

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**Microesferas de lactato de quitosana transportadoras de  
quimioterápicos para quimioembolização de tumores.**

**Priscila da Silva Machado Costa**

**Itajubá, dezembro de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**Priscila da Silva Machado Costa**

**Microesferas de lactato de quitosana transportadoras de  
quimioterápicos para quimioembolização de tumores.**

**Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Materiais para  
Engenharia como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
em Materiais para Engenharia**

**Área de Concentração: Não Metais**

**Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio  
Alencar de Queiroz**

**Dezembro de 2013**

**Itajubá**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**Priscila da Silva Machado Costa**

**Microesferas de lactato de quitosana transportadoras de  
quimioterápicos para quimioembolização de tumores.**

Dissertação aprovada pela banca  
examinadora em 18 de dezembro de 2013,  
conferindo ao autor o título de ***Mestre em***  
***Ciências em Materiais para Engenharia.***

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de  
Queiroz

Prof. Dr. Edson Giuliani Ramos  
Fernandes

Prof. Dr. Elcio Rogério Barrak

**Itajubá**  
**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá  
Bibliotecária Jacqueline Rodrigues de Oliveira Balducci- CRB\_6/1698

C837m

Costa, Priscila da Silva Machado.

Microesferas de lactato de quitosana transportadoras de  
quimioterápicos para quimioembolização de tumores. / Priscila  
da Silva Machado Costa. – Itajubá,(MG) : [s.n.], 2013.  
102 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiróz.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Lactato de Quitosana. 2. Microesferas. 3. Quimioemboli-  
zação. 4. Estreptoquinase. 5. Biomateriais. I. Queiróz, Álvaro  
Antônio Alencar de, orient. II. Universidade Federal de Itajubá.  
III. Título.

A meu esposo Lucas, por todo apoio, pelas palavras de motivação e,  
sobretudo por sempre acreditar em mim.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que despertaram em mim o desejo constante de crescimento e aperfeiçoamento, além de me orientarem sempre no caminho da retidão e comprometimento.

Ao meu esposo Lucas, que sempre teve uma palavra de incentivo e encorajamento nos momentos mais difíceis, e por dividir comigo todas as expectativas, sonhos, e esperanças envolvidos nesse trabalho.

Ao professor Álvaro, pela atenção, apoio e paciência no decorrer de todo o trabalho realizado.

Aos professores Demétrio, Rossano, Geovani Rodrigues e Élcio, por disponibilizarem os equipamentos de seus laboratórios e também ao técnico Marcos Cirilo, pela disponibilidade e auxílio com as análises.

Aos colegas Amanda, Angélica, Tessa e Aldo, pelo companheirismo, auxílio com dúvidas e principalmente por dividirmos os anseios, alegrias e também as decepções.

Ao Instituto Federal do Sul de Minas por ter me proporcionado a oportunidade de estar buscando essa capacitação e construindo mais um degrau no meu desenvolvimento profissional.

À Universidade Federal de Itajubá, por ter me recebido de portas abertas para a realização desse curso.

*“Obstáculo é aquilo que você enxerga, quando tira os olhos do seu objetivo.”*

*Henry Ford*

## RESUMO

Neste trabalho obteve-se microesferas de lactato de quitosana por *spray drying* a fim de avaliar seu potencial como sistema de liberação controlada na quimioembolização de tumores. O fármaco 5-FU foi adicionado ao lactato de quitosana em solução e posteriormente atomizada para a secagem em um secador por aspersão Spray Dryer. As microesferas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), análise termogravimétrica (TA) e difração de raios X. Ensaio biológicos foram realizados para avaliação das propriedades citotóxicas e hemocompatíveis das microesferas de lactato de quitosana. Foram realizados ensaios de formação de trombos e determinação da atividade hemolítica. A técnica de secagem por *spray drying* mostrou-se promissora para produção de micropartículas esféricas com estreita distribuição de tamanhos para utilização em quimioembolização de tumores. As microesferas de lactato de quitosana apresentaram superfície lisa, ocas e sem observação de sinal de aglomeração; observação essa em boa concordância com as medidas de potencial zeta. O perfil de liberação das amostras de 5-fluorouracil (5-FU) apresentou efeito *burst* que foi diminuído após o processo de reticulação das microesferas de lactato de quitosana com glutaraldeído na fase vapor. A liberação lenta do fármaco 5-FU foi associada ao baixo intumescimento das microesferas de lactato de quitosana reticuladas com glutaraldeído. O processo de reticulação das microesferas com glutaraldeído na fase vapor provocou uma diminuição do efeito *burst* e também um prolongamento da liberação do 5-FU. Os ensaios de citotoxicidade indicaram que as microesferas de lactato de quitosana apresentaram características não citotóxicas, portanto biocompatíveis e adequadas para utilização em processos clínicos invasivos a exemplo da quimioembolização. Os resultados obtidos dos ensaios de trombogenicidade e atividade hemolítica sugerem que as microesferas de lactato de quitosana apresentam boas propriedades hemocompatíveis para utilização em condições *in vivo* em contato com o sangue.

**Palavras Chave:** Lactato de Quitosana, Microesferas, Quimioembolização, Estreptoquinase, Biomateriais.

## ABSTRACT

In this work chitosan lactate microspheres were prepared by spray drying in order to assess its potential as a controlled release system in chemoembolization of tumors. The drug 5-fluorouracil (5-FU) was added to the chitosan lactate solution and then it was atomized in a Spray Dryer. The microspheres obtained were characterized by scanning electron microscopy (SEM), infrared (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR), thermal analysis (TGA) and X-ray diffraction. Biological assays were performed to assess the cytotoxic and hemocompatible properties of the chitosan lactate microspheres. Assays about thrombus formation and determination of hemolytic activity were performed. The spray drying technique showed a promisor drying to produce spherical microparticles with narrow distribution of sizes for use in chemoembolization of tumors. The microspheres of chitosan lactate showed a smooth surface, hollow and without agglomeration in good agreement with the zeta potential measurements. The release profile of 5-fluorouracil (5-FU) from chitosan lactate microspheres showed a burst effect that was decreased after the process of crosslinking of the chitosan lactate microspheres with glutaraldehyde in vapor phase. The slow release of the 5-FU was associated with the low swelling ratio of the crosslinked chitosan lactate microspheres with glutaraldehyde. The crosslinking process of the microspheres with glutaraldehyde in vapor phase caused a decreased burst effect and also a prolonged release of 5-FU release. Cytotoxicity assays indicated that the microspheres of chitosan lactate prepared in this work showed no cytotoxic characteristics, biocompatibility and suitability for use in the chemoembolization procedures. The results of the thrombogenicity assays and hemolytic activity suggest that the microspheres of chitosan lactate present good hemocompatible properties for use in contact with blood.

**Key words:** Chitosan Lactate, Microspheres, Chemoembolization, Streptokinase, Biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das moléculas de quitina e quitosana.	33
Figura 2: Fluxograma da obtenção da quitosana a partir da quitina.	34
Figura 3: Representação da molécula de lactato de quitosana.	37
Figura 4: Tipos de vibração molecular.	42
Figura 5: Esquema geral do MEV.	45
Figura 6: Poder de resolução do microscópio eletrônico de varredura (MEV) comparativamente ao microscópio óptico.	46
Figura 7: Técnicas de análise térmica dos materiais.	47
Figura 8: Ilustração do fenômeno de difração de raios X.	49
Figura 9: Mecanismo de esterificação do biopolímero Quitosana com Cloreto de Lactofla para obtenção de Lactato de Quitosana.	54
Figura 10: Fluxograma ilustrando o princípio de funcionamento do equipamento <i>spray-dryer</i> da Buchi e bico injetor.	55
Figura 11: Amostras de microesferas de lactato de quitosana depositadas no porta amostra para análise no MEV.	57
Figura 12: Espectro FTIR dos biopolímeros quitina (A) e quitosana (B), obtidos <i>in natura</i> à temperatura ambiente (25 °C).	64
Figura 13: Espectro FTIR do lactato de quitosana obtidos <i>in natura</i> à temperatura ambiente (25 °C).	65
Figura 14: Ilustração da estrutura química da quitosana e suas respectivas numerações.	65
Figura 15: Espectro H-NMR do biopolímero quitosana (A) e do éster, lactato de quitosana (B). Solvente utilizado: D <sub>2</sub> O. As medidas foram feitas a 70 °C.	67

Figura 16: As ligações de hidrogênio no polímero quitosana são devido às ligações de hidrogênio entre os grupos acetila, amins e hidroxilas existentes nas unidades méricas do biopolímero. Adaptado de [78].	68
Figura 17: Micrografias MEV das microesferas de lactato de quitosana.	70
Figura 18: Micrografia MEV de uma microesfera de lactato de quitosana com sua casca rompida. Observam-se no interior da microesfera partículas de 5-FU.	71
Figura 19: Distribuição dos tamanhos das esferas de lactato de quitosana determinado a partir das micrografias MEV.	72
Figura 20: DRX medido à temperatura ambiente (25 °C) da quitina (A), quitosana (B) e lactato de quitosana (C).	73
Figura 21: Curvas TG/DTG do biopolímero quitina em atmosfera de $N_{2(g)}$ .	75
Figura 22: Curva TG/DTG para o biopolímero quitosana em atmosfera de $N_{2(g)}$ .	76
Figura 23: Curva termogravimétrica as microesferas de Lactato de Quitosana reticuladas com glutaraldeído.	77
Figura 24: Análise termogravimétrica do 5-Fluorouracil.	78
Figura 25: Potencial $\zeta$ das microesferas de lactato de quitosana em função do pH do meio.	79
Figura 26: Perfis de liberação do 5-FU a partir das microesferas de lactato de quitosana não reticuladas (A) e reticuladas (B) com glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4.	80
Figura 27: Ensaio de citotoxicidade das microesferas de lactato de quitosana. Controle positivo = fenol a 4% (■), controle negativo = polietileno de baixa densidade (PEBD) (●), microesferas de lactato de quitosana (▲).	83
Figura 28: Cinética da formação de trombos nas superfícies das microesferas de lactato de quitosana (B) e do silicone grau médico (C). O vidro (A) foi utilizado como controle negativo (superfície com elevada propriedade trombogênia). O	84

número de amostras ensaiadas foi igual a 3 (n=3). Quantidade de estreptoquinase imobilizada na superfície polimérica: 27 mg/g.

Figura 29: Hemólise das microesferas de lactato de quitosana (LQ). Utilizaram-se como controle positivo o vidro e controle negativo o silicone de grau médico (SiM). 85

Figura 30: Estrutura química dos quimioterápicos: 5-FU (A), DOX (B) e TS (C). 89

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

- FTIR Microscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.
- UV-VIS Ultra-violeta visível.
- TG Termogravimetria.
- DTG Termogravimetria Derivada.
- MEV Microscopia Eletrônica por Varredura.
- DRX Difração de Raios X.
- PZ Potencial Zeta.
- DNA Ácido Desoxirribonucleico.
- OMS Organização Mundial da Saúde.
- WGO World Gastroenterology Organization
- INCA Instituto Nacional do Câncer.
- CHC Carcinoma Hepatocelular.
- VHB Vírus da Hepatite B.
- VHC Vírus da Hepatite C.
- EASL Associação Européia para Estudos do Fígado.
- AASLD Associação Americana para Estudo das Doenças do Fígado.
- AFP Alfa fetoproteína.
- TC Tomografia Computadorizada.
- US Ultrassonografia.
- RMN Ressonância Magnética Nuclear.
- BCLB Barcelona Clinic Liver Cancer.
- QETA Quimioembolização Transarterial.
- pH Potencial Hidrogeniônico.
- IR Infravermelho.

ATR Reletância Total Atenuada.

ICTAC Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria.

ISO International Organization for Standardizations.

IC50% Índice de Citotoxicidade 50%.

TP Tempo de Protombina.

APTT Tromboplastina Parcial Ativada.

TC Tempo de Coagulação.

GD Grau de Desacetilação.

TEA Trietilamina.

PVA Polivinilacrilato.

PBS Tampão Fosfato-salino.

ACD Anti coagulante citrato-dextrose.

IPEN Instituto de Pesquisas Nucleares.

DOX Doxorrubicina.

TS Enzima Timidilatosintase.

FDA Food and Drug Administrations.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....	18
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA .....	20
2.1 HEPATOCARCINOMA: ANTECEDENTES E SIGNIFICADO.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIAS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	22
2.2.1 Fatores de risco.....	22
2.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HEPATOCARCINOMA.....	24
2.4 DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	26
2.4.1 Alfa-1 Fetoproteína.....	27
2.4.2 Ultra-sonografia (US).....	28
2.4.3 Tomografia Computadorizada (TC).....	28
2.4.4 Ressonância Magnética Nuclear.....	29
2.5 ABORDAGEM CLÍNICA DO CHC .....	29
2.5.1 Estágio muito inicial e inicial .....	30
2.5.2 Estágio Intermediário .....	30
2.5.3 Estágio Avançado .....	30
2.5.4 Estágio Terminal .....	31
2.6 EMBOLIZAÇÃO ARTERIAL DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	31
2.6.1 Quimioembolização Transarterial (QETA).....	32
2.6.2 QETA combinado com outros tratamentos intervencionistas .....	33
CAPÍTULO 3: PROJETO RACIONAL DE NOVOS MATERIAIS PARA QUIMIOEMBOLIZAÇÃO .....	34
3.1 SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS MULTIESTÁGIOS .....	34
3.2 O BIOPOLÍMERO QUITOSANA: OBTENÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	35
3.2.1 Aplicações Biomédicas da Quitosana.....	37
3.2.2 Micropartículas e Nanopartículas de Quitosana para o Tratamento do CHC .....	37
3.3 MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS .....	38
3.4 UTILIZAÇÃO DE LACTATO DE QUITOSANA NA FABRICAÇÃO DE MICROESFERAS .....	39
CAPÍTULO 4: TÉCNICAS DE FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO/NANO PARTÍCULAS DE QUITOSANA .....	40
4.1 TÉCNICAS TRADICIONAIS.....	40
4.2 CONTROLE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULAS .....	40

4.3 TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE MICRO/NANO PARTÍCULAS .....	41
4.3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR).....	42
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	45
4.3.3 Análise Térmica.....	48
4.3.4 Difractometria de raios-X.....	49
4.3.5. Potencial Zeta .....	51
4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS MICRO/NANOESEFERAS.....	52
4.4.1. Citotoxicidade <i>in-vitro</i> .....	52
4.4.2. Hemocompatibilidade.....	53
CAPÍTULO 5: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	54
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA QUITOSANA UTILIZADA NESSE TRABALHO .....	54
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO LACTATO DE QUITOSANA.....	55
5.3 PREPARO DAS MICROESFERAS DE LACTATO DE QUITOSANA .....	56
5.3.1 Funcionalização das microesferas de lactato de quitosana com Estreptoquinase .....	57
5.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	58
5.4.1 Análise da morfologia e distribuição do tamanho de partículas de lactato de quitosana	58
5.4.2 Difractometria de raios-X.....	59
5.4.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	59
5.4.4 Análise Termogravimétrica .....	59
5.4.5. Potencial Zeta .....	60
5.5 ANÁLISES BIOLÓGICAS .....	60
5.5.1 Citotoxicidade.....	60
5.5.2. Hemocompatibilidade.....	61
5.5.3 Ensaio de formação de trombos.....	62
5.5.4 Determinação da atividade hemolítica .....	62
CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROESFERAS DE LACTATO DE QUITOSANA .....	64
6.1.1 Análise por FTIR e NMR do lactato de quitosana .....	64
6.1.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS MICROESFERAS DE LACTATO DE QUITOSANA .....	68
6.1.3 Análises das microesferas de lactato de quitosana por difração de raios-X.....	73
6.1.4 Análises Termogravimétricas das amostras de quitina, quitosana, microesferas de lactato de quitosana e 5-Fluorouracil .....	75
6.1.5. Potencial zeta.....	79

6.1.6. Estudo da liberação do 5-Fluorouracil .....	80
6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO .....	82
6.2.1 Citotoxicidade.....	82
6.2.2. Ensaio de formação de trombos.....	84
6.2.3 Determinação da atividade hemolítica .....	85
CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES .....	87
CAPÍTULO 8: PERSPECTIVAS FUTURAS .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## CAPÍTULO 1: Introdução

O hepatocarcinoma, mais comumente conhecido como câncer de fígado, é o mais comum dentre os chamados carcinomas. Tem uma taxa de incidência mundial de 500 mil a 1 milhão de novos casos [1]. Dentre os casos confirmados, um baixo índice de cura é alcançado por meio de tratamentos convencionais devido principalmente à velocidade de propagação da doença e aos altos custos dos tratamentos, em sua maioria intervencionista.

Como alternativa aos tratamentos intervencionistas, a utilização de nanomateriais associados a processos como a quimioembolização prometem reduzir os conhecidos incômodos dos efeitos colaterais dos processos quimioterápicos tradicionais e ainda aumentar a eficiência dos tratamentos desses tumores, contendo seu avanço e possibilitando um tempo de sobrevida superior.

Na busca por esses novos materiais, o emprego de compostos poliméricos naturais, como a quitosana, tem alcançado altos níveis de eficiência, devido, sobretudo à sua capacidade natural de biodegradação, biocompatibilidade, hemocompatibilidade e baixa citotoxicidade.

Nesse contexto, surgiu o principal objetivo desse trabalho, que foi a síntese e caracterização de microesferas do lactato de quitosana para utilização na quimioembolização de tumores hepáticos. Em segundo plano, porém não menos importante, avaliou-se também a utilização do quimioterápico 5-fluorouracil em união com as esferas de lactato de quitosana, caracterizando o objetivo secundário desse trabalho. Para tanto, foram caracterizadas as propriedades físico-químicas da quitina, o material base da quitosana, da quitosana, e do 5-fluorouracil, através das técnicas de análise de Microscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR), Ultravioleta visível (UV-VIS), Análise Termogravimétrica (TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios X.

Esse trabalho é composto de oito capítulos, sendo que os capítulos dois, três e quatro contém uma revisão bibliográfica sistemática em torno do objetivo principal, um levantamento sobre os novos materiais utilizados atualmente nos processos de tratamento de câncer e as técnicas disponíveis para fabricação de microesferas, respectivamente.

No capítulo cinco, são descritos os processos analíticos envolvidos na caracterização de novos materiais de base polimérica e também as técnicas utilizadas nesse trabalho.

No capítulo seis, são apresentados os resultados obtidos e no capítulo sete são esclarecidas as conclusões e observações obtidas durante o desenvolvimento do trabalho.

Finalizando o trabalho, são apresentadas no capítulo oito as sugestões para estudos futuros relacionados com a temática dessa dissertação e as bibliografias consultadas para o desenvolvimento e composição desse trabalho.

## CAPÍTULO 2: Revisão da Literatura

### 2.1 Hepatocarcinoma: antecedentes e significado

O câncer é por definição um conjunto de doenças que tem uma origem comum, o crescimento descontrolado das células de determinada região do organismo. Ao mesmo tempo, podem ser classificados em dois diferentes tipos de acordo com a velocidade de multiplicação das células, sendo assim aqueles classificados como malignos apresentam acelerada multiplicação celular, ao contrário dos benignos que apresentam lenta multiplicação celular, geralmente sem trazer danos para o organismo.

A origem do câncer deve-se a duas causas principais: a herança genética, quando os filhos recebem dos pais os genes modificados que darão origem a células cancerosas, sendo responsável pela menor parcela dos casos, e por fatores externos relacionados à frequente exposição aos agentes oncogênicos, como por exemplo, tabagismo, alcoolismo, uso de drogas, exposição excessiva ao sol, uso irresponsável de medicamentos e alimentação desregrada.

O câncer é uma neoplasia conhecida pelo homem há muitos séculos. No princípio, acreditava-se que esta era uma doença que ocorria somente em regiões desenvolvidas e com abundantes recursos financeiros como resultado do acelerado ritmo de vida da população. No entanto, estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que nos últimos quarenta anos, ele vem se desenvolvendo com maior incidência em países ainda em desenvolvimento e transformou-se em um evidente problema de saúde pública mundial.

A maior ocorrência dos casos de hepatocarcinoma concentra-se nas regiões da África e Ásia. Segundo a WGO (World Gastroenterology Organization), os altos índices de mortalidade dessas regiões devem-se principalmente à incapacidade por parte dos órgãos e profissionais relacionados à saúde de reconhecer os casos que devem ser enquadrados em alto risco, à falta de boa formação dos profissionais da saúde que permita um diagnóstico precoce da doença e à falta de recursos e de tratamentos eficazes depois de feito o diagnóstico.

A Organização Mundial da Saúde estimou que, até o ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de

peças, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas [1].

Os tipos de câncer podem ser classificados em cinco grandes categorias [2]:

- Carcinoma: É o tipo mais comum, é aquele que se origina num tecido epitelial.
- Sarcoma: É um grupo heterogêneo de tumores malignos que surgem de células mesenquimais, que são células derivadas de células tronco e que podem dar origem a diversos tipos de tecidos, tais como muscular, epitelial, gorduroso, cartilaginoso, etc.
- Leucemia: Atinge as células do sangue e tem origem a partir de uma modificação genética na medula óssea.
- Linfoma: Atinge o sistema linfóide que é formado pela medula óssea, o timo, o baço e os linfonodos.
- Tumor do Sistema Nervoso Central: É o mais frequente entre crianças e adolescentes, atinge principalmente o cérebro e o cerebelo.

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a maior incidência é dos cânceres classificados como carcinomas, seguido pelos sarcomas, linfomas, tumores do sistema nervoso central e por último aparecem as leucemia.

Entre os carcinomas, especial atenção será dada neste trabalho ao hepatocarcinoma, que é o mais comum e mais agressivo dos tumores do grupo dos hepatobiliares [3]. Atualmente o hepatocarcinoma é o quinto câncer mais comum em homens e o oitavo em mulheres. Globalmente, sua incidência anual é de 560.000 novos casos, sendo que, sua ocorrência é maior em países com maior frequência de fatores de risco, como na Ásia, pela altíssima incidência de hepatite B [4].

Estudos indicam que no Brasil a incidência do hepatocarcinoma é maior em indivíduos do sexo masculino, já contaminados com o vírus da hepatite B e apresenta uma taxa de mortalidade para ambos os sexos variando de 0,25% na região Sul, 0,27% no Sudeste, 0,12% no Nordeste, 0,08% no Norte e 0,05% de casos por 100.000 habitantes por ano [5].

## 2.2 Epidemiologias do Carcinoma Hepatocelular

Dentre as causas do carcinoma hepatocelular, as principais ocorrências são originadas a partir de processos infecciosos por hepatite B e C e principalmente a partir de casos de Cirrose Hepática, cerca de 80% dos casos, o que explica, em termos, sua frequência maior em homens, que representam a maior parcela da população contaminada com cirrose proveniente do uso excessivo de álcool [6].

No Japão, Estados Unidos, América Latina e Europa, a principal causa do Carcinoma Hepatocelular (CHC) é o vírus da Hepatite C, o que vem obrigando esses países a desenvolverem uma extensa campanha anual de vacinação em massa, visto que a prevenção desse tipo de doença é a melhor maneira de se controlar a incidência de câncer. Já na Ásia, África e alguns países do leste da Europa, a principal causa de mortalidade por CHC provém dos altos índices de Hepatite B crônica.

No Brasil, apesar de não figurar entre os 10 tipos de câncer de maior ocorrência, um fato interessante e ao mesmo tempo preocupante é a alta incidência dessa doença no norte do Estado do Paraná, que segundo as pesquisas desenvolvidas na região, está relacionada ao uso indiscriminado de pesticidas organoclorados. Esse tipo de ocorrência é um bom exemplo de causa de câncer devido a um agente oncológico ambiental, ou seja, agente carcinogênico desenvolvido por uma determinada atividade [7].

### 2.2.1 Fatores de risco

A Hepatite B pode ocorrer de duas formas, aguda ou crônica. A forma aguda pode durar apenas algumas semanas ou em alguns casos até meses e pode ser tratada com o auxílio de medicamentos. Em alguns casos pode curar-se espontaneamente sem a necessidade de grandes intervenções, isso ocorre quando a proporção entre as células infectadas é menor do que as células de defesas do organismo. Já na forma crônica é uma doença que pode durar por toda a vida do paciente fazendo-se necessária a intervenção médica para controle e estagnação da doença, pois essa forma pode dar origem a outras doenças graves no fígado, incluindo o hepatocarcinoma. Nesse caso a quantidade de células hepáticas afetadas é muito grande e o organismo não apresenta defesas suficientes para combater o vírus sozinho.

O Vírus que causa a Hepatite B é transmitido através do sangue e pode ocorrer em transfusões, no momento do parto, por agulhas contaminadas, por relação sexual desprotegida, através de instrumentos odontológicos contaminados e ainda como consequência do tratamento de hemodiálise em locais com baixa biossegurança.

Em pacientes já contaminados com o vírus da Hepatite B, o risco da doença evoluir para um CHC aumenta progressivamente com a presença de alguns fatores de risco como: alto índice do vírus no organismo, sexo masculino, idade avançada, presença ou tendência a desenvolver cirrose, exposição à aflatoxinas, um grupo de compostos tóxicos produzidos por certas cepas dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que contaminam alimentos armazenados inadequadamente.

Segundo estudos, no Brasil 15% da população já foi contaminada com o vírus da hepatite B e desses, 1% corresponde a portadores da doença na forma crônica [8]. Nos pacientes com hepatite B, a integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro pode ser um evento inicial, induzindo alterações na expressão celular e no gene do vírus da hepatite B (VHB) devido a rearranjos cromossômicos ou produzindo mutagênese [7].

A Hepatite C, juntamente com a doença hepática alcoólica, ocupa o primeiro lugar em enfermidades causadoras de doenças crônicas do fígado. As formas de contaminação pelo vírus da hepatite C (VHC) são semelhantes ao da Hepatite B, freqüentemente causado pelo contato com materiais cirúrgicos, odontológicos e seringas contaminadas.

No Brasil, desde 1993, há a obrigatoriedade dos testes sorológicos (anti-VHC) em candidatos a doadores de sangue. Assim, a hepatite pós-transfusional tornou-se rara, mas outros meios, parenterais ou não, continuam a disseminar a doença [8].

Os casos crônicos da Hepatite C são os que merecem especial atenção, pois podem evoluir para um quadro hepático inflamatório característico do Hepatocarcinoma.

Os meios de tratamento constituem uma tentativa de impedir a multiplicação do vírus e apresentam uma eficácia de cerca de 50%, um percentual relativamente baixo, devido principalmente ao alto custo do tratamento que atualmente é disponibilizado no Brasil, pelo Sistema Único de Saúde.

A cirrose hepática, ao contrário das Hepatites B e C, não é causada por vírus e sim por um processo difuso de fibrose das células do fígado acompanhada da necrose hepatocelular, geralmente oriundo da Hepatite B, do excesso de medicamentos tóxicos ao fígado, da esteato-hepatite não alcoólica, entre outras causas raras. Infelizmente quase 30% dos casos, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) não apresentam causa definida.

A cirrose é a lesão precursora mais bem conhecida na carcinogênese hepatocelular. Pode ser compreendida como promotora das transformações neoplásicas, pois é responsável por induzir ciclos repetidos de proliferação de hepatócitos e a interação dessas células com leucócitos, fibroblastos e vasos [7].

Outro fator de risco no aparecimento do CHC está relacionado aos altos índices de contaminação com aflatoxina, que é uma toxina produzida por fungos. Ela está presente em diversos produtos alimentícios como milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, pistache, arroz, amêndoa, feijão, semente de algodão, coco, gengibre, etc. As principais pesquisas epidemiológicas demonstram elevada relação entre a exposição à aflatoxina, que causa a mutação no DNA do genoma do hepatócito, e o risco de tumores [7].

A queda do número de mortes devido ao Hepatocarcinoma tem sido observada em locais onde os maiores investimentos têm sido direcionados para a diminuição da aquisição dos fatores de risco, o melhor exemplo é a queda drástica na incidência de CHC em Taiwan após uma extensa campanha de vacinação contra o vírus da Hepatite B [9]. Sendo assim, a conduta ideal frente ao CHC é a prevenção primária da hepatite viral, prevenção ao abuso de álcool, e ainda evitar a formação de aflatoxinas através do correto manejo dos alimentos e seu correto armazenamento.

## 2.3 Características Biológicas do Hepatocarcinoma

O processo de carcinogênese envolve inúmeras e complexas etapas que podem ser afetadas positiva ou negativamente por diversos fatores ambientais. Essas etapas são classificadas em três categorias, comumente chamadas de estágios: Iniciação, Promoção e Progressão.

Na **Iniciação** ocorre a exposição a um carcinógeno que tem a capacidade de interagir com o DNA e provocar uma alteração ou uma mutação permanente. Esse evento é o desencadeador de todo o processo, consiste em uma alteração estrutural permanente no genoma das células somáticas (mutação transmitida às células filhas) que atinge genes fundamentais para a regulação e controle do crescimento celular [10].

Na fase da **Promoção**, não ocorrem mais alterações no material genético como na fase de iniciação, mas sim mudanças na expressão do genoma. Nessa fase atuam os agentes

chamados de promotores, que atuam no processo de transdução de sinais ambientais para o genoma alterado, interferindo assim com a subsequente expressão do mesmo [10].

A última fase, a da **Progressão**, caracteriza-se por apresentar múltiplas alterações genéticas, independência do processo proliferativo e a persistência do estímulo. Nessa etapa a célula se torna imobilizada e há um aumento progressivo da instabilidade genômica que pode ser percebido pelo aparecimento freqüente de aberrações cromossômicas [10].

Macroscopicamente, o CHC pode ser classificado em três tipos fundamentais [7].

- Nodular: nódulos solitários ou múltiplos bem demarcados;
- Maciço: padrão que envolve um lobo hepático inteiro, ou que atinge as proporções de um lobo. O tumor pode não demonstrar demarcação bem definida e acompanha-se de metástases intra-hepáticas pequenas;
- Difuso: numerosos pequenos focos circundados por tecido fibroso e espalhados por todo o fígado de difícil distinção com nódulos cirróticos.

Ainda, por ser o CHC um dos tumores morfológicamente mais heterogêneos, microscopicamente pode ser classificado em quatro padrões histológicos distintos [7].

- Grau 1: tumores bem diferenciados, com trabeculações delicadas que também podem ser entendidas como cílios, filamentos;
- Grau 2: estrutura trabecular básica mantida, com aparecimento de estruturas acinares ou glandulares, e eventualmente áreas papilares. Os núcleos apresentam um número maior de atipia (falta de regularidade demonstrada nas doenças que ocorrem periodicamente) que no grau 1;
- Grau 3: aumento de atipia nuclear, com presença de múltiplos nucleófilos, áreas com perda do arranjo trabecular e presença de células gigantes;
- Grau 4: padrão sólido ou medular de crescimento, as células não são coesas, mostrando formas bizarras e a situação mais freqüente é a que há dificuldade em firmar a linhagem hepatocelular da neoplasia.

Em fase tardia da evolução, é comum o CHC disseminar-se através da via hematogênica. Já a disseminação intra-hepática pode ocorrer precocemente através de ramos venosos portais. Sendo assim, o primeiro órgão mais comumente afetado é o pulmão, seguido em ordem decrescente de frequência pela adrenal, trato gastrointestinal, ossos, baços, coração e rins [7].

## 2.4 Diagnóstico de Carcinoma Hepatocelular

Devido ao aumento considerável de casos de câncer de fígado que têm sido relatados atualmente, inúmeros centros de pesquisa têm trabalhado incansavelmente na busca de técnicas mais precisas de caracterização dessa enfermidade, tentando diminuir os casos de erro e antecipando o diagnóstico para que o tratamento mais adequado seja rapidamente iniciado, pois essa enfermidade apresenta um tempo de evolução muito curto em alguns casos, sem apresentar sintomas indicativos da gravidade do quadro evolutivo. Segundo dados do INCA-2011 [1], esse tipo de tumor leva em média quatro meses para duplicar sua massa tumoral, sendo assim, o tempo de vida de um paciente diagnosticado com hepatocarcinoma é relativamente curto, tornando necessária a confirmação em fase inicial para que seja possível iniciar um tratamento adequado.

O primeiro passo na direção correta de se estabelecer um bom diagnóstico é o conhecimento dos fatores de risco, que segundo a WGO, são:

- Infecção crônica pelo vírus da Hepatite B ou C;
- Cirrose alcoólica;
- Esteato-hepatite não alcoólica;
- Diabete (a síndrome metabólica é o processo de risco mais provável);
- A cirrose por si mesma, de qualquer causa.

Vários são os métodos para diagnóstico do Hepatocarcinoma: exames sorológicos, ultrassonografia, tomografia, ressonância magnética, sendo que os mais utilizados e com maior eficiência são as técnicas de diagnóstico por imagens.

Sabe-se que por volta de 80% dos casos tem como origem a cirrose hepática, logo quando um paciente é diagnosticado com essa enfermidade, a Associação Européia para Estudo do Fígado (EASL) e Associação Americana Para Estudos das Doenças do Fígado (AASLD), que são referências mundiais em estudos das doenças hepáticas, indicam que se deve iniciar um monitoramento da evolução das lesões hepáticas através da técnica de ecografia abdominal ainda na fase inicial, muitas vezes assintomática, e que esse monitoramento deve ser feito periodicamente em intervalos de seis em seis meses [11].

No entanto, estabelecer um diagnóstico conclusivo de CHC apenas através da ultrassonografia, mesmo com os avanços alcançados atualmente (aumentou de 25 para 90% de exatidão nos últimos 10 anos), é tarefa desafiadora para o médico hepatologista, pois

existem diversas variáveis que podem dificultar e confundir o diagnóstico, como a localização do tumor, distúrbios da coagulação ou presença abundante de ascite [12].

Um diagnóstico de CHC só é conclusivo após uma série de exames confirmatórios que são solicitados geralmente aos pacientes que se encontram na classificação de risco, como os portadores das Hepatites B e C e os cirróticos.

No caso de indivíduos com cirrose já estabelecida, inicialmente é feita uma ecografia abdominal. Se for encontrado algum nódulo, avalia-se primeiramente seu tamanho, se o nódulo for menor que um centímetro, repete-se a ecografia em um período de 2 a 3 meses, e nesse caso as chances de se tratar de um nódulo do tipo maligno são bem pequenas [11]. Se o nódulo tiver um tamanho maior do que um e menor do que dois centímetros, são realizadas duas técnicas de imagem dinâmica como, por exemplo, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Se for detectado um padrão de vascularização específico de CHC nas duas técnicas utilizadas, conclui-se diretamente que se trata de um hepatocarcinoma, porém se é encontrado um padrão de vascularização atípico em uma ou nas duas técnicas de imagem, é realizada uma biópsia no nódulo e, caso seu resultado seja negativo, indica-se repetir o teste [11].

Se o nódulo é maior que dois centímetros, uma única técnica de imagem é suficiente para determinar um padrão vascular atípico ou específico. No caso de atípico, é realizada a biópsia, porém se o padrão vascular for específico já é possível concluir que se trata de um caso de carcinoma hepatocelular [11].

Em indivíduos que não apresentam um caso típico de cirrose, os critérios de diagnóstico por imagem não são válidos e nesses casos é indicado realizar uma biópsia para resultados mais conclusivos.

### **2.4.1 Alfa-1 Fetoproteína**

O exame sorológico para determinação dos valores de alfa-1 fetoproteína tem sido muito utilizado nos dias de hoje como uma forma de diagnóstico precoce dos casos da doença porque essa proteína é produzida em grande quantidade em várias situações clínicas, inclusive em casos de lesão hepática. Deve ser associada a outras técnicas, pois possui uma baixa especificidade e sensibilidade em tumores menores que 5 cm.

### **2.4.2 Ultrassonografia (US)**

A ultrassonografia é o principal exame utilizado para diagnóstico de CHC em pacientes portadores de cirrose hepática ainda em fase assintomática.

Apesar de ser uma técnica diagnóstica bastante conclusiva, a AASLD e a EASL recomendam que em casos de tumores menores que dois centímetros deve ser utilizada em conjunto com outras técnicas por imagens e também se deve fazer uma biópsia do material lesionado para evitar o risco de um falso positivo [12]. Isso se deve ao fato dos nódulos menores de dois centímetros terem uma característica hipoecogênica, ou seja, são estruturas anatómicas quase fluidas que refletem mal o ultrassom, e por isso podem ser facilmente confundidos com cistos.

### **2.4.3 Tomografia Computadorizada (TC)**

A tomografia computadorizada é uma técnica complementar no diagnóstico de CHC, pois é utilizada em conjunto com a Ultrassonografia, ou quando há um aumento progressivo na taxa de  $\alpha$  1- fetoproteína. Representa uma secção ou fatia do corpo, que é obtida após o bombardeamento do local com raios X.

Os parâmetros avaliados na tomografia computadorizada são: tamanho do tumor, localização, densidade, presença de cápsulas peri-tumoral, permeabilidade portal, metástases regionais ou em locais distantes do tumor. A TC não deve ser aplicada constantemente devido ao fato dos raios X serem radiações ionizantes que podem causar mutações genéticas nas células por onde passa o feixe.

#### **2.4.4 Ressonância Magnética Nuclear**

A ressonância magnética nuclear (RMN) é indicada principalmente para determinar o estágio tumoral da doença e é utilizada também quando o resultado da tomografia não é conclusivo.

Os parâmetros que são avaliados na ressonância são tamanho, número, localização, intensidade de sinal do nódulo, degeneração gordurosa intratumoral e cápsula peritumoral, permeabilidade da veia porta e presença de metástase [12].

### **2.5 Abordagem clínica do CHC**

Apesar de algumas pessoas doentes não apresentarem sintomas característicos do CHC, dentre os apresentados em maior frequência, em todos os estágios da doença, podemos citar icterícia, ascite e/ou edema, sensação de distensão e peso na barriga, emagrecimento, dor no quadrante superior direito, encefalopatia hepática, febre e redução da massa muscular, que é comumente apresentada por pacientes cancerosos. Depois de confirmado o diagnóstico, é iniciada uma série de exames laboratoriais para classificar em que fase da doença o paciente está. Este processo é chamado de estadiamento.

O sistema de estadiamento é utilizado atualmente para definir prognósticos e opções de tratamento. Inúmeras opções já foram propostas pelas associações para estudos das doenças hepáticas, sendo que o método indicado pela AASLD é o da BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) que pode ser usado como guia para a escolha do tipo de tratamento e para obter a expectativa de sobrevivência dos pacientes com CHC, sendo que os outros sistemas de estadiamento conhecidos são úteis apenas para traçar uma taxa de sobrevivência em cada estágio [13].

De acordo com o sistema de estadiamento proposto pela BCLC, os pacientes portadores de HCC podem ser classificados segundo cinco estágios diferentes da doença, que são: estágio muito inicial, estágio inicial, estágio intermediário, estágio avançado e estágio terminal.

### **2.5.1 Estágio muito inicial e inicial**

Em um estágio muito inicial, são encontrados tumores individuais, geralmente de tamanhos inferiores a 2 cm. As concentrações de bilirrubina são normais e não há registro de hipertensão portal.

Podem ser classificados como um estágio inicial, tumores individuais geralmente de tamanho menor ou igual a 5 cm ou até três tumores de tamanhos inferiores ou iguais a 3 cm cada um [14]. São registradas concentrações anormais de bilirrubina e há registro de hipertensão portal. Nessa fase, são empregados tratamentos curativos como a ressecção do tumor, a ablação do nódulo ou o transplante hepático. Os métodos ablativos, radiofrequência e alcoolização percutânea, são realizados com maior frequência e são indicados quando não é possível fazer a ressecção ou o transplante [15].

### **2.5.2 Estágio Intermediário**

São classificados em estágio intermediário os pacientes que apresentam doença multinodular assintomática, restrita ao fígado e sem invasão vascular ou disseminação. Possuem função hepática e estado geral conservados, geralmente apresentam mais de 3 tumores ou lesões maiores que 3 cm [14]. Para esse estágio, segundo os critérios da BCLC, a forma de tratamento indicada é a quimioembolização [16].

### **2.5.3 Estágio Avançado**

São classificados nesse estágio os pacientes que apresentam invasão vascular ou espalhamento extra-hepático [14]. Nesse estágio, o padrão de estadiamento segundo a BCLC indica como forma de tratamento a utilização do medicamento Sorafenibe.

O Sorafenibe ou tosilato de sorafenibe é uma droga do grupo das inibidoras de quinase. Sua função é inibir o crescimento de células cancerosas no fígado e diminuir a quantidade de vasos sanguíneos no tumor [17]

#### **2.5.4 Estágio Terminal**

São pacientes que possuem muitos tumores de origem hepática espalhados por todo organismo, conseqüentemente com função hepática muito comprometida [14]. Nesse estágio da doença são empregados métodos paliativos, apenas como medidas de suporte, ou seja, sem melhora da sobrevida.

### **2.6 Embolização Arterial de Carcinoma Hepatocelular**

A embolização arterial é uma técnica empregada no tratamento de diversos tipos de câncer, sobretudo do carcinoma hepatocelular. Consiste na interrupção da irrigação do tumor através da obstrução da artéria ou veia que leva o sangue até ele. Esse procedimento é realizado através da introdução de determinados tipos de produtos médicos apropriados.

Sendo assim, seu objetivo é entupir a artéria para que não seja mais levado sangue até o tumor, causando assim uma diminuição de seu tamanho, e em alguns casos a sua morte por desnutrição.

A constatação da diminuição das dimensões do tumor pode ser feita através das técnicas de análises por imagem disponíveis e é possível também monitorar a diminuição progressiva do seu tamanho através da diminuição da concentração dos níveis de alfa-1 fetoproteína [18].

### 2.6.1 Quimioembolização Transarterial (QETA)

A quimioembolização transarterial é um processo alternativo ao da embolização. Ela causa o envenenamento do tumor através da injeção de medicamentos quimioterápicos dentro da artéria que irriga o tumor, seguida de seu fechamento.

A QETA é uma técnica intervencionista desenvolvida no Japão, consistindo na combinação de infusão intra-arterial (seletiva ou altamente seletiva) de agentes quimioterápicos com materiais embólicos. Essa infusão é feita diretamente no local onde se encontra o nódulo através de micro cateteres que são inseridos, geralmente através da punção da artéria femoral direita ou esquerda (técnica de Soldinger), diferentemente da quimioterapia convencional, na qual a medicação é adicionada no sistema sanguíneo do paciente e nem sempre consegue atingir o tumor com eficiência [19].

Segundo critérios da BCLC a QETA é aplicada em pacientes em estágio intermediário ou estágio B, definidos como pacientes com doença multinodular assintomática, restrita ao fígado e sem invasão vascular [16]

A quimioembolização está indicada inicialmente como tratamento paliativo nos pacientes que não são candidatos a tratamentos curativos como ressecção cirúrgica, transplante ou ablação percutânea, tais como aqueles que apresentam tumores maiores que 5 cm ou em número maior que 3 cm [16].

Nesses casos o procedimento de quimioembolização surge como uma alternativa para diminuir as dimensões dos tumores para que os pacientes enquadrem-se na possibilidade de ressecção cirúrgica, segundo os “Critérios de Milão”, ou para aumentar a sobrevida de pacientes que estão na fila do transplante para que tenham chance de esperar por mais tempo.

É fato conhecido que, devido ao número de doadores de órgãos ser consideravelmente insuficiente, o tempo de espera do receptor tem sido maior que o tempo de evolução natural da doença [19]. Sendo assim, a associação de um método terapêutico visando a desacelerar a evolução do hepatocarcinoma, permitindo a manutenção das condições necessárias ao transplante é uma alternativa viável. Com este propósito, o uso pré-transplante da quimioembolização com um esquema terapêutico adequadamente escolhido apresenta poucas complicações e contra indicações e é de considerável eficácia antitumoral [19].

## **2.6.2 QETA combinado com outros tratamentos intervencionistas**

A Oncologia intervencionista é um ramo da medicina que se apresenta, atualmente, em crescente desenvolvimento, prometendo se tornar um importante componente de práticas oncológicas nos próximos anos.

A utilização de transcateteres minimamente invasivos tem sido aplicada em diversos tipos de câncer, dentre eles o hepatocarcinoma, como uma forma de conter o avanço de tumores e para aumentar a taxa de sobrevivência para que os pacientes possam permanecer à espera do transplante.

Portanto, a utilização da quimioembolização guiada por um monitoramento por imagens como a ultrassonografia e a tomografia computadorizada, está associada à utilização de outras técnicas intervencionistas como a ressecção cirúrgica e o transplante do órgão como uma etapa pré-operatória ou pré-transplante (terapia adjuvante) e não como uma técnica propriamente curativa.

### **2.6.2.1 Vantagens e Desvantagens da QETA**

No caso específico do hepatocarcinoma, sua principal fonte de nutrição é a artéria hepática, diferentemente dos outros tipos de tumores que se nutrem da veia porta (responsável por 70% da irrigação de sangue do fígado). Por isso a quimioembolização pode ser empregada sem prejuízo do restante do órgão.

Outra vantagem da utilização da quimioembolização é a possibilidade de se ter uma elevada concentração do quimioterápico diretamente sobre o tumor, ocasionando uma maior eficiência no tratamento e também há a redução dos efeitos colaterais sofridos, pois se tem uma menor concentração da droga circulando na corrente sanguínea.

As desvantagens da utilização dessa técnica, segundo levantamento bibliográfico variado, são os elevados custos das várias seções que devem ser realizadas periodicamente e a impossibilidade de se aplicar a técnica em pacientes com cirrose avançada e naqueles que apresentam comprometimento da veia porta [19].

## CAPÍTULO 3: Projeto Racional de Novos Materiais para Quimioembolização

### 3.1 Sistema de Entrega de fármacos Multiestágios

Quando um determinado fármaco é administrado a um organismo através da corrente sanguínea, apenas uma pequena fração atinge o local onde deve agir, pois uma grande parte dele não chega ao tecido alvo uma vez que é distribuído para outros tecidos. Outra parte sofre processos de metabolização e excreção antes de atingir seu alvo, processos esses que são naturais ao organismo biológico. Para evitar que isso ocorra, a indústria farmacêutica tem investido no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos mais eficientes. Esses sistemas têm como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da sua administração seja maximizado e os efeitos adversos minimizados [20]. A eficiência desses sistemas implica na perfeita associação química ou física do fármaco com materiais biocompatíveis que serão responsáveis pelo controle de sua taxa de liberação no organismo e também servirão de transportadores, carregadores de fármacos até o local onde o princípio ativo deve agir.

Os primeiros estudos realizados com o objetivo de desenvolver sistemas transportadores de fármacos tiveram como base o encapsulamento de moléculas, proposto por Paul Ehrlich no início do século XX, modelo que ficou conhecido como “Bala Mágica de Ehrlich” [21]. Desde então, diversos tipos de materiais tem sido estudados e desenvolvidos com este objetivo, materiais lipídicos como os lipossomas, emulsões diversas, micro e nano géis, micro e nano partículas biodegradáveis além das nanocápsulas. Destes, certamente os materiais poliméricos são os mais investigados [21-22]

### 3.2 O Biopolímero Quitosana: Obtenção e Propriedades Físico-Químicas

O crescente uso de polímeros naturais tem sido de grande importância para os avanços das ciências da saúde e suas aplicações apresentam inúmeras vantagens que dentre elas podem-se destacar principalmente a sua fácil obtenção, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os polissacarídeos são bons exemplos dessas macromoléculas naturais e são geralmente derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos, a exemplo da quitina e quitosana.

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidas por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em atividades industriais e tecnológicas há quase setenta anos [23-24]. Suas estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), entretanto os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade [23-24]. A Figura 1 ilustra as estruturas químicas dos biopolímeros quitina e quitosana.

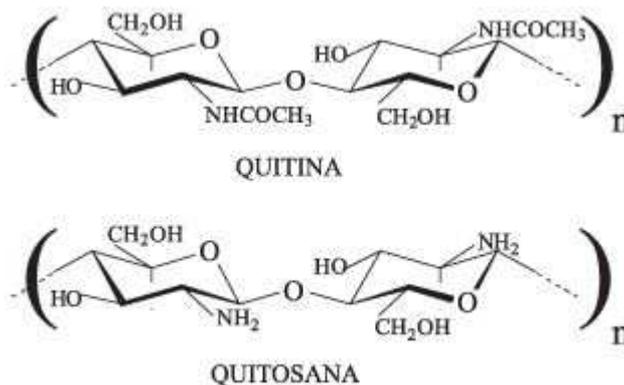


FIGURA 1: Representação das moléculas de quitina e quitosana. Adaptado de [24].

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear, catiônico, geralmente obtido pela desacetilação parcial da quitina, conforme ilustrado no fluxograma apresentado na Figura 2, sendo comercialmente conhecido como seu derivado N-desacetilado. A quitina é um

polissacarídeo abundantemente encontrado na natureza e que constitui o exoesqueleto de insetos, crustáceos, lagostas, camarões, caranguejos e siris [23].

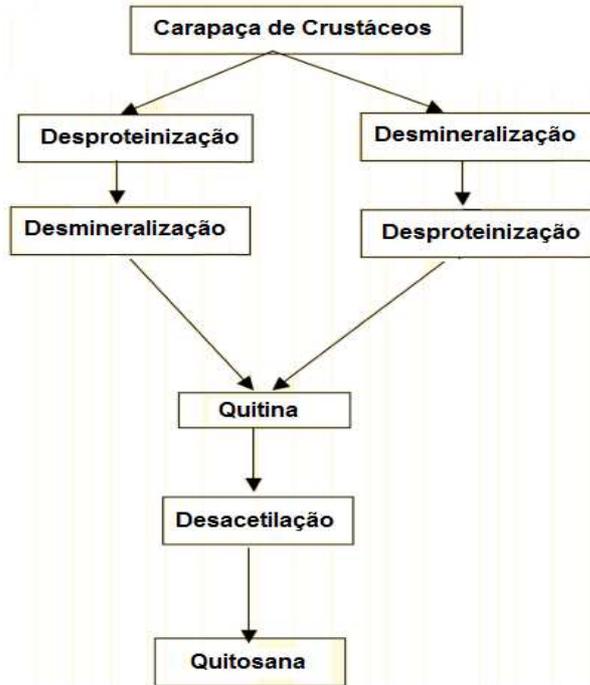


FIGURA 2: Fluxograma de obtenção da quitosana a partir da quitina. Adaptado de [26].

A quitosana é um polímero insolúvel em soluções aquosas com pH superior a sete, porém torna-se potencialmente solúvel em algumas soluções ácidas porque seus grupos amino livres são protonados [25]. Como sua solubilidade está diretamente relacionada com a quantidade de grupos ( $-\text{NH}_3^+$ ), quanto maior a sua quantidade, maior também será a proporção de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e maior será a sua solvatação em água [25].

### **3.2.1 Aplicações Biomédicas da Quitosana**

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas na área de biomedicina relacionadas às diversas possibilidades de aplicação do polímero quitosana. O grande interesse desse ramo de estudos se deve às características peculiares da quitosana, tais como sensibilidade às mudanças de pH, biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade além da capacidade de ser hidrolisada por algumas enzimas humanas, como as lisozimas [26].

Alguns trabalhos científicos têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar a formação de hidrogéis de quitosana por complexação eletrolítica para utilização como sistemas de entrega de drogas, culturas de células, imobilização de enzimas e até mesmo como agente cicatrizante, devido principalmente à sua alta hidratação e alta densidade de cargas elétricas, o que permite uma maior difusão de água ou até mesmo das moléculas de fármacos [27-28]

Outro interessante trabalho relata a utilização da quitosana para o recobrimento do núcleo magnético de nanopartículas de ferrita de manganês dopadas com Gadolínio. Esse revestimento das partículas com filmes de quitosana tem o objetivo de proteger o núcleo das partículas e melhorar a sua funcionalidade [29]. O estudo demonstrou que as partículas que foram recobertas com quitosana tiveram suas propriedades magnéticas melhoradas graças às excelentes propriedades do filme de quitosana. Essas partículas podem então ser guiadas por um campo magnético externo até um sítio específico onde será feita a entrega dos fármacos utilizados como agentes quimioterápicos. Portanto, é mais um bom exemplo da utilização da quitosana em partículas carreadoras de fármacos que pode ser utilizada para funções biomédicas [29].

### **3.2.2 Micropartículas de Quitosana para o Tratamento do CHC**

As micropartículas de quitosana têm encontrado várias possibilidades de aplicação em diversos ramos da engenharia sendo que a Engenharia de Materiais aliada aos conhecimentos de biomedicina, biotecnologia e bioquímica, tem proporcionado a obtenção de novos derivados desse biopolímero com notáveis propriedades físico-químicas e biológicas para diversas aplicações tecnológicas na área da saúde. Sob essa vertente, vários trabalhos buscam

desenvolver alternativas viáveis tanto do lado econômico como do lado prático, para o tratamento das diversas enfermidades que acometem a população mundial, principalmente o câncer.

### **3.3 Micropartículas e Nanopartículas de Quitosana como Sistemas Transportadores de Fármacos**

A quitosana tem sido amplamente estudada e explorada desde sua descoberta no século XIX devido às suas excelentes características biofarmacêuticas tais como biocompatibilidade, sensibilidade à alteração de pH, biodegradabilidade e baixa toxicidade, sendo por isso amplamente utilizada em conjunto com fármacos específicos em sistemas de carreamento.

Laranjeira et.al. (2009) publicaram um artigo na revista Química Nova no qual faz uma extensa abordagem das várias formas de utilização da quitosana interagindo com diversos fármacos diferentes [30]. Dentre essas formas, microesferas de quitosana foram utilizadas para encapsular indometacina para tratamento de artrite e nifedipina para utilização como antidepressivo. Em estudos relacionados ao tratamento de câncer, segundo o mesmo autor, N-lauril carboximetil quitosana tem sido utilizada para liberação de taxol em diversos tipos de células cancerosas [30]. Em estudo semelhante, esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído ou epícloridrina foram utilizadas para liberação de diclofenaco de sódio, um conhecido antiinflamatório utilizado em diversas aplicações. Esse estudo demonstrou que a liberação de fármacos a partir de matrizes de quitosana é afetada por alterações de pH [30].

Laranjeira et.al. (2009) também observaram por meio de levantamento bibliográfico que a quitosana pode ser utilizada na forma de microesferas, lipossomas, géis e sais (lactato, aspartato, glutamato e cloridrato) e ainda bioadesivos para liberação controlada do fármaco cloridrato de vincomicina. Sua propriedade bioadesiva também foi explorada para o tratamento de câncer de cólon e *diabetes mellitus* para liberação sustentada de 5-fluorouracil e insulina respectivamente [30].

As diversas propriedades aliadas a não toxicidade da quitosana tem proporcionado a sua utilização junto com fármacos de diversas especificidades para aplicações biomédicas em inúmeras patologias, o que tem despertado um crescente interesse acadêmico sobre esse biopolímero

### 3.4 Utilização de Lactato de Quitosana na Fabricação de Microesferas

De modo geral, a literatura considera o biopolímero quitosana como biocompatível, sendo essa propriedade dependente da massa molecular, grau de desacetilação e também do método de preparação [31-33]. Entretanto, estudos recentes demonstram que, similarmente a outros polímeros catiônicos, a quitosana apresenta significativa citotoxicidade dependente da concentração do biopolímero [34-35].

Por esse motivo, vários derivados de quitosana têm sido pesquisados quanto à sua citotoxicidade, observando-se que o lactato de quitosana apresenta propriedades não citotóxicas bem superiores a seus derivados [36]. Nesse caso, a redução na citotoxicidade parece ser devido a uma redução da interação das cargas positivas do biopolímero com as membranas celulares carregadas negativamente, que leva ao vazamento de proteínas e outros constituintes celulares [37].

Como já foi dito, a quitosana é um polímero insolúvel em solução aquosa com pHs próximos ou superiores a sete, porém em soluções ácidas, os grupamentos amina livres estão protonados, o que lhes confere solubilidade em intervalos de pHs inferiores a 4,5 - 5,0 [30]. O lactato de quitosana (Figura 3) por sua vez, apresenta solubilidade próxima ao pH fisiológico (pH=7,0) o que melhora significativamente as suas aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. O lactato de quitosana tem sido utilizado em várias aplicações biomédicas, destacando-se os curativos para feridas e membranas para a odontologia [30-38].

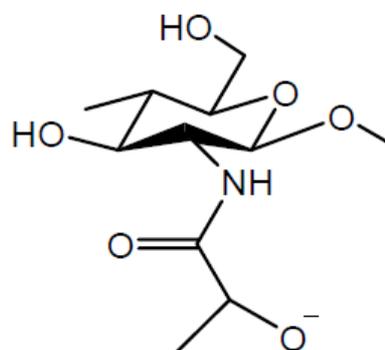


FIGURA 3: Representação da molécula de lactato de quitosana.

## CAPÍTULO 4: Técnicas de Fabricação e Caracterização de micropartículas de Quitosana

### 4.1 Técnicas Tradicionais

Micropartícula é o termo utilizado para se referir às partículas sólidas com dimensões da ordem de 1 a 500  $\mu\text{m}$ . Podem ser constituídas por matrizes poliméricas de materiais biodegradáveis e biocompatíveis e podem ser utilizadas em diversas aplicações de engenharia, dentre elas, em sistemas de liberação controlada de fármacos para aplicações biomédicas [39-40].

Em geral, são divididas em dois tipos de estruturas, as microesferas que são matrizes poliméricas onde o fármaco pode ser absorvido, incorporado ou ligado covalentemente à estrutura tridimensional formada pelo polímero. Ou pode ser sintetizado como uma microcápsula onde o fármaco pode estar na forma sólida, líquida ou gasosa, encapsulado por um filme polimérico, constituindo uma estrutura semelhante a um reservatório [39-40].

Diversos métodos são descritos na literatura para obtenção das micropartículas e a escolha do método deve ser com base nas propriedades de hidrofília-lipofília do composto químico em questão. Deve-se também colocar em questão características como simplicidade, rapidez, reprodutibilidade, baixo custo, facilidade em transpor para escala industrial e baixa dependência da solubilidade do fármaco na escolha do método que será empregado [39].

Dentre as técnicas usualmente utilizadas, a mais tradicional é o método de secagem por atomização (*spray drying*), devido principalmente à sua eficiência. É amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e química em geral [40].

A técnica consiste basicamente em dissolver ou emulsionar um polímero juntamente com um determinado fármaco, ocorrendo um processo de atomização, e em seguida são geradas gotículas que são rapidamente secas através de sua passagem por uma câmara de secagem, a uma temperatura superior ao ponto de ebulição do solvente utilizado, promovendo a sua rápida evaporação e conseqüente formação das micropartículas. Esse processo de atomização seguido de secagem rápida promove a formação de partículas esféricas de tamanhos uniformes, que são características apreciáveis em sistemas de liberação de fármacos [39-40].

## 4.2 Controle da distribuição de tamanhos de partículas

O controle da distribuição de tamanhos das micropartículas é uma importante ferramenta que permite aumentar a eficiência dos sistemas de liberação de fármacos, pois interfere na sua velocidade de liberação. Existem atualmente diversos métodos para controle do tamanho, sendo que a escolha do método deve ser feita com base nas propriedades das partículas e no tipo de informação que se procura sobre a sua distribuição [41]. A difração a laser é a técnica mais utilizada atualmente para esse controle, e as principais vantagens dessa técnica são [42]:

- Compreende uma ampla faixa de tamanhos desde microns até milímetros;
- Medições rápidas;
- Reprodutividade e repetibilidade dos resultados;
- Possibilidade de realizar várias medições ao mesmo tempo e
- Calibração desnecessária.

A estimativa da distribuição dos tamanhos de partículas é feita com base na medida da variação angular da intensidade da luz difundida através da amostra, proveniente de um feixe de laser. Partículas pequenas dispersam o feixe formando um ângulo maior e partículas grandes dispersam o feixe formando um ângulo pequeno [42]. Os dados da intensidade de espalhamento angular são utilizados para calcular o tamanho das partículas responsáveis por criar o padrão de dispersão através da Teoria da difusão da luz de Mie [42].

## 4.3 Técnicas Físico-Químicas de Caracterização de Micropartículas

Após a obtenção das micropartículas, é iniciado um processo de caracterização do material obtido. As técnicas de caracterização se dividem em caracterização bioquímica e caracterização físico-química. Levando em consideração o escopo desse trabalho, serão abordados apenas os fundamentos das técnicas utilizadas em nossos laboratórios para a caracterização do material aqui obtido. Quanto à caracterização físico-química, foi realizada

nesse trabalho a caracterização das microesferas de lactato de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TG), Difractometria de raios X (DRX) e potencial zeta (PZ). As técnicas bioquímicas utilizadas nesse trabalho foram a citotoxicidade e hemocompatibilidade.

### **4.3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)**

As técnicas de análise que utilizam a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria para se obter características físicas e químicas do material a ser analisado, são chamadas de espectroscópicas e podem ser divididas em espectroscopia de emissão e de absorção. Na espectroscopia de emissão, os átomos do material estudado são energizados por uma fonte térmica ou eletrônica e seus elétrons saltam para um nível energético superior, quando a fonte de energia é cessada os átomos voltam ao seu estado fundamental e durante esse processo emitem, na forma de ondas eletromagnéticas, a energia que haviam absorvido. Essa energia emitida é quantificada e utilizada para a análise do material.

Na espectroscopia de absorção, a amostra é posicionada entre o detector e uma fonte que emite a radiação eletromagnética com o comprimento de onda desejado. A análise é feita comparando-se a radiação transmitida ou refletida pela amostra com a radiação da fonte.

A escolha da técnica espectroscópica depende da análise de alguns parâmetros como exatidão necessária, quantidade de amostra disponível, faixa de concentração da amostra, componentes da amostra que podem causar interferência, propriedades físicas e químicas da matriz da amostra e da resposta que se pretende obter. Em se tratando de compostos orgânicos, a espectroscopia de absorção da radiação no infravermelho é a mais indicada, pois existe uma vasta gama de compostos que já apresentam suas bandas de absorção catalogadas em diversas literaturas.

A espectroscopia de absorção no infravermelho baseia-se nos efeitos que a absorção da radiação infravermelha provoca no aumento das amplitudes das vibrações entre as ligações químicas, que correspondem a níveis de energia das moléculas. Portanto, pode ser racionalizado que os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho se originam

de numerosas variações de energia produzidas pela migração das moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro e essa migração ocorre devido ao aumento das vibrações moleculares. As vibrações moleculares podem ocorrer nas formas de estiramento, variação da distância interatômica ao longo do eixo de ligação entre os átomos, e deformação, que são caracterizadas por uma variação no ângulo entre duas ligações que podem ainda ser classificadas em quatro tipos: deformação simétrica no plano (scissoring), deformação assimétrica no plano (rocking), deformação simétrica fora do plano (wagging) e deformação assimétrica fora do plano (twisting) [43]. A Figura 4 ilustra esses tipos de vibrações, que são possíveis em qualquer molécula contendo mais de dois átomos.

A intensidade dessas vibrações em frequências diferentes produz o espectro de absorção que representa as diferentes bandas características dos grupos funcionais que compõem a molécula, tornando possível assim a sua identificação por comparação com padrões repetitivos. A frequência ou comprimento de onda da absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes das forças entre as ligações e da geometria dos átomos [44]

Três tipos de instrumentos para medidas de absorção no infravermelho (IR) estão freqüentemente disponíveis: (1) espectrofotômetros dispersivos, que empregam monocromador baseado em redes de difração, (2) espectrofotômetros com Transformada de Fourier (FTIR) que empregam um interferômetro e (3) espectrofotômetros não dispersivos, que empregam um filtro ou um gás absorvente, que são utilizados para análises de gases atmosféricos em comprimentos de ondas específicos [43].

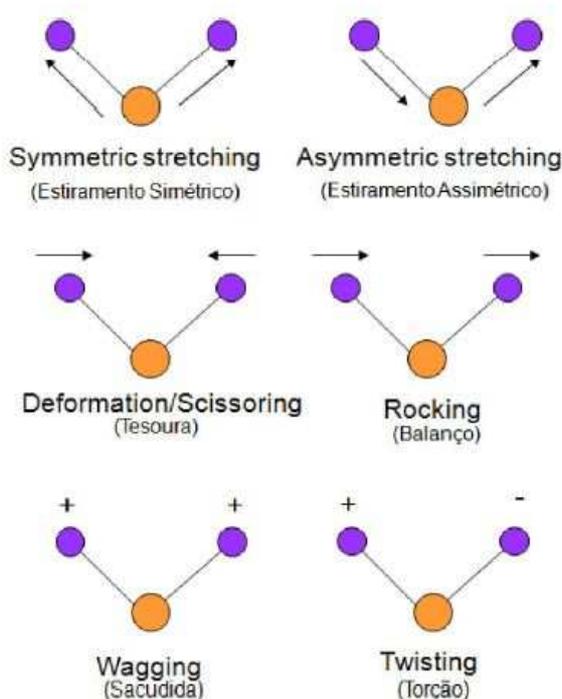


FIGURA 4: Tipos de vibração molecular. Adaptado de [46]

A espectroscopia com transformada de Fourier foi inicialmente desenvolvida por astrônomos, no início dos anos 1950, para estudar o espectro infravermelho de estrelas distantes, somente por meio da técnica de Fourier os sinais muito pouco intensos dessas fontes poderiam ser isolados do ruído ambiental [43].

Atualmente, a identificação dos componentes de uma matéria por este processo tem sido uma das técnicas mais utilizadas por ser um procedimento rápido e com alto índice de eficácia. Nessa análise, uma radiação infravermelha com todos os comprimentos de onda da faixa utilizada é passada pela amostra após ser guiada por um interferômetro do tipo *Michelson*. O sinal produzido gera um interferograma no qual é aplicada a transformada de Fourier, resultando assim em um espectro idêntico ao produzido pela espectroscopia dispersiva convencional, sendo importante ressaltar que essa técnica difere da espectroscopia convencional pelo fato de que todos os elementos de resolução para um espectro são medidos simultaneamente, reduzindo assim, enormemente o tempo necessário para se obter um espectro característico da amostra [45].

Como as demais técnicas de caracterização, a FTIR também apresenta vantagens e desvantagens que devem ser analisadas previamente. Segundo Holler, dentre as principais vantagens podemos destacar primeiramente o aproveitamento da energia radiante, ou *Vantagem de Jaquinot*, a qual é obtida porque os instrumentos com transformada de Fourier possuem poucos elementos ópticos e não possuem fendas que atenuem a radiação. Outra importante vantagem desse método é o seu alto poder de resolução e reprodutividade do comprimento de onda, permitindo análise de espectros complexos, e ainda podemos destacar a vantagem de que todos os elementos da fonte atingem o detector simultaneamente possibilitando a obtenção de dados do espectro em 1 segundo ou menos.

Neste tipo de instrumento, os requisitos para obtenção de interferogramas satisfatórios e, portanto, espectros satisfatórios são a velocidade constante do espelho móvel e o conhecimento exato de sua posição em qualquer instante. A planaridade do espelho também tem que permanecer constante durante todo o seu percurso de 10 cm ou mais [43]. Essa técnica também é conhecida como espectroscopia vibracional, pois se baseia no conceito de que todas as moléculas apresentam certa vibração, não são exatamente estáticas.

A frequência das vibrações pode ser calculada de acordo com a Equação 1 [46]:

$$\nu \approx \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

Sendo:  $\nu$  = frequência vibracional,  $k$  é uma constante característica de cada ligação química e  $\mu$  é a massa ponderada, que pode ser calculada através da Equação 2.

$$\mu = \frac{m_1 * m_2 * \dots * m_n}{m_1 + m_2 + \dots + m_n} \quad (2)$$

Sendo que  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_n$  são as massas dos  $n$  átomos que compõem a molécula [46].

É importante observar que a frequência de vibração aumenta com o aumento da constante  $k$  (relacionada à força de ligação química) e com a diminuição das massas dos átomos que compõe o sistema.

A espectroscopia FTIR é uma técnica não destrutiva que permite a análise microestrutural de polímeros e apresenta a versatilidade necessária para ser adequada a uma rotina padronizada em uma linha de produção industrial, permitindo assim o controle de qualidade e monitoramento dos processos industriais. Atualmente com os modernos espectrômetros de reflectância total atenuada (ATR) o método de análise de polímeros orgânicos por FTIR é adequado para uso em linha de produção uma vez que exige preparo mínimo da amostra, é rápido (menos de um minuto na leitura por amostra) e pode ser aplicado para caracterizar qualquer polímero orgânico.

### 4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização microestrutural de materiais orgânicos ou inorgânicos cujo princípio de funcionamento se concentra na interação de um feixe de elétrons com a superfície de um material. A interação gera uma série de sinais que podem ser utilizados para a caracterização das propriedades da amostra tais como composição, superfície topográfica, cristalografia, entre outras [47].

De modo geral, o MEV é composto por uma coluna de alto vácuo, onde os elétrons são gerados por efeito termiônico através de uma lâmpada de tungstênio. Esses elétrons são acelerados por uma diferença de potencial de 0,3 kV a 30 kV que é gerada ente o catodo e o anodo. A Figura 5 ilustra o esquema básico de um MEV.

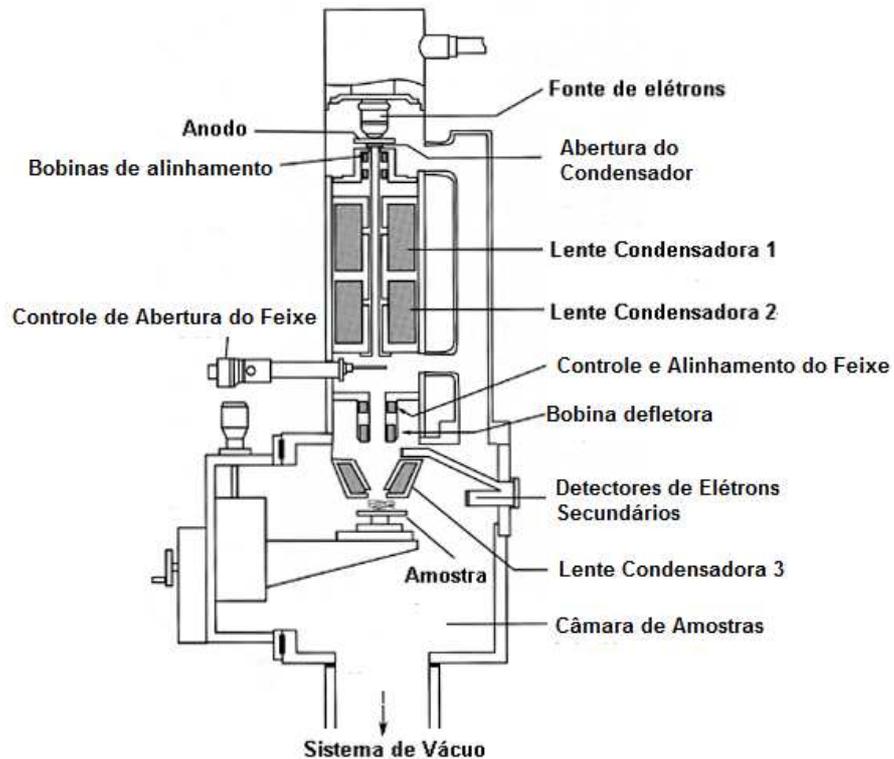


FIGURA 5: Esquema geral do MEV

Fonte: Adaptado de <http://cmrf.research.uiowa.edu/scanning-electron-microscopy>. Acessado em 06/09/2013

Um material torna-se visível ao microscópio óptico como um resultado de sua interação com a radiação eletromagnética na região do visível (400-700 nm) utilizada para iluminá-lo. Dessa forma, a imagem surge como resultado dos desvios das ondas eletromagnéticas quando estas passam pelo objeto. Assim, quanto menor o comprimento de onda da luz, melhor será o poder de resolução do microscópio.

O intervalo de comprimentos de onda da luz visível limita a quantidade de detalhes que pode ser resolvida por um microscópio óptico, conforme pode ser observado na Figura 6.

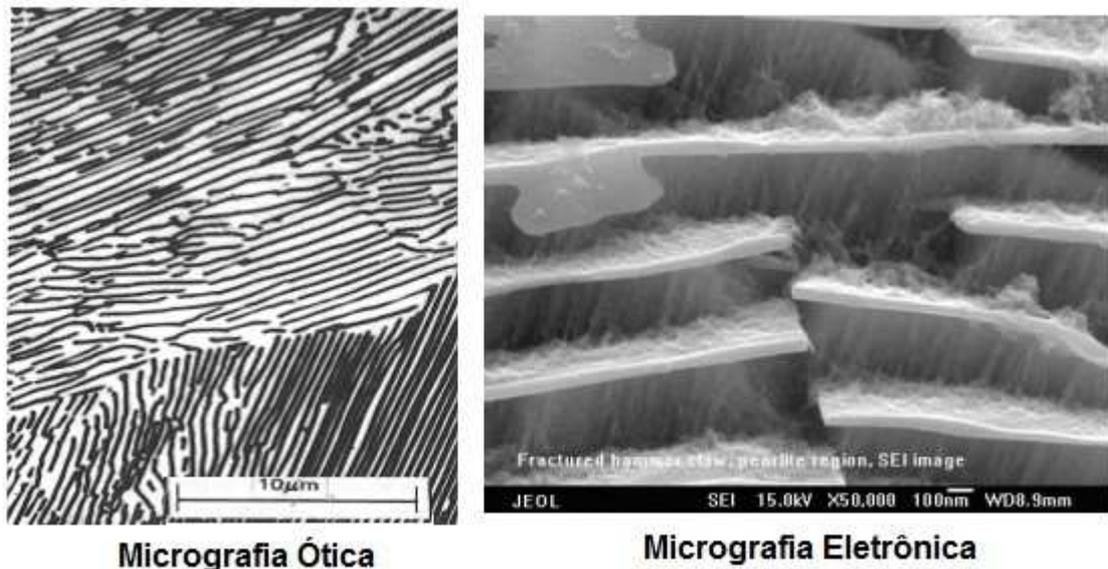


FIGURA 6: Poder de resolução do microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Direita) comparativamente ao microscópio óptico (Esquerda). As amostras correspondem à caracterização de lamelas de perlita do aço carbono. Fonte: Adaptado de [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-PGMat/MEV\\_Apresentacao.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-PGMat/MEV_Apresentacao.pdf). Acessado em 06/09/2013

A análise de materiais em um microscópio eletrônico de varredura exige que a amostra apresente algumas características que possibilitem a observação da estrutura desejada. Nesse caso, se a amostra não for eletricamente condutora o acúmulo de cargas elétricas em sua superfície dificulta ou mesmo impossibilita a obtenção de imagens de elétrons secundários. Para contornar este efeito, existe a possibilidade de fazer um recobrimento metálico (geralmente ouro) ou de carbono para tornar a superfície condutora. Também é possível trabalhar em modo baixo vácuo, de maneira que moléculas de água ionizadas possam anular a carga sobre a superfície da amostra. Caso a amostra receba recobrimento condutor é necessário que sua superfície seja conectada ao porta-amostra com fitas de carbono, cobre ou cola de prata.

Amostras em forma de pó ou microesferas podem ser depositadas sobre o suporte do MEV através de solução e posteriormente deve-se deixá-la secar completamente antes de colocar no microscópio. Alternativamente também é possível depositar pequena quantidade do pó ou microesfera sobre uma fita de carbono, tomando-se o cuidado de remover todo o excesso (com ar comprimido) antes de colocá-lo no microscópio. Nesse trabalho, as microesferas de lactato de quitosana foram depositadas sobre uma fita de carbono seguida da deposição de ouro.

### 4.3.3 Análise Térmica

A confederação internacional de análise térmica e calorimetria (ICTAC) define a análise térmica como um conjunto de técnicas analíticas nas quais uma propriedade da amostra é monitorada em função da temperatura ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma variação programada de temperatura em uma atmosfera específica (inerte ou reativa) [48]. A Figura 7 resume as várias técnicas da análise térmica utilizada na caracterização de materiais, poliméricos, cerâmicas, metais e compósitos.

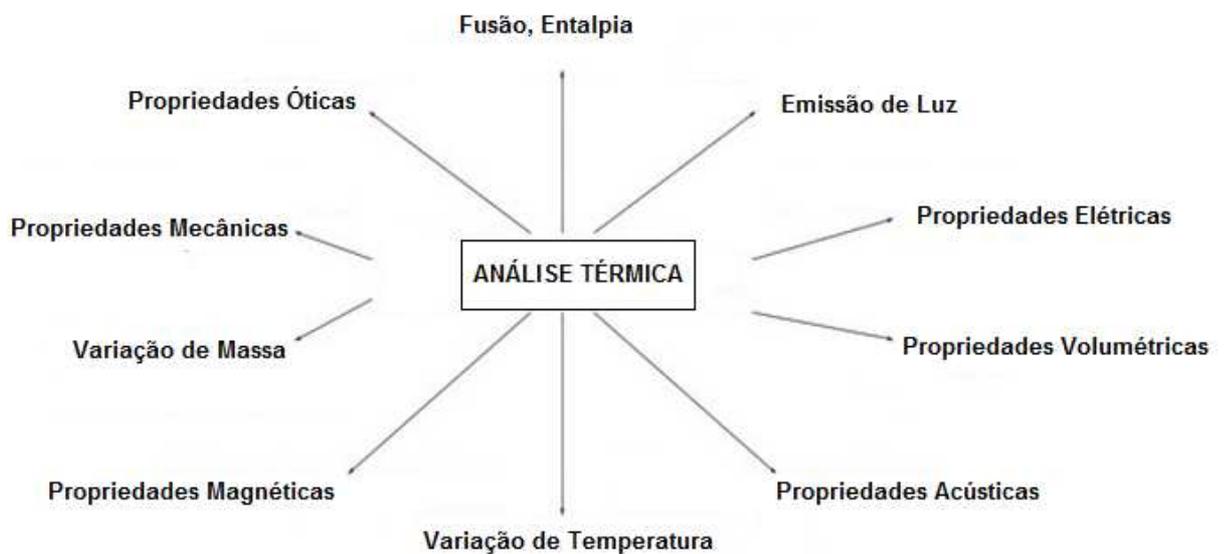


FIGURA 7: Técnicas de análise térmica dos materiais. Adaptado de [http://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise\\_instrumental/aula2a.html](http://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/aula2a.html). Acessado em 06/09/2013.

Nesse trabalho, é de particular interesse o estudo da estabilidade térmica das microesferas de lactato de quitosana sintetizadas para quimioembolização de tumores. A estabilidade térmica pode ser estudada com o auxílio da termogravimetria ou análise termogravimétrica (TG). A TG é uma técnica de análise térmica, destrutiva empregada para monitorar a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em condições controladas de atmosfera e temperatura.

As variações de massa de uma amostra podem ser interpretadas como resultantes de diversos fenômenos como a desidratação, sublimação, decomposição, entre outras que podem ser utilizadas para diferentes aplicações como: estudo da decomposição térmica de minerais, minérios, carvão, petróleo, madeira, polímeros, alimentos, materiais explosivos, estudos sobre

a corrosão de metais em atmosferas controladas, estudos sobre a velocidade de evaporação de líquidos, dentre outras [49].

A análise termogravimétrica pode ser empregada em três diferentes modos [48]:

- Termogravimetria isotérmica, que consiste em registrar a variação de massa da amostra em temperatura constante;
- Termogravimetria quase-isotérmica, que compreende o aquecimento da amostra em patamares de temperatura até um limite constante;
- Termogravimetria dinâmica, que obedece a um programa de temperatura previamente definido para o aquecimento da amostra, preferencialmente linear.

Apesar da extensa aplicabilidade da TG devida principalmente ao seu baixo custo, devem ser observados também os fatores que podem interferir em uma análise quantitativa tais como a quantidade de amostra utilizada, tamanho das partículas, contato amostra/atmosfera, natureza da amostra, condutividade térmica e ainda fatores relacionados com o instrumento como taxa de aquecimento, atmosfera, geometria do forno e porta amostra, dentre outros [48].

#### **4.3.4 Difratomia de raios X**

A difratometria de raios X (DRX), é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais poliméricos, cerâmicos, metálicos e seus compósitos, encontrando aplicações em variadas áreas do conhecimento, destacando-se principalmente a Engenharia e Ciência dos Materiais e Metalurgia além da Química e Física do Estado Sólido, Biofísica de Proteínas, entre outras [50].

A técnica DRX fundamenta-se no fato de que ao interagir com uma estrutura cristalina, os raios X podem ser difratados. A difração pode indiretamente mostrar detalhes de estrutura interna dos materiais a exemplo da distância interplanar em cristais verdadeiros ou a presença de cristalitos nos polímeros orgânicos. A difração de raios X irá depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Essa condição, expressa pela Lei de Bragg (Equação 3) está ilustrada na Figura 8 [50].

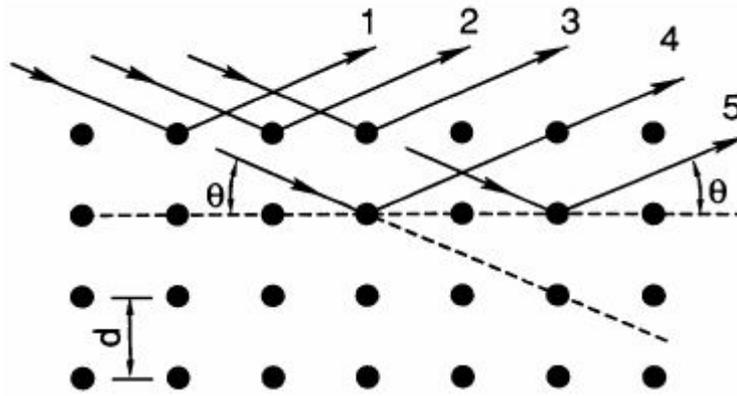


FIGURA 8: Ilustração do fenômeno de difração de raios-X.  
Fonte: [50]

Quando o objetivo do estudo são as estruturas cristalinas, a técnica DRX mede diretamente a distância entre planos paralelos de pontos do retículo cristalino de acordo com a lei de Bragg [50]:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (3)$$

Sendo que  $\lambda$  corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente,  $n$  é a ordem de difração,  $d$  é a distância interplanar entre os planos selecionados da estrutura cristalina e  $\theta$  é o ângulo de incidência dos raios X, medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos.

A intensidade de raios X que sofrem difração é diretamente dependente do número de elétrons que o átomo possui. Considera-se ainda que os átomos sejam distribuídos no espaço de tal forma que os vários planos de sua estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que a intensidade de difração seja por consequência diferente para os diversos planos cristalinos [50].

Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos ao longo de cada plano são características específicas e únicas de cada substância cristalina e por esse motivo correspondem a um padrão difratométrico específico de cada substância, sendo comparado a uma impressão digital de cada substância. Devido a essa característica, essa técnica é amplamente utilizada para identificação de compostos cristalinos.

### 4.3.5. Potencial Zeta

O Potencial zeta é mais uma ferramenta amplamente utilizada para caracterização de diversos tipos de materiais tanto para aplicações de rotina, quanto para medidas de controle de qualidade e ainda em materiais utilizados em pesquisas. É indicada para a otimização de formulações de suspensões ou emulsões e também para previsão da estabilidade de determinadas formulações.

Em linhas gerais, o potencial zeta é definido como sendo o potencial elétrico no plano de cisalhamento quando uma partícula está em movimento pela ação de um campo elétrico. [51].

É uma grandeza difícil de ser medida, pois é necessário utilizar técnicas de eletroforese. Mas pode ser estimada através do rastreamento do movimento de partículas carregadas em um campo de tensão. A esse fenômeno, dá-se o nome de mobilidade eletroforética (quão rápido uma partícula se move em um campo elétrico). Seu cálculo é feito através do modelo proposto por O'Bryen, que leva em consideração as propriedades do solvente que tem dependência com a temperatura, tais como: densidade, viscosidade, permissividade dielétrica e velocidade de propagação do som. [51].

O valor numérico do potencial zeta medido eletronicamente ou calculado pelo modelo de O'Bryen nos permite tirar conclusões a respeito das propriedades físico químicas do material em solução. Um valor de potencial zeta relativamente alto traduz uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois representa que as forças repulsivas estão em evidência, evitando a agregação das micropartículas em função das colisões ocasionas entre partículas adjacentes [52].

## 4.4. Caracterização Biológica das Microesferas

### 4.4.1. Citotoxicidade *in-vitro*

Para que um material sintético possa ser utilizado como um sistema implantável no organismo humano, duas propriedades biológicas devem ser inicialmente avaliadas em condições *in-vitro* antes da experimentação animal, a citotoxicidade e a hemocompatibilidade.

Alguns métodos de análise do comportamento de um material sintético quanto à sua citotoxicidade foram padronizados utilizando-se culturas celulares em condições *in vitro*, minimizando e racionalizando a experimentação animal. Os ensaios de citotoxicidade consistem em submeter o material direta ou indiretamente ao contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares como a lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular e outros efeitos ocasionados pelo material sintético candidato à implantação no organismo biológico [53-54]. O material comprovadamente citotóxico é representado por aquele que libera um elemento ou composto tóxico em quantidade suficiente para causar a morte celular. Nesse caso, o conceito de dose liberada do composto tóxico é considerado equivalente à dose absorvida pelas células.

Nesse trabalho, as microesferas de lactato de quitosana foram estudadas quanto à sua citotoxicidade após incubação do meio de cultura de seus extratos com as linhagens celulares de células de ovário de Hamster Chinês (CHO) segundo a norma ISO 10.993-5 [55] utilizando-se controle negativo e positivo. A norma ISO 10.993-5 foi desenvolvida pela Organização Internacional para a Padronização, e estipula procedimentos para a avaliação biológica de dispositivos médicos. Essa norma é aplicada a dispositivos que estejam em contato direto ou indireto com o organismo biológico ou com fluidos corpóreos. O controle negativo deve ser um material que não produz resposta citotóxica, sendo utilizado nesse trabalho o próprio meio de cultura celular. Como controle positivo utilizou-se o fenol, um material que ocasiona resposta citotóxica reprodutível.

O parâmetro mais utilizado para avaliação da toxicidade segundo a norma ISO 10.993-5 é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais. No presente trabalho a viabilidade celular, após a exposição das linhagens celulares descritas aos extratos das microesferas de lactato de quitosana, foi medida após a incubação com o corante vital

MTS [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil-2H-tetrazolio)] e reagente acoplador de elétrons, PMS (metassulfato de fenazina) na razão 2:1. A indução da toxicidade pela amostra avaliada é medida em uma faixa de concentrações específica do candidato a biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS foi considerada como o parâmetro de toxicidade.

A citotoxicidade IC50%, ou concentração de extrato que inibe a formação de 50% das colônias em relação ao controle foi estimada ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas em relação ao controle, versus a concentração do extrato expressa em porcentagem [54].

#### **4.4.2. Hemocompatibilidade**

A hemocompatibilidade pode ser definida como a habilidade que um material sintético apresenta ao promover uma resposta biológica apropriada quando entra em contato com o tecido biológico [56-57]. Esta propriedade das microesferas produzidas nesse trabalho é imprescindível, uma vez que estes devem estar intimamente em contato com os fluídos biológico, nesse caso, o sangue. Infelizmente, nenhum material sintético, modificado ou não, é 100% compatível biologicamente.

Dentre os vários critérios necessários para a classificação de um material sintético como biocompatível, a compatibilidade com o sangue tem sido a grande limitação para a aplicação dos polímeros sintéticos na área cardiovascular. De um modo geral, um polímero é considerado hemocompatível ou antitrombogênico se não houver ativação da cascata de coagulação intrínseca do sangue bem como ausência de plaquetas e leucócitos ativadas aderidos em sua superfície [58]. Apesar da vasta literatura existente acerca da síntese de polímeros compatíveis com o sangue, do ponto de vista teórico, o conhecimento acerca do mecanismo pelo qual uma superfície sintética interage com o sangue e seus elementos continua sendo apenas qualitativo.

Neste trabalho, utilizando as rotinas do laboratório de análises clínicas, a hemocompatibilidade das microesferas de lactato de quitosana foi avaliada através da determinação do tempo de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de coagulação (TC). Tais técnicas encontram-se descritas no Capítulo 5, adiante.

## CAPÍTULO 5: Procedimento Experimental

### 5.1 Características Físico-Químicas da Quitosana utilizada nesse trabalho

A cadeia polimérica da quitosana é formada predominantemente por unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-deoxi-D-glucopiranosose, sendo obtida em quantidades viáveis do ponto de vista industrial a partir da desacetilação alcalina da quitina [59]. A quitina e a quitosana são considerados biopolímeros distintos, sendo a forma do biopolímero predominante definida pelo grau de desacetilação, ou seja, a quantidade de monômeros desacetilados em suas cadeias. Nesse caso, o biopolímero é considerado quitosana quando o grau de desacetilação for superior a 50% [60].

A quitosana utilizada foi de procedência da Sigma-Aldrich (Cas number 9012-76-4). O grau de desacetilação do biopolímero foi confirmado através da espectroscopia no infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR). As amostras foram analisadas em um equipamento FTIR da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 Series, acoplado a um acessório de reflexão total atenuada ATR. As amostras foram analisadas na forma sólida de origem, sem nenhum tratamento especial, no intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 16 varreduras por amostra. O grau de desacetilação da quitosana foi calculado de acordo com a Equação 4 [60]:

$$GD = \left[ 100 - \frac{A_{1620}/A_{3359}}{1,33} \right] \times 100 \quad (4)$$

Sendo GD o grau de desacetilação,  $A_{1620}$  representa a banda de absorção correspondente à deformação axial de C=O de amida a 1620  $\text{cm}^{-1}$ ,  $A_{3359}$  representa a banda de absorção correspondente ao estiramento axial de -OH, sobreposta à banda de estiramento N-H a 3359  $\text{cm}^{-1}$  e 1,33 é a constante que representa a razão  $A_{1620} / A_{3359}$  para amostras de quitina completamente N-acetiladas.

A massa molar média das cadeias poliméricas de quitosana foi obtida através de medidas viscosimétricas, utilizando um viscosímetro de Ostwald modelo 520-10 da marca Schott.

## 5.2 Síntese e caracterização do Lactato de Quitosana

Nesse trabalho, o lactato de quitosana foi sintetizado de acordo com nossos trabalhos anteriores [61]. Nesse caso, 10g de quitosana foi adicionado inicialmente em ácido metanossulfônico (100 mL) e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 4 horas à temperatura ambiente (25 °C). Adicionou-se à solução de quitosana cloreto de lactoíla (4 equivalentes/unidade métrica de Ch) seguido da adição de trietilamina (TEA). O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente (25 °C). A reação foi interrompida pela refrigeração do sistema em gelo seco. Após neutralização do meio com bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) o polímero obtido foi dialisado utilizando membrana de acetato de celulose e água destilada (*cut off* de 14 kDa e tamanho de poro de 50 Å) por 7 dias para remoção do excesso de ácido láctico, seguido de liofilização. Um líquido viscoso de cor amarelada foi obtido com rendimento de 92%. O lactato de quitosana obtido foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (Bruker DRX 500) e análise termogravimétrica. A Figura 9 ilustra o mecanismo de esterificação do ácido láctico com o biopolímero quitosana para obtenção do lactato de quitosana.

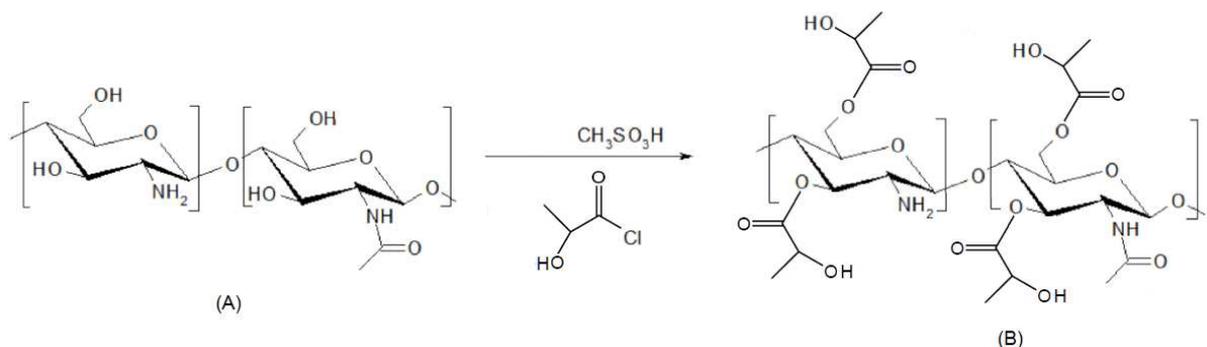


FIGURA 9: Mecanismo de esterificação do biopolímero quitosana (A) com cloreto de lactoíla para a obtenção de lactato de quitosana (B).

### 5.3 Preparo das microesferas de lactato de quitosana

As microesferas de lactato de quitosana contendo 5-Fluorouracil (5-FU) foram preparadas utilizando a técnica *spray-drying*. Ambos, 5-FU e lactato de quitosana foram dissolvidos em solução aquosa de poli (álcool vinílico) (PVA) a 1% como colóide protetor à temperatura ambiente (25 °C). A mistura quitosana/5-FU foi sonicada por 2 minutos utilizando um sonicador de 250 W. Microesferas de lactato de quitosana carregadas com 5-FU foram preparadas em um *spray-dryer* utilizando-se um bico injetor com diâmetro interno de 1 mm. A Figura 10 ilustra o princípio de funcionamento de um equipamento de secagem por spray (*spray-dryer*). Os parâmetros de processo foram ajustados para as seguintes condições: temperatura de entrada 60°C, temperatura saída 34–36 °C, velocidade de fluxo de 15 mL/min. As microesferas obtidas foram lavadas três vezes com 100 mL de água destilada para remoção do 5-FU não ligado e PVA. Em seguida, as microesferas foram coletadas por filtração e secas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as microesferas obtidas foram reticuladas por exposição ao vapor de glutaraldeído 25% w/w (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas. Novamente as microesferas foram lavadas três vezes com 100 mL de água destilada para remoção do glutaraldeído em excesso e, em seguida, as microesferas foram coletadas por filtração e secas a 37 °C por 24 horas.

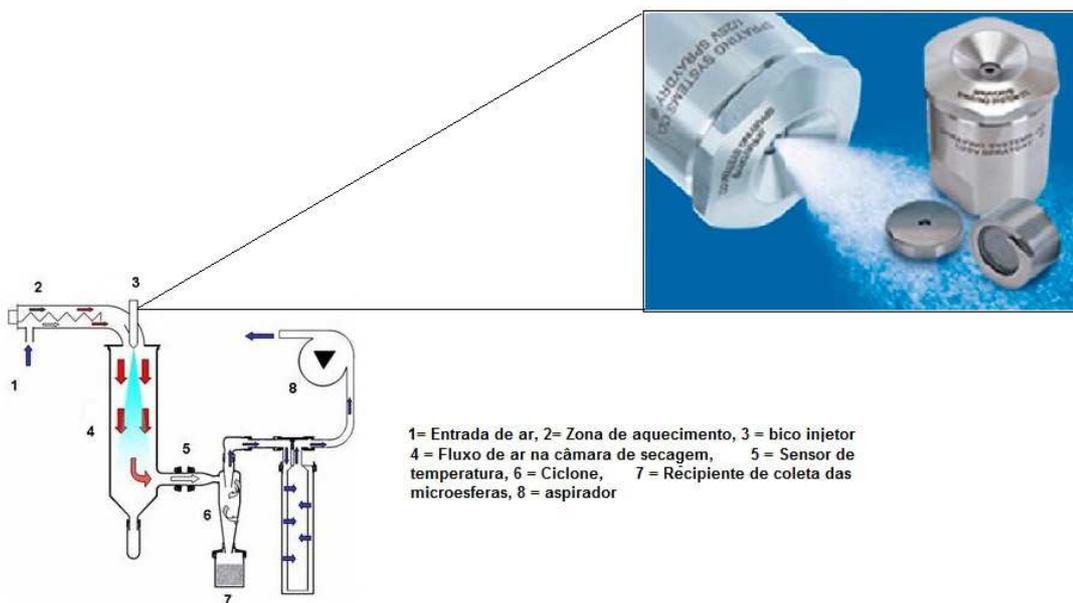


FIGURA 10: Fluxograma ilustrando o princípio de funcionamento do equipamento de *spray-dryer* da Buchi e bico injetor. Adaptado de <http://www.mybuch.com/Process.1950.0.html> e <http://www.directindustry.com/prod/spraying-systems/spray-drying-nozzles-5300-496825.html>

### **5.3.1 Funcionalização das microesferas de lactato de quitosana com Estreptoquinase**

O fígado desempenha um importante papel no mecanismo da hemostase produzindo os fatores de coagulação sanguínea, proteínas fibrinolíticas e seus respectivos inibidores. Algumas das proteínas sintetizadas no fígado são a protrombina, fibrinogênio, fatores de coagulação (V, VII, IX, X, XI, XII e XIII), o plasminogênio, entre outras. Por sua vez, é também no fígado que são eliminados todos os fatores de coagulação ativados, bem como as enzimas fibrinolíticas [62]. Portanto, é de se esperar que pacientes com doenças hepáticas possam desenvolver diferentes formas de coagulopatia [63].

A fim de se inibir uma possível formação de coágulos do sangue nas microesferas de lactato de quitosana sintetizadas, a enzima estreptoquinase foi imobilizada na superfície das microesferas de acordo com metodologia desenvolvida em nossos laboratórios [64]. A enzima Sk foi imobilizada covalentemente na superfície das microesferas através de ataque nucleofílico dos grupos amina da quitosana aos grupos carbonilas do glutaraldeído. Nesse caso, após exposição das microesferas ao vapor de glutaraldeído à temperatura ambiente (25 °C), estas foram colocadas em contato com uma solução de estreptoquinase (Sk) em tampão PBS, pH 7,4 a uma concentração de 1,0 mg/mL a 4 °C por 8 horas. O acoplamento da estreptoquinase nas microesferas de lactato de quitosana contendo 5-FU ocorre devido à formação de uma base de Schiff (ligação amina). Após exaustiva lavagem das microesferas com solução tampão PBS, pH 7,4 para remoção da enzima Sk não ligada, as microesferas foram liofilizadas e armazenadas em geladeira (4°C). A quantidade de Sk imobilizada nas superfícies das microesferas foi acompanhada pelo método de Bradford [64].

As propriedades físico-químicas das microesferas de lactato de quitosana obtidas foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, difratometria de raios X (DRX) e potencial zeta. A eficiência do encapsulamento de 5-FU foi determinada espectrofotometricamente. As propriedades biológicas foram determinadas através de ensaios de citotoxicidade e hemocompatibilidade. Tais técnicas de caracterização são descritas a seguir.

## 5.4 Propriedades Físico-Químicas

### 5.4.1 Análise da morfologia e distribuição do tamanho de partículas de lactato de quitosana

A morfologia e distribuição do tamanho das microesferas de lactato de quitosana foram efetuadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Shimadzu, modelo Superscan SS-550. As microesferas foram depositadas em uma fita de carbono e em seguida metalizadas com ouro utilizando-se um evaporador (metalizador) da marca Shimadzu, modelo IonCoater CC-50. Uma imagem do porta-amostras contendo as microesferas pode ser observado na Figura 11. A deposição de ouro foi efetuada durante 5 minutos.

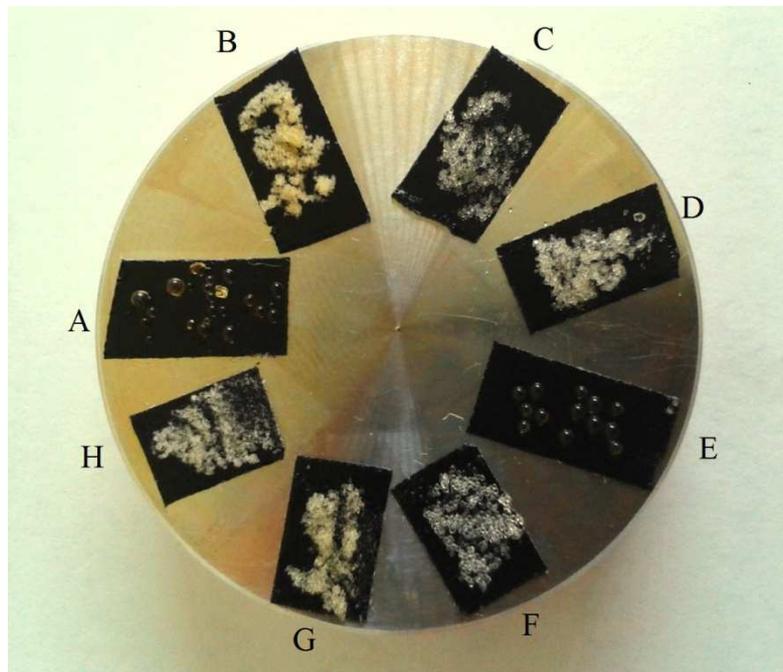


FIGURA 11: Amostras de microesferas de lactato de quitosana depositadas no porta amostras para análise no MEV.

### **5.4.2 Difractometria de raios X**

Utilizou-se a difratometria de raios X (DRX) com a finalidade específica de se analisar a dispersão do 5-FU nas microesferas de lactato de quitosana. As análises de DRX foram realizadas utilizando um difratômetro da marca Siemens, modelo DMAX 2000, operando com radiação de Cu-K $\alpha$ , com uma varredura  $2\theta$  variando de  $10^\circ$  a  $100^\circ$ .

A amostra de quitina necessitou de uma breve trituração, pois estava na forma de lascas, o que acabou dificultando a análise. As amostras de quitosana não necessitaram de nenhuma redução de tamanho, pois já se encontravam na forma fragmentada, e a amostra de 5-FU também necessitou de uma breve maceração para garantir a qualidade dos resultados obtidos.

### **5.4.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

A quantidade de 5-FU nas microesferas de lactato de quitosana e sua liberação das microesferas foram realizadas utilizando-se a espectroscopia UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50. Cerca de 10 mg de microesferas foram pulverizadas em um almofariz de ágata e suspensas em 10 mL de HCl 0,1 M (pH = 2). A solução foi filtrada e adicionada a 25 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4. O conteúdo de 5-FU nas microesferas foi analisado por espectroscopia UV-Vis a 265nm utilizando um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 e uma curva de calibração inicialmente preparada. Foi utilizado o comprimento de onda próximo a 265nm, pois segundo levantamento bibliográfico anteriormente realizado, esta é a faixa de maior absorção do 5-FU.

### **5.4.4 Análise Termogravimétrica**

A estabilidade térmica das microesferas de lactato de quitosana foi realizada utilizando-se um analisador termogravimétrico Mettler TA 4000 equipado com uma microbalança M3 com capacidade máxima para 150 mg e sensibilidade de  $1\mu\text{g}$  e forno TG50 capaz de operar até  $1.000^\circ\text{C}$ , controlado por um microprocessador TC-11. Utilizou-se a razão de aquecimento

de 10°C/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio de 150 mL/min e cadinho de  $\alpha$ -alumina. A temperatura inicial do aquecimento foi de 25 °C e a temperatura final foi de 900 °C. As massas utilizadas no experimento situaram-se entre 2 e 20 mg.

#### **5.4.5. Potencial Zeta**

O potencial Zeta foi utilizado nesse trabalho para a determinação da carga superficial das microesferas de lactato de quitosana. A técnica é um fenômeno eletrocinético resultante do movimento de uma fase sólida, com carga de superfície, relativamente a uma fase líquida, contendo um eletrólito. As partículas sólidas (fase móvel) carregadas movem-se através do líquido (fase estacionária) sob a influência de um campo elétrico. Nesse caso, o fenômeno é chamado de eletroforese e a mobilidade das microesferas denomina-se mobilidade eletroforética. O potencial zeta foi determinado por anemometria laser-Doppler utilizando um Zeta sizer Nanoseries (Malvern Instruments Unido). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada da suspensão das amostras em tampão PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente (25 °C). Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética de três medidas.

### **5.5 Análises Biológicas**

#### **5.5.1 Citotoxicidade**

Para avaliação da citotoxicidade preparou-se um extrato das microesferas de lactato de quitosana em meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>), na concentração de 200 mg/mL, seguindo a orientação normativa da ISO 10.993-12 [65]. O extrato foi incubado por 48 h a 37 °C e em seguida filtrado utilizando filtro de seringa com poros de 0,45  $\mu$ m (Corning<sup>®</sup>). A solução resultante foi então submetida à diluição seriada 1:2 até a concentração de 6,25 mg/mL.

Alíquotas de 50 µL de cada extrato foram transferidas para uma placa de 96 poços contendo células da linhagem permanente de ovário de hamster chinês (CHO-K1), previamente incubadas por 48 h. As placas foram incubadas por mais 72 h em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C e ao final desse período adicionou-se 20 µL de solução 2:1 do corante supra vital MTS (5-(3-carboxi metoxi fenil)-2-(4,5-dimetil tiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio a 0,2% do acoplador de elétrons metassulfato de fenazida (PMS) (0,09%) [66]. Após incubação por 2 horas, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas contra o branco. A citotoxicidade (IC50%) foi estimada como sendo a concentração de extrato que inibe a formação de 50% da incorporação do MTS em relação ao controle, ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas relativamente ao controle, versus a concentração do extrato expressa em porcentagem.

### **5.5.2. Hemocompatibilidade**

O contato de um material sintético com o sangue desencadeia uma série de fenômenos complexos que podem levar à hemólise (intravascular ou extravascular) nos vasos sanguíneos e a formação de trombos. Ambos os fenômenos são eventos indesejáveis e podem provocar efeitos catastróficos no organismo biológico que recebeu o material sintético. Vale ressaltar que a destruição acelerada dos eritrócitos pelo material sintético dentro dos vasos sanguíneos leva à hemoglobinemia e, uma vez que a grande quantidade de hemoglobina livre no plasma supera a capacidade do sistema biológico de remoção, pode resultar na deposição de hemoglobina nos tecidos, particularmente nos rins. Esses eventos indesejáveis trazem consigo várias consequências desastrosas para o organismo biológico que recebeu o material sintético, causando nefrose hemoglobinúrica, necrose hepática e infartos focais em decorrência da obstrução de capilares de pequenos calibres por trombos [67]. Por esse motivo, as microesferas de lactato de quitosana foram analisadas quanto aos processos de formação de trombos e atividade hemolítica, descritos a seguir.

### 5.5.3 Ensaio de formação de trombos

A interação das microesferas de lactato de quitosana com o sangue foi avaliada segundo o método cinético de formação de trombos adaptada da literatura [68]. Sangue humano (4mL) com anticoagulante foi coletado no momento do ensaio em tubo siliconado contendo 1 mL de solução de ACD (Citrato/Dextrose - anticoagulante que impede a hemólise dos glóbulos vermelhos) e mantido refrigerado no decorrer do ensaio. Cerca de 500 mg de microesferas foram colocadas em uma placa de Petri tampada contendo em seu interior um papel de filtro umedecido para saturação da umidade relativa. O sistema foi mantido em estufa a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, as microesferas foram adicionadas ao tubo siliconado preparado com a solução de ACD e a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20 µL de CaCl<sub>2</sub> a 3,8%. A reação foi interrompida em diferentes intervalos de tempo pela adição de água destilada (5 a 10 mL). A fixação dos trombos foi realizada por meio da imersão das amostras em formaldeído a 37 % durante 5 minutos para fixação dos trombos formados. Em seguida, as microesferas foram secas sob vácuo à temperatura ambiente (25 °C) até peso constante. Como controle positivo foram utilizadas microesferas de vidro e como controle negativo, silicone de grau médico, adquiridos no comércio local. A quantidade de trombos formada foi avaliada gravimetricamente de acordo com a Equação 5.

$$Trombos(\%) = \frac{W_{TV}}{W_M} \quad (5)$$

Sendo  $W_{TV}$  o peso dos trombos formados no vidro após 60 minutos (referência da coagulação total) e  $W_M$  representa o peso dos trombos formados nas microesferas após um determinado tempo de exposição.

### 5.5.4 Determinação da atividade hemolítica

Os ensaios de hemólise determinam o grau de lise das células vermelhas do sangue e a liberação da hemoglobina causada pelos artefatos, materiais e/ou seus extratos *in vitro*. É um

importante teste de triagem da hemocompatibilidade de um material sintético onde é refletida a fragilidade da membrana do eritrócito (célula vermelha) em contato com o material [69-70].

As amostras das microesferas de lactato de quitosana foram testadas quanto à sua capacidade de hemólise (destruição dos eritrócitos com liberação de hemoglobina) por meio do método de contato direto. Hemácias humanas foram coletadas previamente ao ensaio e diluídas em solução de Alsever (glicose 100 mM, citrato de sódio 30 mM, NaCl 70 mM, pH 6,0) na proporção 1:3 e mantidas a 4 °C. As hemácias foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 para remover materiais em excesso. O número de células foi determinado de modo indireto pela liberação da hemoglobina na lise em água destilada. Após a última lavagem, 100 µL do sedimento de hemácias foram adicionados a 900 µL de PBS pH 7,4. Em seguida, 100 µL dessa nova suspensão foram adicionados a 1.400 µL de água destilada para rompimento das células. As densidades óticas foram lidas a 415 nm, 450 nm e 380 nm. O cálculo da densidade óptica (DO) foi considerado como sendo igual a  $(2 \times 415) - (450 + 380)$  [71]. Uma curva de calibração de densidade óptica versus concentração de hemoglobina foi obtida.

A atividade hemolítica das microesferas de lactato de quitosana foi determinada após incubação das microesferas com solução tampão PBS, pH 7,4 em tubos contendo cerca de  $3 \times 10^6$  hemácias. Após incubação por 30 minutos a 37 °C os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 500 x para sedimentar as hemácias não rompidas. A hemoglobina liberada no sobrenadante foi lida a 414 nm. Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada foi obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias com 10 µL de solução de Triton X-100 a 0,25%. Foi utilizado um branco com tubos que continham somente as hemácias e tampão para o controle da lise espontânea, subtraída dos resultados. A lise espontânea de todos os experimentos realizados se situou em torno de 4,7%. Silicone grau médico adquirido no comércio local foi utilizado como comparação.

## CAPÍTULO 6: Resultados e Discussão

### 6.1 Caracterização físico-química das microesferas de lactato de quitosana

#### 6.1.1 Análise por FTIR e NMR do lactato de quitosana

A Figura 12 mostra os espectros de infravermelho das amostras de quitina e quitosana respectivamente. A quitina (Figura 12-A) apresenta uma forte banda de absorção a  $3259\text{ cm}^{-1}$ , característica das frequências de estiramento dos grupos hidroxila e  $\text{NH}_2$ . Essa mesma banda de absorção também aparece no espectro FTIR da quitosana, porém com deslocamento para  $3359\text{ cm}^{-1}$  (Figura 12-B), característico da presença do grupo  $\text{NH}_2$  em maior proporção na quitosana [60]. Ao mesmo tempo, destaca-se também na quitina uma banda de absorção a  $1375\text{ cm}^{-1}$ , característica da deformação simétrica do grupo  $\text{CH}_3$  que também está presente na quitosana. As bandas características de amida I e da deformação NH da amida II podem ser observadas a  $1620\text{ cm}^{-1}$  e  $1551\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, no espectro FTIR da quitina. No espectro FTIR da quitosana observou-se uma diminuição significativa na intensidade da banda de absorção a  $1620\text{ cm}^{-1}$  e um sensível deslocamento na banda de absorção a  $1551\text{ cm}^{-1}$ , caracterizando assim a desacetilação ocorrida na quitina [60].

Para o cálculo do grau de desacetilação da amostra de quitosana foi utilizada a Equação 4, sendo o resultado encontrado igual a 50,3%. Segundo dados bibliográficos, quitosanas que apresentam esse grau de desacetilação apresentam boa solubilidade em água [72], sendo assim, o valor encontrado mostrou-se satisfatório.

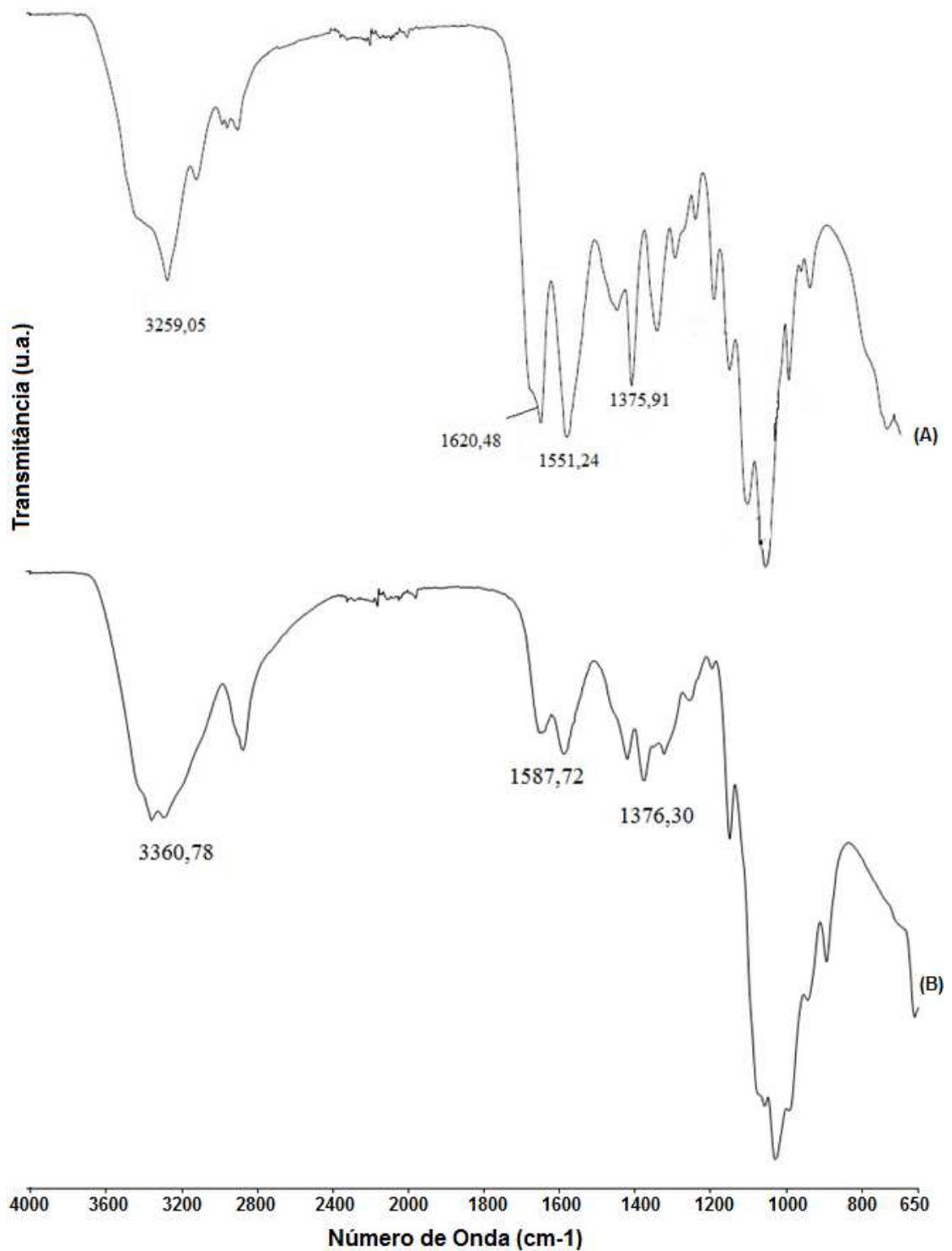


Figura 12 - Espectro FTIR dos biopolímeros quitina (A) e quitosana (B), obtidos *in natura* à temperatura ambiente (25 °C).

A Figura 13 mostra o espectro FTIR do lactato de quitosana sintetizado neste trabalho. O éster lactato de quitosana apresenta uma intensa banda de absorção a  $1748\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao modo de vibração de estiramento de carbonilas, característico de ésteres. A

banda vibracional localizada a aproximadamente  $1200\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao modo vibracional de estiramento correspondente ao grupo  $\text{-C-O}$  de ésteres, sugerindo a esterificação das hidroxilas da quitosana com o ácido láctico.

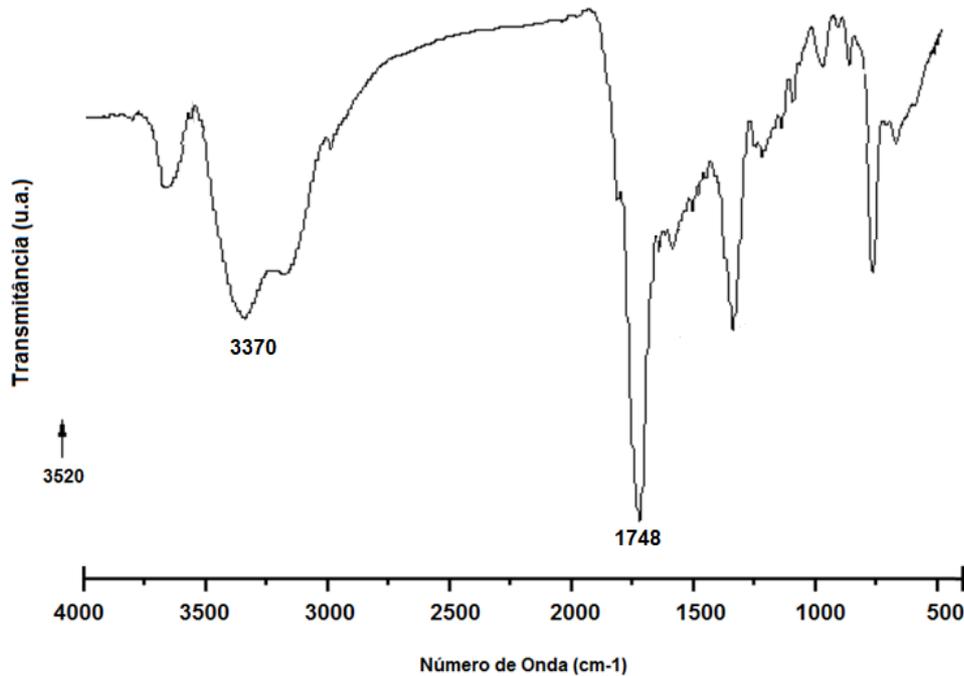


Figura 13 - Espectro FTIR do lactato de quitosana obtidos *in natura* à temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

A Tabela 1 resume as principais bandas de absorção no FTIR para o biopolímero quitosana [73-74] cuja estrutura está ilustrada na Figura 14.

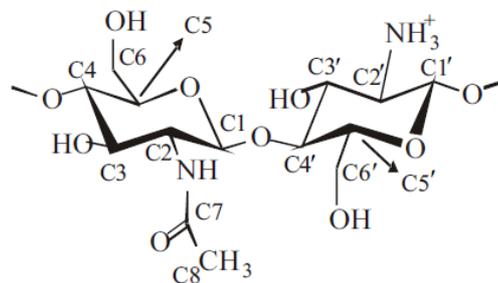


Figura 14 - Ilustração da estrutura química da quitosana e suas respectivas numerações.

Tabela 1- Principais atribuições no espectro IR da quitosana [75-76].

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3450 – 3500	Indica a presença de grupos OH (C <sub>3</sub> -OH e C <sub>6</sub> -OH) e interações intra e intermoleculares.
3360	Absorção de grupos –NH.
2920 – 2880	Vibrações simétricas e assimétricas de –CH <sub>2</sub> - no anel glicosídico.
1660	Oscilações de C=O dos grupos NH <sub>2</sub> . Está relacionado com a desacetilação da quitina.
1630	Grupos NH <sub>2</sub> protonados.
1560	Oscilações dos grupos –NH em amidas.
1590	Oscilação de NH <sub>2</sub> .
1425	Oscilação do grupo CH <sub>2</sub>
1420 – 1320	Oscilações dos grupos –OH e CH
1380	Oscilações dos grupos –CH e deformações C-CH <sub>3</sub> no grupo amida.
1150 – 1040	Oscilações –C-O-C nas ligações glicosídicas do biopolímero.
850 - 840	Vibração característica dos grupos CH <sub>3</sub> COH.

A Figura 15-B mostra o espectro <sup>1</sup>H-NMR do lactato de quitosana obtido nesse trabalho. Quando o biopolímero é esterificado com ácido láctico, os sinais correspondentes aos grupos hidroxilas na região entre 4,5 e 6 ppm desaparecem, indicando a reação de esterificação. O grau de substituição, calculado a partir do espectro H-RMN foi de 0,87 hidroxilas esterificadas por unidade métrica do biopolímero [74].

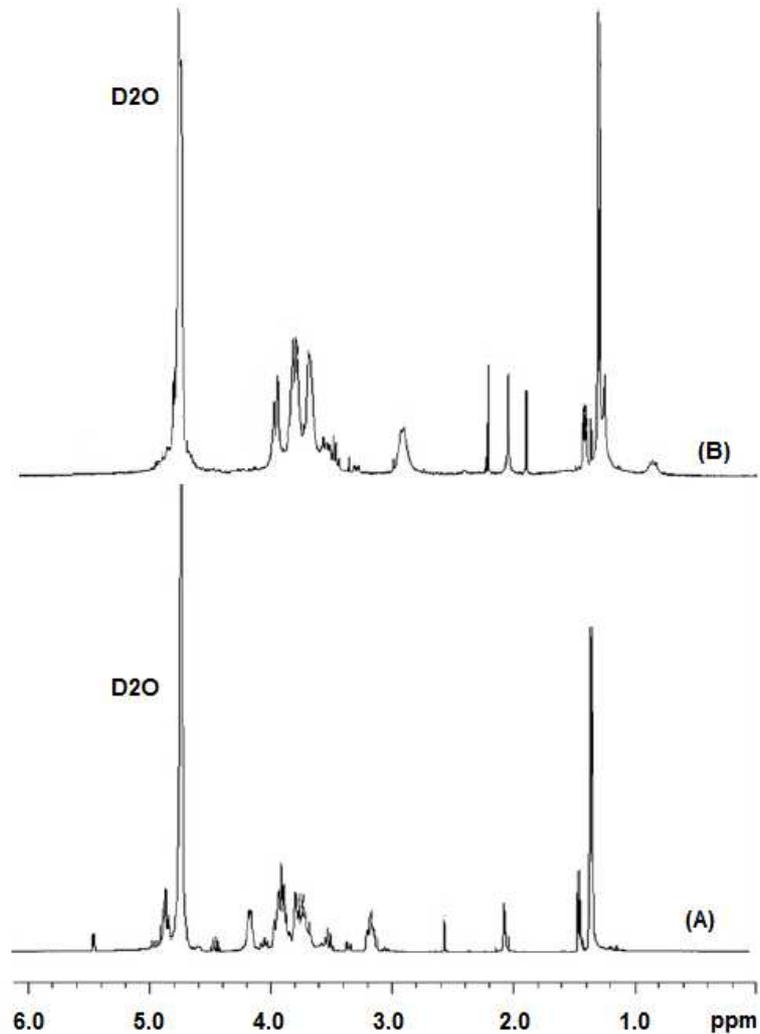


Figura 15- Espectro H-NMR do biopolímero quitosana (A) e do éster, lactato de quitosana (B). Solvente utilizado: D<sub>2</sub>O. As medidas foram feitas a 70 °C.

### 6.1.2 Análise da morfologia e distribuição do tamanho de partículas das microesferas de lactato de quitosana

Como já observado anteriormente, o biopolímero quitosana é obtido via desacetilação da quitina sendo, portanto, um copolímero formado por unidades  $\beta(1\rightarrow4)$  2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose. Embora existam grupos funcionais hidrofílicos, o biopolímero é hidrofóbico e insolúvel em meio aquoso. A insolubilidade da quitosana em solventes orgânicos e meio aquoso é atribuída além da cristalinidade, às ligações de hidrogênio entre as cadeias do biopolímero, conforme ilustrado pela Figura 16.

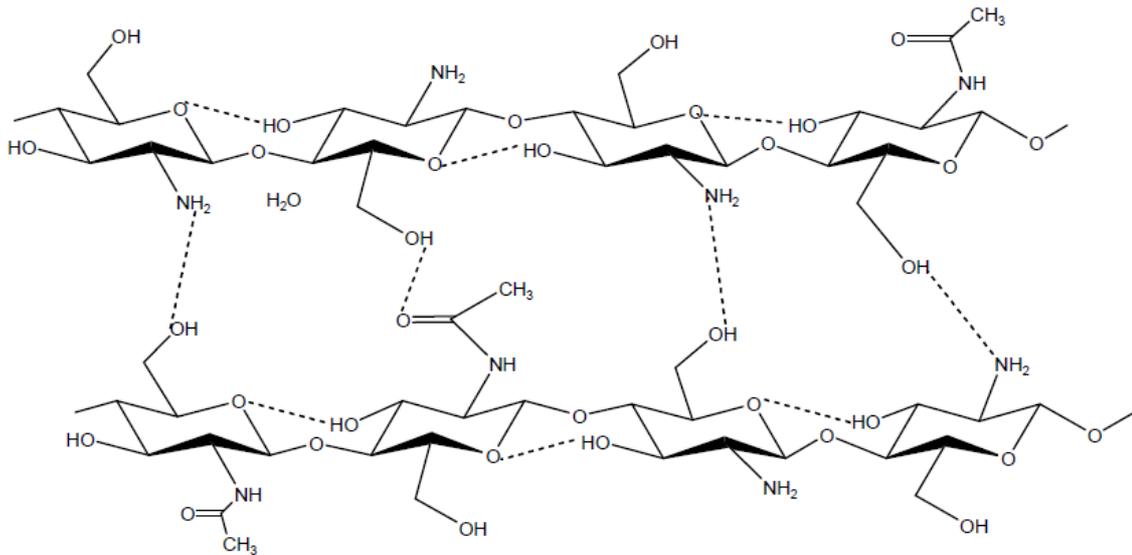


Figura 16: As ligações de hidrogênio no polímero quitosana são devidas às ligações de hidrogênio entre os grupos acetila, amins e hidroxilas existentes nas unidades méricas do biopolímero. Adaptado de [77].

Muitas tecnologias têm sido desenvolvidas para a obtenção de derivados da quitosana com solubilidade aumentada, uma vez que as condições de processamento, particularmente a técnica de secagem por *spray dryer* requer um processamento a pH neutro, principalmente devido à proteção ao equipamento e a aplicação do produto final como biomaterial [78-79]. Ao mesmo tempo deve ser observado que devido à presença de grupos lactato, o lactato de quitosana é mais versátil relativamente à quitosana, formando soluções com viscosidade controlável em função do teor de lactato no biopolímero, melhorando significativamente suas propriedades formadoras de filmes, o que contribuiu para a formação de microesferas [80].

A análise através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas sintetizadas de lactato de quitosana é de fundamental importância para sua utilização na quimioembolização de tumores para avaliação do tamanho e identificação de possíveis heterogeneidades nas superfícies poliméricas. A utilização da técnica MEV nesse trabalho teve como objetivo a análise de sua morfologia, avaliação do diâmetro das partículas obtidas, distribuição de tamanho e avaliação da presença ou não de poros.

As micrografias MEV das microesferas sintetizadas nesse trabalho estão representadas na Figura 17. É possível observar que as esferas apresentam uma superfície lisa, regular e praticamente sem poros. Ao mesmo tempo, observa-se que as microesferas obtidas apresentam uma boa uniformidade na distribuição de tamanhos, não se observando estados de aglomeração significativos, fator importante a ser considerado quando se pretende utilizá-las para a administração de fármacos no organismo [81-82].

A micrografia MEV da Figura 18 mostra que as microesferas sintetizadas possuem o núcleo oco, podendo-se observar em seu interior a dispersão de pequenas partículas de 5-FU.

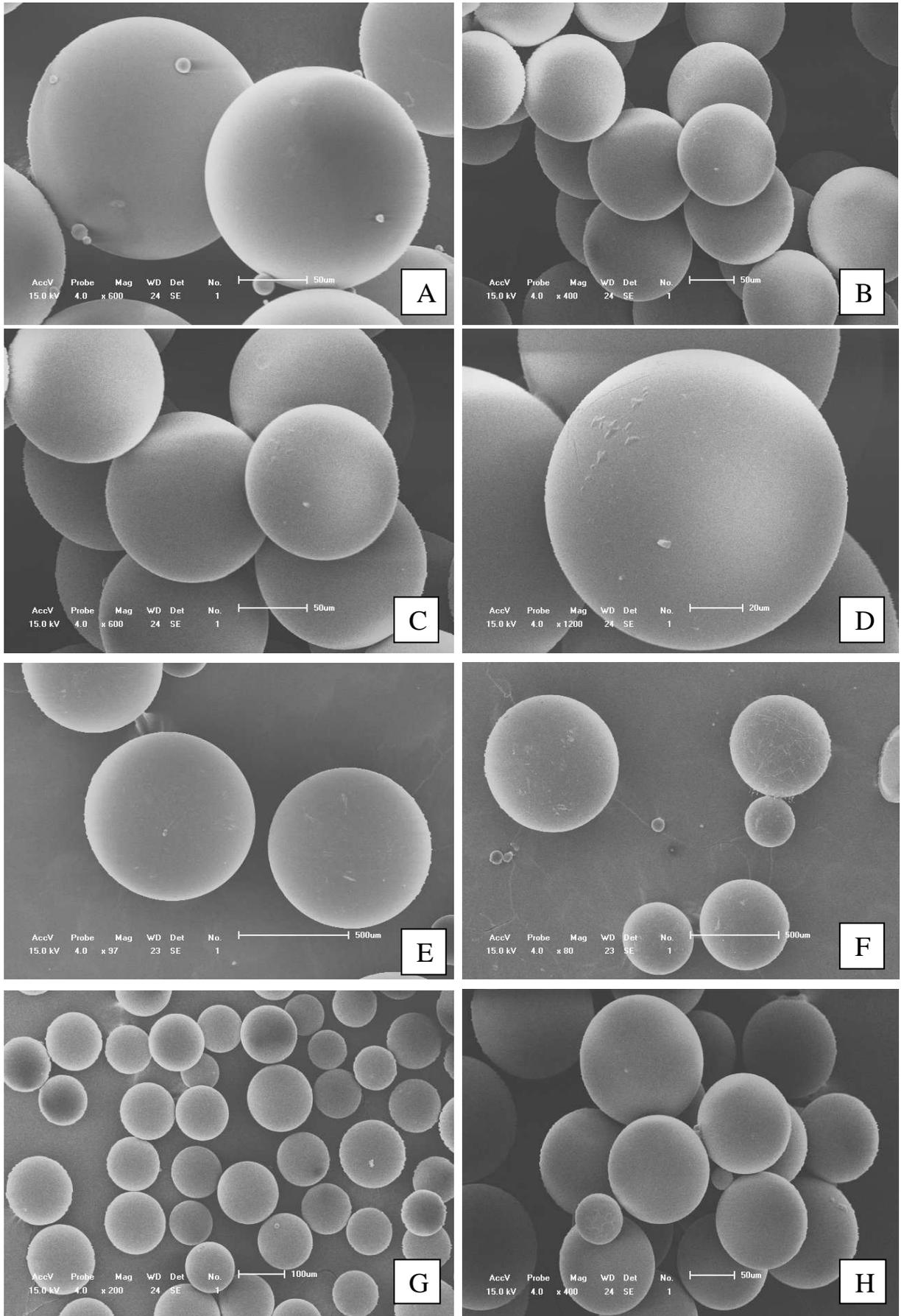


Figura 17: Micrografias MEV das microesferas de lactato de quitosana.

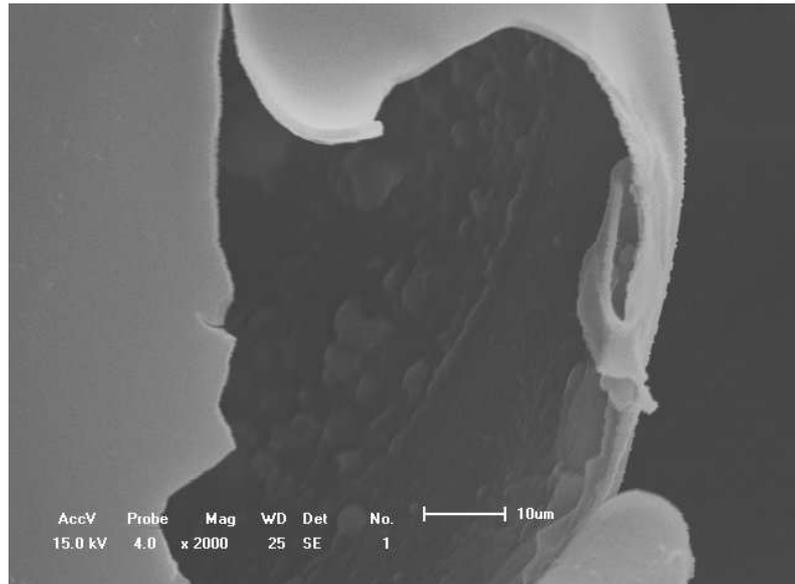


Figura 18: Micrografia MEV de uma microesfera de lactato de quitosana com sua casca rompida. Observam-se no interior da microesfera partículas de 5-FU.

A distribuição média dos diâmetros das microesferas de lactato de quitosana, calculado a partir de medições dos diâmetros das esferas obtidas através das micrografias MEV é mostrado na Figura 19. Observa-se que as esferas apresentam distribuição de tamanho em torno de 80 μm, o que parece ser adequado, uma vez que o diâmetro da artéria que nutre o CHC é da ordem de 10 a 140 μm [83-84].

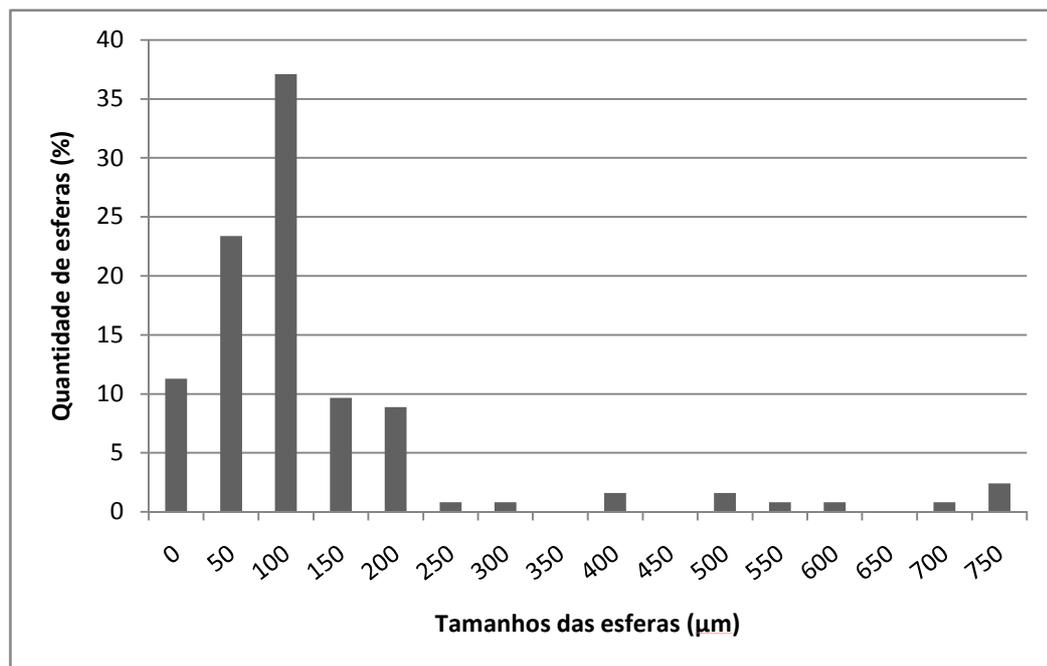


Figura 19: Distribuição dos tamanhos das esferas de lactato de quitosana determinado a partir das micrografias MEV.

### 6.1.3 Análises das microesferas de lactato de quitosana por difração de raios-X

A Figura 20 apresenta os difratogramas de raios X (DRX) das amostras de quitina, quitosana e lactato de quitosana. O DRX da quitina (Fig. 20-A) revela a estrutura polimórfica do biopolímero acetilado correspondente às três fases cristalinas distintas denominadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$  apresentando boa concordância com a literatura [85-86]. Por sua vez, o DRX da quitosana (Fig. 20-B), revela significativa perda de cristalinidade após o processo de desacetilação, com o desaparecimento dos picos a  $2\theta = 10^\circ$ ,  $25^\circ$  e  $40^\circ$ , presentes inicialmente na quitina. Portanto, pode-se concluir que o processo de desacetilação leva à perda de cristalinidade. O polímero quitosana utilizado nesse trabalho exibe um pico largo a  $2\theta = 20^\circ$  caracterizando o material como amorfo, em boa concordância com a literatura [87-88].

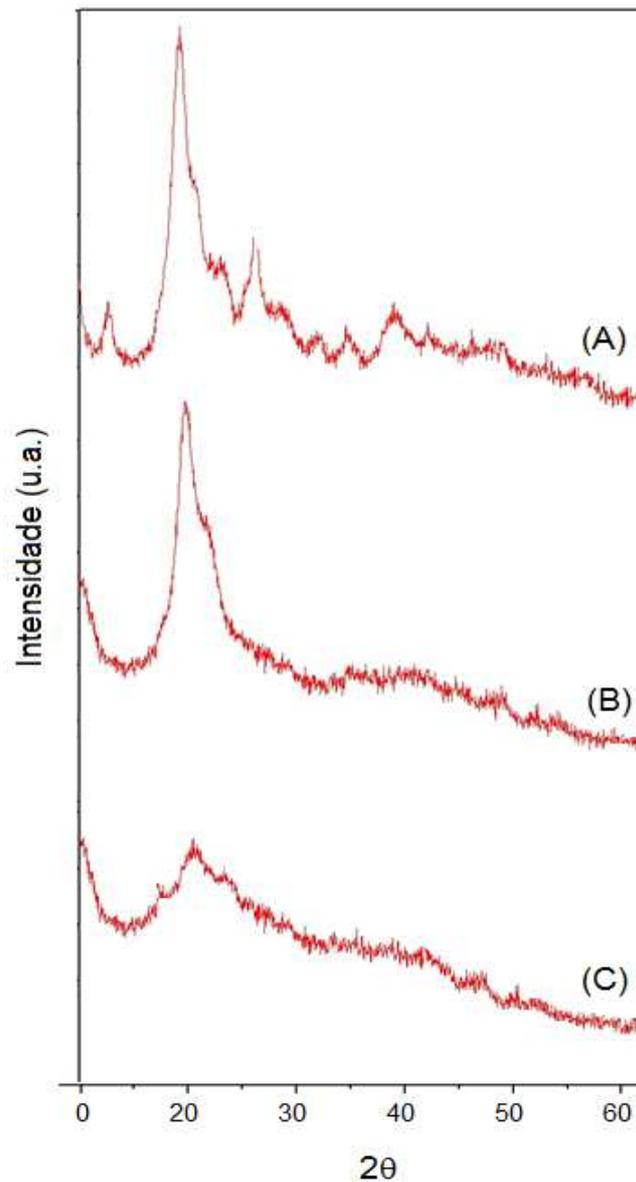


Figura 20: DRX medido à temperatura ambiente (25 °C) da quitina (A), quitosana (B) e lactato de quitosana (C).

A difratometria de raios X do lactato de quitosana (Figura 20-C) revela uma estrutura amorfa, com perda significativa da cristalinidade após o processo de esterificação. A perda de cristalinidade pode estar associada a efeitos de impedimento estérico e diminuição das ligações de hidrogênio no lactato de quitosana. A perda de cristalinidade e o controle do processo de reticulação contribuem para a formação de microesferas com parede lisa e distribuição de tamanhos com boa homogeneidade, conforme observado em outros trabalhos da literatura [89].

#### **6.1.4 Análises Termogravimétricas das amostras de quitina, quitosana, microesferas de lactato de quitosana e 5-Fluorouracil**

A análise termogravimétrica é uma ferramenta analítica utilizada na química de polímeros objetivando o estudo da estabilidade térmica de novas formulações poliméricas e sua adequação para aplicações na biomedicina. Através da análise termogravimétrica é possível se conhecer as propriedades térmicas do lactato de quitosana obtendo-se informações sobre seu mecanismo de decomposição e estabilidade térmica. Além disso, será possível se observar as alterações na composição química e na estrutura molecular ocorridas durante o processo de obtenção das microesferas de lactato de quitosana.

A Figura 21 apresenta as curvas TG/DTG sobrepostas para a amostra de quitina (Sigma-Aldrich), submetida à razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de N<sub>2</sub>, onde puderam ser observados dois eventos térmicos. A primeira decomposição, referente à perda de água, ocorreu numa temperatura aproximada de 60°C, com perda de massa de 10%. A segunda decomposição, referente a perda de material orgânico, inicia-se em torno de 300°C até 400°C aproximadamente com perda de massa em torno de 70%, corresponde à temperatura de degradação do polímero. Não se observa a formação de outros componentes durante a sua degradação e nota-se também que a degradação do polímero não é completa para a faixa de aquecimento estabelecida, obtendo-se um resíduo de aproximadamente 20%.

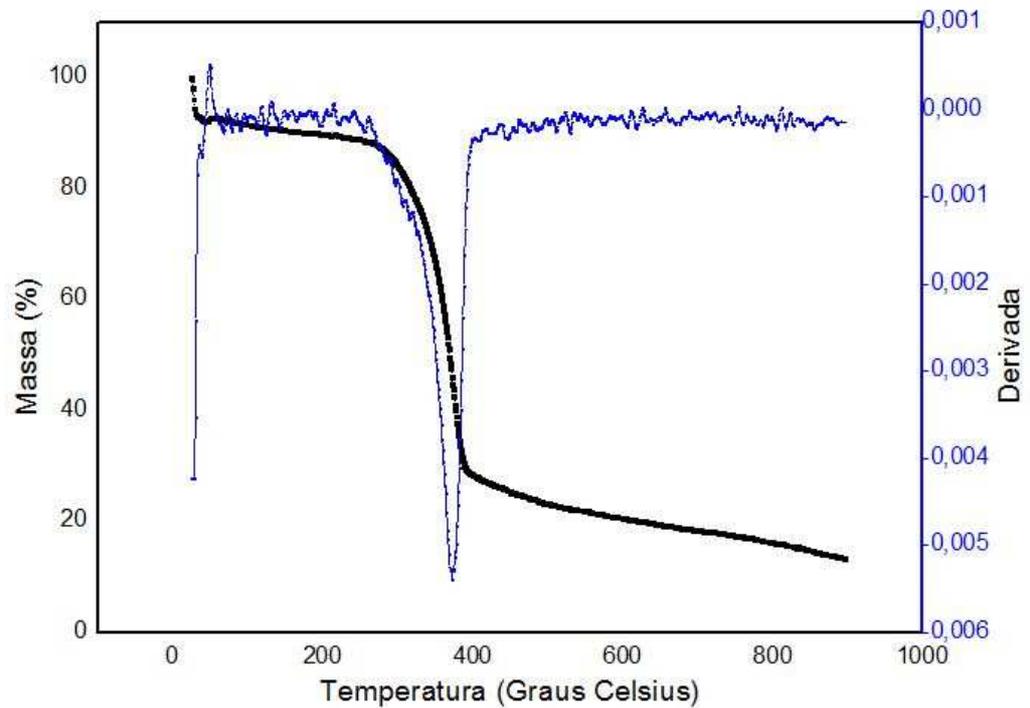


Figura 21: Curvas TG/DTG do biopolímero quitina em atmosfera de  $N_2(g)$ .

A curva TG apresentada na Figura 22 mostra a termodecomposição da quitosana, onde se pode observar a perda de massa em dois estágios. O primeiro, no intervalo entre 45°C a 115°C, com perda de massa de aproximadamente 12%, e o segundo com início próximo a 220°C até termodegradação incompleta e perda de massa de cerca de 60% em 600°C. A massa de resíduo obtida foi de aproximadamente 28% a 800 °C. A diminuição da estabilidade térmica da quitosana relativamente à quitina já era esperada uma vez que a estabilidade térmica da quitina aumenta com o grau de acetilação. Quando a forma acetilada prevalece, o efeito endotérmico aparece em 320 °C, enquanto que, na forma desacetilada o efeito ocorre a 220 °C [90].

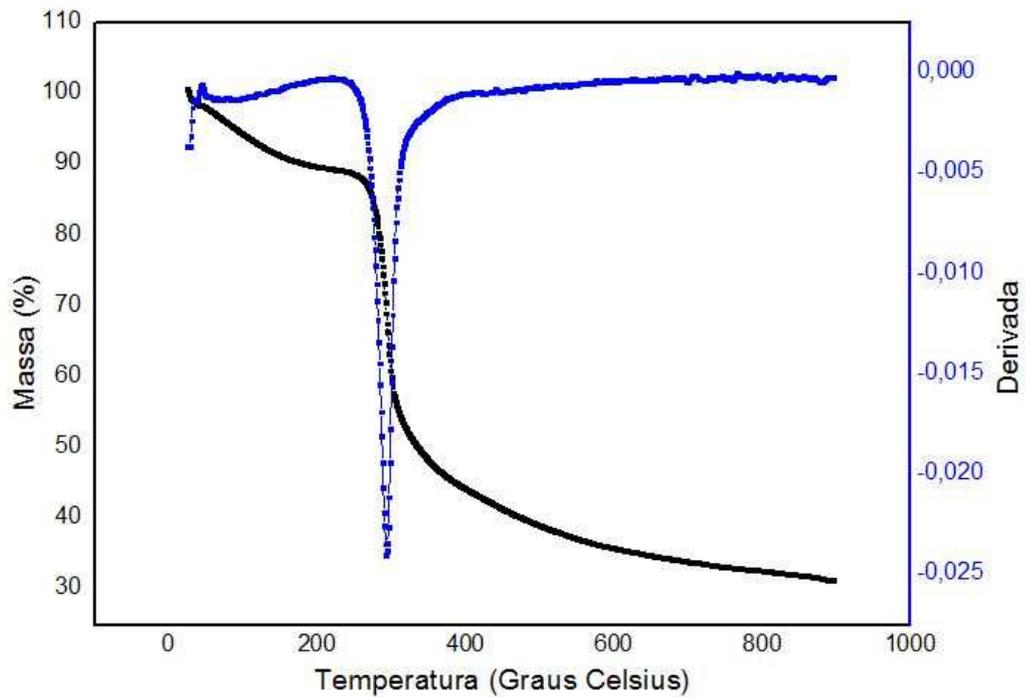


Figura 22: Curva TG/DTG para o biopolímero quitosana em atmosfera de  $N_{2(g)}$ .

A Figura 23 exibe a curva termogravimétrica e sua derivada (TG/DTG) para o lactato de quitosana. Inicialmente, existe uma perda de massa de aproximadamente 15% no intervalo de temperatura de 25°C a 100°C, correspondente à perda de água. Posteriormente, no intervalo de temperatura de 200°C a 300°C observa-se uma perda de massa de aproximadamente 30%. A segunda etapa de degradação térmica inicia-se a aproximadamente 300°C com perda de massa de aproximadamente 50%. A massa de resíduo final observado foi de aproximadamente 5% a 800°C.

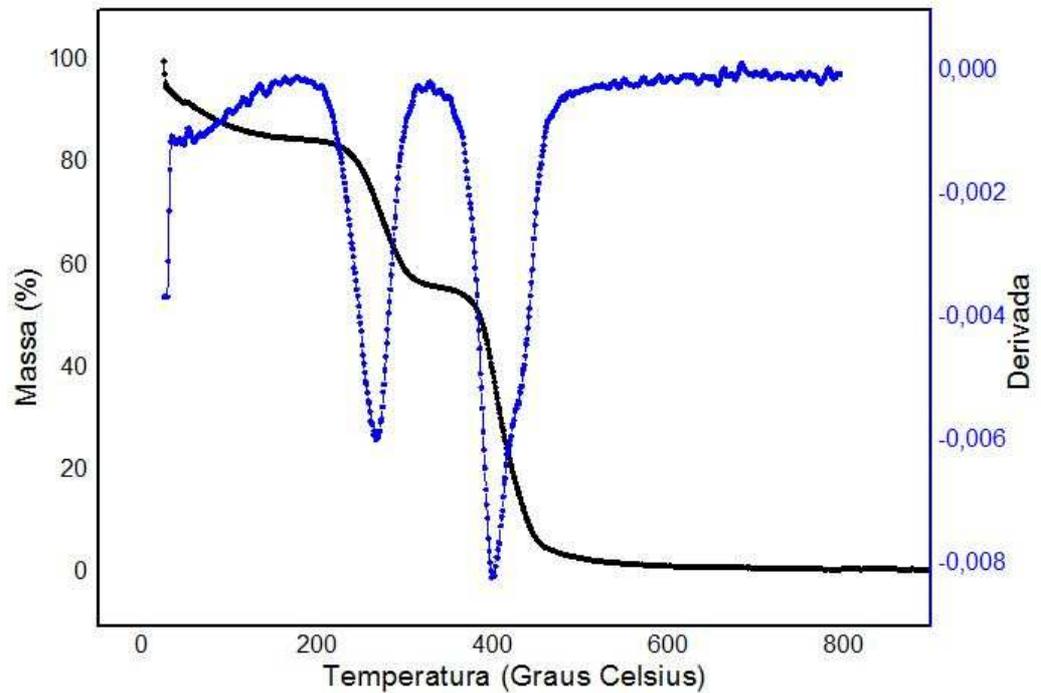


Figura 23: Curva termogravimétrica das microesferas de lactato de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

A curva termogravimétrica do lactato de quitosana apresenta similaridades com a curva termogravimétrica de copolímeros de enxerto, onde a perda de massa é caracterizada por dois degraus onde tais perdas de massa são significativas. O primeiro degrau corresponde à degradação térmica do polímero enxertado, nesse caso, lactato de quitosana e, o segundo degrau corresponde à degradação térmica do esqueleto do copolímero, nesse caso, o biopolímero quitosana [91].

Com a finalidade de se observar a estabilidade do 5-FU durante a etapa de secagem por atomização, realizou-se a análise térmica do fármaco no mesmo intervalo de temperaturas da análise da quitosana e seu derivado, lactato de quitosana. Os resultados obtidos referentes à análise TG/DTG para o 5-FU são apresentados na Figura 24.

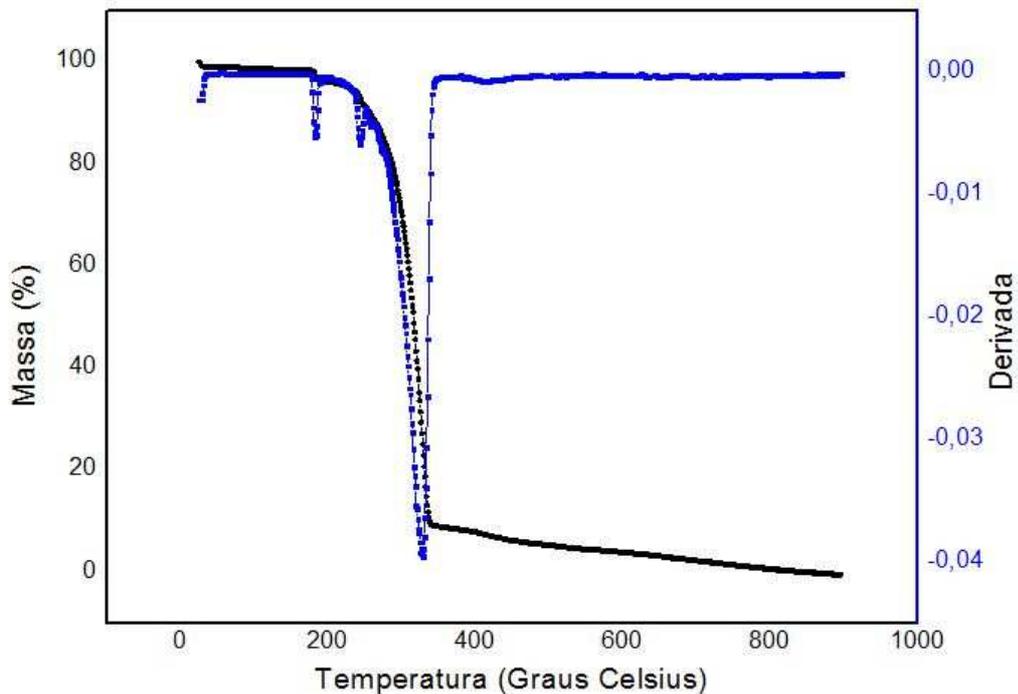


Figura 24: Análise termogravimétrica do 5-Fluorouracil.

A análise termogravimétrica do quimioterápico 5-Fluorouracil apresentou resultados bastante satisfatórios no que se refere à sua temperatura de degradação, que ocorreu na faixa de 280°C a 380°C, coincidindo com a faixa de temperatura de degradação do lactato de quitosana. Dessa forma, os resultados de TG/DTG permitem concluir que a estrutura molecular do quimioterápico é preservada na temperatura do processo de atomização por *spray dryer*.

### 6.1.5. Potencial zeta

A Figura 25 mostra o potencial zeta,  $\zeta$ , das microesferas de lactato de quitosana em função do pH. Observa-se que as partículas apresentaram carga superficial negativa na faixa de pH explorada, de 3,5 a 7,5. Os resultados parecem ser consistentes com o fato de que a enxertia do ácido lático no biopolímero quitosana confere às microesferas camadas de cadeias carregadas negativamente de ácido lático. Também pode ser observado que o potencial aumentou à medida que o pH aumenta como resultado da desprotonação dos grupos amins do biopolímero quitosana. Um potencial zeta alto é importante, pois cria uma boa estabilidade

físico-química da suspensão coloidal devido às grandes forças repulsivas que tendem a evitar a agregação em função das colisões de micropartículas adjacentes [92].

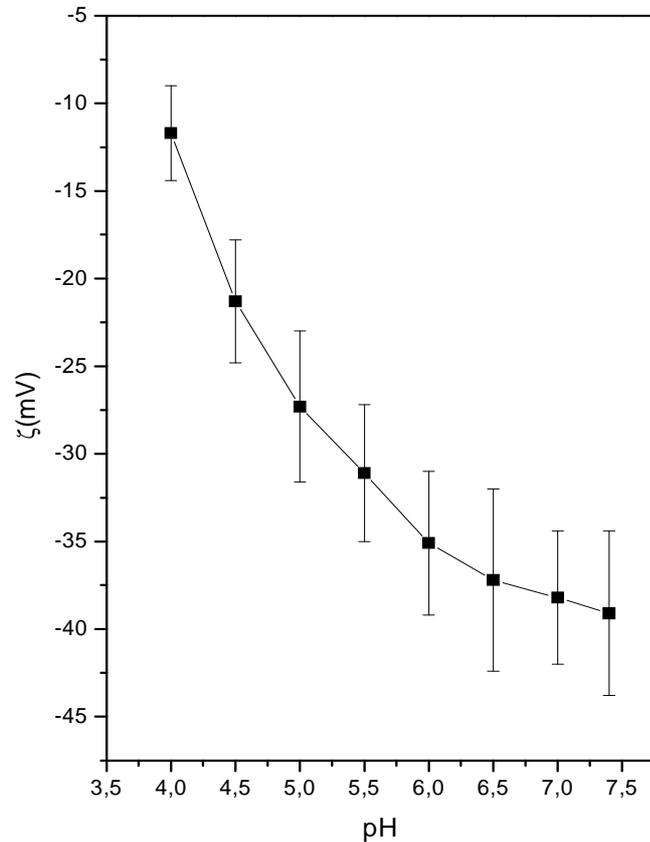


Figura 25: Potencial  $\zeta$  das microesferas de lactato de quitosana em função do pH do meio.

### 6.1.6. Estudo da liberação do 5-Fluorouracil

As microesferas de lactato de quitosana obtidas pela técnica de atomização *spray drying* permitiram que o fármaco 5-FU, que possui um tempo de meia vida de 10 a 20 minutos, permanecesse encapsulado em seu interior, com uma baixa incidência de defeitos. Dessa maneira, a membrana de lactato de quitosana permanece como uma barreira para a liberação do quimioterápico. Os perfis de liberação do 5-FU das microesferas de lactato de quitosana foram estudados com as microesferas não reticuladas e reticuladas com vapor de glutaraldeído

e são mostradas na Figura 26. Os perfis de liberação indicam haver diferenças na liberação do fármaco após a reticulação das microesferas, principalmente nas primeiras horas. Os perfis de liberação de ambas as microesferas, reticulada e não reticulada de lactato de quitosana são complexos e exibem um efeito *burst* inicial, caracterizado pela liberação de uma grande quantidade do fármaco nas primeiras horas ou minutos. Após o *burst* o sistema atinge um estágio de liberação que se aproxima mais de uma cinética de ordem zero (liberação mais constante).

A liberação do 5-FU das microesferas de lactato de quitosana reticuladas com glutaraldeído apresentou uma diminuição de cerca de 20% em relação às microesferas não reticuladas na região onde a cinética de liberação atinge a ordem zero. Na primeira hora, as microesferas de lactato de quitosana diminuíram a liberação do 5-FU em cerca de 30% em comparação às microesferas não reticuladas. Também deve ser ressaltado que, pode ser constatado pelos gráficos um efeito de prolongamento na liberação de 5-FU em comparação às microesferas de lactato de quitosana não reticuladas.

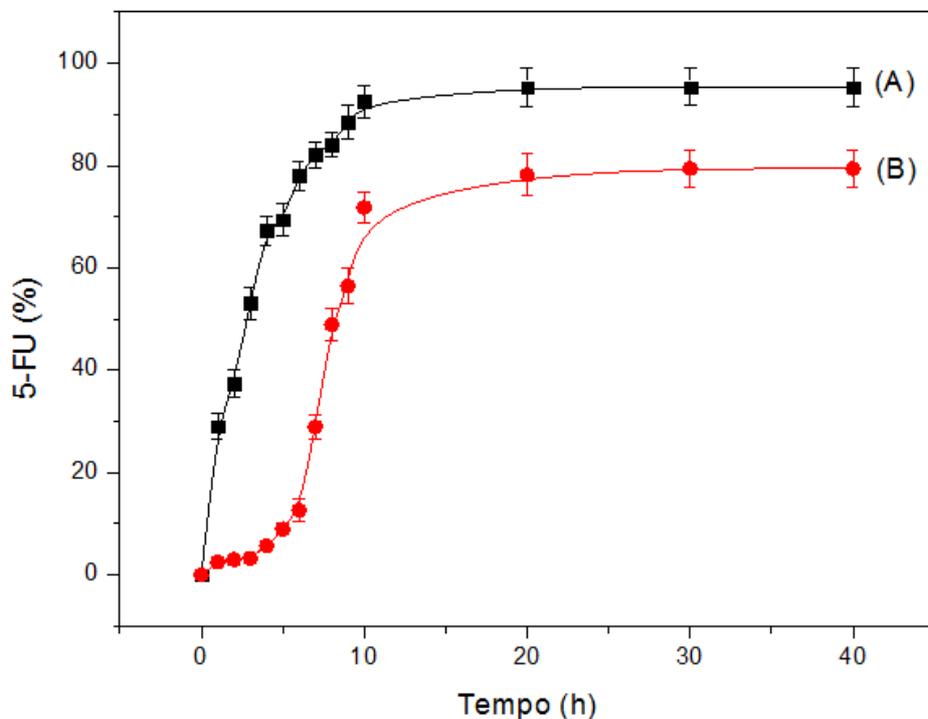


Figura 26 - Perfis de liberação do 5-FU a partir das microesferas de lactato de quitosana não reticuladas (A) e reticuladas (B) com glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4.

As microesferas de lactato de quitosana transportadoras de 5-FU, reticuladas com glutaraldeído, apresentam como principal vantagem a liberação prolongada do fármaco. Estudos têm apontado que a liberação prolongada do agente quimioterápico comparativamente à liberação rápida traz benefícios clínicos para o tratamento da neoplasia uma vez que o tempo de contato entre o tumor e o fármaco é prolongado permitindo assim, que se atinjam níveis plasmáticos inferiores aos observados na terapia convencional e conseqüentemente menores efeitos colaterais. Ao mesmo tempo, é possível se obter concentrações locais do quimioterápico da ordem de centenas de vezes superiores à quimioterapia convencional [93-94].

## **6.2 Ensaios Biológicos *in vitro***

### **6.2.1 Citotoxicidade**

Tendo em vista a importância de verificar-se a inocuidade das microesferas de lactato de quitosana para aplicação como biomaterial, foram efetuados os ensaios de citotoxicidade. O ensaio de citotoxicidade define o potencial de degeneração ou morte celular causado pelas microesferas de lactato de quitosana. Assim, um resultado positivo no ensaio de citotoxicidade descaracterizaria a condição de inocuidade das microesferas, sendo possível causar um processo de irritabilidade do tecido biológico seguido de degeneração celular. O estudo da citotoxicidade foi efetuado em colaboração com o laboratório de biologia molecular do Instituto de Pesquisa e Nucleares – IPEN/USP tendo sido selecionado o método de inibição da formação de colônia devido à sua sensibilidade (ISO 10.993-5, 1992) [95].

Os ensaios *in vitro* são habitualmente efetuados como testes de triagem no início da avaliação da biocompatibilidade de materiais. A ISO 10.993-5 (1992) refere-se ao teste de citotoxicidade como um teste “*in vitro*” de aplicabilidade geral, usado largamente com o objetivo de sugerir, a partir de seus resultados, um plano de ensaios aplicáveis ao biomaterial. Uma das vantagens deste teste é a sua alta sensibilidade, e os resultados obtidos tanto pela inibição do crescimento celular, formação de colônias, morte celular e outros, indicam que

este tipo de avaliação fornece informação integrada da ação dos componentes do material no meio biológico.

As microesferas de lactato de quitosana, como todo material sintético com perspectivas de utilização como biomaterial, devem ser submetidas à avaliação de sua biocompatibilidade. Uma vez que as microesferas são reticuladas em fase vapor pelo glutaraldeído, a presença de resíduos oriundos do processo de reticulação no microambiente biológico (sangue) pode levar à ativação do sistema imunológico do paciente ou mesmo a degeneração celular. Torna-se necessário, portanto, avaliar a citotoxicidade das microesferas de lactato de quitosana levando-se em consideração os métodos *in vitro* de análise, uma tendência atual na Europa e EUA. Os ensaios de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se a viabilidade celular por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição de formação de colônias (ISO, 1992).

Na Figura 27 observa-se que as microesferas de lactato de quitosana apresentam IC50% (índice de citotoxicidade) superior a 100%, portanto não citotóxica, assim como o controle negativo. Por estes ensaios conclui-se que os processos de purificação das microesferas de lactato de quitosana foram eficientes na remoção de componentes tóxicos oriundos da síntese química.

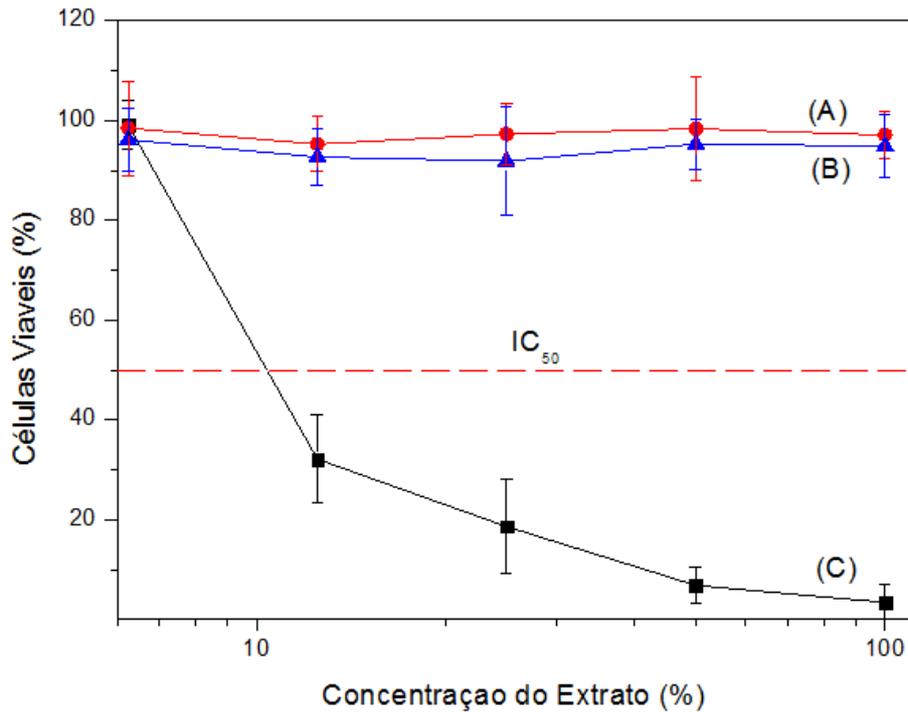


Figura 27: Ensaio de citotoxicidade das microesferas de lactato de quitosana. Controle positivo = fenol a 4% (■), controle negativo = polietileno de baixa densidade (PEBD) (●), microesferas de lactato de quitosana (▲).

### 6.2.2. Ensaio de formação de trombos

A formação de trombos é um processo indesejável, resultante de uma série de reações complexas, envolvendo adsorção de fibrinogênio, ativação e adesão plaquetária, liberação dos fatores da coagulação e deposição de leucócitos e hemácias [96-97]. O resultado final deste processo é a formação de trombos na superfície polimérica. Estes trombos, composto de fibrina e plaquetas agrupadas, podem causar danos no sistema circulatório, como por exemplo, a obstrução de capilares e arteríolas [98-99].

A Figura 28 mostra as curvas que representam a cinética da formação de trombos nas superfícies das microesferas de lactato de quitosana e de lâminas de vidro. Observa-se que a superfície das microesferas de lactato de quitosana é significativamente menos trombogênica que a superfície de vidro utilizada como controle negativo (altamente trombogênica). Ao mesmo tempo, pode ser observado na Figura 28, que a trombogenicidade das microesferas de lactato de quitosana (Fig. 28 B) é muito parecida com a trombogenicidade do silicone grau médico (Fig. 28 C).

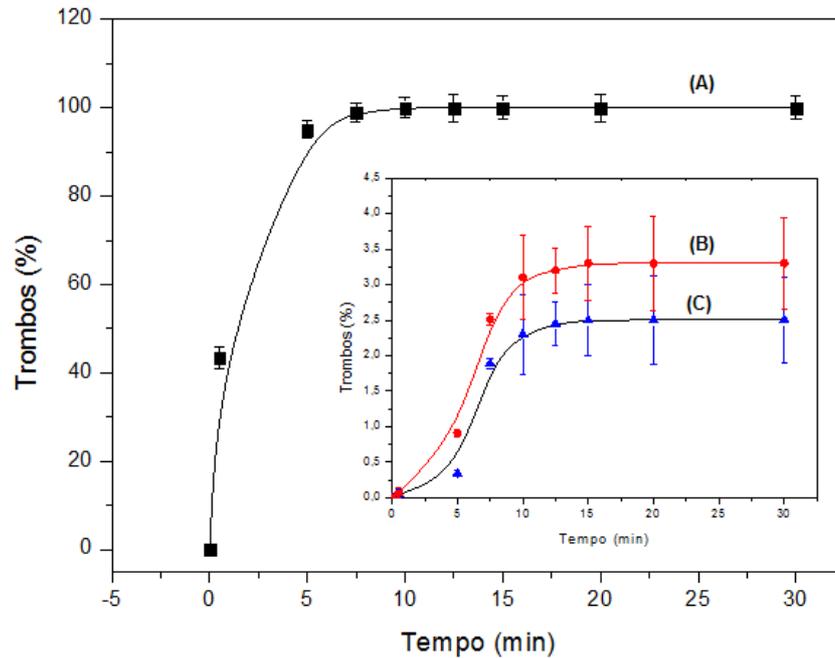


Figura 28: Cinética da formação de trombos nas superfícies das microesferas de lactato de quitosana (B) e do silicone grau médico (C). O vidro (A) foi utilizado como controle negativo (superfície com elevada propriedade trombogênica). O número de amostras ensaiadas foi igual a 3 ( $n=3$ ). Quantidade de estreptoquinase imobilizada na superfície polimérica: 27 mg/g.

Observa-se que as microesferas de lactato de quitosana são estatisticamente menos trombogênicas que o silicone de grau médico, indicando que a estreptoquinase imobilizada parece permanecer significativamente ativa quanto ao processo de fibrinólise de coágulos formados nas superfícies das microesferas.

### 6.2.3 Determinação da atividade hemolítica

As interações entre os biomateriais no sangue podem induzir a lise dos eritrócitos (ou glóbulos vermelhos). Os eritrócitos são células desprovidas de núcleo e de mitocôndrias, o que indica baixa atividade metabólica e, portanto, se comparada com outras células, menor diversidade de biomoléculas em seu citoplasma, sendo seu constituinte principal a hemoglobina [100]. A hemoglobina é facilmente identificada e quantificada devido à presença do grupo heme, o qual confere à hemoglobina uma intensa absorção em torno de 540 nm. A membrana plasmática dos eritrócitos é constituída por uma alta concentração de ácidos graxos

poli-insaturados (cerca de 50%) e proteínas [100]. Portanto, um ensaio importante para avaliação da propriedade hemocompatível de um polímero é a determinação de sua atividade hemolítica.

Os resultados obtidos no ensaio para determinação da atividade hemolítica das superfícies poliméricas estão apresentados na Figura 29. Utilizou-se o vidro como controle positivo [101]. As microesferas de lactato de quitosana apresentaram atividade hemolítica inferior a 2%, o que permite a classificação das microesferas de lactato de quitosana como não hemolíticas [102].

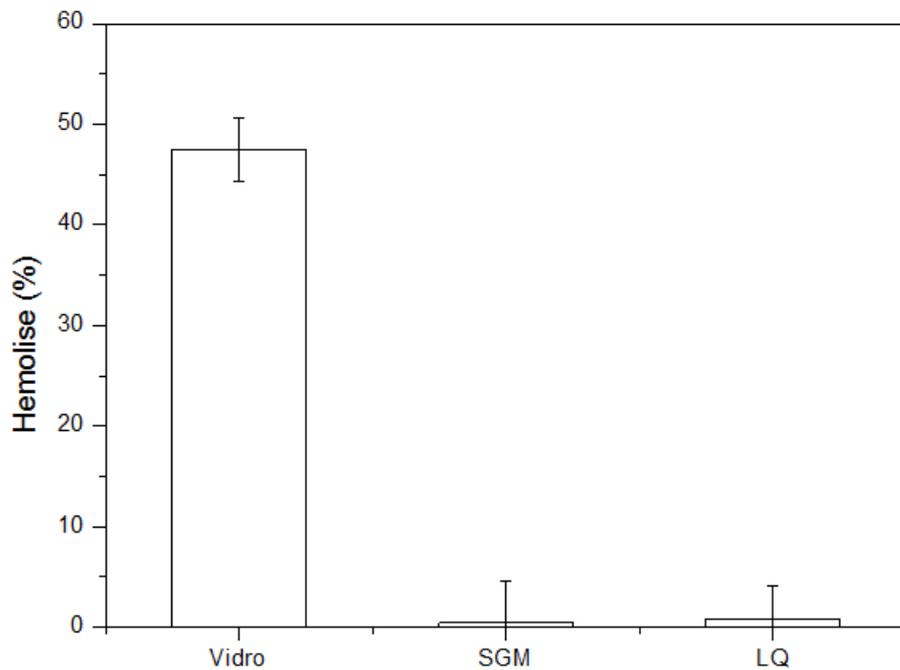


Figura 29: Hemólise das microesferas de lactato de quitosana (LQ). Utilizaram-se como controle positivo o vidro e controle negativo o silicone de grau médico (SGM).

## CAPÍTULO 7: Conclusões

Nesse trabalho, foi sintetizado o lactato de quitosana de forma a se obter um derivado da quitosana, mais solúvel e fácil de ser processado em formas farmacêuticas mais apropriadas para a medicina como sistema de liberação controlada de 5-fluorouracil. Ao mesmo tempo, estudou-se um processo de secagem por *spray dryer* para a obtenção de microesferas de lactato de quitosana para utilização na quimioembolização de tumores. As principais conclusões obtidas são sintetizadas a seguir:

(1) O derivado lactato de quitosana foi sintetizado e caracterizado com sucesso por técnicas espectroscópicas (NMR, FTIR) e termogravimétricas. Nos resultados obtidos através das análises espectroscópicas, comprova-se a reação de esterificação via substituição nucleofílica entre os grupos hidroxilas da quitosana e o ácido láctico. O grau de substituição, calculado por RMN indicou ser igual a 0,87 hidroxilas esterificadas por unidade mérica do biopolímero.

(2) Em relação à morfologia das microesferas de lactato de quitosana, observou-se morfologia homogênea. Todas as microesferas apresentaram um formato esférico com distribuição de tamanho muito próxima da mono dispersividade. Os tamanhos médios das microesferas, determinados pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura, ficaram entre 20 a 80 nm.

(3) Não foi observada aglomeração significativa entre as microesferas, ficando estas bastante dispersas, demonstrando que processo de secagem por spray (*spray-drying*) é conveniente para o preparo de microesferas de lactato de quitosana para quimioembolização de tumores.

(4) As microesferas de lactato de quitosana obtidas pela técnica de *spray-drying* demonstraram estabilidade térmica satisfatória e possuem potencial para utilização em sistemas de liberação controlada de 5-FU.

(5) Os dados de DRX mostram que o derivado lactato de quitosana é mais amorfo que a quitosana, isso ocorre, possivelmente, devido à introdução do lactato na cadeia polimérica da quitosana.

(6) A técnica de *spray drying* mostrou-se viável para a obtenção de microesferas de lactato de quitosana como sistemas de liberação controlada de 5-FU. O processo de reticulação das microesferas com glutaraldeído na fase vapor provocou uma diminuição do efeito *burst* e também um prolongamento da liberação do 5-FU.

(7) O potencial zeta das microesferas de lactato de quitosana aumenta proporcionalmente ao pH e possui valores elevados no pH fisiológico. Um potencial  $\zeta$  alto é importante, pois cria uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal devido às grandes forças repulsivas que tendem a evitar a agregação em função das colisões de micropartículas adjacentes.

(8) As microesferas de lactato de quitosana apresentaram características não citotóxicas, portanto, biocompatíveis e adequadas para utilização em processos clínicos invasivos a exemplo da quimioembolização.

(9) Os resultados dos ensaios de hemocompatibilidade, formação de trombos e atividade hemolítica, indicaram que as microesferas de lactato de quitosana são adequadas para utilização como biomaterial.

## CAPÍTULO 8: Perspectivas Futuras

O 5-fluorouracil (5-FU) é um agente antitumoral que pertence à classe dos anti metabólitos, diferindo da base uracil pela substituição de um átomo de flúor na posição 5 do carbono do anel pirimídico (Figura 30-A). O 5-FU é um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia do câncer e seu mecanismo de ação não está até esse momento completamente esclarecido. A hipótese é que seu metabólito fosforilado, o 5-fluoro-2'- desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) inativa a enzima timidilatosintase (TS), impedindo assim a síntese das timinas e conseqüentemente a síntese do DNA. A literatura tem relatado importantes casos de resistência ao 5-FU no tratamento das neoplasias. Os mecanismos de resistência ao 5-FU podem ser adquiridos ou herdados, estando relacionados de modo geral, à diminuição das enzimas que convertem o 5-FU aos seus metabólitos que resulta na inibição incompleta da enzima TS. Por isso, torna-se necessário a inclusão de um quimioterápico coadjuvante nas microesferas de lactato de quitosana. Acredita-se que, um agente quimioterápico que poderia ser utilizado simultaneamente ao 5-FU seja a doxorubicina (DOX) e o tosilato de sorafenibe (TS).

A DOX (Figura 30-B) é um fármaco da família das antraciclina, utilizado extensivamente na prática clínica pela sua atividade antineoplásica contra diversos tipos de neoplasias, principalmente o carcinoma hepatocelular.

O fármaco TS (Figura 30-C) é um medicamento aprovado pelo FDA e comercializado há cerca de uma década na Europa e EUA. O TS inibe as enzimas tirosina quinases, disparadas de vários receptores associados ao crescimento do tumor. Além disso, o sorafenibe bloqueia a ação das serina treonina quinases, responsáveis pela proliferação dos vasos sanguíneos que alimentam a massa tumoral - ação chamada antiangiogênese. Essas enzimas agem nas células normais quando há falta de oxigênio. No paciente com câncer, como o organismo está desregulado, há uma exacerbação desse processo, fazendo com que o caminho da proliferação fique 'aberto' o tempo todo. Estudos clínicos constataram que o TS retarda o avanço do câncer e chega a aumentar o tempo de vida do paciente sem o crescimento evidente do tumor.

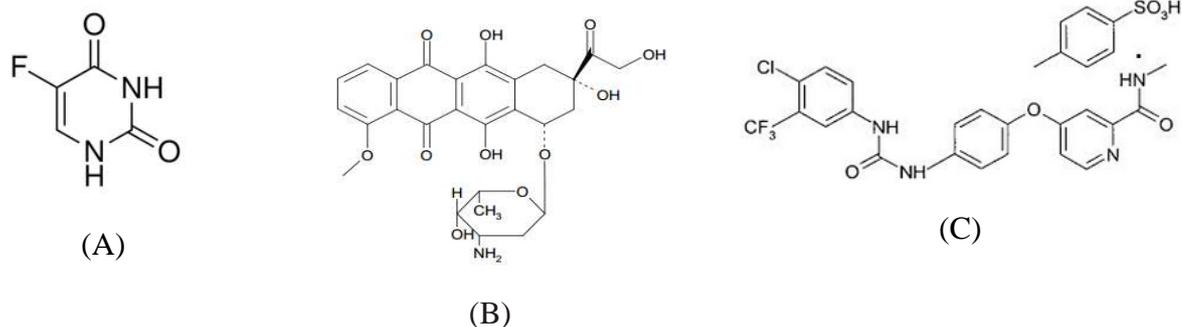


Figura 30: Estrutura química dos quimioterápicos: 5-FU (A), DOX (B) e TS (C).

Em função do exposto, as seguintes perspectivas futuras norteariam a continuidade desse trabalho:

- 1) Incorporar os fármacos doxorrubicina e tosilato de sorafenibe nas microesferas de lactato de quitosana para embolização dos vasos sanguíneos que irrigam tumores malignos hipervascularizados.
- 2) Estudar os efeitos de adsorção do fármaco doxorrubicina e tosilato de sorafenibe nas características das microesferas de lactato de quitosana e na distribuição do fármaco.
- 3) Desenvolver métodos para avaliar a eluição de doxorrubicina e tosilato de sorafenibe de microesferas de lactato de quitosana e efetuar correlações *in vitro* e *in vivo*.
- 4) Desenvolver e caracterizar através de técnicas *in vitro*, um dispositivo de administração de microesferas de lactato de quitosana para quimioembolização transarterial.
- 5) Estudar a farmacocinética e a segurança das microesferas de lactato de quitosana carregadas com doxorrubicina e tosilato de sorafenibe em modelo experimental de embolização arterial.
- 6) Comparar a efetividade das microesferas de lactato de quitosana carregadas de doxorrubicina e tosilato de sorafenibe com a quimioembolização transarterial convencional com lipiodol (éster etílico do ácido graxo do óleo de papoula iodado).
- 7) Analisar a eficiência das microesferas de lactato de quitosana carregadas com doxorrubicina e tosilato de sorafenibe no tratamento coadjuvado da ablação por radiofrequência do carcinoma.

## Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Coordenação Geral de Ações Estratégicas-Coordenação de Prevenção e Vigilância, *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*, Rio de Janeiro, p.25, 2011.
- [2] C. A. Stiller, A. Trama, Serraino D., Rossi S., Navarro C., Chirlique M. D., Casali P. G., *Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE Project*.European Journal of Cancer, 2012. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 de outubro de 2012.
- [3] S. C. Ramzi, K. Vinay, C. Tucker, *Tratado de Patologia Estructural y Funcional de Robins*, 6. ed. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, Cap.19, 2000.
- [4] S. G. Jorge, *Hepatocarcinoma*, 2011. Disponível em: <[http://www.hepcentro.com.br/neoplasia\\_hepatica.htm](http://www.hepcentro.com.br/neoplasia_hepatica.htm)>. Acesso em: 19 de novembro de 2012.
- [5] C. S. Gonçalves, F. E. L. Pereira, L. C. C. Gayotto, *Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995)*Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, vol.39, n.3, p.165 – 170, 1997.
- [6] A. T. Toro, M. L. Sanin, M. C. Navas, *Epidemiologia y factores de riesgo de carcinoma hepatocelular*,p.64, 2007.
- [7] L. C. C. Gayotto, V. A. F. Alves, *Doenças do Fígado e Vias Biliares*, São Paulo: Editora Atheneu, p.994 – 1012, 2001.
- [8] S. G. Jorge, *Hepatite B*,2007. Disponível em: <[http://www.hepcentro.com.br/hepatite\\_b.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm)>. Acesso em 19 de novembro de 2012.

- [9] E. Strauss, *Hepatite C*, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, ed. 8682, p. 69 – 82, 2001.
- [10] M. R. G. Carneiro, L. F. R. Pinto, F. J. R. Paumgarten, *Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista*, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, p. 31 – 33, 1997.
- [11] R. Vilana, A. Forner, A. Garcia, C. Ayuso, C. Bru, *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, staging and treatment strategy*, Elsevier Doyma, ed. 52(5), p.385 – 398, 2010.
- [12] A. Forner, C. Ayuso, M. I. Real, J. Sastre, R. Robles, B. Sangro, M. Varela, M. De La Mata, M. Buti, L. Martí-Bonmati, C. Brus, J. Tabernero, J. M. Llovet, J. Bruix, *Diagnostico y tratamiento del carcinoma hepatocellular*, Revista Medicina Clínica, ed.132, p. 272 – 287, 2009.
- [13] C. Chen, F. Hu, G. Huang, P. Lee, Y. Tsang, A. Cheng, D. Chen, J. Wang J. Sheu, *Applicability of staging for patients with hepatocellular carcinoma is dependent on treatment method – Analysys of 2010 Taiwanese patients*, European Journal of Cancer, ed. 45, p. 1630 – 1639, 2009.
- [14] J. Wang, C. Changchien, T. Hu, C. Lee, K. Kee, C. Lin, C. Chen, T. Chen, Y. Hung, S. Lu, *The efficacy of treatment schedules according to Barcelins Clinic Liver Cancer stagins for hepatocellular carcinoma – Survival analysys of 3892 patients*, European Journal of Cancer, ed. 44, p. 1000 – 1006, 2008.
- [15] J. A. S. Soares, *Alcoolização percutânea no carcinoma hepatocelular: análise crítica da literatura e proposta de indicação do método*, GED gastroenterologia, endoscopia digestiva, ed. 30 (supl. 3), p.10 – 72, 2011.
- [16] J. H. M. Luz, *Avaliação das partículas de polímeros super absorventes (DC-Beads) no tratamento do hepatocarcinoma intermediário e avançado*. 2012. 46p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, Rio de Janeiro, 2012.

- [17] Cartilha de apoio médico e científico ao judiciário, *Sorafenibe para o tratamento de câncer de fígado*, cap. 38, 2009. Disponível em: <[http://www.unimeds.com.br/caju/capitulo\\_38.html](http://www.unimeds.com.br/caju/capitulo_38.html)>. Acessado em 03 de Janeiro de 2013.
- [18] C. Ayuso, J. Rimola, A. Forner, *Técnicas de imagem em el carcinoma hepatocelular: diagnóstico, extension y evaluacion de la respuesta terapeutica*, Revista Gastroenterologia e Hepatologia, ed.33(10), p. 721-726, 2010.
- [19] L. F. Langer, A. M. Gonzales, J. E. Amorim, S. A. Ajzen, *Contribuição da quimiombolização de hepatocarcinomas em pacientes cirróticos na espera pelo transplante hepático*, Radiologia Brasileira, ed. 38(1), p. 1 – 6, 2005.
- [20] P. M. A. Coimbra, *Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*, 2010. 242p. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2010.
- [21] J. S. Henrique, R. S. Falcare, P. S. Lopes, *Sistemas de Liberação Controlada*, Revista Pharmacia Brasileira, p.22, Novembro/Dezembro, 2006.
- [22] M. M. M. Azevedo, *Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos*, 2002. 20p. Monografia – Universidade de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2002.
- [23] V. V. C. Azevedo, S. A. Chaves, D. C. Bezerra, M. V. Liafook, A. C. F. Costa, *Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais*, Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.2.3, p.27 – 34, Campina Grande, 2007.
- [24] M. E. A. Goosen, *Applications of Chitin and Chitosan*, Technomic Publishing Company, Lancaster 1996.

- [25] R. Spin-Neto, C. Pavone, R. M. Freitas, R. A. C. Marcantonio, E. Marcantonio-Junior, *Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura*, Revista de Odontologia da UNESP, ed. 37(2), p.155 – 161, 2008.
- [26] N. M. Alves, J. F. Mano, *Chitosan Derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications*, International Journal of Biological Macromolecules, ed.43, p.401 – 414, 2008.
- [27] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, R. Gurny., *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, ed.57, p.35 – 52, 2004.
- [28] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, R. Gurny, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, ed.57, p.19 – 34, 2004.
- [29] T. G. D. Ribeiro, *Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos Mistos de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> recobertas com quitosana. Estudo da Influência da Dopagem com Gd<sup>3+</sup> nas Propriedades Estruturais e Magnéticas*. 2008. 106p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.
- [30] M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere, *Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico*, Química Nova, ed.32, nº3, p.672 – 678, 2009.
- [31] T. Chandy, C. P. Sharma Chitosan as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs*; 18:1–24, 1990.
- [32] M. Efentakis, K. Stamoylis, *Na Investigation Into the Swelling Properties, Dimensional Changes, and Gel Layer Evolution in Chitosan Tablets Undergoing Hydration*, Advances in Polymer Technology, vol. 28, Nº1, p.32 – 39, 2009.
- [33] R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, *Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences*. *Adv Polym Sci*; 186:151–209, 2005.

- [34] K. H. Bae, C. W. Moon, Y. Lee, T. G. Park, *Intracellular delivery of heparin complexed with chitosan-g-poly(ethylene glycol) for inducing apoptosis*. Pharm Res 26(1): 93-100, 2009.
- [35] Li-Feng Q., Zi-Rong X., Yan L., Xia J., Xin-Yan H., *In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of humangastric carcinoma cell line MGC803 cells*. World J Gastroenterol; 11(33):5136-5141, 2005.
- [36] B. Carreño-Gómez, R. Duncan, *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspher*, Int J Pharm.; 148: 231Y240, 1997.
- [37] B. O. Jung; C. H. Kim; K. S. Choi, Y. M. Lee, J. J. Kim, *Preparation of Amphiphilic Chitosan and Their Antimicrobial Activities*, Journal of Applied Polymer Science, 72: 1713-1719, 1999.
- [38] Queiroz, A. A. A., Ferraz, H. G., Abraham, G. A., Fernandez, M. M., Bravo, A. L., Román, J. S. *Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and in vivo behavior*. Journal of Biomedical Materials Research, v.64, p. 147-154, 2003.
- [39] J. B. E. Mendes, *Desenvolvimento e Avaliação de Micropartículas Poliméricas Contendo Resveratrol*, 2011. 88p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.
- [40] G. Rossanenezi, *Micropartículas Biodegradáveis para Liberação Prolongada Intraocular de Ceterolaco de Trometamina Obtidas por “Spray Drying”*, 2008, 64p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.
- [41] S. S. M. Oliveira, *Preparação e Caracterização in vitro de Micropartículas de Heparina Fracionada Potencialmente Aplicáveis ao Tratamento de Trombose Venosa Profunda*, 2009, 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2009.

- [42] Laser Diffraction. *Malver Instruments*. Disponível em: <<http://www.malver.com>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2013.
- [43] F. Holler, D. A. Skoog, S. R. Crouch, - *Princípios de Análise Instrumental*- Tradução Célio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder ET AL. – 6 ed. – Porto Alegre : Bookman, 2009.
- [44] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle – *Spectrometric Identification of Organic Compounds in United States*: John Wiley & Sons, 2005.
- [45] C. A. Albuquerque; *Modelagem Molecular Aplicada ao Desenvolvimento de Sistemas Nanoscópicos Bioativos*. 2008, 133 f. Tese (Mestrado em Materiais para Engenharia) – UNIFEI, Itajubá.
- [46] C. Benetti, *Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er, Cr: YSGG em tecidos ósseos por espectroscopia ATR-FTIR*, 2010, 119p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2010.
- [47] L. C. Duarte, P. L. Juchem, G. M. Pulz, T. M. M. Brum, N. Chodur, A. Liccardo, A.C. Fischer, R. B. Acauan; *Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros*: Instituto de Geociências, UFRGS, Porto Alegre, 2003.
- [48] P.K. Gallagher, *Thermal Characterization of polymeric materials (Second Edition)*, Ed. E. Turi, Chapter 1, Academic Press, San Diego (EUA) , 1997, p.2.
- [49] J. G. Pereira, F. Okumura, L. A. Ramos, E. T. G. Cavalheiro; *Termogravimetria: Um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovo*, Química Nova, Vol. 32, nº6, p.1661-1666, 2009.
- [50] H. Kahn, *Difração de Raios X*, São Paulo, 2002, 18 p. Apostila do Curso de Difração de Raios X - Método do pó - Escola politécnica da USP.

- [51] S. L. M. Brito, *Síntese, caracterização e modificação superficial de nano partículas de Titanato de Bário produzidas pelo método Pechini*, 2009, 136p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- [52] S. R. Schaffazick, S. S. Guterres, *Caracterização e estabilidade físico – química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos*, Química Nova, vol.26, nº5, p.726 – 737, 2003.
- [53] A. H. Cory, *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. Cancer Comm., v. 3, 207-212, 1991.
- [54] S. O. Rogero et al. *Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias*. Materials Research, v. 6, No. 3, 317-320, 2003.
- [55] International Organization For Standardization. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, Genève, 2009.
- [56] B. D. Ratner, Biomaterial Science - *An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. New York: Elsevier; 2004.
- [57] M. F. Gouzy, C. Sperling, K. Salchert, T. Pompe, U. Streller, P. Uhlmann, C. Rauwolf, F. Simon, F. Böhme, B. Voit, C. Werner, *In vitro blood compatibility of polymeric biomaterials through covalent immobilization of an amidine derivative*. Biomaterials.; 25(17):3493-501, 2004.
- [58] M. Kenny, T. Samuele , I. Joakim, J. Wetterö, M. Textor, L. Lindahl, P. Tengvall. *Whole blood coagulation on protein adsorption-resistant PEG and peptide functionalised PEG-coated titanium surfaces*. Biomaterials, 26(8): 861-872, 2005.
- [59] G. A. F. Roberts, “*Chitin Chemistry*”, The MacMillan Press Ltda, (1992).

[60] S.P.Campana, R. Signini. *Efeitos de aditivos na Desacetilação da Quitina*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, Vol.11, n.4, p.169-173, 2001.

[61] De Queiroz A. A. A., Ferraz H.G., Abraham G.A., Del Mar Fernández M., Bravo A.L., San Román J. *Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and in vivo behavior*. J. Biomed. Mater. Res. 64A: 147-154, 2003.

[62] G. A Everson, *hepatologist's perspective of coagulation disorder before liver transplantation*. Liver TranspSurg, 3(6): 646-652, 1997.

[63]Y. Kang, *Coagulo pathies in hepatic disease*. Liver Transpl, 6(4) S1: S72-S75, 2000.

[64] M. M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. AnaLBiochem. 72:248-54, 1976.

[65] International organization for standardization. *Biological evaluation of medical devices: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. Switzerland: Iso, 2009. (ISO 10993-5).

[66] J. A. Barltrop, T. C. Owen, A. H. Cory, J. G. Cory (1991), "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators", *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 1, 611-614.

[67] Fisiologia da destruição dos eritrócitos. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto-SP. Acesso no site [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca\\_dos\\_eritrocitos/3%20Doen%C3%A7a%20dos%20Eritr%C3%B3citos%20%20Fisiologia%20da%20Destruicao%20dos%20Eritr%C3%B3citos.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca_dos_eritrocitos/3%20Doen%C3%A7a%20dos%20Eritr%C3%B3citos%20%20Fisiologia%20da%20Destruicao%20dos%20Eritr%C3%B3citos.pdf)

- [68] Y. Imai, Y. Nose, *A new method for evaluation of anti thrombogenicity of materials*. J. Biomed. Mater.Res., 6: 165 - 172, 1972.
- [69] S. Henkelman, G. Rakhorst, J. Blanton, Van Oeveren W. *Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials*. Materials Science & Engineering C – Biomimetic and Supramolecular Systems; 29:1650-1654, 2009.
- [70] R. A. Malinauskas. *Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices*. Artificial Organs; 21:1255-1267, 1997.
- [71] Harboe. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry, Scand. Clin. Lab. Invest.; 11:66-70, 1959.
- [72] T. Sannan, K. K. Kurita, Y. Iwakura. *Studies in Chitin, 2. Effect of desacetylation on solubility*. Die Makromolekulare Chemie, 177: 3589 –3600, 1976.
- [73] R. Mohammad, K. Asaai, *Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review*, J Agric. Food Chem., 57, 5, (2009), 1667–1676.
- [74] M. Lavertu, Z. Xia, A.N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M.D. Buschmann, Ajay Gupta. *Validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 32: 1149-1158, 2003.
- [75] K. Wan de Velde, P. Kiekens, *Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state <sup>13</sup>C NMR*, Carbohydrate Polymers, 58, 4, (2004), 409-416.

- [76] K.V. Harish Prashanth, F.S. Kittur and R.N. Tharanathan, *Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. Carbohydrate Polymers* 50 (2002), 27–33.
- [77] Yui, T.; Imada, K.; Okuyama, K.; Obata, Y.; Suzuki, K.; Ogawa, K. *Macromolecules*, 27, (26), 7601-5, 1994.
- [78] G. Shwini, M. Dixit, P. K. Kulkarni, *Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble drug by spray drying using different grade of chitosan. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 231-235, 2011.
- [79] K. Goud, H. Desai, H. J. Park, *Preparation and Characterization of Drug- loaded chitosan–tripolyphosphate microspheres by spray drying. Drug Development Research*, 64: 114–128, 2005.
- [80] De queiroz A. A. A.; Ferraz, H. G., Abraham, G. A. ; Fernández, M. M. ; Bravo, A. L. ; Román, J. S., *Development of new hydroactive dressing based on chitosan membranes: Characterization and in vivo behavior. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, Estados Unidos*, v. 64A, p. 147-154, 2003.
- [81] V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs- Review. International Journal of Pharmaceutics* 274: 1–33, 2004.
- [82] Bogataj, M., Mrhar, A., Grabnar, I., Rajtman, Z., Bukovec, P., Srcic, S., Urleb, U. *The influence of magnesium stearate on the characteristics of muco adhesive microspheres. J. Microencapsul.* 17, 499–508, 2000.

- [83] G. Bonomo, L. Monfardini, P. D. Vigna, G. Orgera, V. Pedicini, F. Orsi. *Does microparticle size affect bland embolization outcomes of local treatment for liver malignancies?* *Vascular Disease Management*, 6 (5): 129-134, 2009.
- [84] K. M Pillai, P. E. McKeever, C. A. Knutsen, P. A. Terrio, D. M. Prieskorn, W. D. Ensminger, *Microscopic analysis of arterial microsphere distribution in rabbit liver and hepatic VX2 tumor*. *Sel CancerTher*; 7:39–48, 1991.
- [85] Y. Zhang, Q. Xue, C. H., Y. Xue, R. C Gao, X. L. Zhang, *Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction*, *Carbohydr Res*, 340, 1914-1917, 2005.
- [86] K. Ogawa, T. Yui, M. Miya, *'Dependence on the Preparation Procedure of the Polymorphism and Crystallinity of Chitosan Membranes'*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 56, 6, 1992, 858 - 862.
- [87] K. Ogawa, T. Yui, *'Crystallinity of partially N-acetylated chitosan'*, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 57, 9, 1993: 1466 - 1469.
- [88] L. George, F. Albert, *X-ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and derivatives*. *J. Phys. Chem.*, 40 (7), pp 863–879, 1936.
- [89] I. Aranaz, M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galedand, A. Heras. *Functional Characterization of Chitin and Chitosan* *Current Chemical Biology*, 2009, 3, 203-230 203
- [90] P. Covas, M. S. Jiménez, *Characterization of silver-binding chitosan by thermal analysis and electron impact mass spectrometry*. *Carbohydr. Polym.*, v. 9, p. 249-256, 1988.

[91] S. R. Schaffazick; S. S. Guterres; L. L. Freitas; A. R. Pohlmann. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, 26(5): 726-737, 2003.

[92] S. R. Schaffazick; S. S. Guterres; L. L. Freitas; A. R. Pohlmann, *Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos*. *Quim. Nova*, 26(5): 726-737, 2003.

[93] D. E. Ramsey, L. Y. Kernagis, M. C. Soulen, J. F. Geschwind, *Chemoembolization of hepatocellular carcinoma*. *J VascInterv Radiol*; 13(9 pt 2):S211-221, 2002.

[94] Lewis A.L., Gonzalez M.V., Lloyd A.W.D.C *bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization*. *J VascIntervRadiol*; 17(2pt 1):335-342, 2006.

[95] ISO (1992). Biological evaluation of medical devices – Part5 – Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. *ISO document 10993*.

[96] B. Furie, B. C. Furie. *Mechanisms of thrombus formation*. *N Engl J Med*; 359: 938-49, 2008.

[97] N. Mackman. *New insights into the mechanisms of venous thrombosis*. *J ClinInvest.*; 122(7):2331–2336, 2012.

[98] J. M. Anderson. *Biological responses to materials*. *Annu. Rev. Mater. Res.*; 31:81–110, 2001.

[99] Gorbet M. B., Sefton M. V., *Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes*. *Biomaterials*; 25(26):5681-703, 2004.

[100] Huang Y. X. , Kang L. L. , Wu Z. J. , Luo M., *Effect of pH on molecular constitution and distribution of hemoglobin in living erythrocyte*. *Biopolymers*. 93(4):348-54, 2010.

[101] W.O. Fenn, *Hemolysis of erythrocytes in contact with glass*. *J Exp Med*. 31;35(2):271-86, 1922.

[102] American Society of Testing and Materials, “*Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials*,” ASTM 756-00, ASTM International, Conshohocken, Pa, USA, 2000.