pm 17,0 \%$ ao 41º dia.

3.4.2 Processo de aquecimento a 50° C

Uma vez concluído o estudo acerca do grau de inchaço dos filmes da amostra Dex4 à temperatura ambiente, o seguinte passo consistiu em submeter novos filmes, formados pelas amostras Dex3 e Dex4, a um processo de aquecimento antes de colocados na solução de soro fisiológico. Esta etapa experimental teve como objectivo perceber se esta alteração provocaria uma modificação no grau de inchaço dos filmes ao longo do tempo. Assim, foram feitos filmes a partir das amostras Dex3 e Dex4, com cerca de 100 mg de amostra cada filme. Enquanto alguns filmes foram colocados numa estufa a uma temperatura igual a 50° C durante três dias, outros foram colocados num exsiccador durante também três dias, à temperatura ambiente. Passados os três dias, todas as

amostras foram colocadas em 8 ml de soro fisiológico com pH = 7 e a uma temperatura igual a 37° C, de modo a simular o ambiente do corpo humano.

Com base nos resultados obtidos tem-se que, tanto os filmes submetidos a uma temperatura elevada antes de colocados na solução de soro fisiológico como os que não foram, se degradam aproximadamente ao 10° dia e que, os filmes que foram submetidos a uma temperatura igual a 50° C durante três dias numa estufa, independentemente do tipo de amostra (Dex3 ou Dex4), apresentaram um grau de inchaço médio superior às amostras que não sofreram o processo de aquecimento. Ainda, comparando os resultados obtidos neste estudo com os resultados apresentados através do gráfico da Figura 3.7, observa-se que os filmes que neste estudo foram submetidos a uma temperatura igual a 37° C se degradam bastante mais cedo (10° dia) em relação aos filmes que foram mantidos à temperatura ambiente no estudo anterior (41° dia), concluindo-se que a temperatura acelera de forma bastante significativa a taxa de degradação dos filmes.

Uma vez que o objectivo final é encapsular fármaco no interior dos filmes e conseguir que haja uma libertação controlada do fármaco em questão, principalmente nos primeiros dias, seria fundamental que os valores referentes ao grau de inchaço dos vários filmes tivessem uma maior progressividade ao longo do tempo. Desta forma, como o processo de aquecimento não ajudou a ultrapassar esta questão, nos passos seguintes optou-se por não submeter os filmes a um processo de aquecimento previamente a serem colocados na solução de soro fisiológico.

3.4.3 Grau de inchaço médio a 37° C

Amostras Dex3 e Dex4

Uma vez que previamente se verificou que os filmes referentes à amostra Dex4 apresentam um grau de inchaço razoável à temperatura ambiente, verificando-se este um ponto favorável para o desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos, os próximos passos consistiram em estudar o grau de inchaço médio e o respectivo tempo de degradação de alguns filmes a 37° C. Estes estudos tinham como objectivo perceber quais seriam os filmes que apresentariam as melhores características para posteriormente se proceder ao encapsulamento do fármaco 5-Fu. Assim, inicialmente, foram feitos vários filmes com cerca de 100 mg cada um, com base nas amostras Dex3 e Dex4. Estes filmes

foram colocados numa solução de 8 ml de soro fisiológico a uma temperatura igual a 37° C e a um pH neutro, de modo a tentar simular o corpo humano, tanto em valores de temperatura como de pH. As Figuras 3.8 e 3.9 apresentam os resultados obtidos.

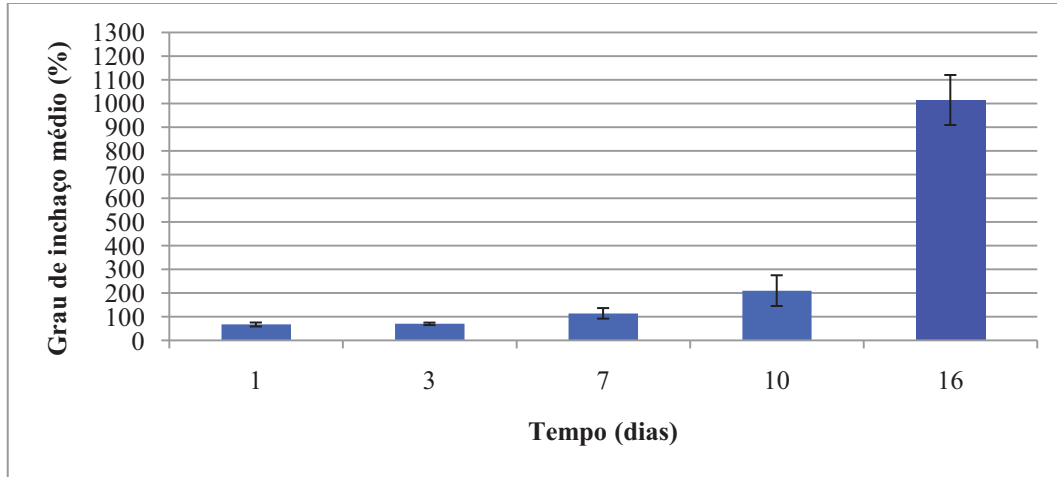


Figura 3. 8 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex3 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.

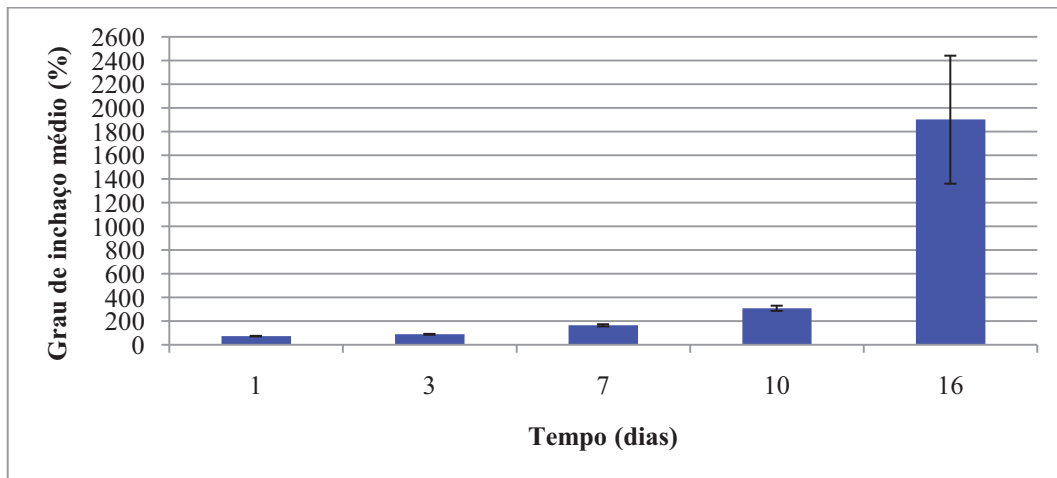


Figura 3. 9 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex4 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.

Comparando a Figura 3.9 com a Figura 3.7 facilmente se verifica que os filmes formados a partir da amostra Dex4, colocados numa solução de 8 ml de soro fisiológico com um pH = 7 e a uma temperatura igual a 37° C, se degradam muito mais rapidamente, uma vez que apresentam uma durabilidade de apenas dezasseis dias. A partir deste resultado conclui-se, mais uma vez, que o aumento da temperatura acelera o processo de degradação dos filmes.

Ainda comparando as Figuras 3.9 e 3.7, também se verifica que os filmes submetidos a 37° C apresentam, na sua totalidade, um grau de inchaço médio bastante superior aos filmes que foram colocados em 8 ml de soro fisiológico com um pH = 7 à temperatura ambiente. No entanto, verifica-se que em relação aos primeiros dias, o grau de inchaço é bastante mais controlado nos filmes colocados a uma temperatura igual a 37° C, uma vez que após um dia o grau de inchaço médio é de apenas $75,1 \pm 2,4$ %.

Comparando a Figura 3.8 com a Figura 3.9, também se consegue perceber que apesar de ambos os filmes (Dex3 e Dex4) se degradarem aproximadamente ao 16° dia, ao longo dos vários dias os filmes Dex3 apresentam um grau de inchaço médio inferior aos dos filmes Dex4. Mais concretamente, ao 16° dia, os filmes referentes à amostra Dex3 apresentam um grau de inchaço médio igual a $1014,5 \pm 105,5$ % enquanto que os filmes referentes à amostra Dex4 apresentam um grau de inchaço médio igual a $1901,4 \pm 539,9$ %.

Ainda pela comparação das Figuras 3.8 e 3.9, em relação ao 1° dia, os filmes referentes à amostra Dex3 apresentam um grau de inchaço médio igual a $67,5 \pm 8,3$ % enquanto que os filmes referentes à amostra Dex4 apresentam um grau de inchaço médio igual a $75,1 \pm 2,4$ %. Tendo em conta os erros associados aos valores apresentados e apesar dos filmes referentes à amostra Dex4 apresentarem valores relativamente ao grau de inchaço médio mais elevados, nas primeiras horas após a imersão dos filmes no soro fisiológico a diferença dos valores apresentados entre as duas amostras não se verifica muito significativa.

Os espectros FTIR referentes a estas duas amostras encontram-se no Anexo A (Figuras A.3 e A.4).

Amostras Dex8, Dex9 e Dex10

Nas reacções que deram origem a estas três amostras foram variadas as quantidades do agente reticulante AR (informação disponível na Tabela 2.2 do Capítulo II). Em relação à amostra Dex8, os vários filmes, com cerca de 100 mg cada, um foram colocados em 8 ml de soro fisiológico com pH = 7, a uma temperatura igual a 37° C, e no dia seguinte encontravam-se completamente degradados. O mesmo aconteceu com os filmes formados a partir da amostra Dex9, que num ambiente de soro fisiológico com um pH = 7, a uma temperatura igual a 37° C, se degradaram passados dois dias, tendo apresentado um grau de inchaço médio no 1° dia igual a 52,9%. Estes resultados são

facilmente explicados uma vez que a quantidade do agente reticulante AR nestes dois casos foi diminuída e seguramente a quantidade utilizada não foi a suficiente, dado que a degradação dos filmes se verificou bastante precoce e o grau de inchaço médio da amostra Dex8 nem foi possível calcular.

Os resultados obtidos relativamente ao grau de inchaço médio dos vários filmes produzidos a partir da amostra Dex10 encontram-se apresados na Figura 3.10.

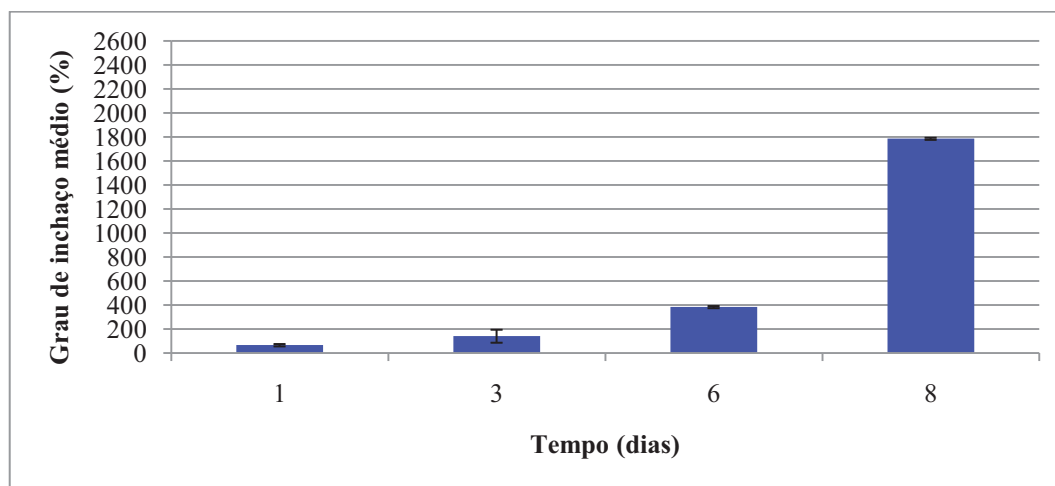


Figura 3. 10 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex10 (4 filmes) durante 8 dias, a 37° C.

Com base na análise do gráfico apresentado na Figura 3.10, observa-se que a degradação dos filmes se verifica ao 8º dia. Comparando com as Figuras 3.8 e 3.9 referentes aos filmes das amostras Dex3 e Dex4 respectivamente, a degradação dos filmes da amostra Dex10 ocorre bastante mais cedo. Ao 8º dia o grau de inchaço médio é cerca de $1784,9 \pm 8,8\%$, número que se verifica, tendo em conta os erros associados, bastante próximo do valor do grau de inchaço médio dos filmes constituídos pela amostra Dex4 que é de aproximadamente $1901,4 \pm 539,9\%$ ao 16º dia. Estes resultados levam a crer que, apesar da quantidade do agente reticulante AR ser maior na amostra Dex10 do que na amostra Dex4, em nada melhora as características dos filmes em relação ao grau de reticulação. Assim, conclui-se que o grau de reticulação não aumentou significativamente e o comportamento relativo ao grau de inchaço dos dois filmes verificou-se praticamente semelhante. Como consequência, os filmes referentes a esta amostra não serão alvo de testes na fase experimental seguinte.

Os espectros FTIR referentes às amostras Dex8, Dex9 e Dex10 encontram-se apresentados no Anexo A (Figuras A.8, A.9 e A.10).

Amostras Dex11 e Dex12

O objectivo da síntese das amostras Dex11 e Dex12 é aumentar o grau de reticulação dos produtos formados. Desta forma, quando encapsulado o fármaco no interior dos filmes, pretende-se que a sua libertação seja controlada. Assim, a grande diferença entre as amostras Dex11 e Dex12 em relação às amostras Dex3 e Dex4 é a presença de um segundo agente reticulante: o pentaeritritol. Posto isto, a amostra Dex3 é semelhante à amostra Dex11 com excepção de que na reacção desta última foram utilizados dois agentes reticulantes, ao invés de apenas um que foi utilizado no caso da reacção que levou à produção da amostra Dex3. Esta mesma diferença ocorre também nas amostras Dex4 e Dex12, em que na reacção que deu origem à amostra Dex4 foi apenas utilizado um agente reticulante e na reacção que originou a amostra Dex12 foram utilizados dois agentes reticulantes (informação disponível no Capítulo II nas Tabelas 2.1 e 2.3).

Nas Figuras 3.11 e 3.12 podem ser observados os espectros FTIR referentes à amostra Dex3 em comparação com a amostra Dex11 e à amostra Dex4 em comparação com a amostra Dex12. Nestes quatro espectros apresentados consegue-se verificar que os espectros Dex3 e Dex11 são bastante semelhantes um em relação ao outro e os espectros Dex4 e Dex12 também não apresentam uma diferença notória em relação aos picos observados. Desta forma, pode-se deduzir que o agente reticulante pentaeritritol não influenciou a estrutura das amostras Dex11 e Dex12 em relação às amostras Dex3 e Dex4, respectivamente.

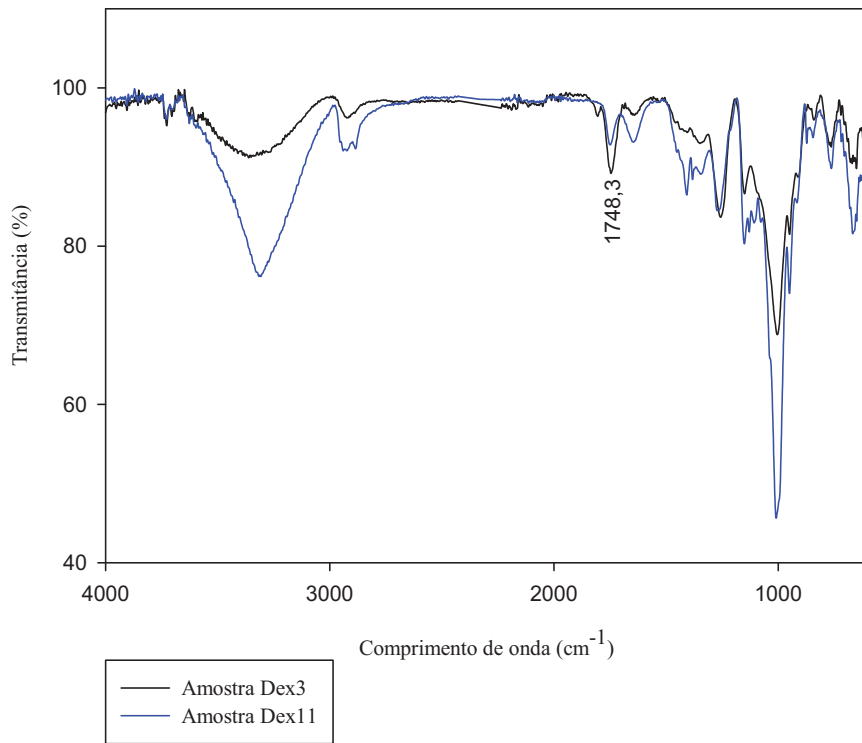


Figura 3. 11 - Espectros FTIR das amostras Dex3 e Dex11.

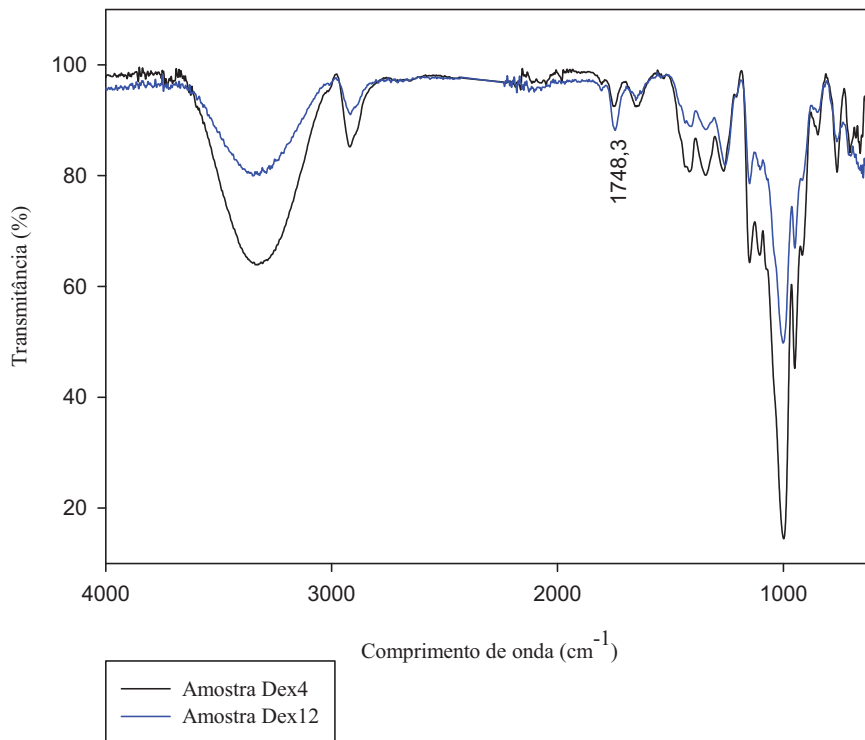


Figura 3. 12 - Espectros FTIR das amostras Dex4 e Dex12.

As Figuras 3.13 e 3.14, por sua vez, apresentam os resultados obtidos em relação ao grau de inchaço médio dos filmes referentes às amostras Dex11 e Dex12, respectivamente, após terem sido colocados numa solução de soro fisiológico com pH = 7, a uma temperatura igual a 37° C.

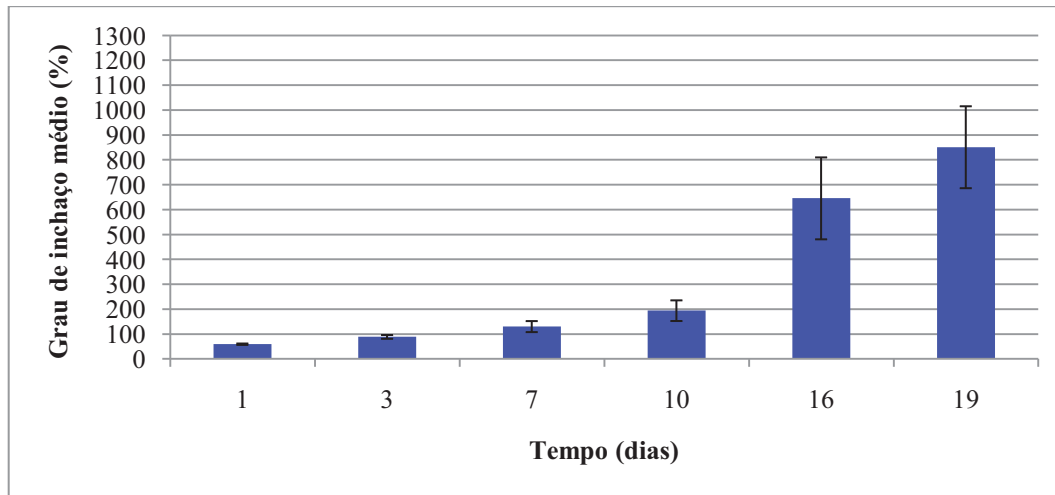


Figura 3. 13 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex11 (4 filmes) durante 19 dias, a 37° C.

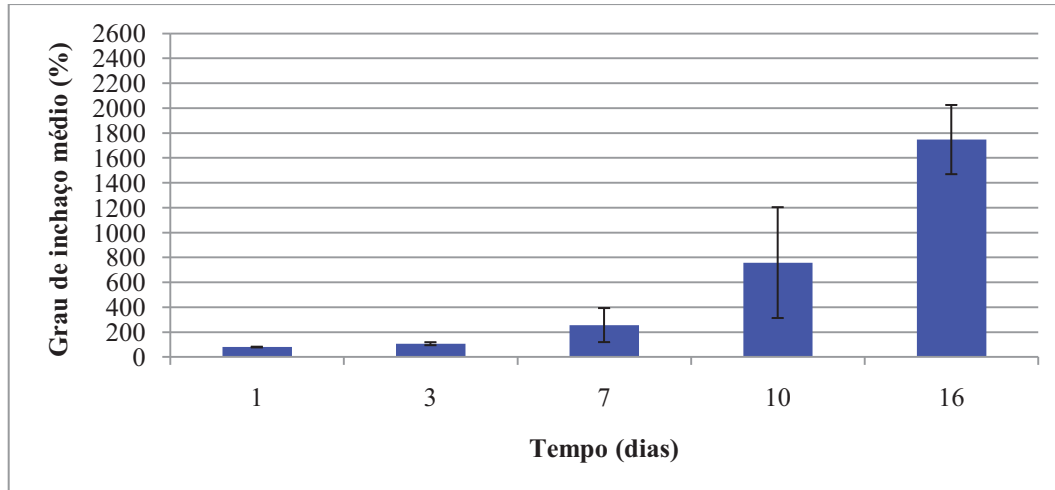


Figura 3. 14 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Dex12 (4 filmes) durante 16 dias, a 37° C.

Pela observação das Figuras 3.13 e 3.14 acima apresentadas, facilmente se percebe que a presença de um segundo agente reticulante, para além de não alterar de forma significativa o grau de inchaço médio, tanto da amostra Dex11 como da amostra Dex12 em relação às amostras Dex3 e Dex4 respectivamente, também não altera de forma relevante o tempo que demora a ocorrer a degradação dos dois tipos de filmes. Os filmes

referentes às amostras Dex3 e Dex4 apresentam um grau de inchaço médio, ao 16º dia, de $1014,5 \pm 105,5\%$ e de $1901,4 \pm 539,9\%$ respectivamente e os filmes referentes às amostras Dex11 e Dex12, por sua vez, apresentam um grau de inchaço médio, passados dezanove e dezasseis dias, de $851,2 \pm 164,6\%$ e de $1746,8 \pm 277,9\%$.

Uma das alterações que se pretendia também verificar nos filmes das amostras Dex11 e Dex12 em relação aos filmes das amostras Dex3 e Dex4 respectivamente, era a diminuição dos valores referentes ao grau de inchaço médio nos primeiros dias, uma vez que estes se mostravam bastante acentuados. Dado que os valores referentes às amostras Dex11 e Dex12 foram respectivamente, $59,7 \pm 2,8\%$ e $79,4 \pm 2,9\%$ no 1º dia, não houve uma melhoria significativa em relação aos filmes Dex3 e Dex4: $67,5 \pm 8,3\%$ e $75,1 \pm 2,4\%$.

Os gráficos apresentados na Figura 3.15 apresentam as diferenças relativas ao grau de inchaço médio entre as amostras.

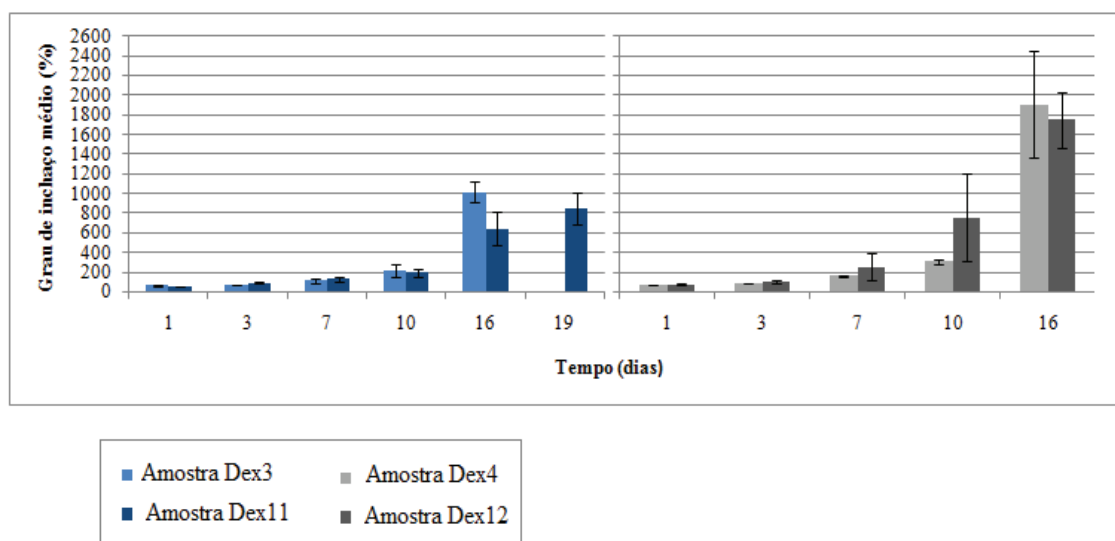


Figura 3. 15 - Comparação do grau de inchaço médio dos filmes Dex3 e Dex4 (4 + 4 filmes) com os filmes Dex11 e Dex12 (4 + 4 filmes) respectivamente.

Amostra Hea3

A amostra Hea3 é composta por um polímero diferente do apresentado nas amostras até então referidas neste subcapítulo: o hidroxietilamido. Desta forma, as características dos filmes baseados nesta amostra são, por consequência, diferentes das

referidas anteriormente. A Figura 3.16 apresenta o grau de inchaço médio destes filmes numa solução de soro fisiológico com um pH neutro, a uma temperatura igual a 37° C.

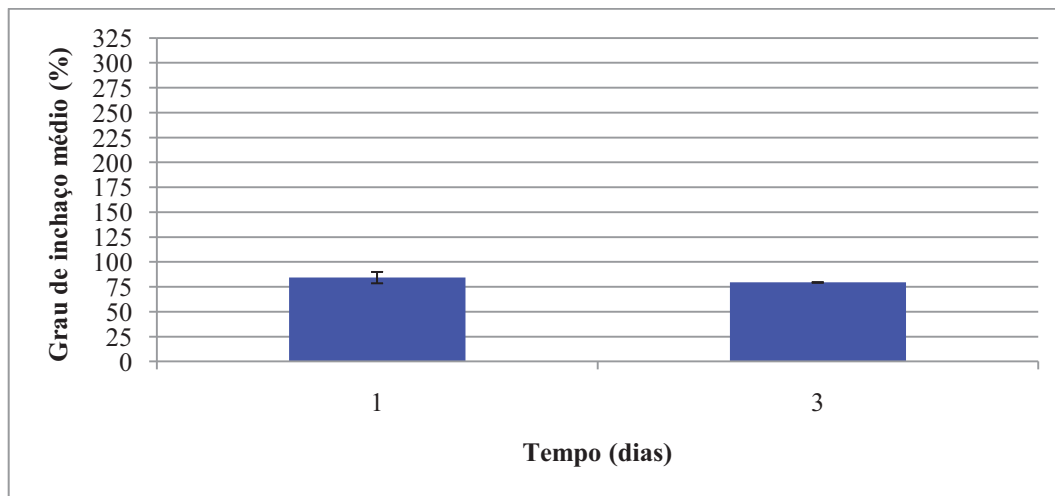


Figura 3. 16 - Representação do grau de inchaço médio dos filmes Hea3 (2 filmes) durante 3 dias, a 37° C.

Após a análise do gráfico representado na Figura 3.16, verifica-se que os filmes produzidos a partir da amostra Hea3 se degradam bastante mais rapidamente que os filmes produzidos através das reacções com os vários polímeros de dextrano. Para além da sua degradação extremamente precoce, estes filmes exibem um grau de inchaço médio exageradamente baixo em comparação com os filmes de dextrano, rondando os $84,4 \pm 5,7\%$ e os $79,5 \pm 0,38\%$ ao 1º e ao 3º dia, respectivamente.

Apesar dos resultados referentes a esta amostra não se verificarem promissores para o encapsulamento de fármacos, o espectro FTIR desta amostra encontra-se apresentada no Anexo A (Figura A.14).

3.4.4 Estudos da libertação do 5-Fu através dos filmes

Uma vez concluído o estudo em relação ao grau de inchaço dos vários filmes formados a partir de diferentes amostras e de escolher as amostras cujas características revelaram ser mais promissoras, o trabalho experimental prosseguiu com o encapsulamento do fármaco 5-Fu nos vários filmes através de dois diferentes métodos e com o estudo da libertação do fármaco ao longo de vários dias num ambiente apropriado.

Fármaco encapsulado através do método de encapsulamento I

O método de encapsulamento realizado através da deposição da solução aquosa de 5-Fu nos vários filmes referentes às amostras Dex3 e Dex4, prosseguiu com a imersão de cada um dos vários filmes, devidamente secos e já com o fármaco encapsulado, numa solução de soro fisiológico durante alguns dias. Os filmes, uma vez colocados na solução de soro fisiológico com um pH neutro, foram submetidos a uma temperatura igual a 37° C, de modo a ser estudada a libertação do fármaco neles encapsulado num ambiente simulador do corpo humano em termos de pH e de temperatura.

Através deste método foram encapsulados 1,5 mg, tanto nos filmes constituídos pela amostra Dex3 como pela amostra Dex4, e os resultados obtidos em relação à libertação do 5-Fu através destes dois tipos de filmes (imersos num volume de soro fisiológico igual a 5 ml) são apresentados nas Figuras 3.17 e 3.18.

Também através deste método foram encapsulados 3,0 mg, tanto nos filmes constituídos pela amostra Dex3 como pela amostra Dex4, e os resultados obtidos em relação à libertação do 5-Fu através destes dois tipos de filmes (imersos num volume de soro fisiológico igual a 8 ml) são apresentados nas Figuras 3.19 e 3.20.

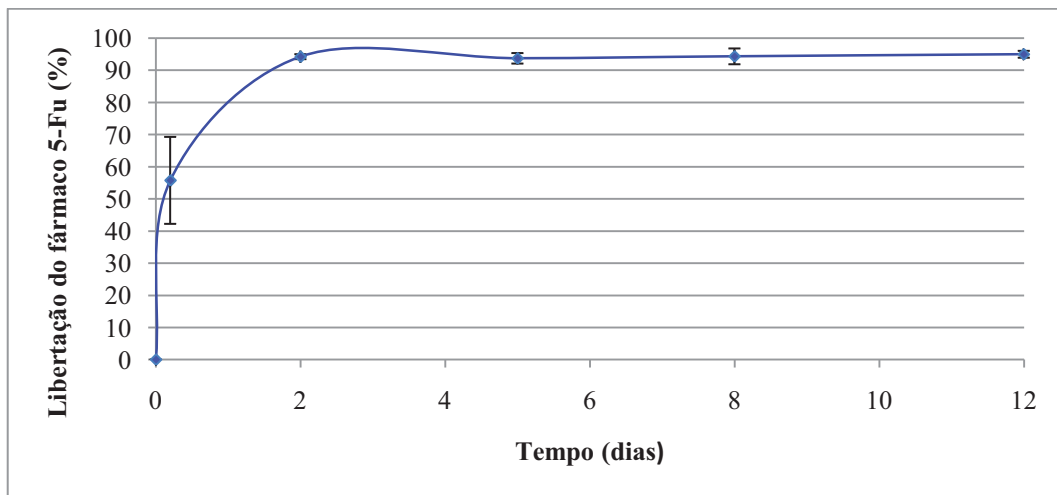


Figura 3. 17 - Libertação dos 1,5 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (4 filmes).

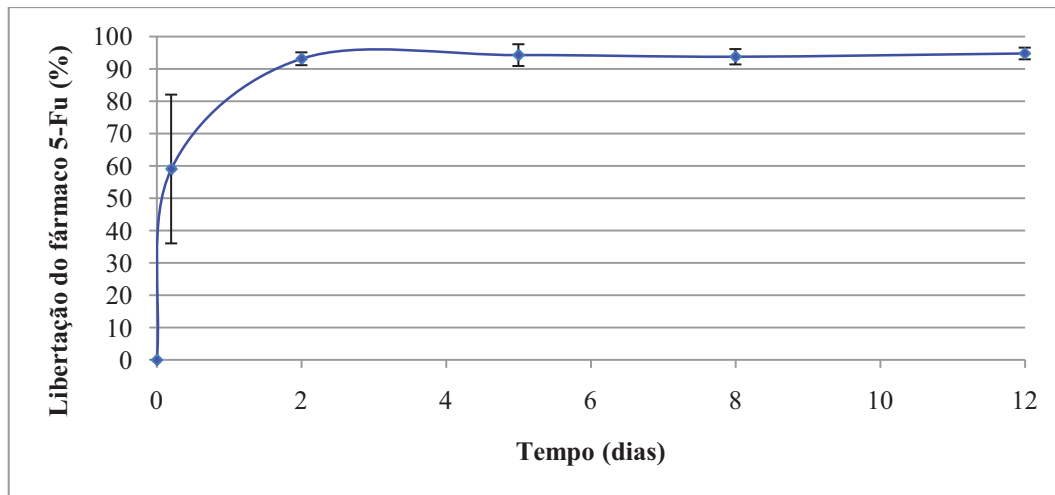


Figura 3. 18 - Libertação dos 1,5 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).

Através da análise dos gráficos apresentados nas Figuras 3.17 e 3.18 verifica-se que os valores referentes à liberação do fármaco pelos filmes da amostra Dex3 e pelos filmes da amostra Dex4 são bastante semelhantes.

A liberação do fármaco não aconteceu de forma controlada, uma vez que, passadas quatro horas já $55,8 \pm 13,5\%$ do fármaco encapsulado tinha sido libertado através dos filmes da amostras Dex3 e $59,0 \pm 22,9\%$ do fármaco tinha sido libertado através dos filmes da amostras Dex4. Ao 2º dia já praticamente toda a quantidade do fármaco encapsulado tinha sido libertada através dos filmes, mais propriamente $94,2 \pm 0,8\%$ do fármaco contido nos filmes da amostra Dex3 e $93,1 \pm 1,9\%$ do fármaco encapsulado nos filmes da amostra Dex4.

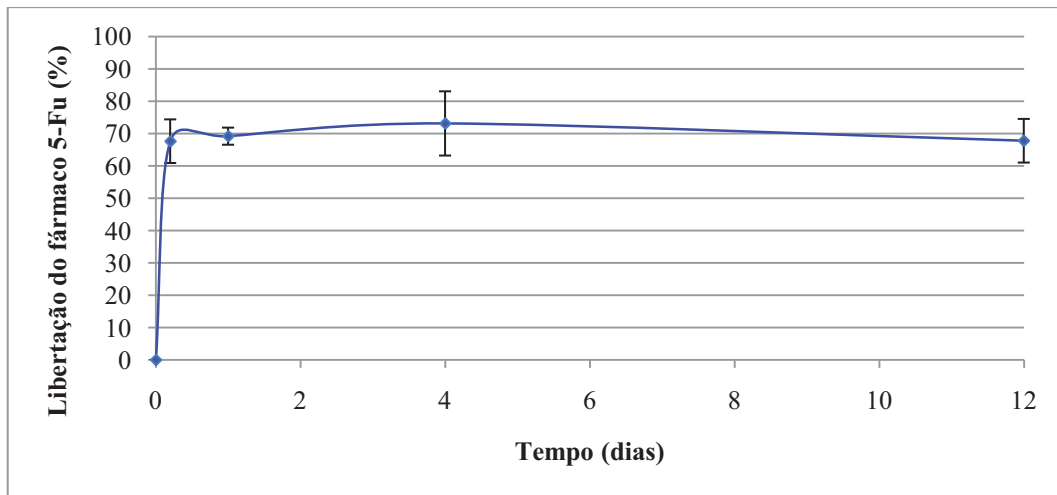


Figura 3. 19 - Libertação dos 3,0 mg de fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (2 filmes).

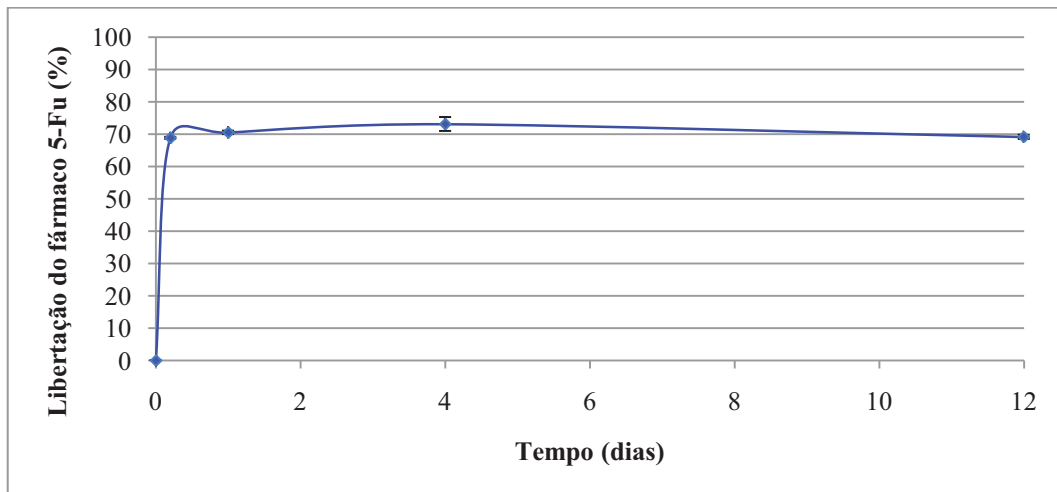


Figura 3. 20 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (2 filmes).

Pela observação das quatro Figuras, da 3.17 à 3.20, conclui-se que através deste método de encapsulamento, independentemente da quantidade de fármaco encapsulada, os valores referentes à liberação do fármaco 5-Fu tanto nos filmes da amostra Dex3 como nos filmes da amostra Dex4 são bastante semelhantes.

Através da análise das Figuras 3.19 e 3.20 verifica-se que da mesma forma que no caso anterior, o processo de liberação do fármaco não aconteceu de forma controlada, uma vez que apenas passadas quatro horas os filmes referentes à amostra Dex3 já tinham libertado cerca de $67,6 \pm 6,7\%$ do fármaco encapsulado e os filmes referentes à amostra Dex4 já tinham libertado cerca de $68,8 \pm 0,3\%$ do fármaco.

Neste estudo, os valores referentes ao total de fármaco libertado através dos filmes não ultrapassaram os $73,1 \pm 9,9\%$ no caso dos filmes da amostra Dex3 e os $73,1 \pm 2,2\%$ no caso dos filmes da amostra Dex4. O menor valor final pode ser explicado pelo aumento da quantidade de fármaco encapsulada em cada um dos filmes para o dobro, uma vez que o volume de soro fisiológico onde se encontravam imersos os filme não foi aumentado de forma proporcional, levando a que fosse atingido um estado de equilíbrio que provocou a diminuição o valor da taxa de libertação total do fármaco.

Em relação às quatro Figuras apresentadas percebe-se, ainda, que os filmes submetidos ao encapsulamento do fármaco 5-Fu se degradaram sensivelmente ao 12º dia. Desta forma, comparando com as Figuras 3.8 e 3.9, verifica-se que os filmes que foram submetidos a este método de encapsulamento, independentemente da quantidade de fármaco encapsulada, se degradaram mais cedo do que os filmes provenientes das mesmas amostras que não foram submetidos a qualquer tipo de encapsulamento. Assim, conclui-se que este método de encapsulamento altera as características dos filmes, diminuindo a sua resistência à degradação. Uma vez que o objectivo é promover uma libertação controlada e duradoura do fármaco através dos filmes, e que logicamente, a degradação antecipada dos filmes leva, por consequência, a que o fármaco seja libertado durante menos dias, tornou-se necessário recorrer a outro método de encapsulamento.

Fármaco encapsulado através do método de encapsulamento II

Um outro método para o encapsulamento do fármaco 5-Fu nos filmes foi também testado, uma vez que o anteriormente apresentado tornava os filmes bastante mais sensíveis e mais propícios à degradação, levando a que o processo de libertação do fármaco ocorresse num período de tempo bastante curto. Assim, neste método a quantidade de fármaco desejada em cada filme (3,0 e 6,0 mg) foi incorporada aquando da preparação do mesmo. Uma vez formados os filmes já com o fármaco no seu interior, foi testada a libertação do fármaco em questão num ambiente de 8 ml de soro fisiológico com um pH neutro, a uma temperatura igual a 37º C. As três seguintes Figuras (3.21, 3.22 e 3.23) apresentam os resultados obtidos.

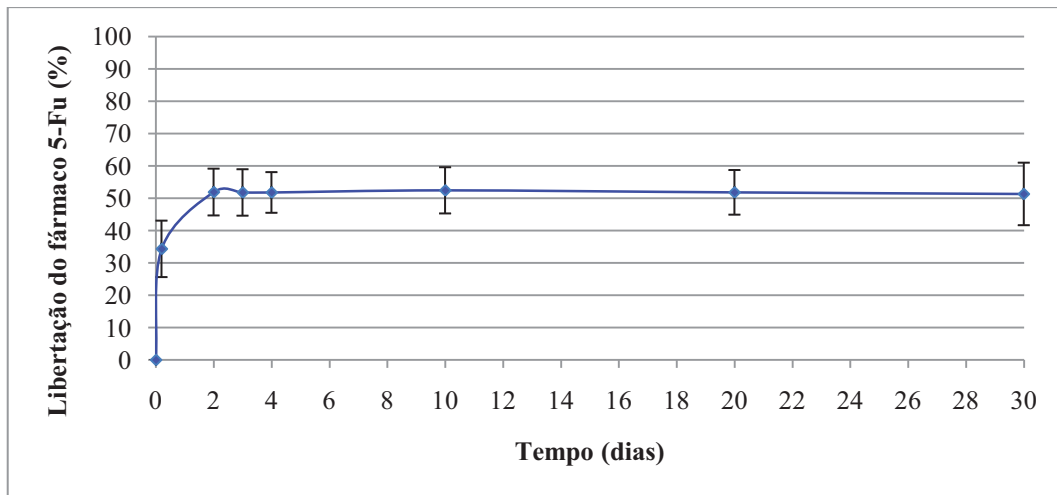


Figura 3. 21 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex3 (4 filmes).

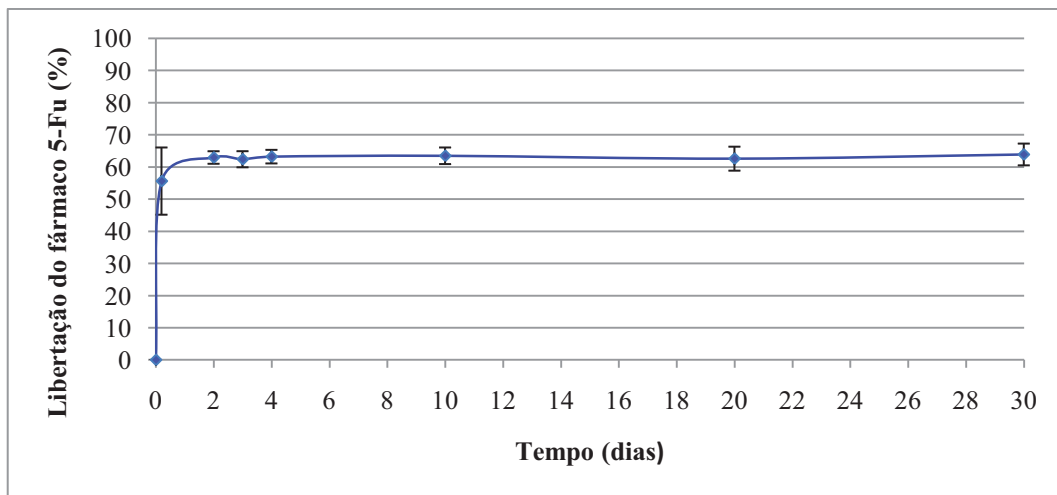


Figura 3. 22 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 3.21 e 3.22 consegue-se verificar que o valor máximo de liberação atingido pelos filmes referentes à amostra Dex3 foi de $52,4 \pm 7,1\%$ e o valor máximo de liberação atingido pelos filmes referentes à amostra Dex4 foi de $63,9 \pm 3,4\%$.

É de notar que, mais uma vez, os valores em relação à taxa de liberação não atingiram os 100%. O aumento da quantidade de fármaco encapsulada em cada um dos filmes (3,0 mg em vez de 1,5 mg), dado que o volume de soro fisiológico onde se encontravam imersos não foi aumentado de forma proporcional, levou a que fosse

atingido um equilíbrio que provocou a diminuição da taxa de libertação do fármaco em questão.

Passadas sensivelmente quatro horas, os filmes referentes à amostra Dex3 tinham libertado do $34,4 \pm 8,7\%$ fármaco encapsulado, enquanto que os filmes referentes à amostra Dex4 tinham libertado $55,6 \pm 10,4\%$ do fármaco encapsulado. Ao segundo dia já sensivelmente $51,9 \pm 7,2\%$ e $62,9 \pm 1,9\%$ de fármaco tinha sido libertado pelos filmes das amostras Dex3 e Dex4 respectivamente. Assim, mais uma vez, é notório que os filmes não apresentaram um processo de libertação controlada, preferencialmente no caso dos filmes da amostra Dex4. No entanto, estes valores em comparação com o método anterior verificam-se mais promissores, uma vez que através do método de encapsulamento I passadas apenas quatro horas os filmes referentes à amostra Dex3 já tinham libertado cerca de $67,6 \pm 6,7\%$ do fármaco encapsulado e os filmes referentes à amostra Dex4 já tinham libertado cerca de $68,8 \pm 0,3\%$ do fármaco.

Através deste método foi aumentada a quantidade de fármaco encapsulada para o dobro: 6,0 mg. Este estudo tinha como objectivo confirmar se a quantidade de fármaco encapsulada, sem variação do volume de soro fisiológico onde eram imersos os filmes (8 ml), influenciava a taxa de libertação do fármaco. A Figura 3.23 apresenta os resultados obtidos.

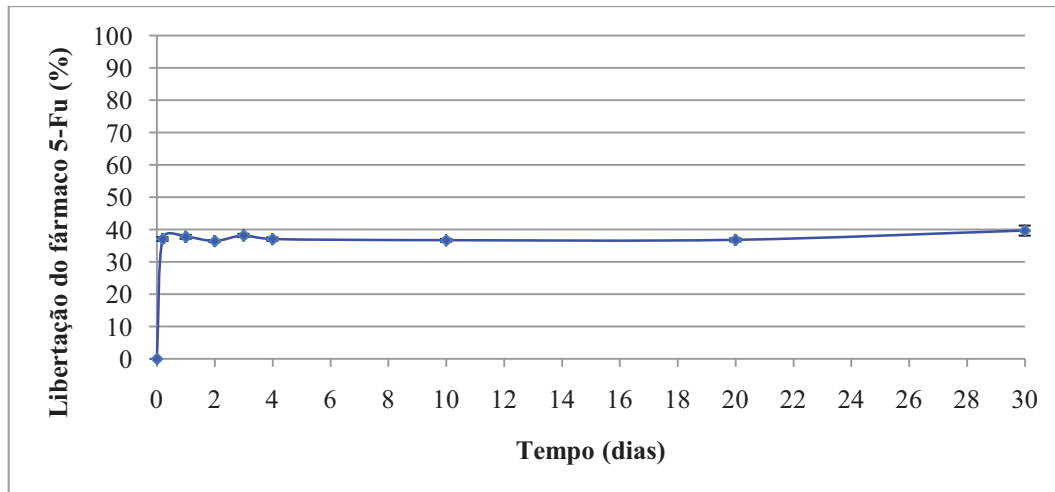


Figura 3. 23 - Libertação dos 6,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4 (4 filmes).

Uma vez que os estudos de libertação são bastante demorados, devido à escassez de tempo, nesta etapa final foram apenas realizados testes de libertação em apenas filmes de um tipo de amostra.

Através da análise do gráfico apresentado na Figura 3.23, verifica-se que, o valor máximo de libertação atingido pelos filmes foi de $39,7 \pm 1,6\%$. Este valor, em comparação com os valores obtidos nos testes de libertação realizados anteriormente, verifica-se bastante inferior. Este resultado deve-se ao facto da quantidade de fármaco encapsulada ter sido aumentada para 6,0 mg e de o volume de soro fisiológico não ter sido aumentado proporcionalmente ao aumento da quantidade de fármaco encapsulada nos vários filmes. Desta forma, provavelmente mais uma vez, foi atingido um estado de equilíbrio que provocou a diminuição da taxa de libertação do fármaco 5-Fu ao longo do tempo.

Verifica-se, ainda, que tendo em conta a taxa de libertação máxima, ocorreu uma libertação inicial acentuada, uma vez que passadas apenas quatro horas os filmes tinham libertado $37,1 \pm 0,6\%$ da quantidade de fármaco encapsulada.

Em todos estes testes, uma vez retirada a quantidade de soro fisiológico necessária à análise espectrofotométrica, esta não era repostada, isto é, o volume das soluções de soro fisiológico onde se encontravam os filmes diminuía à medida que o estudo ia avançando. No entanto, e como finalização do trabalho experimental, através deste último método de encapsulamento referido, foram encapsulados 3,0 mg de fármaco em cada um dos filmes. A sua libertação através dos filmes foi estudada, novamente, num ambiente de pH neutro e com uma temperatura igual a 37°C , mas desta vez, numa solução de 4 ml de soro fisiológico. Neste estudo, sempre que era efectuada uma medição espectrofotométrica, os 4 ml onde se encontravam imersos os filmes eram utilizados para esse efeito e os filmes eram imersos em 4 ml de soro fisiológico novos, permitindo que os filmes, à medida que o estudo ia avançando, permanecessem numa solução com o mesmo volume de soro fisiológico.

Neste estudo foram, novamente, utilizados filmes referentes a apenas uma amostra e a Figura 3.24 apresenta os resultados obtidos.

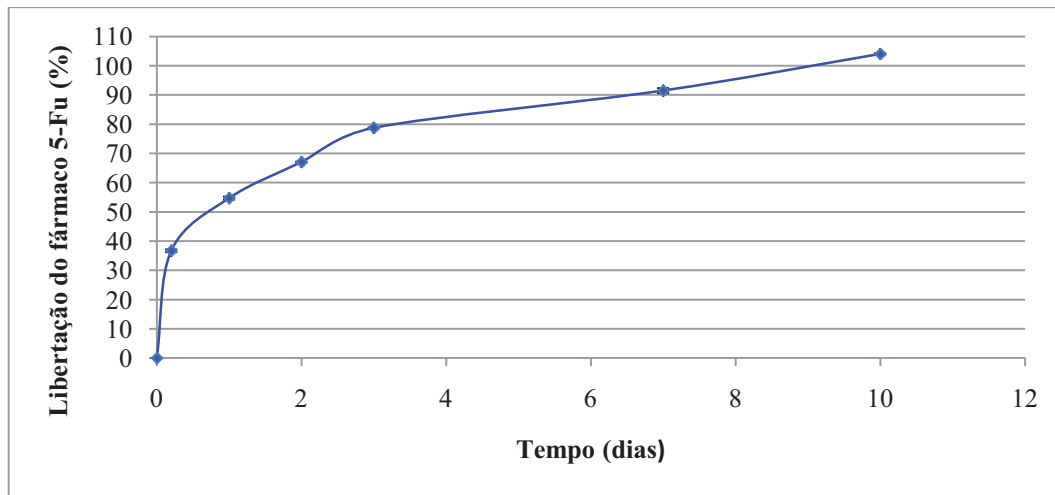


Figura 3. 24 - Libertação dos 3,0 mg do fármaco 5-Fu encapsulados nos filmes referentes à amostra Dex4, com reposição dos volume de soro fisiológico (4 filmes).

Pela observação do gráfico apresentado na Figura 3.24 verifica-se que o processo de libertação do fármaco ao longo do tempo foi bastante mais controlado em relação a todos os casos anteriores. Passadas sensivelmente quatro horas tinham sido libertados $36,7 \pm 0,5\%$ de fármaco 5-Fu através dos filmes e ao 10^o dia verificou-se a libertação total dos 3,0 mg encapsulados.

Comparando com o gráfico da Figura 3.22 verifica-se que no caso do encapsulamento do fármaco sem reposição do volume do soro fisiológico, passadas sensivelmente quatro horas tinham sido libertados $55,6 \pm 10,4\%$ do fármaco, enquanto que neste caso apenas se verificaram libertados, como já foi referido, $36,7 \pm 0,5\%$ do fármaco 5-Fu. O valor referente à percentagem de fármaco libertada, neste estudo, verifica-se inferior em comparação com o valor obtido no estudo sem reposição do volume de soro fisiológico, uma vez que neste estudo apesar da a quantidade do fármaco encapsulada ter sido igual, o soro fisiológico onde se encontravam imersos os filmes foi diminuído para metade (4 ml). Assim, tendo em conta que foi atingido um equilíbrio depende directamente da quantidade de fármaco encapsulada e do volume da solução de soro fisiológico onde se encontram os imersos os filmes, se o volume de soro fosse o dobro (8 ml), como no casos dos estudos anteriormente realizados, ter-se-ia verificado a libertação total do fármaco encapsulado ao 5^o dia e não, como é o caso, ao 10^o dia.

Na literatura, estudos de libertação de 5-Fu encapsulado em esferas à base de quitosano com enxertos de poli(N-isopropilacrilamida) referem que nas cinco primeiras horas já cerca de 55% do fármaco tinha sido libertado e passadas quarenta horas, cerca de

82%. Apesar do método de encapsulamento do estudo ter sido diferente do utilizado, a libertação do fármaco foi feita numa solução com uma temperatura igual a 37° C, de pH = 7,4, cujo volume era igual a 5 ml. Sempre que se efectuava uma medição, 5 ml novos eram repostos. Com base nesta informação e comparando os resultados do estudo com os referidos anteriormente, poder-se-á concluir que se verificaram melhorias em relação à libertação do fármaco nas primeiras horas, uma vez que através dos filmes de dextrano nas primeiras quatro horas foram apenas libertados $36,7 \pm 0,5\%$ do fármaco. Ainda, no estudo, passadas quarenta horas, que equivalem a cerca de dois dias, já se tinha verificado uma libertação de cerca de 82%, ao passo que através dos filmes de dextrano apenas houve uma libertação de $67,0 \pm 0,2\%$. Assim sendo, verificam-se melhorias nos valores referentes à libertação do 5-Fu através dos filmes de dextrano em relação ao estudo mencionado, uma vez que se verifica uma libertação mais lenta e controlada do fármaco [42].

Por último, percebe-se, ainda, que os filmes submetidos ao encapsulamento do fármaco 5-Fu através do método II se degradaram sensivelmente ao 30º dia. Desta forma, comparando com as Figuras 3.8 e 3.9, verifica-se que os filmes que foram submetidos a este método de encapsulamento, independentemente da quantidade de fármaco encapsulada, se degradaram significativamente mais tarde comparativamente aos filmes provenientes das mesmas amostras que não foram submetidos a qualquer tipo de encapsulamento. Assim, ao contrário do método de encapsulamento I, este método não acelera o processo de degradação dos filmes, sendo este um aspecto positivo tendo em conta o objectivo a cumprir, a libertação controlada de fármacos durante um longo intervalo de tempo. Desta forma, se os filmes durarem mais dias, o fármaco é por eles libertado durante mais tempo.

Em todos os estudos de libertação pretendeu-se ao máximo assemelhar as condições dos estudos realizados às condições do corpo humano, no entanto tornou-se difícil simular a reposição de fluídos fisiológicos *in vitro*.

Capítulo IV

4. Conclusões e perspectivas futuras

4.1 Conclusões

No presente trabalho foram sintetizados hidrogéis e os respectivos filmes a partir de três diferentes polímeros: o dextrano, o amido e o hidroxietilamido. Desta forma, foram estudadas as características dos diferentes produtos sólidos formados a partir dos hidrogéis. Os que permitiram a formação de filmes foram sujeitos a testes relativamente ao grau de inchaço, uma vez que a sua produção teve como objectivo a sua utilização como agentes encapsulantes do fármaco 5-Fu e, posteriormente, a libertação controlada deste fármaco. Através deste estudo foi possível concluir que os filmes que apresentaram as melhores características para a posterior encapsulação do fármaco foram os referentes às amostras Dex3 e Dex4.

O trabalho experimental prosseguiu com a escolha do método de encapsulamento. O método de encapsulamento I diminuía a resistência dos filmes, despoletando, por consequência, a sua degradação precoce. O método de encapsulamento II, apesar de se tratar de um método bastante mais fácil e rápido de realizar e de, ao contrário do método I, aumentar a durabilidade dos filmes e o tempo da libertação do fármaco, no que se refere ao encapsulamento propriamente dito não melhorou a taxa de libertação do fármaco 5-Fu. Assim, apesar de os filmes submetidos ao método de encapsulamento II apresentarem vantagens em relação aos filmes submetidos ao método I, nenhum dos filmes simulou um sistema de libertação controlada de fármacos perfeito.

O mecanismo ideal permitiria que os filmes sintetizados funcionassem como sistemas de libertação de fármaco cujo tempo de vida igualasse o tempo da libertação do fármaco, isto é, que os filmes encapsulantes libertassem o fármaco lentamente até praticamente ao dia da sua degradação. No entanto, nenhum dos métodos de encapsulamento facultou uma libertação controlada do fármaco, uma vez que passadas algumas horas após a imersão dos vários filmes no soro fisiológico, uma percentagem bastante elevada da quantidade do fármaco encapsulada nos filmes foi libertada.

Ao longo de todo este trabalho experimental, apesar de se terem conseguido atingir características bastante favoráveis e promissoras em relação aos filmes preparados, ficaram ainda algumas questões por solucionar. As questões pendentes referem-se, maioritariamente, à quantidade de fármaco encapsulada aliada à libertação relativamente rápida do fármaco em apenas algumas horas.

4.2 Perspectivas futuras

Como já foi referido, verifica-se que os filmes, mas mais propriamente os referentes às amostras Dex3 e Dex4, apresentam valores relativos ao grau de inchaço bastante elevados, principalmente nas primeiras horas após a sua imersão na solução de soro fisiológico. Como consequência deste resultado, o fármaco que se encontra encapsulado no interior dos filmes é libertado muito rapidamente nas primeiras horas, originando um mecanismo de libertação descontrolado e pouco eficaz. Assim, seria conveniente aumentar o grau de reticulação dos hidrogéis de modo a que os filmes posteriormente sintetizados absorvessem menos quantidade de soro fisiológico nas horas iniciais e, conseqüentemente, o fármaco fosse libertado de forma mais vagarosa e controlada até à degradação total do filme. Uma potencial solução para este problema seria aumentar a quantidade do agente reticulante pentaeritritol em cada uma das amostras Dex11 e Dex12, uma vez que a quantidade utilizada nos estudos previamente realizados não se verificou suficiente para solucionar esta questão. O aumento do grau da reticulação permitiria, também, uma maior longevidade dos filmes e conseqüentemente a libertação do fármaco seria, logicamente, mais duradoura.

Um outro problema refere-se ao facto de os dois métodos de encapsulamento causarem a acumulação de uma elevada concentração do fármaco 5-Fu na superfície dos filmes e não no seu interior. Por conseguinte, como apresenta solubilidade no soro fisiológico, o fármaco em questão tende a libertar-se muito rapidamente. Uma forma de combater este problema seria produzir, através do método de encapsulamento II, dois filmes e no meio destes dois, colocar-se-ia a quantidade de fármaco desejada. Deste modo, o fármaco ao invés de ficar disperso na superfície, ficava acumulado no interior dos dois filmes. Apesar deste estudo já ter sido feito e de terem sido obtidos alguns avanços em relação aos resultados até então alcançados no que diz respeito à libertação controlada do fármaco 5-Fu, este estudo foi realizado apenas com uma única amostra. Desta forma, seria conveniente repeti-lo com uma população amostral maior, de modo a aumentar a fiabilidade dos resultados.

Referências bibliográficas

1. Ebewele, R.O., *Polymer science and technology*. 2000, Boca Raton: CRC Press.
2. Sperling, L.H., *Introduction to physical polymer science*. 2006, Hoboken: John Wiley & Sons.
3. Gupta, A.L., *Polymer chemistry*. 2010, Newmarket: Pragati.
4. Endres, H.-J. and A. Siebert-Raths, *Engineering biopolymers: Markets, manufacturing, properties and applications*. 2012, Munique: Hanser.
5. Niaounakis, M., *Biopolymers: reuse, recycling, and disposal* 2013, Oxford: Elsevier.
6. Thomas, S., et al., *Handbook of biopolymer-based materials: From blends and composites to gels and complex networks*. 2013, Weinheim: Wiley-VCH.
7. Kalia, S. and M.W. Sabaa, *Polysaccharide based graft copolymers*. 2013, Berlim: Springer.
8. Reis, R.L., et al., *Natural-based polymers for biomedical applications*. 2008, Cambridge: Woodhead.
9. García-González, C.A., M. Alnaief, and I. Smirnova, *Review: Polysaccharide-based aerogels - Promising biodegradable carriers for drug delivery systems*. *Carbohydrate Polymers*, 2011. **86**: p. 1425–1438.
10. Heinze, T., *Polysaccharides I: Structure, characterization and use*. *Advances in Polymer Science*. Vol. 186. 2005, Berlim: Springer.
11. Marchessault, R.H., F. Ravenelle, and X.X. Zhu, *Polysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications*, ed. A.S. Series. Vol. 934. 2006, Washington: American Chemical Society.
12. Heinze, T., et al., *Functional polymers based on dextran*. *Advances in Polymer Science*. Vol. 205. 2006, Berlim: Springer. 199–291.
13. Deligkaris, K., et al., *Review: Hydrogel-based devices for biomedical applications*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **147**: p. 765–774.
14. Gross, R.A. and C. Scholz, *Biopolymers from polysaccharides and agroproteins*, ed. A.S. Series. Vol. 786. 2001, Washington: American Chemical Society.
15. Almeida, J.F., et al., *Synthesis of a dextran based thermo-sensitive drug delivery system by gamma irradiation*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013. **61**: p. 150-155.
16. Stenekes, R.J.H., H. Talsma, and W.E. Hennink, *Formation of dextran hydrogels by crystallization*. *Biomaterials*, 2002. **22**: p. 1891}1898.

17. Belder, A.N.d., *Dextran*. Handbooks from Amersham Biosciences. 2003, Uppsala: Amersham Biosciences.
18. Kim, S.H., C.Y. Won, and C.C. Chu, *Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking*. Carbohydrate Polymers, 1999. **40**: p. 183–190.
19. Ottenbrite, R.M., K. Park, and T. Okano, *Biomedical applications of hydrogels handbook*. 2010, Nova Iorque: Springer.
20. Ratner, B.D., et al., *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. 2^a ed. 2004, San Diego: Elsevier.
21. Barbucci, R., *Hydrogels: Biological properties and applications*. 2009, Milão: Springer.
22. Sadowski, G. and W. Richtering, *Intelligent hydrogels*. Progress in colloid and polymer science. Vol. 140. 2013, Heidelberg: Springer.
23. Jain, K.K., *Drug Delivery Systems*. Methods in molecular biology. 2008, New Jersey: Humana Press.
24. Siepmann, J., R.A. Siegel, and M.J. Rathbone, *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. Advances in delivery science and technology. 2012, New York: Springer.
25. Brandl, F., et al., *Hydrogel-based drug delivery systems: Comparison of drug diffusivity and release kinetics*. Journal of Controlled Release, 2010. **142**: p. 221–228.
26. Brown, D.M., *Drug delivery systems in cancer therapy*. Cancer drug discovery and development. 2004, New Jersey: Humana Press.
27. Bertz, A., et al., *Encapsulation of proteins in hydrogel carrier systems for controlled drug delivery: Influence of network structure and drug size on release rate*. Journal of Biotechnology, 2013. **163**: p. 243–249.
28. Ranade, V.V. and M.A. Hollinger, *Drug delivery systems*. 2^a ed. 2004, Boca Raton: CRC Press.
29. T., S., et al., *Three case of reports of 5-fluorouracil induced serpentine supravenuous hyperpigmentation*. International Journal of Current Pharmaceutical & Clinical Research, 2014. **4**(1): p. 1-3.
30. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *Review: 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies* Nature Publishing Group, 2003. **3**: p. 330-338.

31. Pendekal, M.S. and P.K. Tegginamat, *Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **20**: p. 1-11.
32. Yuan, M., et al., *Micelle controlled release of 5-fluorouracil: Follow the guideline for good polymer–drug compatibility*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **457**: p. 116-124.
33. Gao, H., Y. Gu, and Q. Ping, *The implantable 5-fluorouracil-loaded poly(L-lactic acid) fibers prepared by wet-spinning from suspension*. Journal of Controlled Release, 2007. **118**: p. 325–332.
34. Wang, Y. and T. Jiang, *Understanding high grade glioma: Molecular mechanism, therapy and comprehensive management*. Cancer Letters, 2013. **331**: p. 139–146.
35. Arias, J.L., *Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems*. Molecules, 2008. **13**: p. 2340-2369.
36. Stuart, B., *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*, ed. A.T.i.t. Sciences. 2004, Chichester: John Wiley & Sons.
37. Stuart, B.H., *Polymer analysis Analytical Techniques in the Sciences*. 2002, Chichester: John Wiley & Sons.
38. Morrison, R.T. and R. Boyd, *Organic chemistry*. 1992, New Jersey: Prentice-Hall.
39. Skoog, D.A., et al., *Fundamentals of analytical chemistry*. 9^a ed. 2013, Belmont: Brooks/Cole.
40. Bertolini, A.C., *Starches: Characterization, properties and applications*. 2010, Boca Raton: CRC Press.
41. Meybodia, Z.E., M. Imania, and M. Ataib, *Kinetics of dextran crosslinking by epichlorohydrin: A rheometry and equilibrium swelling study*. Carbohydrate Polymers, 2013. **92**: p. 1792– 1798.
42. Li, G., et al., *Thermo- and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **55**: p. 69– 74.

Anexos

Anexo A - Análises FTIR

Nas seguintes Figuras são apresentados os espectros FTIR das amostras mencionadas ao longo deste trabalho, mais propriamente no Capítulo III.

A presença dos grupos carboxílicos nos diferentes espectros apresentados indica a ocorrência de uma reação de reticulação entre o polímero e o(s) agente(s) reticulante(s) utilizado(s). Normalmente os grupos carboxílicos apresentam uma banda de absorção característica na faixa de, sensivelmente, 1750 cm^{-1} .

Da Figura A.1 à Figura A.10 estão representados os espectros FTIR das várias amostras formadas a partir do polímero dextrano. Em todos os espectros pode ser observado um pico aos $1748,3\text{ cm}^{-1}$, o qual em alguns espectros se verifica mais intenso.

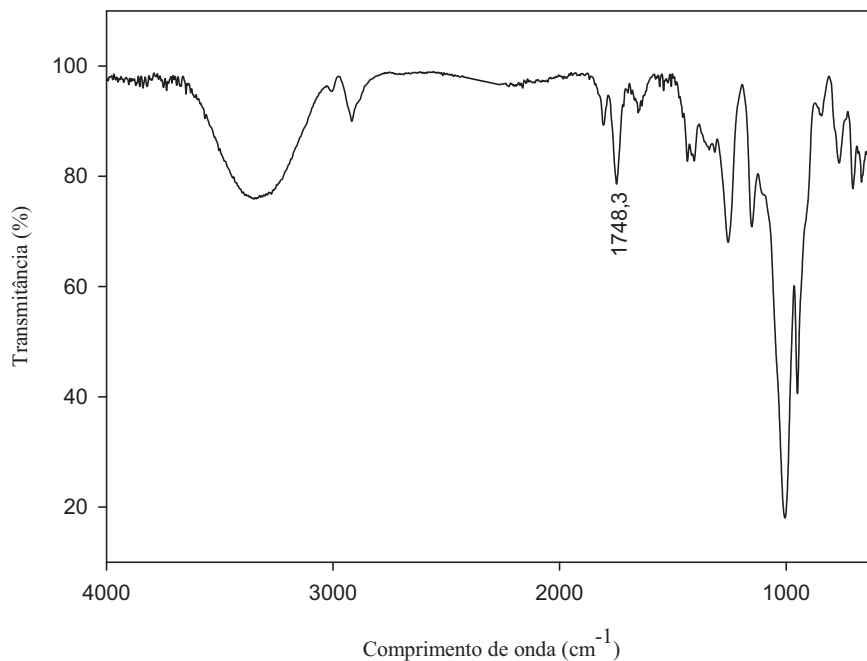


Figura A. 1 - Espectro FTIR referente à amostra Dex1.

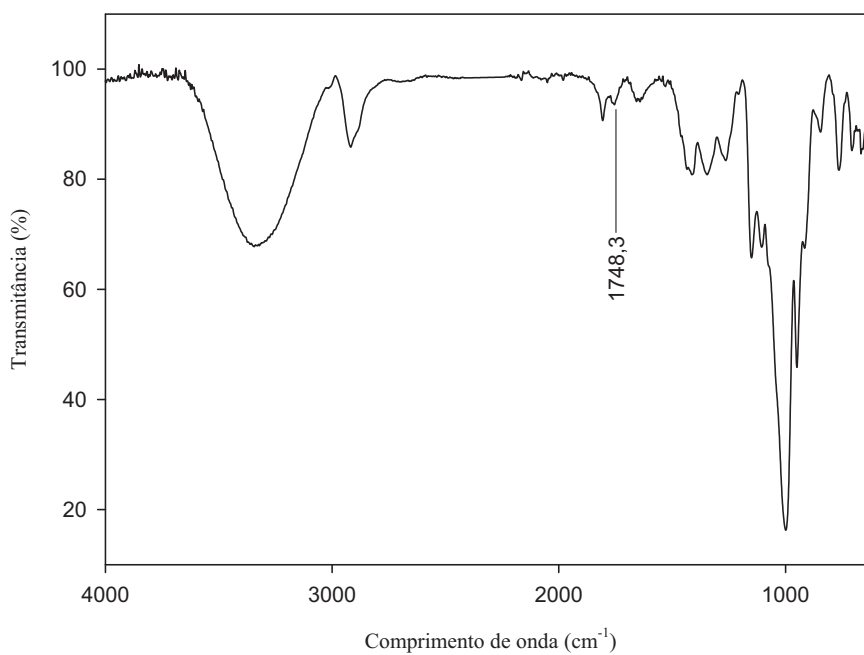


Figura A. 2 - Espectro FTIR referente à amostra Dex2.

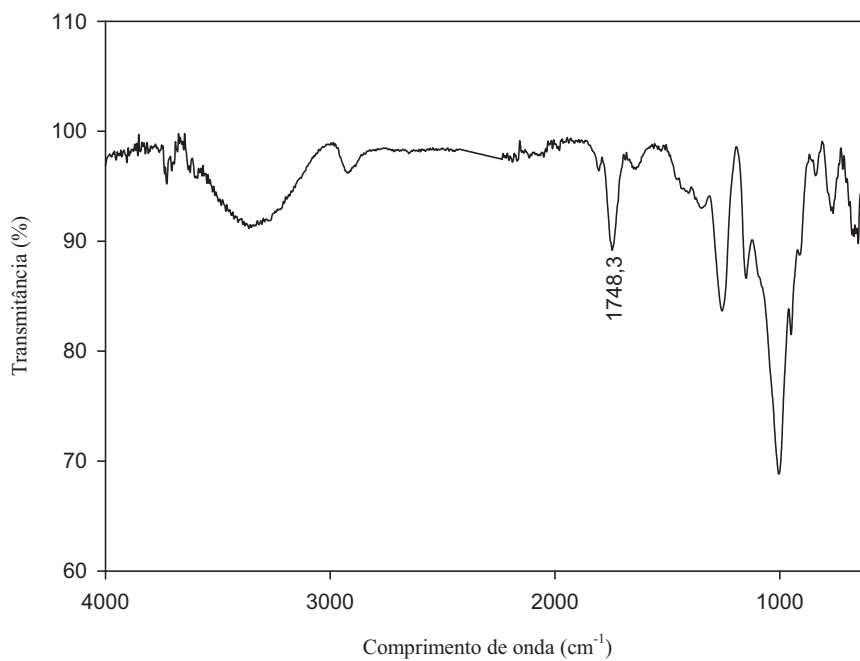


Figura A. 3 - Espectro FTIR referente à amostra Dex3.

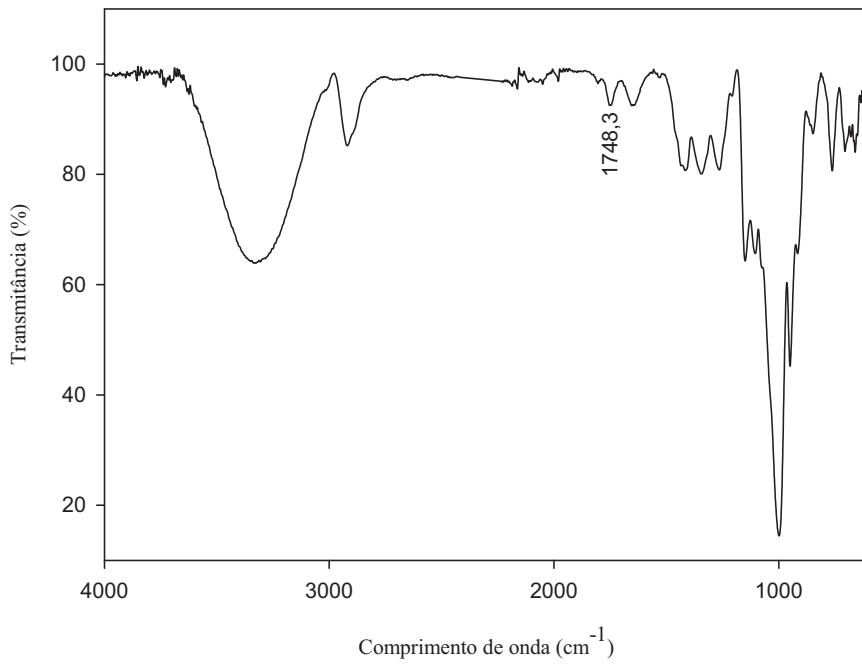


Figura A. 4 - Espectro FTIR referente à amostra Dex4.

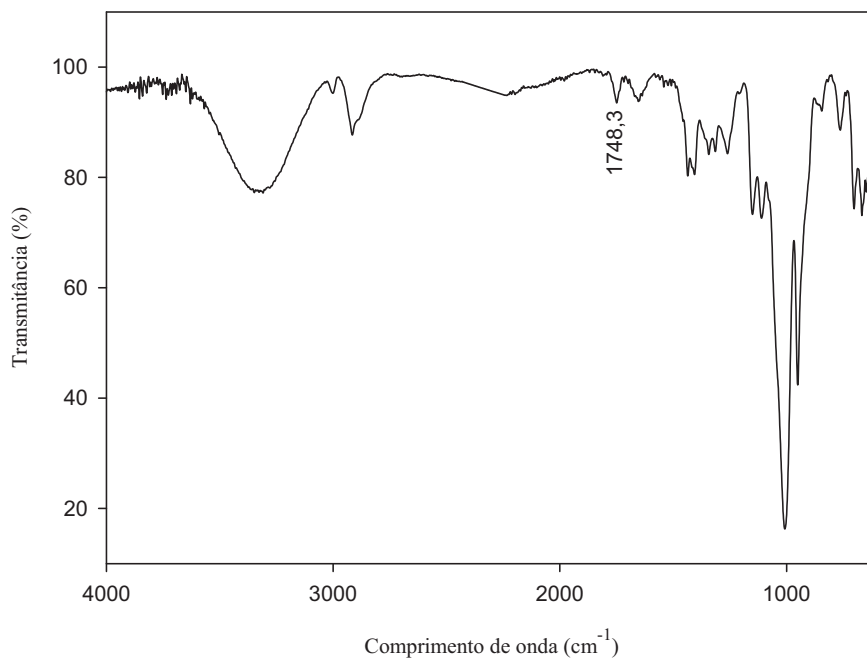


Figura A. 5 - Espectro FTIR referente à amostra Dex5.

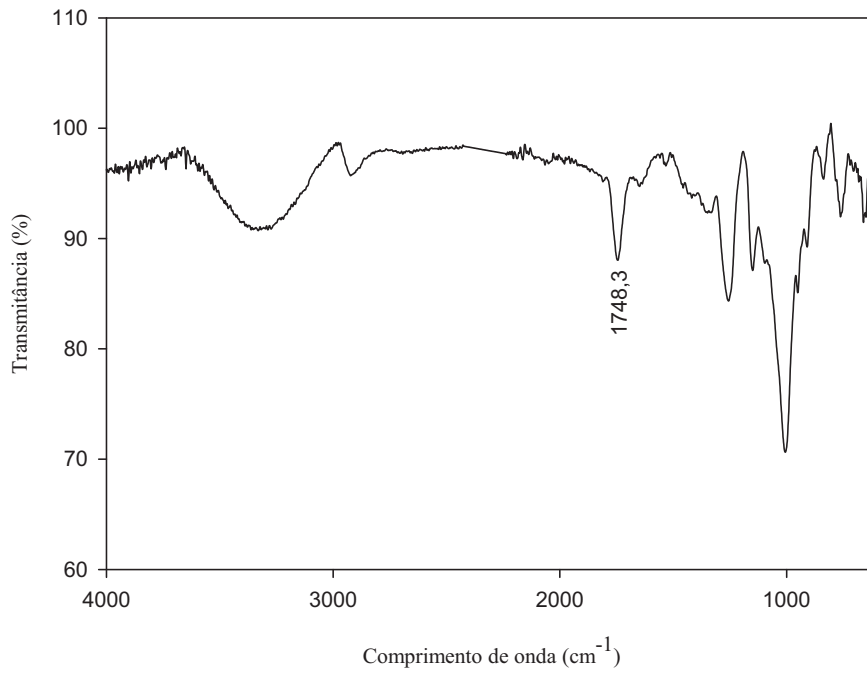


Figura A. 6 - Espectro FTIR referente à amostra Dex6.

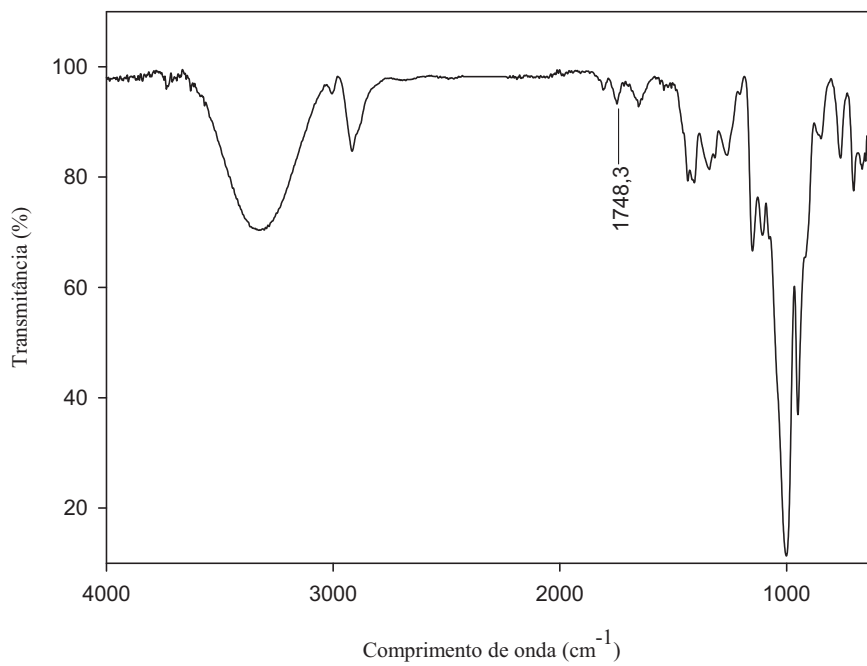


Figura A. 7 - Espectro FTIR referente à amostra Dex7.

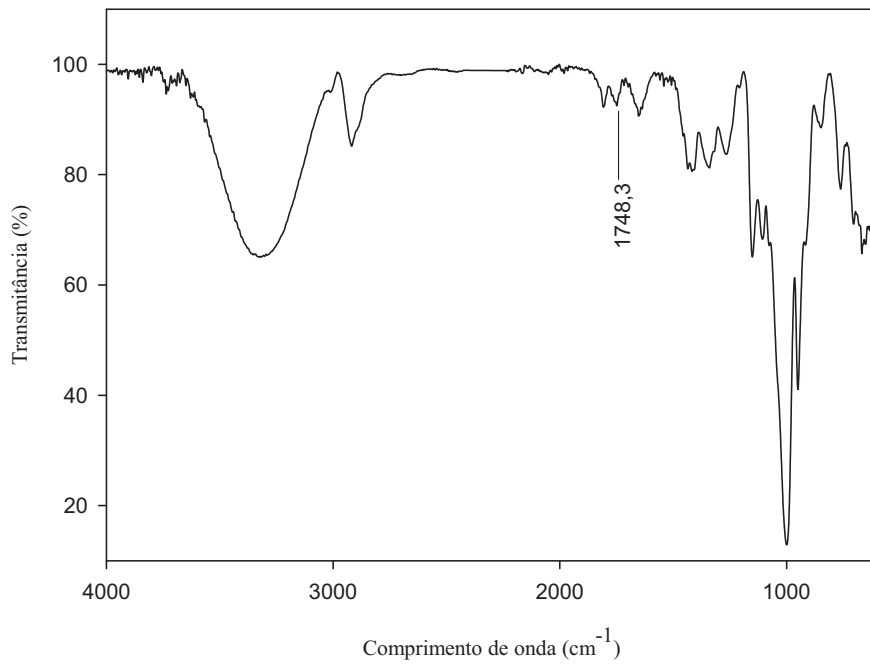


Figura A. 8 - Espectro FTIR referente à amostra Dex8.

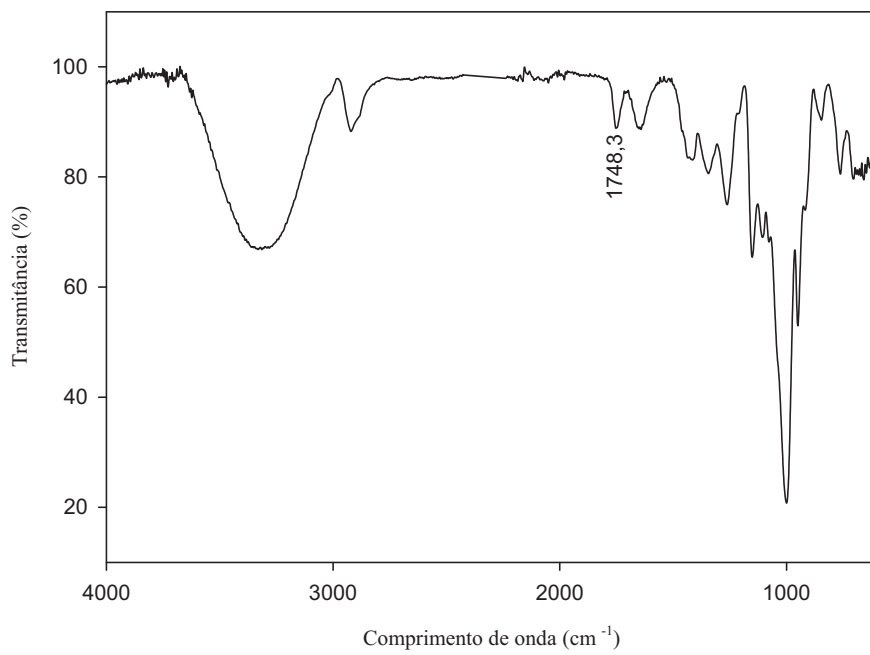


Figura A. 9 - Espectro FTIR referente à amostra Dex9.

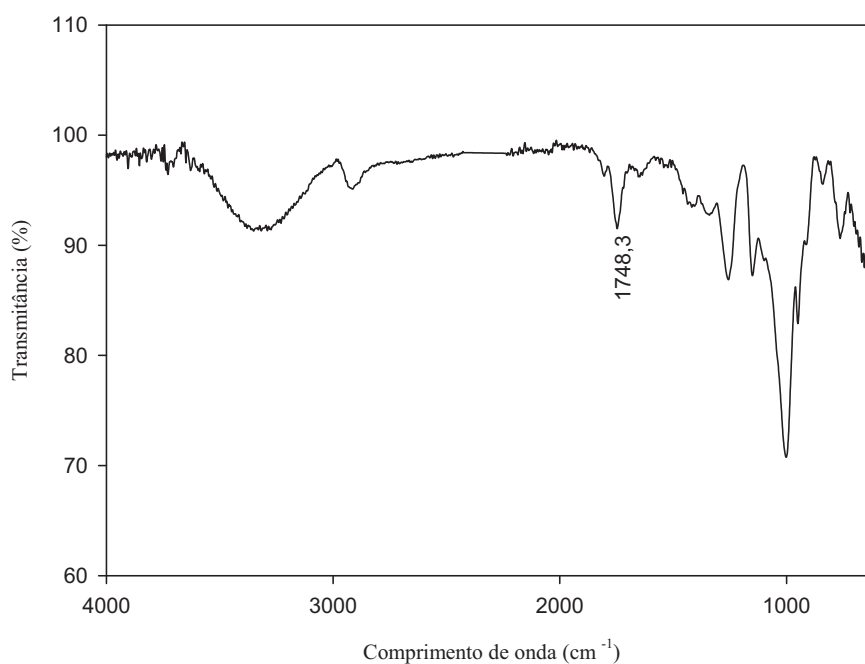


Figura A. 10 - Espectro FTIR referente à amostra Dex10.

A Figura A.11 representa o espectro FTIR da única amostra formada a partir do polímero amido. Neste espectro pode-se visualizar, também, um pico aos 1748,3 cm⁻¹ que confirma a ocorrência da reação de reticulação entre o amido e o agente reticulante AR.

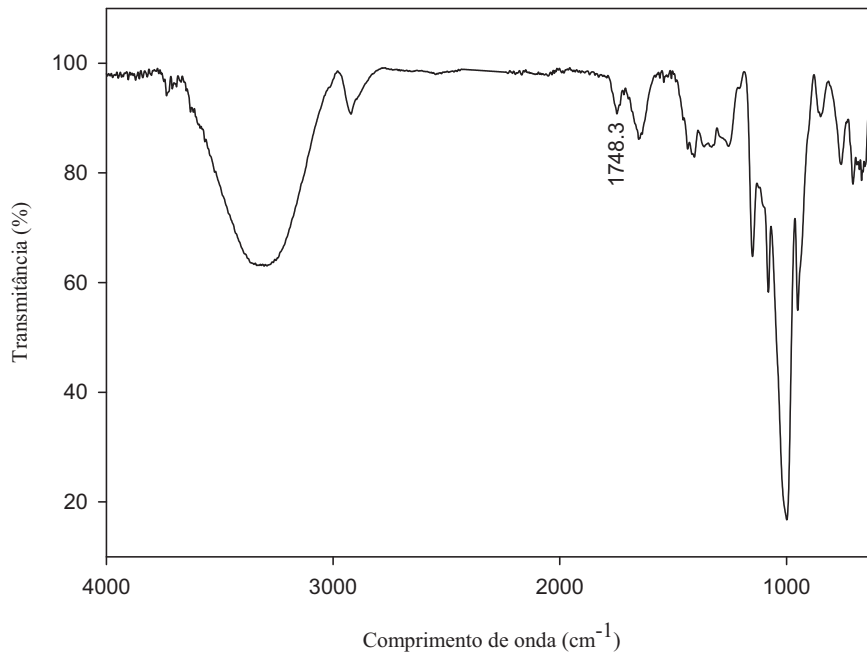


Figura A. 11 - Espectro FTIR referente à amostra Ami1.

As Figuras A.12, A.13 e A.14 representam os espectros FTIR das três amostras formadas a partir do polímero hidroxietilamido. Em cada um dos três espectros pode ser observado um pico aos $1748,3 \text{ cm}^{-1}$, que confirma a ocorrência da reacção de reticulação do hidroxietilamido com o agente reticulante AR na Figura A.12 e a reacção de reticulação do polímero com os agentes reticulantes AR e pentaeritritol nas Figuras A.13 e A.14.

É de notar que, ao contrário da utilização não satisfatória do agente reticulante pentaeritritol nas amostras Dex11 e Dex12, nas amostras Hea2 e Hea3 este agente reticulante provocou alterações a nível estrutural. Através da análise dos três espectros apresentados na Figura A.15 pode-se verificar que existem diferenças do espectro referente à amostra Hea1, na qual o agente pentaeritritol não foi utilizado, em relação aos espectros referentes às amostras Hea2 e Hea3. No entanto, o pico que comprova a ocorrência da reacção de reticulação está presente nos três espectros, aos $1748,3 \text{ cm}^{-1}$.

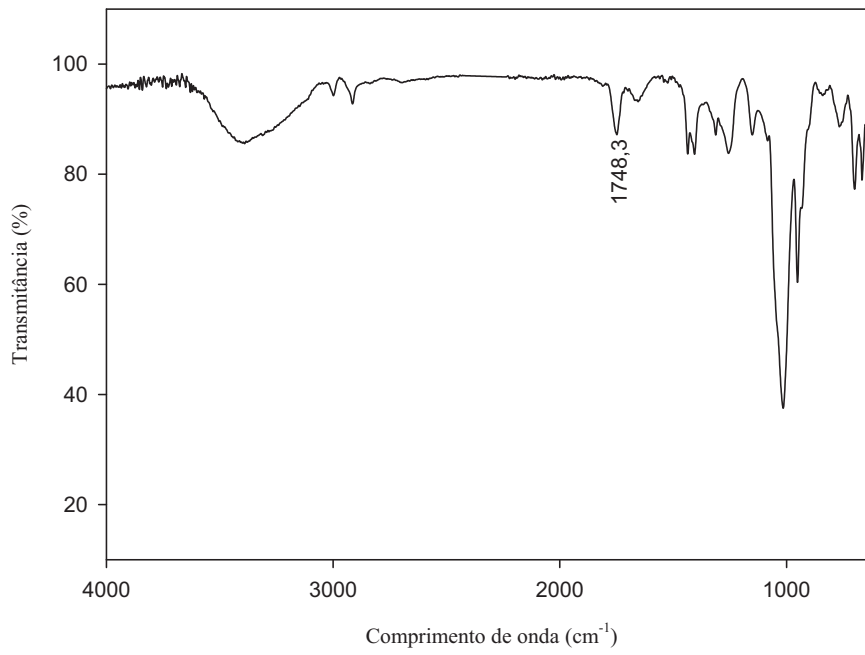


Figura A. 12 - Espectro FTIR referente à amostra Hea1.

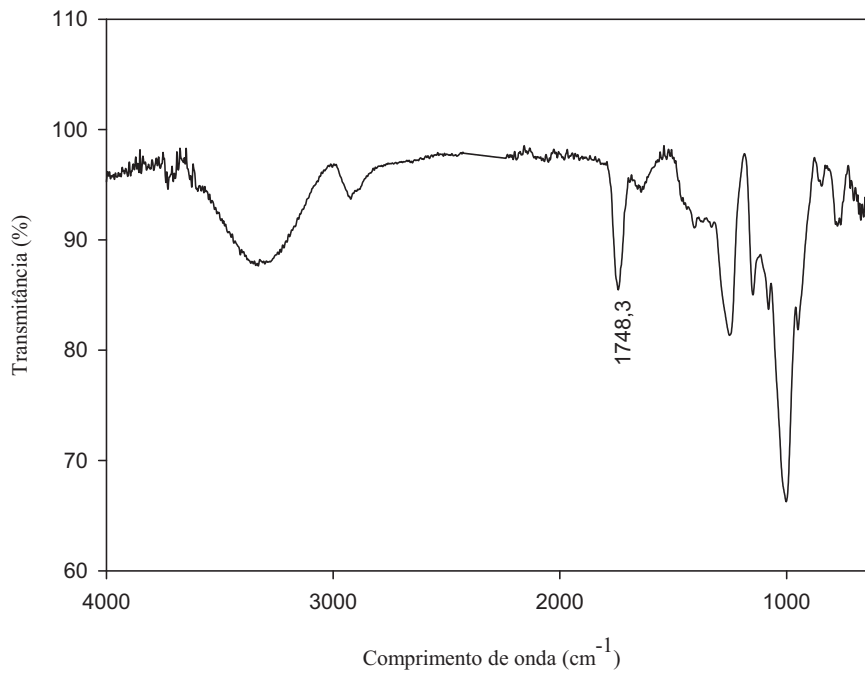


Figura A. 13 - Espectro FTIR referente à amostra Hea2.

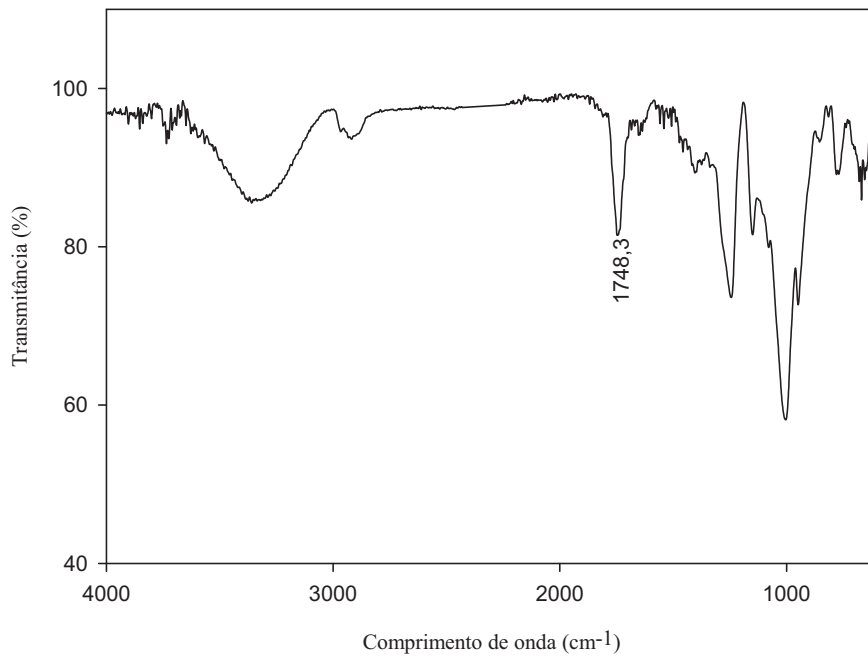


Figura A. 14 - Espectro FTIR referente à amostra Hea3.

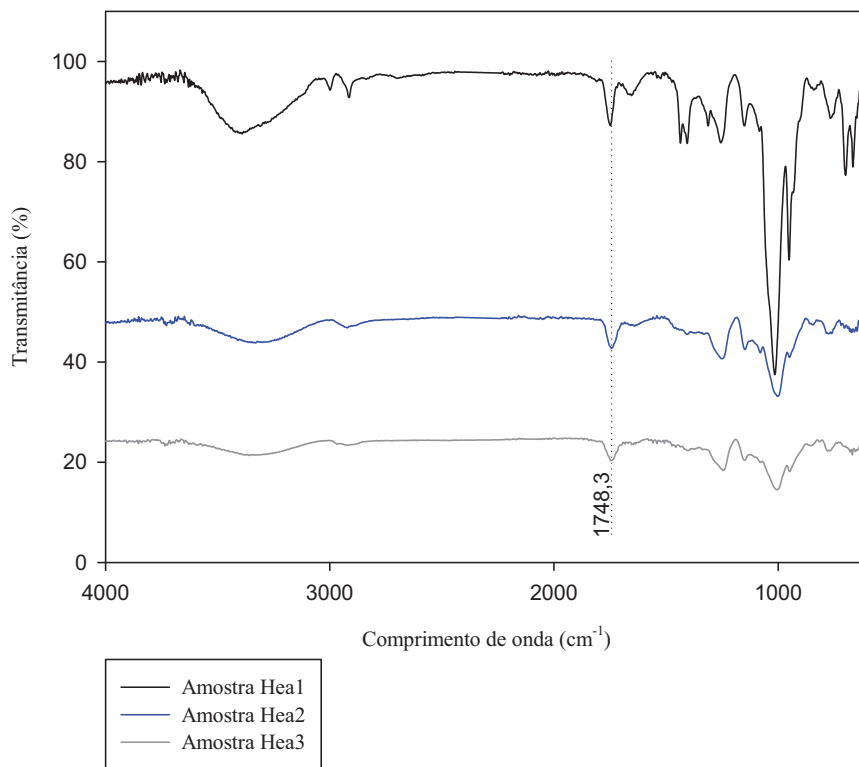


Figura A. 15 - Espectros FTIR referentes às amostras Hea1, Hea2 e Hea3.