



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
Instituto Superior Técnico  
Programa Doutoral em Engenharia dos Materiais

## ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Raquel Sofia Cardoso Galante

Versão Original

Orientadora FCF-USP: Professora Doutora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Orientadora IST-UL: Professora Doutora Ana Paula Valagão Amadeu do Serro

Co-orientador IST-UL: Professor Doutor Rogério Anacleto Cordeiro Colaço

Tese especialmente elaborada para obtenção do Grau de Doutor em:

Ciências (FCF-USP) e Engenharia dos Materiais (IST-UL)

São Paulo – Brasil

2017



Raquel Sofia Cardoso Galante

ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

*Comissão Julgadora*

*da*

*Tese para obtenção do Título de DOUTOR*

---

Orientador/Presidente

---

1ºExaminador

---

2ºExaminador

---

3ºExaminador

---

4ºExaminador

São Paulo , \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017



Ficha Catalográfica  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

G146e Galante, Raquel  
Esterilização de hidrogéis para aplicações  
biomédicas / Raquel Galante. - São Paulo, 2017.  
229 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia.

Orientador: Andreoli Pinto, Terezinha de Jesus  
Coorientador: Serro, Ana Paula

1. Esterilização. 2. Hidrogel. 3. Calor húmido.  
4. Irradiação Gama. 5. Ozônio. I. T. II. Andreoli  
Pinto, Terezinha de Jesus , orientador. III. Serro,  
Ana Paula , coorientador.

**Nota:** Este documento foi redigido em português de Portugal, respeitando as regras do acordo ortográfico.



## RESUMO

A esterilidade é um requisito indispensável para a maioria dos biomateriais. Devido à sensibilidade dos hidrogéis, a sua esterilização apresenta-se como um desafio, sobretudo quando estão em causa nanoestruturas ou a presença de fármacos. O objetivo deste trabalho foi estudar os principais efeitos de diversos métodos de esterilização nas propriedades de diferentes tipos de sistemas à base de hidrogel. Além dos métodos convencionais (calor húmido e radiação gama) foi aferida a aplicabilidade da esterilização por ozono, um processo que embora se revele recente e ainda em fase de desenvolvimento, não deixa, no entanto, de ser bastante promissor. Estudou-se uma formulação de hidrogel natural nanoparticulado à base de quitosano (nanogel), com um largo espectro de possíveis aplicações, e duas formulações de hidrogéis sintéticos para aplicações oftálmicas (modelos de lentes de contato convencional e da nova geração de silicone-hidrogel), com e sem fármacos incorporados. Avaliaram-se alterações nas principais propriedades vitais ao bom desempenho e integridade dos materiais. No caso do nanogel: tamanho médio de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, absorvância, morfologia, estrutura química e citotoxicidade. No caso dos hidrogéis sintéticos: intumescimento, propriedades ópticas, permeabilidade iónica, molhabilidade, morfologia e topografia, estrutura química, propriedades mecânicas, citotoxicidade e perfil de libertação dos fármacos. Para garantir a melhor eficácia dos métodos de esterilização, realizaram-se testes de esterilidade após a contaminação intencional das amostras com diferentes cargas dos respetivos indicadores biológicos. A esterilização por calor húmido revelou-se o método mais agressivo, no caso do nanogel, e o menos agressivo para os hidrogéis sintéticos, quer na presença quer na ausência de fármacos. Relativamente à irradiação gama, para o nanogel, verificou-se que a sua resistência à irradiação aumenta consideravelmente na presença de açúcares protetores. Já os hidrogéis sintéticos mostram-se resistentes à técnica, apresentando sinais de degradação evidente apenas para a dose mais elevada (25 kGy). Na presença de fármacos, a irradiação gama mostrou-se inadequada devido à sensibilidade dos mesmos. Os resultados obtidos são promissores no que diz respeito à aplicabilidade da esterilização por ozono, tanto para o nanogel como para os hidrogéis sintéticos, sem fármacos incorporados. Os fármacos sofrem, na generalidade, degradação quando expostos a este agente oxidante. Em suma, face à evidente complexidade dos fatores envolvidos (e.g. natureza, composição e propriedades dos materiais, estabilidade dos fármacos, condições e parâmetros dos processos esterilização), torna-se difícil generalizar os efeitos e prever o resultado dos métodos de esterilização. A escolha do processo mais adequado deve, portanto, ser feita caso a caso.





## ABSTRACT

Sterility is mandatory requirement for most biomaterials. Because of their known sensitivity, hydrogel sterilization poses as a challenge, particularly when it comes to nanostructures or when drugs are incorporated. The main goal of this work was to study the key effects of different sterilization methods on the properties of different types of hydrogel-based systems. In addition to the conventional methods (steam heat and gamma radiation) the applicability of a promising new ozone method was assessed. Two formulations of synthetic hydrogels for ophthalmic applications (representing conventional contact lenses and new generation silicone-hydrogel contact lens), unloaded and loaded with ophthalmic drugs, were studied; and a natural chitosan-based nanostructured hydrogel (nanogel), with a broad spectrum of possible applications. Changes in the essential properties were evaluated. For synthetic hydrogels: swelling, optical properties, ionic permeability, wettability, morphology and topography, chemical structure, mechanical properties, cytotoxicity and drug release profile. For the nanogel: average particle size, zeta potential, polydispersity index, absorbance, morphology, chemical structure and cytotoxicity. In order to ensure the effectiveness of the sterilization methods, sterility tests were carried out after purposely contaminating the samples with different loads of biological indicators. Steam heat sterilization proved to be the most aggressive method for the nanogel, while being the least aggressive for the synthetic hydrogels in the presence and absence of drugs. Regarding gamma irradiation, the nanogel resistance to irradiation increased considerably in the presence of protective sugars. The synthetic hydrogels were resistant to this technique, showing signs of severe degradation only at the highest dose (25 kGy). In the presence of drugs, gamma irradiation proved to be inadequate due to drug degradation. The obtained results were encouraging with regard to the applicability of ozone sterilization for both the nanogel and the unloaded synthetic hydrogels. The drugs generally undergo degradation when exposed to this oxidizing agent. In view of the evident complexity of the factors involved (e.g. nature, composition and properties of materials, drug stability, conditions and parameters of sterilization processes), it is difficult to generalize the effects and predict the outcome of the sterilization methods. The selection of the most suitable procedure must be made on a case-by-case basis.



## **PALAVRAS CHAVE**

Hidrogel, esterilização, calor húmido, irradiação gama, ozono, caracterização.

## **KEYWORDS**

Hydrogel, sterilization, steam heat, gamma irradiation, ozone, characterization



## AGRADECIMENTOS

A boa relação entre um aluno de doutoramento e os seus orientadores é essencial para o desenvolvimento do trabalho com sucesso. Deste ponto de vista, considero-me uma aluna extremamente privilegiada.

À Professora Terezinha, que aceitou com entusiasmo o risco de acolher uma aluna estrangeira, agradeço as inúmeras oportunidades que me proporcionou, mas agradeço especialmente a confiança que me depositou, proporcionando-me todas as condições para a elaboração de um trabalho com motivação e independência.

À Professora Ana Paula e ao Professor Rogério um agradecimento sem limite à confiança, ao incentivo, ao apoio e o acompanhamento permanentes e incondicionais, muitas vezes à distância, sem os quais o início, desenvolvimento e conclusão deste trabalho teria sido impossível.

As diversas colaborações e contributos durante a execução experimental foram fundamentais e mais do que merecedoras do meu total reconhecimento.

Em Portugal, agradeço: à Professora Benilde, por me receber e sempre me fazer sentir em casa no seu laboratório, ao Dr. Luís Pinto (Altakitin) pelo seu apoio e oferta de material, ao Prof. Vitor Alves (ISA), pelo uso do equipamento texturometro, à Eng.<sup>a</sup> Paula Matos (ITN-IST), pela ajuda indispensável nos ensaios de irradiação, à Eng.<sup>a</sup> Isabel Nogueira (IST), pelo rigor na condução das análises por microscopia eletrónica, as empresas BASF e EDOL pelo gentil fornecimento de reagentes.

Ainda em Portugal, um especial e sentido agradecimento a todas as colegas de laboratório, pelo ambiente de trabalho proporcionado, pelo apoio à distância e principalmente pela amizade: Eng.<sup>a</sup> Ana Topete, Eng.<sup>a</sup> Andreia Oliveira, Eng.<sup>a</sup> Andreia Pimenta, Eng.<sup>a</sup> Diana Silva e à Dra. Patrizia Paradiso, a quem agradeço ainda a realização da análise por AFM.

No Brasil, agradeço: a todos os membros do Laboratório CONFAR, a toda a equipa da Brasil Ozônio (em especial Dr. Samy Menasce, Eng.<sup>a</sup> Taís Cecchi e o Rafael), à Prof.<sup>a</sup> Nádía Chacra, pelo acompanhamento durante a fase inicial deste projeto e pelo uso do seu laboratório. Ao Dr. Pablo Vásquez e ao Dr. Paulo Santos (CTR-IPEN) pela colaboração durante nos ensaios de irradiação no Brasil. À Dr.<sup>a</sup> Natália Cerise e à Thaís Aragão, pelo uso do laboratório (IPT), ao André Novaes (United States Pharmacopeia – Brazil), pelo uso do equipamento FTIR-ATR, à Dr. Aurea Cruz (IAL) pela realização dos ensaios de citotoxicidade, ao Dr. Adir Moreira e Dr. Ronaldo Mansano pela ajuda nas análise de microscopia eletrônica, no Brasil (EP-USP).

Agradeço ainda as colegas Dr.<sup>a</sup> Carolina Redigueri, Dr.<sup>a</sup> Daniela Ghisleni, Dr.<sup>a</sup> Marina Souza e Túlia Botelo, por toda a ajuda, cumplicidade e amizade ao longo de deste o percurso.

Um agradecimento pessoal, muito especial, a todos os meus amigos, pelo apoio incondicional, pelo carinho e compreensão, em particular a Filipa, a Carolina, o Hélder e o Luiz Henrique. A vossa amizade tornou tudo muito mais fácil.

A toda a minha família, dos dois lados do Atlântico, mas particularmente à minha tia Helena, cuja ajuda preciosa, em tempos muito difíceis, permitiu que não tivesse de adiar este projeto.

Mas acima de tudo, aos meus queridos pais, Margarida e Hermenegildo, e ao meu querido irmão, Rui, junto a quem encontro sempre amor incondicional, e com quem aprendi tudo o que são hoje as minhas qualidades e virtudes, agradeço-vos por TUDO, pelo agora e para sempre.

Por fim, agradeço ao Vinicius, por ter embarcado nesta aventura comigo, e por, durante todo o caminho, garantir que nunca me falte paz, companheirismo, compressão e amor.

A todos, o meu profundo e sincero muito obrigada

Aos meus queridos pais, Margarida e Hermenegildo, ao meu querido irmão Rui e ao meu marido Vinicius.





## ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
PALAVRAS CHAVE – KEYWORDS	V
AGRADECIMENTOS	VII
LISTA SIGLAS	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS	XXI
FIGURAS	XXV
TABELAS	XXX
<b>1 HIDROGÉIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS - ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>1</b>
1.1 HIDROGEL .....	3
1.2 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DO HIDROGEL.....	5
1.3 PROPRIEDADES DO HIDROGEL .....	7
1.3.1 Hidrogéis nanoestruturados – Nanopartículas de hidrogel (HNP) .....	10
1.3.1.1 Tamanho e dispersão .....	11
1.3.1.2 Potencial zeta .....	14
1.3.1.3 Condutividade e pH .....	15
1.3.1.4 Estrutura química.....	15
1.3.1.5 Morfologia e Topografia.....	17
<i>Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)</i> .....	17
<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i> .....	18
1.3.2 Hidrogéis para lentes de contato .....	19
1.3.2.1 Propriedades ópticas .....	21
1.3.2.2 Capacidade de intumescimento.....	22
1.3.2.3 Permeabilidade ao oxigênio.....	24
1.3.2.4 Permeabilidade Iônica .....	25
1.3.2.5 Propriedades mecânicas .....	27
1.3.2.6 Molhabilidade.....	29
1.3.2.7 Coeficiente de atrito .....	32
1.4 ESTERILIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS .....	34

1.4.1	Processos de esterilização terminal .....	37
1.4.1.1	Esterilização por calor húmido .....	37
1.4.1.2	Esterilização por irradiação gama .....	39
1.4.1.3	Esterilização por ozono .....	41
1.4.1.4	Outros métodos de esterilização .....	44
1.4.2	Esterilização de hidrogéis para aplicações biomédicas .....	46
1.4.2.1	Revisão da literatura .....	48
<b>2</b>	<b>ESTERILIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS DE HIDROGEL DE QUITOSANO</b>	
	<b>71</b>	
<b>2.1</b>	<b>ENQUADRAMENTO .....</b>	<b>73</b>
<b>2.2</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>76</b>
2.2.1	Materiais .....	76
2.2.2	Produção das nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP) .....	77
2.2.3	Caracterização das nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP) .....	78
2.2.3.1	Estrutura química – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier. 78	
2.2.3.2	Tamanho, índice de dispersão e potencial zeta .....	79
2.2.3.3	Condutividade e pH .....	79
2.2.3.4	Morfologia .....	79
2.2.3.5	Absorvância .....	80
2.2.3.6	Reatividade biológica .....	81
2.2.4	Esterilização .....	82
2.2.4.1	Esterilização por Ozono .....	82
2.2.4.2	Esterilização por calor húmido .....	83
2.2.4.3	Esterilização por irradiação gama .....	84
2.2.5	Avaliação da esterilidade .....	86
2.2.5.1	Quantificação do microrganismo pelo método das diluições decimais sucessivas. 86	
2.2.5.2	Contaminação dos hidrogéis e teste de esterilidade .....	88
2.2.6	Tratamento estatístico .....	89
<b>2.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>

2.3.1	Nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP).....	89
2.3.1.1	Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.....	91
2.3.1.2	Morfologia.....	94
2.3.2	Efeito da esterilização por calor húmido .....	96
2.3.3	Efeito da esterilização por irradiação gama .....	97
2.3.4	Efeito da esterilização por ozono .....	105
<b>2.4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>2.5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>3</b>	<b>ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA LENTES DE CONTATO .....</b>	<b>115</b>
<b>3.1</b>	<b>ENQUADRAMENTO.....</b>	<b>117</b>
<b>3.2</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>120</b>
3.2.1	Materiais .....	120
3.2.2	Preparação dos hidrogéis .....	121
3.2.3	Caracterização dos hidrogéis.....	123
3.2.3.1	Transmitância.....	123
3.2.3.2	Intumescimento .....	123
3.2.3.3	Molhabilidade .....	124
3.2.3.4	Propriedades mecânicas .....	124
3.2.3.5	Morfologia.....	125
3.2.3.6	Topografia .....	125
3.2.3.7	Estrutura Química.....	126
3.2.3.8	Reatividade biológica .....	126
3.2.3.9	Coefficiente de atrito.....	126
3.2.3.10	Permeabilidade iónica .....	127
3.2.3.11	Tratamento estatístico.....	127
3.2.4	Esterilização.....	128
3.2.4.1	Ozono.....	128
3.2.4.2	Esterilização por calor húmido.....	128
3.2.4.3	Esterilização por irradiação gama .....	128
3.2.4.4	Avaliação da esterilidade.....	130

<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>130</b>
3.3.1	Efeito da esterilização na transmitância .....	131
3.3.2	Efeito da esterilização na capacidade de intumescimento .....	132
3.3.3	Efeito da esterilização na molhabilidade .....	133
3.3.4	Efeito da esterilização propriedades mecânicas .....	134
3.3.5	Efeito da esterilização na morfologia e topografia.....	136
3.3.6	Efeito da esterilização na estrutura química.....	138
3.3.7	Efeito da esterilização na reatividade biológica.....	139
3.3.8	Efeito da esterilização no coeficiente de atrito .....	140
3.3.9	Efeito da esterilização na permeabilidade iônica .....	142
3.3.10	Avaliação da esterilidade .....	143
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>145</b>
<b>3.5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>147</b>
<b>4</b>	<b>EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS NA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....</b>	<b>149</b>
<b>4.1</b>	<b>ENQUADRAMENTO.....</b>	<b>151</b>
<b>4.2</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>153</b>
4.2.1	Materiais .....	153
4.2.2	Preparação do hidrogel.....	153
4.2.3	Incorporação do fármaco .....	153
4.2.4	Caracterização do hidrogel carregado .....	154
4.2.4.1	Transmitância.....	154
4.2.4.2	Intumescimento .....	154
4.2.4.3	Propriedades mecânicas .....	155
4.2.4.4	Morfologia.....	155
4.2.4.5	Reatividade biológica .....	155
4.2.5	Esterilização do hidrogel carregado .....	155
4.2.5.1	Esterilização por calor húmido.....	155
4.2.5.2	Esterilização por ozono .....	155
4.2.5.3	Esterilização por irradiação gama .....	156

4.2.5.4	Avaliação da esterilidade.....	156
4.2.6	Ensaio de liberação.....	156
4.2.6.1	Quantificação de fármaco liberado.....	157
4.2.6.2	Mecanismo de liberação do fármaco.....	159
4.2.7	Tratamento estatístico.....	159
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>159</b>
4.3.1	Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na transmitância do hidrogel 160	
4.3.2	Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na capacidade de intumescimento.....	162
4.3.3	Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização nas propriedades mecânicas 164	
4.3.4	Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na morfologia.....	167
4.3.5	Efeito da esterilização no perfil de liberação do fármaco.....	167
4.3.6	Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na reatividade biológica. ..	179
4.3.7	Avaliação da esterilidade.....	181
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>181</b>
<b>4.5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>185</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>189</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>149</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL CALORIMÉTRICA.....</b>	<b>151</b>



## LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido Acrílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CHX	Clorexidina
CIETEC	Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia
CRD	Dispositivos médicos de liberação controlada
CS	Quitosano
CS-HNP	Nanopartículas de hidrogel de quitosano
CTR-	Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas
IPEN	Energéticas e Nucleares
DLS	Espalhamento dinâmico de luz <i>Dynamic Light Scattering</i>
EB	Feixe eletrões
e.g.	<i>Exempli gratia</i>
EGDMA	Etileno Glicol dimetacrilato
EtO	Óxido de etileno
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
FE	Farmacopeia Europeia
FTIR-	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier -
ATR	Refletância Total Atenuada
GI	Irradiação gamma
HDEEMA	Hidroxidietoxietil Metacrilato
HEEMA	Hidroxietoxietil Metacrilato
HEMA	Hidroxietil Metacrilato
HNP	Nanopartícula de hidrogel
HPMA	N-(2-hidroxipropil)metacilamida
ISO	Organização Internacional para Padronização
LC	Lentes de Contato
LCT	Lentes de Contato Terapêutica
LEBB	Laboratório de Engenharia Biomolecular e de Bioprocessos
LVF	Levofloxacina



MDEEMA	Metoxietoxidietil Metacrilato
MEEMA	Metoxietoxietil Metacrilato
MEMA	Metoxietil Metacrilato
MMA	Metil metacrilato
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
NVP	N-vinil-2-pirrolidona
OZ	Ozono
PDI	Índice de polidispersidade
PEG	Poli(etileno glicol)
PEGA	Poli(etileno glicol) acrilato
PEGDA	Poli(etileno glicol) diacrilato
PEGDMA	Poli(etileno glicol) dimetacrilato
PEGMA	Poli(etileno glicol) metacrilato
PNSU	Probabilidade de unidade não estéril-probability of non-sterile unit
PHEMA	Formulação hidrogel convencional HEMA/PVP
PMMA	Poli-metil-metacrilato
PoLTF	filme lacrimal pós-lente
PrLTF	filme lacrimal pré-lente
SAL	nível de garantia de esterilidade – sterility assurance level
sCO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono supercrítico
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
SH	Calor húmido
SiHy	Silicone-Hidrogel
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
TML	Timolol
TPP	Tripolifosfato de sódio
TRIS	Formulação silicone-hidrogel Tris/NVP/HEMA
Tris	Tris(trimetilsiloxi)sililpropil metacrilato
TSA	Agar de soja tríptica
TSB	Caldo de soja tríptica
UFC	Unidade formadora de colónia
USP	Farmacopeia do Estados Unidos United States Pharmacopea
UV	Ultravioleta

UV-Vis      Ultravioleta - Visível  
VA          Acetato de vinil



## LISTA DE SIMBOLOS

Abs	Absorbância
A	Área
Bq	Becquerel
%SC	Capacidade de intumescimento
e	Carga do elétron
cm	Centímetro
cP	Centipoise
$^{60}\text{Co}$	Cobalto 60
$\mu$	Coefficiente de atrito
n	Coefficiente de difusão
$D_T$	Coefficiente de difusão translacional
$\lambda$	Comprimento de onda
$n_0$	Concetração iónica
c	Condutividade
kps	Contagens por segundo
$k_B$	Constante de Boltzman
k	Constante de célula
$\epsilon_0$	Constante dielétrica relativa
Da	Dalton
$I_{rup}$	Deformação de rutura
$D_{ef}$	Diâmetro efetivo ou hidrodinamico
$\Delta P$	Diferença de pressão ao longo da interface gás/líquido
D	Dureza
eV	Elétron volt
F	Fluxo
$\vec{F}_a$	Força de atrito
$\frac{dC}{dx}$	Gradiente de concentração
g	Gramma
°	Grau
°C	Grau centígrado
N	Grau de reatividade celular

Gy	Gray
h	hora
$I_0$	Intensidade da luz incidente
$I_t$	Intensidade da luz transmitida
m	Metro
$\mu\text{m}$	Micrometro
mN	Mili Newton
mm	Milímetro
mL	Millitro
min	Minuto
$v_e$	Mobilidade eletroforética
$\epsilon$	Módulo de Young
M	Molar
nm	Nanometro
$^{60}\text{Ni}$	Níquel 60
Z	Número de valência
$\kappa$	Parâmetro de Debye-Hückel
Pa	Pascal
$D_k$	Permeabilidade ao oxigênio
$D_{\text{ion}}$	Permeabilidade iônica
$\epsilon_r$	Permissividade elétrica
$w_h$	Peso do hidrogel hidratado
$w_s$	Peso do hidrogel seco
$\xi$	Potencial Zeta
$r_1$	Raio de curvatura 1
$r_2$	Raio de curvatura 2
$R_a$	Rugosidade
s	Segundo
T	Temperatura
$T_g$	Temperatura de transição
$\sigma_{\text{break}}$	Tensão de rutura
%EWC	Teor de água no equilíbrio
%T	Transmitância

u.a.	Unidades arbitrárias
$\vec{v}$	Vector da velocidade do corpo
$\eta$	Viscosidade
V ou v	Volume



# FIGURAS

## Capítulo 1

- Figura 1-1. Teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar. .... 9
- Figura 1-2. Esquema representativo da distribuição de cargas à volta de uma nanopartícula em contato com líquido. Retirado e adaptado de [www.malvern.com](http://www.malvern.com), último acesso em 25/02/2016) ..... 13
- Figura 1-3. Reprodução do equipamento Zetasizer (A), célula de medição do tamanho e PDI (B), célula de medição do potencial zeta (C). (Retirado e adaptado de [www.malvern.com](http://www.malvern.com), último acesso em 03/05/2017). ..... 13
- Figura 1-4. Espectrómetro FTIR – esquema de funcionamento do modo ATR. 16
- Figura 1-5. Classes de lentes de contato (A), modalidades de utilização (B). . 20
- Figura 1-6. Relação entre permeabilidade ao oxigênio  $D_k$  e teor de água para hidrogéis convencionais (verde) e para silicone-hidrogel (vermelho). Adaptado de <sup>51</sup>..... 25
- Figura 1-7. Representação esquemática da célula de difusão, desenvolvida e utilizada para a medição da permeabilidade iônica das amostras de hidrogel: condutímetro, compartimento receptor; separador central de fixação da amostra de hidrogel, compartimento dador. As setas indicam o movimento dos iões. Em cima, foto da montagem laboratorial. .... 26
- Figura 1-8. Texturómetro (A): foto do equipamento utilizado na realização de ensaios de tração; posicionamento da amostra a ser analisada (B); determinação das propriedades mecânicas: Curva Tensão-Deformação obtida (C). ..... 28
- Figura 1-9. Modulo de Young de lentes de contato comerciais. Adaptado de<sup>57</sup>. ..... 29
- Figura 1-10. Goniómetro: equipamento utilizado na medição do ângulo de contato do hidrogel. Em cima: representação esquemática dos seus componentes, bem como a disposição experimental para a medida pelo método da bolha cativa. Em baixo: foto do equipamento utilizado..... 31
- Figura 1-11. Coeficientes de atrito de lentes de contato comerciais (adaptado de: <sup>57</sup>). ..... 33
- Figura 1-12. Nanotribómetro, detalhes de alguns dos componentes principais e do suporte das amostras adaptado de <sup>65</sup>. ..... 34



Figura 1-13. Métodos de esterilização e/ou desinfecção. ....	37
Figura 1-14. Representação esquemática do funcionamento de um equipamento de autoclavagem. ....	39
Figura 1-15. Representação das instalações do irradiador multipropósito do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Brasil). Imagem gentilmente cedida por Dr. Pablo Vásquez. ....	40
Figura 1-16. Diagrama do processo de funcionamento da esterilização por ozono. ....	43
Figura 1-17. Número de publicações por ano referentes a hidrogéis (azul) comparativamente ao número de publicações referentes à sua esterilização (vermelho). Dados obtidos através do portal <a href="http://apps.webofknowledge.com/">http://apps.webofknowledge.com/</a> . ....	46

## Capítulo 2

Figura 2-1. Estrutura química do quitosano. ....	73
Figura 2-2. Esquema representativo do método de produção das nanopartículas de hidrogel de quitosano. ....	77
Figura 2-3. Esterilizador de Ozono desenvolvido pela Brasil Ozônio. Detalhe evidenciando o interior da câmara de esterilização e o acondicionamento das amostras. ....	83
Figura 2-4. Equipamento utilizado na esterilização por calor húmido. ....	84
Figura 2-5. Irradiador Multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. (Retirado de <a href="http://www.ipen.br">www.ipen.br</a> ). ....	85
Figura 2-6. Dosímetro de perspex utilizado na determinação da dose absorvida. ....	85
Figura 2-7. Ilustração do método das diluições decimais sucessivas. ....	87
Figura 2-8. Indicadores biológicos (BI) autocontidos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> . À direita, o BI como é comercializado, dispondo de uma fita celulósica impregnada de microrganismos e uma ampola azulada contendo o meio de cultura. À esquerda: os BI, depois de submetidos a processos de esterilização. A ampola é quebrada e o meio de cultura entra em contacto com a fita. Após o período de incubação, o meio de cultura permanece azul, indicando	

a ausência de microrganismos viáveis, ou tornar-se-á amarelo indicando crescimento bacteriano. ....	87
Figura 2-9. Foto tirada à câmara de fluxo laminar durante o estudo da letalidade de esporos, com vistas a caracterizar a esterilidade das amostras. ....	88
Figura 2-10. Aspecto visual opalescente da suspensão de CS-HNP (esquerda), comparativamente ao aspecto visual da água (direita). ....	90
Figura 2-11. Espectro de análise FTIR-ATR obtido para CS puro, TPP puro e para CS-HNP, confirmando-se a presença das principais bandas características dos compostos em estudo. ....	91
Figura 2-12. Gráfico de distribuição de tamanhos de uma amostra armazenada por 24 horas, obtido pelo Zetasizer. ....	93
Figura 2-13. Imagens de TEM das CS-HNP. Ponto de difração representado no canto superior esquerdo. ....	95
Figura 2-14. Imagens de SEM das CS-HNP submetidas a secagem por evaporação ao ar, (A- ampliação 80 000x, B- ampliação 300 000x) e a liofilização (C- ampliação 40 000 X , D – ampliação 150 000x). ....	95
Figura 2-15. Dados da análise por Zetasizer relativas as CS-HNP autoclavadas a 100°C: A - Contagem de partículas por segundo; B - distribuição de tamanho; C - PDI. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3). ....	97
Figura 2-16. Espectros de absorbância UV-Vis: A- CS-HNP sem adição de açúcares; B- CS-HNP na presença de glucose; C- soluções de glucose; D- CS-HNP na presença de manitol; E- soluções de manitol. CTRL- não esterilizado; GI: esterilizado por irradiação gama; OZ- esterilizado por ozonização. ....	99
Figura 2-17. Dados da análise por Zetasizer das CS-HNP irradiadas na ausência e presença de açúcares: A- tamanho médio de partícula; B- PDI e C- potencial zeta. As barras de erro correspondem aos desvios padrão (n≥3). ....	101
Figura 2-18. Espectros de análise por FTIR-ATR das amostras CS-HNP antes e após a esterilização (GI: irradiação gama, Oz: ozonização). ....	103
Figura 2-19. Imagens das placas de cultura durante a avaliação do grau de reatividade celular. ....	105
Figura 2-20. Dados da análise por Zetasizer das CS-HNP ozonizadas na presença e ausência de açúcares: A- tamanho médio de partícula; B- PDI e C- potencial zeta. As barras de erro correspondem aos desvios padrão (n≥3)...	106

### Capítulo 3

Figura 3-1. Estrutura molecular dos compostos utilizados na produção dos hidrogéis.....	119
Figura 3-2. Esquema da preparação do molde com a mistura polimérica antes da polimerização. ....	122
Figura 3-3. Vista exterior da Unidade de Tecnologias da Radiação do Instituto Superior Técnico (A); Esquema da câmara de irradiação e respectivo labirinto (B) adaptado de <sup>12</sup> .....	129
Figura 3-4. Espectro de transmitância dos hidrogéis em estudo, antes e depois de sujeitos aos processos de esterilização (A: formulação PHEMA, B: formulação TRIS). (N≥3. Desvio padrão < 1,5%).....	131
Figura 3-5. Efeito da esterilização na capacidade de intumescimento (SC%) PHEMA (N=4) e TRIS (N=4). As barras de erro correspondem ± ao desvio padrão. ....	133
Figura 3-6. Efeito da esterilização na molhabilidade das amostras PHEMA (N=10) e TRIS (N=10). As barras de erro correspondem ± ao desvio padrão. ....	134
Figura 3-7. Efeito da esterilização no modulo de Young das amostras PHEMA e TRIS.....	136
Figura 3-8. Efeito da esterilização na morfologia dos hidrogéis PHEMA e TRIS (ampliação x 1000).....	137
Figura 3-9. Efeito da esterilização na topografia dos hidrogéis PHEMA e TRIS. ....	137
Figura 3-10. Espectros FTIR-ATR das amostras PHEMA (A) e TRIS (B), antes e depois da esterilização.....	139
Figura 3-11. Efeito da esterilização no coeficiente de atrito dos hidrogéis PHEMA e TRIS. ....	142
Figura 3-12. Efeito da esterilização na permeabilidade iónica do silicone-hidrogel TRIS. Ref Min: valor mínimo, reportado na literatura, necessário a uma boa mobilidade de iões e da própria lente.....	143
Figura 3-13. Exemplo ilustrando algumas placas de cultura durante o procedimento de quantificação de UFC de <i>Bacillus pumilus</i> (contagem das placas contendo entre 50-250 UFC).....	144

## Capítulo 4

- Figura 4.1. Estufa de bancada onde se realizaram os ensaios de libertação, ao abrigo da luz..... 157
- Figura 4.2. Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 158
- Figura 4.3. Transmitância do hidrogel carregado com levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) clorhexidina (D), antes e depois dos diferentes processos de esterilização: calor húmido (SH), irradiação gama (GI) e ozonização (OZ)..... 161
- Figura 4.4. Aspecto visual do hidrogel carregado com diclofenac antes (CTRL) e depois de esterilizado por calor húmido (SH), irradiação gama (GI) e ozonização (OZ)..... 161
- Figura 4.5. Capacidade de intumescimento do hidrogel, em água (H<sub>2</sub>O) e nas diferentes soluções de fármaco (LVF: levofloxacina, DCF: diclofenaco; TML: timolol, CHX: clorhexidina), antes e após os diferentes processos de esterilização (SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro representam  $\pm$  desvio padrão. .... 163
- Figura 4.6. Módulo de Young (A), Tensão de ruptura (B) e Dureza (C) dos hidrogéis hidratados (NaCl: em solução salina 0.9%; LVF: em solução de levofloxacina; DCF: em solução de diclofenac; TML: em solução de timolol; CHX: em solução de clorhexidina) antes e depois da esterilização (SH: calor húmido, GI: irradiação gama; OZ: ozonização). As barras de erro representam  $\pm$  desvio padrão)..... 165
- Figura 4.7. Imagem SEM do hidrogel de silicone (Ampliação x3000). .... 167
- Figura 4.8. Perfis de libertação: levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) e clorhexidina, antes e depois da exposição aos diferentes métodos de esterilização ( SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão..... 171
- Figura 4.9. Cromatogramas referentes à libertação de levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) e clorhexidina, antes e depois da exposição aos diferentes métodos de esterilização ( SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão. .... 173

# TABELAS

## Capítulo 1

Tabela 1-1 – Lista de monómeros mais utilizados na síntese de hidrogéis para aplicações biomédicas e/ou farmacêuticas (adaptado de <sup>4</sup> ).....	4
Tabela 1-2 – Testes recomendados para avaliação da segurança e biocompatibilidade de dispositivos médicos, adaptado de <sup>24</sup> .....	8
Tabela 1-3 - Reatividade celular consoante as farmacopeias (FB, FE e USP) 10	
Tabela 1-4 – Esterilização de hidrogéis sintéticos para aplicações biomédicas .....	51
Tabela 1-5 – Esterilização de hidrogéis naturais para aplicações biomédicas.	53
Tabela 1-6 – Esterilização de hidrogéis nanoestruturados para aplicações biomédicas .....	56
Tabela 1-7 - Esterilização de hidrogéis para libertação de fármaco.....	57

## Capítulo 2

Tabela 2-1 – Tamanho médio das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção.....	92
Tabela 2-2 – PDI das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção. ....	92
Tabela 2-3 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção.....	93
Tabela 2-4 – Resultados referentes aos testes de esterilidade e citotoxicidade. ....	104

## Capítulo 3

Tabela 3.1 – Efeito da esterilização na reatividade biológica .....	140
Tabela 3.2 – Eficácia das condições de esterilidade .....	144

## Capítulo 4

Tabela 4.1 – Principais características dos fármacos em estudo. Adaptado de 14. ....	167
--	-----

Tabela 4.2 – Valores obtidos, a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto por Peppas, para o coeficiente de correlação $r^2$ e expoente $n$ . .....	176
Tabela 4.3 – Resultados dos testes de reatividade biológica (N) e dos testes de esterilidade após as contaminações controladas com diferentes cargas do indicador biológico (UFC/mL). .....	180



# **1 HIDROGÉIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS - ESTADO DA ARTE.**

*A informação contida neste capítulo foi parcialmente submetida para publicação no periódico Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials (conceito Qualis 2016: B1 Farmácia, A2 Interdisciplinar).*





## 1.1 HIDROGEL

Atualmente, a definição de maior aceitação para o conceito de biomaterial é aquela que o descreve como “qualquer substância ou combinação de substâncias, à exceção de fármacos, de origem sintética ou natural, que possa ser utilizada por um determinado período de tempo, que aumente, substitua parcialmente ou totalmente um tecido, órgão ou função corpo humano, de maneira a manter ou melhorar a qualidade de vida de um indivíduo” (American National Institute of Health)<sup>1</sup>.

Os hidrogéis são atualmente muito utilizados como biomateriais. Basicamente, são redes poliméricas tridimensionais com a capacidade de reter água ou outros fluidos, em quantidades que podem variar dos 10-20%, até milhares de vezes o seu peso em seco <sup>2; 3</sup>. A sua classificação pode ser feita considerando-se diversos fatores: e.g. com base na natureza dos seus grupos laterais podem ser classificados como neutros ou iônicos; de acordo com estrutura física da rede podem ser caracterizados como amorfos, semicristalinos, estruturas supramoleculares ou agregados hidrocoloidais; tendo por base a sua composição, podem ser classificados em homopolímeros (quando apenas um tipo de monómero é utilizado) ou redes de copolímeros (quando estão em causa combinações de vários polímeros). Relativamente à origem dos monómeros, podem ainda ser naturais, sintéticos ou híbridos <sup>4; 5</sup>.

As suas propriedades especiais (e.g. elevada biocompatibilidade, conteúdo de água, maleabilidade, porosidade), aliadas à possibilidade de poderem assumir diferentes tamanhos e formas físicas (e.g. sólidos moldados, matrizes de pó prensado, micro/nanopartículas, filmes de revestimento, entre outros) fazem do hidrogel o material ideal para simular ambientes biológicos <sup>2</sup>.

Na última década, têm-se desenvolvido e aprimorado métodos de síntese de hidrogéis (ligações cruzadas químicas ou físicas), nos quais pode ser utilizada uma vasta gama de monómeros, naturais ou sintéticos (Tabela 1-1) <sup>6</sup>.

Tabela 1-1 - Lista de monómeros mais utilizados na síntese de hidrogéis para aplicações biomédicas e/ou farmacêuticas (adaptado de <sup>4</sup>).

Origem	Sigla	Monómero
Sintéticos	HEMA	Hidroxietil Metacrilato
	HEEMA	Hidroxietoxietil Metacrilato
	HDEEMA	Hidroxidietoxietil Metacrilato
	MEMA	Metoxietil Metacrilato
	MEEMA	Metoxietoxietil Metacrilato
	MMA	Metilmetacrilato
	MDEEMA	Metoxietoxidietil Metacrilato
	EGDMA	Etileno Glicol dimetacrilato
	NVP	N-vinil-2-pirrolidona
	NIPAAm	N-isopropilacrilamida
	VAc	Acetato de vinil
	AA	Ácido Acrílico
	HPMA	N-(2-hidroxiopropil)metacilamida
	PEG	Poli(etileno glicol)
	PEGA	Poli(etileno glicol) acrilato
	PEGMA	Poli(etileno glicol) metacrilato
	PEGDA	Poli(etileno glicol) diacrilato
	PEGDMA	Poli(etileno glicol) dimetacrilato
Naturais	Quitosano	
	Celulose	
	Alginato	
	Colagénio	

As propriedades físicas finais do hidrogel, como a capacidade de absorção de água, a transparência, a hidrofiliabilidade, a resistência mecânica, a

permeabilidade iónica ou gasosa, entre outras, podem ser ajustadas através da correta combinação entre o método adequado de síntese e a escolha apropriada dos monómeros <sup>7; 8; 9</sup>.

A temática dos hidrogéis é muito vasta e com grande potencial nas áreas da farmácia e biomedicina. Desde a variedade dos materiais envolvidos, dos métodos de produção, do controle das diversas propriedades físico-químicas desejadas, até ao amplo leque de possíveis aplicações e das suas especificidades, é perceptível uma dificuldade na generalização dos conceitos. As relações entre propriedade/funcionalidade desejadas devem ser estudadas em pormenor e desenvolvidas caso a caso.

## **1.2 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DO HIDROGEL**

Os investigadores Wichterle e Lim (1960) são responsáveis pelo desenvolvimento do primeiro hidrogel copolimerizado (HEMA/EGDMA), com vista a aplicações biológicas <sup>10</sup>. Desde então, os hidrogéis surgem em aplicações tão distintas como lentes de contato, revestimentos de material cirúrgico (e.g. luvas cirúrgicas, cateteres, sistemas de drenagem pensos dérmicos, implantes, etc.) <sup>11</sup>

Os hidrogéis, microgéis e nanogéis são atualmente, cada vez mais, vistos como plataformas viáveis para as mais diversas áreas biomédicas cujas funcionalidades aumentam tanto em versatilidade como em complexidade.

Por exemplo, o estudo da utilização destes materiais como veículos de libertação de fármacos/proteínas tem vindo a aumentar nas últimas décadas <sup>12</sup>. Em geral, as estruturas são carregadas com fármacos e depois colocadas em ambiente biológico, em formato de produtos injetáveis, comprimidos, cápsulas,

implantes, pensos dérmicos ou lentes de contato terapêuticas <sup>12; 13; 14; 15</sup>. A incorporação dos fármacos pode ocorrer de diversos modos: por imersão em soluções do fármaco, por impregnação através de fluidos supercríticos, por encapsulação de fármacos em nanoestruturas ou por técnicas de *'imprinting'*<sup>16;</sup>  
17; 18.

A semelhança entre os hidrogéis e a matriz extracelular dos tecidos levou também ao desenvolvimento de estudos sobre a aplicação destes materiais no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Na literatura da especialidade encontra-se uma vasta gama de trabalhos com hidrogéis, destinados às aplicações em diferentes tecidos, desde ósseos até tecidos moles (e.g. músculo, cartilagem, vertebra) <sup>14; 19; 20; 21</sup>.

Outra área de grande interesse, neste sentido, resulta da capacidade de alguns hidrogéis (os *"smart hydrogels"*) responderem a estímulos ambientais (e.g. variações de temperatura/pH, presença de determinadas moléculas) com alterações drásticas de propriedades específicas (intumescimento, permeabilidade, propriedades mecânicas). Os hidrogéis sensíveis a alterações de temperatura constituem, talvez, os mais estudados. Neste caso, o equilíbrio entre as ligações físicas, as ligações de hidrogénio e as interações hidrofóbicas que mantêm as cadeias poliméricas unidas depende da temperatura. Esta dependência, por sua vez, ditará o comportamento da gelificação do material <sup>22;</sup>  
23.

Para se alcançar um produto final eficiente e seguro é importante garantir a biocompatibilidade do material, a sua adequabilidade para o fim pretendido (assegurando as propriedades necessárias a um eficaz funcionamento) e

também a sua segurança biológica, garantindo a esterilidade ou a baixa carga microbiana, consoante a aplicação.

Deste modo, é imperioso escolher criteriosamente um procedimento de esterilização que preserve as propriedades do material. Para tal, impõe-se a necessidade de compreender quais os efeitos que cada método de esterilização pode causar num determinado material, por forma a minimizar a possibilidade de deterioração e ou de alterações indesejáveis do material.

Só assim será possível assegurar se as propriedades vitais ao bom desempenho do produto final são conservadas após o processo de esterilização ou descontaminação utilizados.

A constante evolução da complexidade e funcionalidade dos biomateriais cria novos desafios no que concerne à sua esterilidade e exige a evolução do conhecimento, assim como o acompanhamento atualizado dos procedimentos de esterilização capazes de garantir a sua segurança biológica <sup>3</sup>.

### **1.3 PROPRIEDADES DO HIDROGEL**

A biocompatibilidade é, como se disse, um requisito de qualquer hidrogel destinado para fins biomédicos. Pode ser definida como a interação entre o biomaterial e o seu hospedeiro, de modo a que nenhum dos intervenientes (hospedeiro/material) desenvolva ações indesejadas. Da parte do hospedeiro, pretende-se que não ocorram nem rejeição nem resposta inflamatória aguda. Já da parte do material, pretende-se que este cumpra a função para a qual foi concebido sem provocar desconforto, dor ou reações tóxicas.

A biocompatibilidade é alcançada através de uma conjugação de fatores inerentes às características e propriedades do material.

Tabela 1-2 - Testes recomendados para avaliação da segurança e biocompatibilidade de dispositivos médicos, adaptado de <sup>24</sup>.

Categoria do Dispositivo Médico			Reação Biológica												
Natureza do Contato		Duração do Contacto A: Limitado (≤24h) B: Prolongado (>24h a 30 dias) C: Permanente (>30 dias)	Citotoxicidade	Sensibilização	Irritação/Reatividade intracutânea	Toxicidade sistêmica (aguda)	Pirogenicidade	Toxicidade subcrônica (subaguda)	Genotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade	Toxicidade Crônica	Carcinogenicidade	Toxicidade reprodutiva	Biodegradação
Categoria	Contato														
Dispositivo de superfície	Pele Intacta	A	x	x	x										
		B	x	x	x										
		C	x	x	x										
	Mucosas	A	x	x	x										
		B	x	x	x	o	o	o		o					
		C	x	x	x	o	o	x	x	o		o			
	Superfície comprometida ou não íntegra	A	x	x	x	o	o								
		B	x	x	x	o	o	o		o					
		C	x	x	x	o	o	x	x	o		o	o		
Dispositivo de comunicação extracorpórea	Vias sanguíneas/Indireto	A	x	x	x	x	o				x				
		B	x	x	x	x	o	o			x				
		C	x	x	o	x	o	x	x	o	x	o	o		
	Tecidos+ / Osso / Dentina	A	x	x	x	o	o								
		B	x	x	x	x	o	x	x	x					
		C	x	x	x	x	o	x	x	x		o	o		
	Circulação sanguínea	A	x	x	x	x	o	o <sup>^</sup>							
		B	x	x	x	x	o	x	x	x					
		C	x	x	x	x	o	x	x	x	x	o	o		
Implante	Tecidos+ / Osso	A	x	x	x	o	o								
		B	x	x	x	x	o	x	x	x					
		C	x	x	x	x	o	x	x	x		o	o		
	Sangue	A	x	x	x	x	o		o	x	x				
		B	x	x	x	x	o	x	x	x	x				
		C	x	x	x	x	o	x	x	x	x	o	o		

X = ISO 10993-1: 2009 testes de referência recomendados para consideração à Food and Drug Administration (FDA) \*

O = Testes adicionais recomendados pela FDA para consideração \*

\* Todos os X's e O's devem ser abordados na avaliação da segurança biológica, seja através do uso de dados, testes específicos, ou uma justificação adicional.

+ Tecido inclui fluidos teciduais e espaços subcutâneos

<sup>^</sup> Para todos os dispositivos utilizados em circuitos extracorpóreos

---

Em termos de segurança biológica existem diversos tipos de testes recomendados pelas agências reguladoras (Tabela 1.2). O tipo de teste necessário para a aprovação de um determinado produto está relacionado com a sua aplicação final.

A substituição nos testes dos modelos animais por culturas celulares é uma prática cada vez mais recorrente e incentivada. A citotoxicidade é o teste mais básico e a sua execução responde a um requisito comum para a aprovação de todo o tipo de dispositivos médicos. Neste sentido, o produto será citotóxico se promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. O teste pode ser realizado por diferentes métodos: e.g. contato direto ou difusão em ágar.

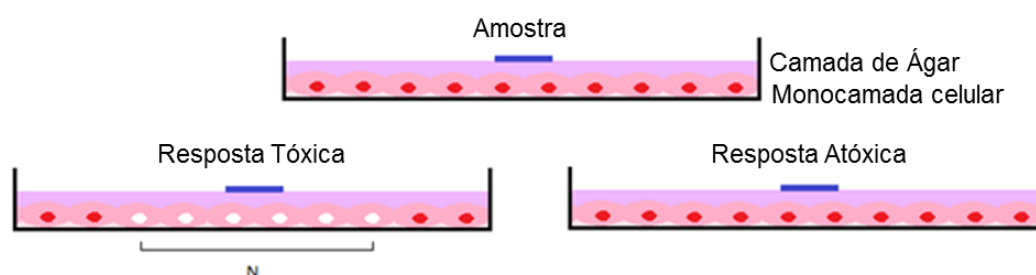


Figura 1-1. Teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.

No teste de difusão em ágar (

Figura 1-1), utilizado neste trabalho, as células encontram-se em monocamada, cobertas por uma fina camada de ágar que lhes confere proteção mecânica. A amostra é então colocada por cima do ágar, sendo que qualquer substância lixiviável potencialmente tóxica se difundirá pelo ágar até às células.

A graduação da reatividade celular (N) é feita através da observação da zona estendida com as células alteradas ou mortas, cujos valores e limites se



encontram harmozinados e definidos nas farmacopeias europeia (EP), brasileira (EB) e americana (USP) (Tabela 1-3).

Tabela 1-3 - Reatividade celular consoante as farmacopeias (FB, FE, e USP)

<b>Grau (N)</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Descrição da reatividade</b>
0	Nenhuma	Ausência de efeito sob a amostra
1	Leve	Alteração ou degeneração celular sob a amostra
2	Suave	Halo claro somente sob a amostra
3	Moderada	Halo entre 0.5-1 cm ao redor da amostra
4	Forte	Halo superior que 1 cm ao redor da amostra

Os hidrogéis devem apresentar outras propriedades específicas, que dependem da aplicação a que se destinam. Seguidamente serão descritas as propriedades relevantes, estudadas neste trabalho, para hidrogéis nanoestruturados e hidrogéis a utilizar em lentes de contato e libertação de fármacos.

### **1.3.1 Hidrogéis nanoestruturados – Nanopartículas de hidrogel (HNP)**

Os nanogéis podem ser definidos como estruturas que compreendem as características dos hidrogéis (e.g. elevada capacidade de retenção de água, biocompatibilidade) ao mesmo tempo que detêm as vantagens de serem nanoestruturados (propriedades físico-químicas únicas atribuídas à sua elevada área superficial em relação ao volume, à forma e estrutura de superfície) <sup>13</sup>.

Estas estruturas têm sido alvo de estudos detalhados com vista a um vasto leque de aplicações biomédicas (e.g. libertação controlada ou direcionada - *target delivery* - de fármacos, proteínas e ADN, engenharia de tecidos e medicina regenerativa) <sup>13</sup>. Embora a bionanotecnologia seja uma área de investigação em crescimento, com resultados promissores, os aspetos de

segurança levantam questões particulares que requerem esclarecimento, sendo necessária especial atenção no controlo das propriedades deste tipo de materiais. Um dos aspetos mais críticos está relacionado com a dificuldade em controlar e prever o comportamento e reação do organismo ao sistema nanoestruturado, em especial para partículas com tamanhos inferiores a 50 nm. Por outro lado, os sistemas nanoestruturados podem também apresentar alterações distintas das sofridas pelos sistemas macroscópicos, quando sujeitos a diferentes agentes físicos ou químicos, como acontece nos processos de esterilização. O tamanho das partículas e o potencial zeta contam-se entre as propriedades mais relevantes a considerar para prever o comportamento de materiais nanoestruturados e avaliar a sua estabilidade. No entanto, outras propriedades como a estrutura química e morfologia das partículas, e o pH e condutividade das respectivas suspensões são também importantes para entender/prever o seu comportamento.

#### **1.3.1.1 Tamanho e dispersão**

O controle do tamanho das nanoestruturas é de extrema importância, pois este parâmetro pode afetar propriedades vitais ao seu desempenho (e.g. óticas, eletrônicas, térmicas, químicas). No campo da nanomedicina, ao tamanho de uma partícula podem ainda estar associadas propriedades críticas como a solubilidade de fármacos, a taxa de absorção pelo tecido alvo, a estabilidade e a viscosidade em suspensão. Há ainda uma correlação entre a diminuição do tamanho de partícula e um aumento na toxicidade, devido à maior área de superfície.

A determinação do tamanho de partícula pode ser feita através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*). O seu princípio de funcionamento passa por fazer incidir um feixe de luz sobre as partículas para posteriormente analisar as flutuações de intensidade da luz espalhada. Através desta análise, utilizando a equação de Stokes-Einstein (Eq. 1-1) e assumindo as partículas como esféricas, é possível calcular o diâmetro efetivo ( $D_{ef}$ ), ou hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio térmico com o solvente:

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T} \quad \text{Eq. 1-1}$$

sendo  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $D_T$  o coeficiente de difusão translacional da partícula (estimado pelo software num passo intermédio). Estando as partículas, em geral, em suspensão, o diâmetro efetivo terá em conta não só o seu tamanho “real” como também a eventual a camada de contra-íões do solvente que possam estar condensados/associados à sua superfície, formando camadas de hidratação (Figura 1-2 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

O Zetasizer (Figura 1 3) faz uso desta técnica (DLS) e é um equipamento muito utilizado na determinação de tamanhos de partículas. Este instrumento vem equipado com um software para a aquisição e análise de dados, capaz de realizar cálculos matemáticos complexos tanto para amostras monodispersas como para formulações polidispersas.

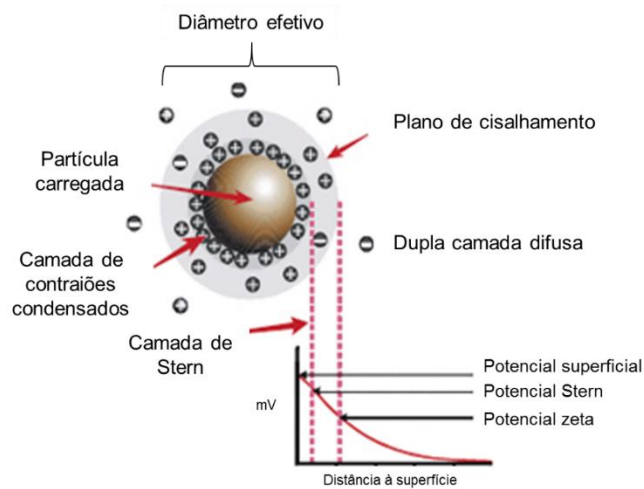


Figura 1-2. Esquema representativo da distribuição de cargas à volta de uma nanopartícula em contato com líquido. Retirado e adaptado de [www.malvern.com](http://www.malvern.com), último acesso em 25/02/2016)

Um dos parâmetros adicionais, calculado pelo software do equipamento, é o índice de polidispersibilidade (PDI). O PDI fornece informação sobre a dispersão de tamanhos na suspensão e é também um indicador valioso para a caracterização das nanoestruturas.



Figura 1-3. Reprodução do equipamento Zetasizer (A), célula de medição do tamanho e PDI (B), célula de medição do potencial zeta (C). (Retirado e adaptado de [www.malvern.com](http://www.malvern.com), último acesso em 03/05/2017).

### 1.3.1.2 Potencial zeta

Outro parâmetro importante é o potencial zeta ( $\xi$ ). Como já referido, quando em contato com um líquido, os materiais nanoestruturados tendem a adquirir carga (e.g. por adsorção/desorção de iões, ionização superficial dos grupos ácidos ou básicos, adsorção de iões, adsorção de surfatantes iónicos). Cria-se, então, uma camada ao redor da partícula, que em movimento Browniano se comporta como sendo parte da partícula. O  $\xi$  define-se como o potencial eléctrico nesta camada (plano de cisalhamento), esquematizado na Figura 1-2..

Este parâmetro está intrinsecamente relacionado não só à estabilidade da suspensão (e.g. tendência para formação de agregados), mas também a outras propriedades ligadas ao desempenho das nanopartículas (e.g. interação com tecidos, adesão, adsorção).

Para medir  $\xi$ , coloca-se uma determinada quantidade da suspensão da amostras numa célula de leitura específica (Figura 1-3 C). A célula contém eléctrodos onde é aplicado um potencial eléctrico. O ZetaSizer determina, na verdade, a mobilidade eletroforética ( $v_e$ ) das partículas em resposta à aplicação desse potencial. Considerando esse parâmetro na fórmula de Smoluchowski (Eq. 1-2), o software calcula o valor do potencial zeta:

$$v_e = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{\xi}{6\pi\eta} (1 + \kappa r) \quad \text{Eq. 1-2}$$

Aqui,  $\epsilon_0$  e  $\epsilon_r$  representam a constante dieléctrica relativa e a permissividade eléctrica do vácuo, respectivamente,  $\eta$  é a viscosidade da amostra,  $r$  o raio da partícula e  $\kappa$  o parâmetro de Debye-Hückel, dado por (Eq. 1-3)<sup>25</sup>:

$$k = \left( \frac{2n_0 Z^2 e^2 \varepsilon_r}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 1-3}$$

Neste caso  $n_0$  corresponde à concentração iónica,  $Z$  à valência do ião,  $e$  à carga do electrão,  $k_B$  constante de Boltzman e  $T$  à temperatura absoluta.

### 1.3.1.3 Condutividade e pH

As propriedades das nanoestruturas, como o tamanho e o potencial zeta são dependentes também da composição e características do solvente utilizado. Assim, a monitorização de parâmetros como a condutividade e o pH das formulações é muito importante na correcta avaliação e interpretação dos resultados obtidos.

A determinação destes parâmetros faz-se, em geral, com recurso a sensores específicos (eléctrodos) que são imersos nas formulações, ou ainda, no caso do pH, recorrendo a papel indicador. A temperatura é um parâmetro que é importante controlar e compensar, especialmente no caso das medidas de condutividade, uma vez que afeta os valores obtidos. Na medição do pH usa-se um eléctrodo de calomelano, enquanto que para a condutividade, usam-se eléctrodos de 2 ou 4 polos (consoante a condutividade for baixa ou alta, respectivamente).

### 1.3.1.4 Estrutura química

A Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR) é uma das mais importantes técnicas instrumentais modernas utilizadas para caracterização estrutural de materiais. Trata-se de uma técnica bem

estabelecida que auxilia tanto em operações de rotina de avaliação e controle de qualidade, quanto na identificação da formação/presença de determinados grupos funcionais nos compostos analisados. A FTIR centra-se no facto da energia absorvida por uma molécula aquando da incidência de radiação infravermelha ser convertida em energia vibracional, já que essa radiação não possui energia suficiente para provocar transições eletrónicas. O seu funcionamento tem por base o princípio do interferómetro de Michelson. Neste tipo de equipamento, o feixe de radiação é separado em dois, sendo que uma parte é encaminhada para um espelho fixo, enquanto que a outra incide sobre a amostra. Após a reflexão final e percorridos trajetos diferentes, os dois feixes encontram-se e sofrem interferência. Os dados provenientes dos atrasos de um feixe em relação a outro originam o denominado interferograma. Os espectros são então obtidos pelo cálculo da transformada de Fourier do referido interferograma.

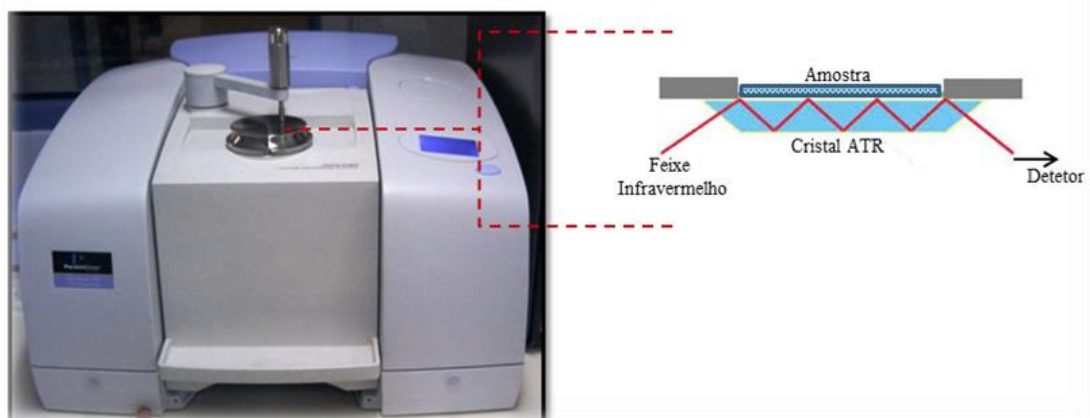


Figura 1-4. Espectrómetro FTIR – esquema de funcionamento do modo ATR.

Para este trabalho a caracterização química estrutural dos hidrogéis foi realizada em modo de Refletância Total Atenuada (ATR), método em que uma pequena quantidade de amostra é colocada em contato direto com o cristal de

ATR (Figura 1-4). O feixe infravermelho penetra o cristal ATR sendo refletido, pelo menos uma vez, a partir da sua superfície em contato com a amostra. Durante a reflexão gera-se uma onda atenuada (*evanescente wave*), que por sua vez incide no material em análise. O registo dos dados é feito sem necessidade de qualquer preparação química ou destruição da amostra.

### **1.3.1.5 Morfologia e Topografia**

#### ***Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)***

O microscópio eletrónico de varrimento (SEM, do inglês scanning electronic microscopy) é um instrumento que faculta a observação e caracterização da superfície de materiais numa escala micro/nanométrica. O seu funcionamento envolve a formação de um feixe de eletrões acelerados por uma diferença de potencial que pode ir de 0,1 keV a 50 keV. A focagem do feixe é facilitada por conjuntos de lentes magnéticas, capazes de concentrar, na superfície da amostra, um spot de eletrões com diâmetro variável entre 1 a 10 nm.

Da interação do feixe eletrónico com a amostra resultam diversos tipos de sinal, que podem ser convertidos em imagens da superfície. Um dos sinais habitualmente utilizados deriva das colisões inelásticas ocorrentes durante a interação do feixe primário de eletrões com átomos da amostra. Neste processo, os eletrões da amostra recebem energia suficiente para serem libertados, facto que possibilita a sua propagação pelo material, sendo, por isso, designados por eletrões secundários.

Outro tipo de sinal utilizado em SEM resulta dos eletrões retrodifundidos. Estes são eletrões do feixe incidente que, ao penetrarem na amostra, sofrem



colisões elásticas com os átomos da mesma e são desviados para fora da amostra com uma energia praticamente igual à energia incidente. A probabilidade de ocorrerem estas colisões elásticas aumenta com o número atómico, Z, dos átomos da amostra. Assim sendo, através da detecção dos eletrões retrodifundidos é possível evidenciar, na amostra, zonas com diferentes números atómicos, obtendo-se contraste químico, ou seja, quanto maior o Z, mais clara aparecerá a zona da amostra na imagem obtida.

Esta técnica é uma das mais utilizadas para caracterização de superfícies/partículas, pela facilidade com que permite obter imagens com ampliações que variam entre 10 e 80000x.

### ***Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)***

A caracterização de materiais por microscopia eletrónica de transmissão (TEM, do inglês transmission electronic microscopy), permite não só visualizar a sua morfologia em diferentes modos de imagem, com elevada resolução espacial, como também fazer uma análise química da composição elementar das amostras.

Na TEM, um feixe de eletrões ao atravessar a amostra sofre diversos tipos de espalhamento que dependem das características do material.

As interações do feixe com o material geram raios-X característicos que, combinados através de uma lente objetiva, fornecem informações sobre a morfologia, estrutura cristalina, defeitos, etc. A imagem obtida por TEM corresponde então ao mapeamento da distribuição de intensidade dos eletrões, resultante da interação dos feixes transmitidos e espalhados através da amostra.

### 1.3.2 Hidrogéis para lentes de contato

As lentes de contato (LC) encontram-se entre os dispositivos médicos mais utilizados e bem aceites na sociedade, constituindo uma das primeiras aplicações biomédicas dos hidrogéis <sup>9</sup>. Verifica-se, desde o final do século XIX, uma considerável evolução nos biomateriais usados nas LC. Entre 1888 e 1940, materiais como o vidro e o poli-metil-metacrilato (PMMA) foram explorados na criação das primeiras lentes, mas o elevado desconforto resultante da sua utilização levou os investigadores a enveredar por outros caminhos, os hidrogéis <sup>26; 27</sup>.

A primeira grande contribuição nesta área decorre da já mencionada pesquisa do Professor Otto Wichterle, que deu origem à criação das primeiras LC compostas de hidroxietil metacrilato (HEMA), monómero hidrofílico capaz de originar um hidrogel com 40% de água <sup>27</sup>. A baixa permeabilidade ao oxigénio deste tipo de lentes (atualmente chamadas de convencionais) estimulou o interesse no desenvolvimento de novas soluções para obter materiais mais permeáveis <sup>28</sup>. O silicone revelou ser um material interessante, visto que no seu estado puro possui uma permeabilidade bastante elevada <sup>27</sup>, criando-se, assim, as primeiras lentes de contato de silicone-hidrogel.

Ao nível mundial, estima-se que existam, atualmente, cento e quarenta (140) milhões de utilizadores de lentes de contato <sup>29</sup>. As lentes de silicone-hidrogel (SiHy) correspondem a 68% das lentes utilizadas (Figura 1-5 A) sendo a modalidade de utilização mensal a mais representativa (Figura 1-5 B) <sup>30</sup>.

Além da correção da acuidade visual ou função estética, existem outras funções reservadas a estes dispositivos.. Um exemplo são as lentes de contato terapêuticas (LCT) que compreendem funções de alívio da dor, manutenção da

hidratação, assim como de fornecimento de proteção mecânica e suporte estrutural, que proporcionam a regeneração mais rápida de tecidos lesados <sup>31</sup>; <sup>32</sup>.

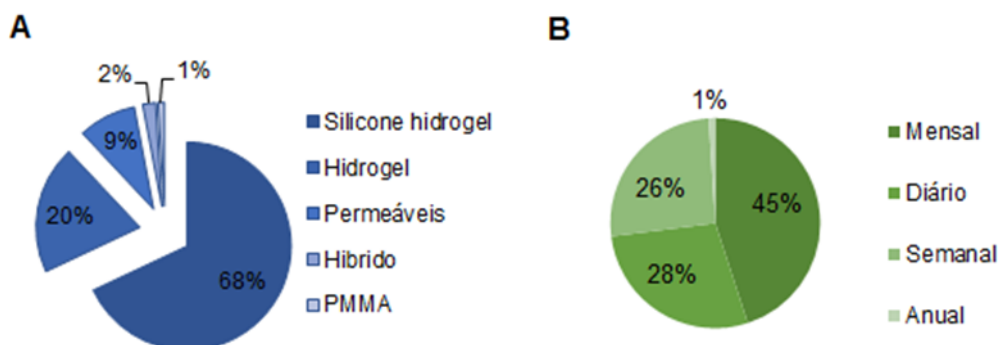


Figura 1-5. Classes de lentes de contato (A), modalidades de utilização (B).

Mais recentemente tem sido equacionada a possibilidade de utilizar estes dispositivos como meio de libertação controlada de fármacos, em virtude da sua comprovada biocompatibilidade e elevado tempo de contacto com o olho. Na literatura recente sobre este assunto existem diversos trabalhos nos quais se estudam os perfis de libertação a partir de lentes de contato de diversas composições, carregadas com recurso às mais variadas técnicas: e.g. imersão em soluções concentradas dos fármacos, impregnação por fluidos supercríticos, imobilização de camadas de lipossomas carregados à superfície, incorporação de nanopartículas contendo o fármaco ou incorporação do fármaco antes da polimerização <sup>33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41</sup>. A libertação de fármacos a partir de LCT possui um grande potencial a ser explorado, tendo presente que, perante um perfil adequado à patologia, se maximizará a biodisponibilidade do fármaco, evitando, assim, a necessidade das repetidas aplicações dos colírios e minimizando os efeitos secundários provocados pela absorção sistémica indesejável. Esta alternativa às formas de tratamento tradicionais tem

despertado grande interesse entre a comunidade clínica e científica. No entanto, até à data, ainda não existe no mercado este tipo de dispositivos médicos.

Devido ao contato direto com o olho estes materiais seguem o mesmo tipo de regulamentação a que estão sujeitos os implantes médicos <sup>42</sup>. A lente de contato ideal deve ser atóxica, capaz de permitir uma visão clara e permanente, manter um filme lacrimal estável, ser permeável ao oxigénio de modo a garantir o bom metabolismo da córnea, e também aos iões para assegurar a mobilidade da lente sobre a superfície ocular e o conforto desejado.

Seguidamente descrevem-se os fundamentos associados à determinação das principais propriedades das lentes de contacto. A informação referente ao estudo da estrutura química e a morfologia/topografia dos materiais, propriedades também relevantes neste caso por se relacionar com outras, como a molhabilidade, coeficiente de atrito ou adesão de biomoléculas, foi já apresentada nas secções 1.3.1.4 e 1.3.1.5.

### **1.3.2.1 Propriedades ópticas**

Os hidrogéis para lentes de contato devem ser transparentes de modo a garantir a máxima acuidade visual possível. Como tal, a sua transmitância, na zona do comprimento de onda da luz visível deve ser igual ou superior a 90% <sup>27</sup>. Adicionalmente, alguns materiais oferecem ainda proteção à radiação ultravioleta (UV), podendo ser rotulados como sendo de Classe 1, quando bloqueiam 96% dos raios UVA e 100% UVB; ou de Classe 2, quando bloqueiam 70% de UVA e 95% de radiação UVB)<sup>43; 44</sup>.

O aparelho normalmente utilizado para a determinação da transmitância é o espectrómetro UV-Vis. O procedimento inicia-se fazendo chegar a radiação

de um determinado comprimento de onda ao detetor, sem o feixe ter sido interceptado pela amostra. Em seguida, introduz-se a amostra e repete-se o procedimento. Deste modo, é sentida pelo detector uma alteração na intensidade da luz.

O cálculo do valor percentual da transmitância da amostra é então calculado pelo software do aparelho tendo em conta a Eq. 1-4:

$$\%T = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \quad \text{Eq. 1-4}$$

Onde  $I_0$  é intensidade da luz incidente e  $I_t$  a intensidade da luz transmitida.

É ainda desejável que o índice de refração das lentes seja próximo do da córnea (1.37). Esta propriedade está intimamente ligada ao conteúdo de água, obtendo-se valores entre 1.43-1.48 para lentes com 20% de água e 1.37-1.38 para lentes com 75% <sup>27</sup>.

### 1.3.2.2 Capacidade de intumescimento

A propriedade que melhor define o hidrogel reside na sua capacidade de absorção e retenção de água. Quando um hidrogel, no seu estado seco, entra em contato com uma solução aquosa, a sua rede começa a expandir. Esta expansão ocorre devido à elevada absorção de água, que pode suceder por diversos mecanismos: por capilaridade, por osmose, por resultado da compatibilidade termodinâmica existente entre as cadeias do polímero e as moléculas água, tornadas possíveis graças à presença de grupos químicos hidrofílicos e.g.  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  <sup>5; 11; 22</sup>.

A tendência para absorver água é contrabalançada pela força retrativa induzida pelas ligações cruzadas (*crosslinks*) da rede polimérica <sup>22</sup>. O equilíbrio

é alcançado no momento em que se estabelece igualdade entre as forças envolvidas nestes processos <sup>45; 46</sup>. Para além da natureza química dos monómeros, outras características importantes controlam diretamente a capacidade de intumescimento de um hidrogel, como o grau de ligações cruzadas e a existência de poros na matriz, na medida em que a água é suscetível de ligação direta às cadeias poliméricas, ou simplesmente ocupa os espaços criados pelos poros <sup>46</sup>.

A capacidade de intumescimento (%SC) de um hidrogel é dada pela Eq. 1-5:

$$\%SC = \frac{w_h - w_s}{w_s} * 100\% \quad \text{Eq. 1-5}$$

Onde  $w_s$  é o peso do hidrogel seco,  $w_h$  o peso do hidrogel do seu estado hidratado. O teor de água no equilíbrio (EWC), por sua vez, é dado por Eq. 1-6:

$$\%EWC = \frac{w_h - w_s}{w_h} * 100\% \quad \text{Eq. 1-6}$$

A determinação do teor de água bem como a cinética envolvida no processo de absorção da mesma são fatores de elevada relevância para o estudo do comportamento dos hidrogéis e, em particular, para aplicações biomédicas. Por um lado, a permeabilidade de um hidrogel ao oxigénio é fortemente condicionada, especialmente no caso das lentes convencionais, pelo teor de água, dado que a difusão através da água constitui o mecanismo exclusivo de transmissão do oxigénio (ver secção seguinte). Lentes que apresentem percentagens de água na ordem dos 73% revelam uma permeabilidade duas vezes superior à das lentes com 55% de água, e estas apresentam o dobro do valor das lentes com 38% <sup>28</sup>. Por outro lado, a libertação

de um fármaco a partir da matriz de um hidrogel é fortemente influenciada pela capacidade de intumescimento do mesmo, uma vez que a quantidade de água presente na matriz irá afetar a difusão do fármaco <sup>47; 48</sup>. Tipicamente, as lentes comercializadas têm teores de água entre 20 e 75% <sup>27</sup>.

### 1.3.2.3 Permeabilidade ao oxigénio

A permeabilidade ao oxigénio ( $D_k$ ) é uma das características a ter em elevada conta para a saúde do olho, sendo especialmente relevante no caso das lentes de uso prolongado. Considerando-se que o espaço deixado entre a lente e a córnea é muito pequeno e contém um reduzido volume de fluido lacrimal, a maior parte do oxigénio que atinge a córnea deverá permear através do material da lente, para evitar hipoxia.

Nas LC convencionais, como se referiu anteriormente, a transmissão de oxigénio verifica-se através da fase aquosa, pelo que existe uma relação entre o EWC do material e a permeabilidade oxigénio, dada pela Eq. 1-7 <sup>49</sup>:

$$D_k = 1.67e^{0.0397EWC} \quad \text{Eq. 1-7}$$

No caso de LC de SiHy, os compostos de silicone permitem melhor transmissão do oxigénio do que as lentes convencionais, pelo facto de, além da difusão do gás através da água, o oxigénio se poder ligar aos grupos siloxano<sup>50</sup>. Este segundo mecanismo produz incrementos muito significativos na permeabilidade ao oxigénio dos materiais, constatando-se que as lentes SiHy apresentam permeabilidades entre 70 e 150 barrer<sup>Ψ</sup> que se contrapõem aos valores da

---

<sup>Ψ</sup> Barrer é uma unidade não-SI de permeabilidade ao gás (especificamente, a permeabilidade ao oxigénio) comumente utilizada na indústria de lentes de contato (1 Barrer =  $10^{-11}$  (cm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>) cm cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> mmHg<sup>-1</sup>)

ordem dos 10-40 barrer das lentes convencionais. A Figura 1-6 mostra a relação entre a permeabilidade ao oxigénio ( $D_k$ ) e o teor de água dos hidrogéis (EWC) convencionais e SiHy <sup>27</sup>.

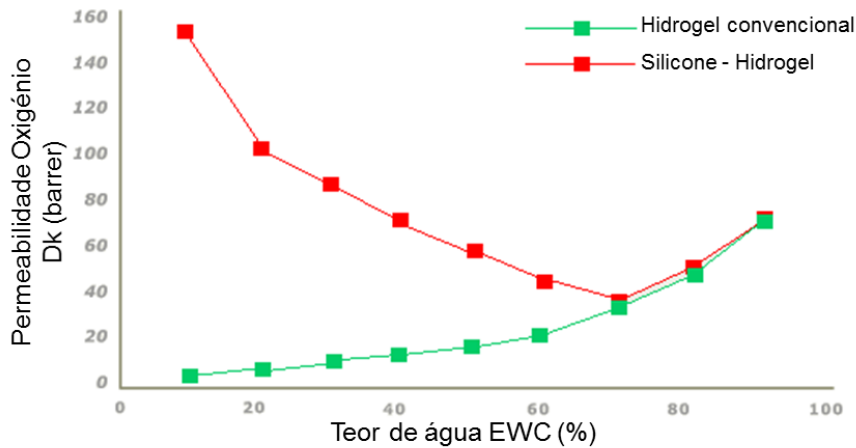


Figura 1-6. Relação entre permeabilidade ao oxigénio  $D_k$  e teor de água para hidrogéis convencionais (verde) e para silicone-hidrogel (vermelho). Adaptado de <sup>51</sup>.

#### 1.3.2.4 Permeabilidade Iónica

Os hidrogéis convencionais, em especial os de elevado teor de água, possuem fases aquosas que permitem tanto o transporte de oxigénio como o transporte de iões. Já os SiHy possuem uma fase polimérica altamente eficaz para o transporte de oxigénio, e uma fase aquosa que garante a presença de água e um nível crítico de mobilidade de iões <sup>52</sup>.

A colocação de uma LC divide o filme lacrimal em duas camadas: uma mais externa que se sobrepõe à lente, chamada de filme lacrimal pré-lente PrLTF (*Pre-Lens Tear Film*), e a camada entre a superfície posterior da lente e a córnea, denominada filme lacrimal pós-lente (PoLTF) (*Post-Lens Tear Film*). Para



conforto e segurança do utilizador é essencial que a LC se movimente e permita a troca e renovação do fluido lacrimal, em especial do PoLTF, de modo a evitar a acumulação de detritos, que por sua vez possam induzir situações críticas inflamatórias <sup>29; 53</sup>.

O valor da permeabilidade iónica pode ser determinado experimentalmente com recurso a um condutivímetro capaz de medir a condutância (G) de soluções. A condutividade (c), por sua vez, é obtida multiplicando-se G pelo valor da constante de célula do sensor (k) (distância dos eléctrodos do sensor / área efetiva dos mesmos).

A Figura 1-7 mostra a célula de difusão utilizada na determinação da permeabilidade iónica dos hidrogéis, que consiste num compartimento receptor contendo um determinado volume de água destilada e desionizada, um separador central onde é fixada a amostra e um compartimento dador, com um determinado volume de solução salina (NaCl 0.9%).

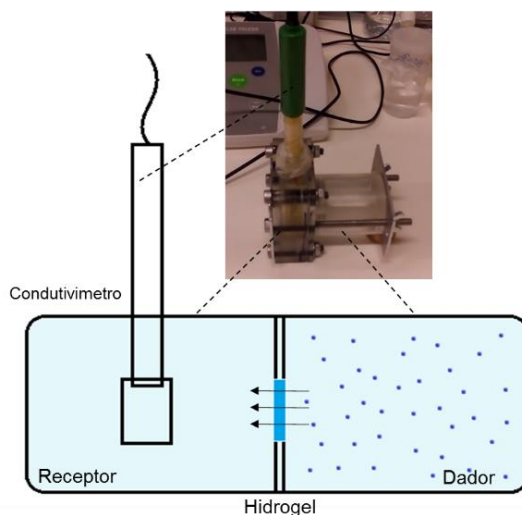


Figura 1-7. Representação esquemática da célula de difusão, desenvolvida e utilizada para a medição da permeabilidade iónica das amostras de hidrogel: condutivímetro, compartimento receptor; separador central de fixação da

amostra de hidrogel, compartimento dador. As setas indicam o movimento dos iões. Em cima, foto da montagem laboratorial.

O condutímetro é colocado no compartimento dador e os valores de condutividade são obtidos ao longo do tempo. A partir de uma reta de calibração é possível converter os valores de condutividade em valores de concentração de NaCl (C). O fluxo de transporte de iões (F) corresponde ao declive regressão linear dos dados de concentração vs tempo. A permeabilidade iónica  $D_{ion}$  é obtida resolvendo-se a equação da Lei de Fick (Eq. 1-8):

$$\frac{F.V}{A} = D_{ion} \frac{dC}{dx} \quad \text{Eq. 1-8}$$

Na qual V representa o volume de solução no compartimento recetor, A representa a área da secção reta efetiva da amostra e  $dC/dx$  representa o gradiente de concentração inicial, entre os compartimentos.

### 1.3.2.5 Propriedades mecânicas

As tensões associadas ao manuseio e utilização de LC (aplicação e remoção repetida, movimento ocular ou ação da pálpebra) podem causar deformação ou rutura da lente e, conseqüentemente, prejudicar o desempenho ótico, provocar desconforto ou mesmo resultar na completa desintegração do material <sup>54</sup>.

O grau de conforto está associado à flexibilidade do material, à capacidade de adaptação à curvatura da córnea e ao seu comportamento perante aos movimentos oculares. No entanto, uma LC demasiado flexível torna-se difícil de manipular, além de originar um fraco desempenho ótico. O aumento da rigidez, por sua vez, torna a lente mais resistente à utilização diária, contudo, quando em excesso, pode induzir complicações oculares resultantes de irritação

mecânica (e.g lesões epiteliais, conjuntivite papilar, distúrbios na produção de mucina)<sup>55</sup>.

Como já mencionado anteriormente, no caso de SiHy, quanto maior o teor de silicone, maior será a permeabilidade ao oxigênio, mas também maior será a rigidez do material <sup>56</sup>. Isto acontece visto que a presença de silicone reduz o teor de água, atuando como um plastificante interno.

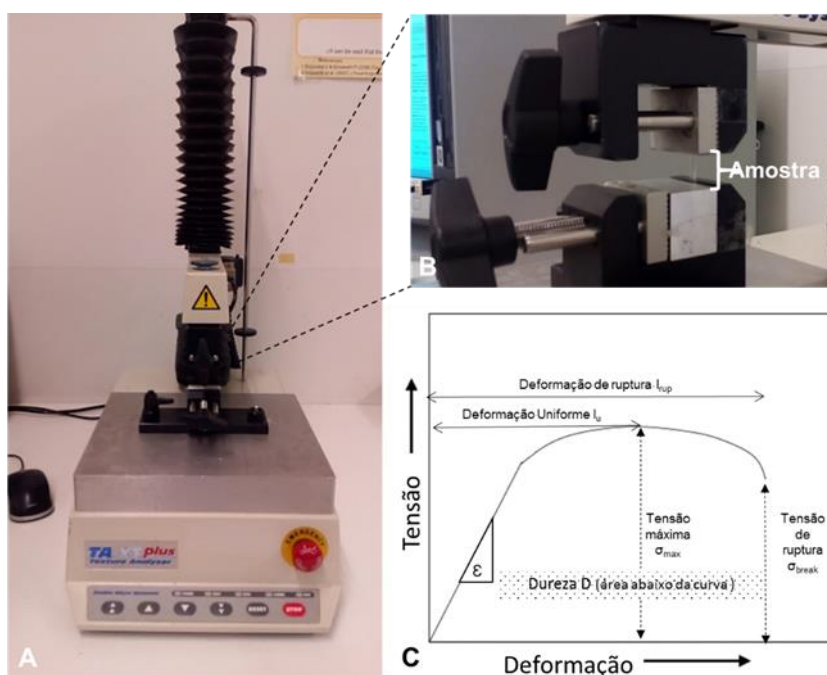


Figura 1-8. Texturómetro (A): foto do equipamento utilizado na realização de ensaios de tração; posicionamento da amostra a ser analisada (B); determinação das propriedades mecânicas: Curva Tensão-Deformação obtida (C).

As propriedades mecânicas de hidrogéis para LC podem ser aferidas através da realização de testes de tensão. Para tal, secções do material hidratado são cortadas, sendo-lhes aplicada uma tensão de tração (Figura 1-8**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Como resposta à aplicação da tensão, o material irá alongar-se até à sua rutura. Da curva de tensão-deformação obtida durante o ensaio é possível determinar

parâmetros tais como: módulo de elasticidade ( $\epsilon$ ) ou módulo de Young, tensão de ruptura ( $\sigma_{break}$ ), deformação na ruptura ( $I_{rup}$ ), dureza (D).

Em geral, é esperado que o módulo de Young dos materiais para lentes de contato seja da ordem do mega pascal (Figura 1-9 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

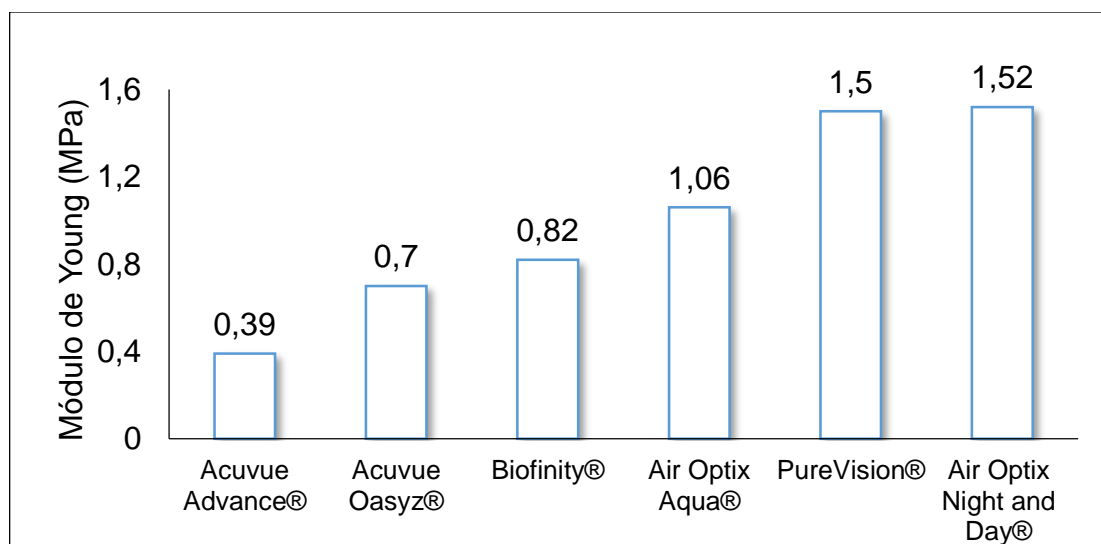


Figura 1-9. Módulo de Young de lentes de contato comerciais. Adaptado de <sup>57</sup>.

### 1.3.2.6 Molhabilidade

As características superficiais de uma LC determinam a sua capacidade de originar uma boa interação com o fluido lacrimal e, conseqüentemente, a sua biocompatibilidade relativamente ao ambiente ocular e grau de conforto que proporcionam ao utilizador <sup>58; 59</sup>.

A molhabilidade de um material está relacionada com a tendência de um determinado líquido para se espalhar na sua superfície. No caso das lentes de contato, a determinação da sua molhabilidade pela água providencia informação sobre a capacidade que o líquido lacrimal terá de se espalhar e manter-se na superfície da mesma. Estes dados são importantes no que se refere à previsão

do desempenho *in vivo* da lente, uma vez que a eventual falha no cumprimento dos pré-requisitos neste campo poderá influir na capacidade da lente proporcionar uma camada de líquido lacrimal estável, resultando daí desconforto, um fraco desempenho visual, bem como a acumulação de depósitos <sup>27; 58; 60</sup>. Além disso, lentes com características de molhabilidade inadequadas podem causar danos na córnea, desencadeando uma resposta inflamatória <sup>61</sup>. A capacidade de originar um filme lacrimal pré-lente de qualidade permite também equacionar o desempenho da lente, no que diz respeito ao atrito existente entre a pálpebra e a superfície do hidrogel, visto que o atrito depende da lubrificação do sistema ocular <sup>60</sup>.

A determinação do ângulo de contato pode ser feita utilizando um goniómetro, através de dois métodos diferentes: gota séssil ou bolha cativa. Os resultados obtidos diferem muitas vezes com o método utilizado, devido à reorganização superficial dos grupos químicos do material <sup>27</sup>, já que nas medidas realizadas pelo método da gota séssil devem ser usadas amostras secas e as medidas realizadas pelo método da bolha cativa são feitas com as amostras equilibradas com o meio líquido. No caso de hidrogéis para LC, o método da bolha cativa apresenta as condições de medição que mais se aproximam do sistema biológico, uma vez que o hidrogel se encontra hidratado e em contacto com o líquido, tal como no ambiente ocular.

Na Figura 1-10 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** encontra-se representado o equipamento e montagem experimental usados na medição do ângulo de contacto pelo método da bolha cativa. A determinação do ângulo de contato é feita de modo indireto, já que este método se baseia na equação de

Laplace da capilaridade, que relaciona a forma da gota e a tensão superficial do líquido (Eq. 1-9):

$$\Delta P = \gamma_{lv} \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{Eq. 1-9}$$

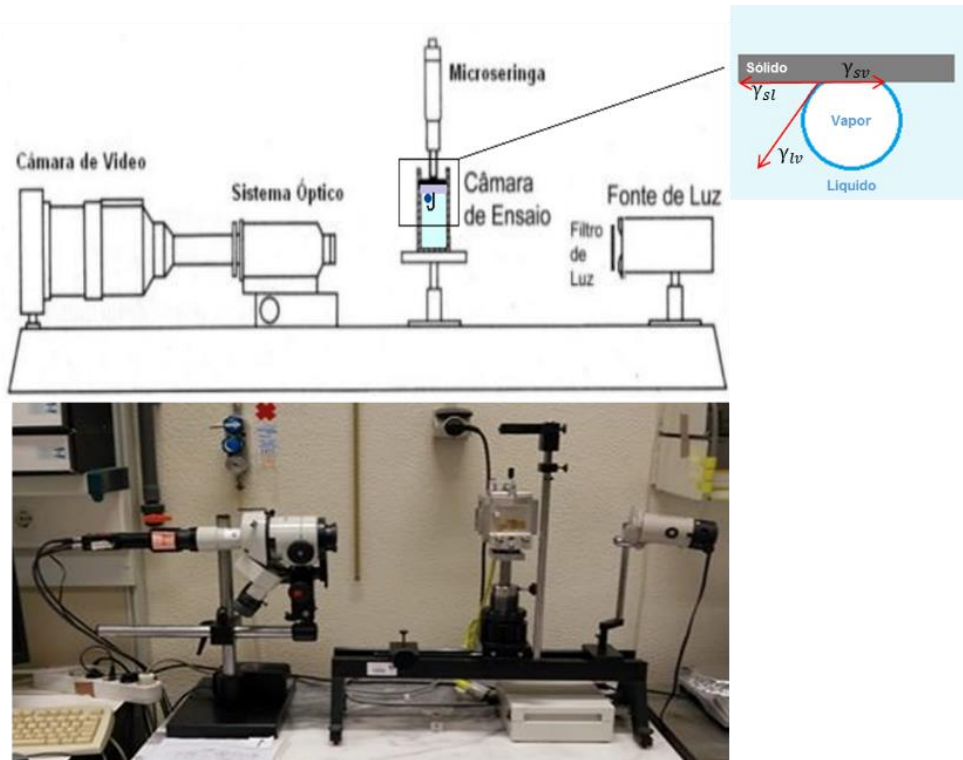


Figura 1-10. Goniómetro: equipamento utilizado na medição do ângulo de contato do hidrogel. Em cima: representação esquemática dos seus componentes, bem como a disposição experimental para a medida pelo método da bolha cativa. Em baixo: foto do equipamento utilizado.

Na expressão mencionada,  $\Delta P$  representa a diferença de pressão ao longo da interface gás/líquido e  $r_1$  e  $r_2$  correspondem aos dois raios de curvatura da interface da gota. Em condições onde apenas exista ação da força da gravidade, é possível descrever a equação de Laplace, utilizando um sistema apropriado de coordenadas, como um conjunto de equações diferenciais de 1ª ordem, as quais se encontram dependentes de parâmetros tais como: o ângulo de contato, a aceleração da gravidade ou a diferença entre as densidades das fases líquida e gasosa. Este cálculo foi realizado com base no algoritmo ADSA-

P (Axisymmetric Drop Shape Analysis-Profile), que minimiza o desvio entre a curva de Laplace teórica e uma série de pontos arbitrários pertencentes ao perfil da gota.

### 1.3.2.7 Coeficiente de atrito

Quando duas superfícies deslizam uma sobre a outra, ocorrem interações entre as respectivas asperezas, que contrariam esse movimento. A força de atrito,  $\vec{F}_a$ , decorrente dessas interações tem a mesma direção, mas sentido oposto ao vetor velocidade do corpo  $\vec{v}$  (Eq. 1-10):

$$\vec{F}_a = -\mu \frac{\vec{v}}{\|\vec{v}\|} \quad \text{Eq. 1-10}$$

O coeficiente de proporcionalidade é designado por coeficiente de atrito ( $\mu$ ). Durante o pestanejar, a pálpebra desliza sobre a superfície ocular, aplicando tensões normais e de corte sobre uma lente de contato, fazendo com que esta se mova, gire ou se distorça <sup>62</sup>.

O desconforto relatado pelos utilizadores de lentes de contato está relacionado com diversos fatores como a desidratação (olho seco), a adsorção de proteínas ao material das lentes e também com os fenómenos tribológicos decorrentes do movimento da pálpebra durante o pestanejar <sup>63</sup>.

A presença de uma lente de contato no olho altera as forças de atrito atuantes, alterando-se também a sensação do utilizador a cada pestanejar <sup>64</sup>. Na literatura da especialidade, é possível encontrar trabalhos nos quais se formulam hipóteses clínicas de uma relação entre o conforto e o atrito, ou seja, diferentes coeficientes de atrito resultariam em diferentes graus de conforto <sup>63</sup>.

Neste sentido, é desejável que hidrogéis para aplicações de lentes de contato sejam desenvolvidos de modo originar coeficientes de atrito baixos, proporcionando conforto para o utilizador (Figura 1-11).

O parâmetro coeficiente de atrito ( $\mu$ ), entre dois corpos, pode ser estimado num nanotribómetro, onde é possível impor condições que simulem de perto aquelas que se observam no sistema biológico <sup>65</sup>.

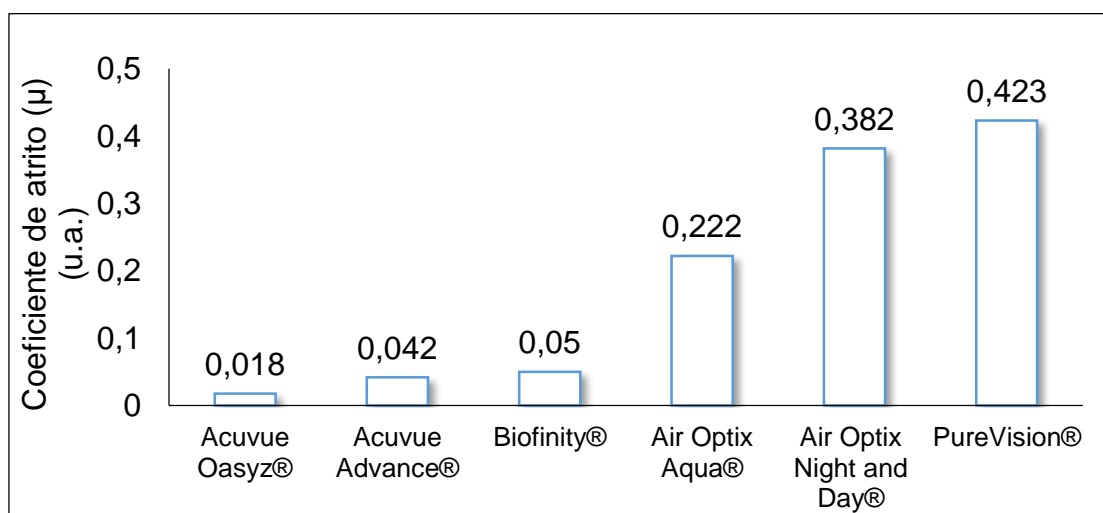


Figura 1-11. Coeficientes de atrito de lentes de contato comerciais (adaptado de: <sup>57</sup>).

O princípio de funcionamento de um nanotribómetro passa por pressionar uma superfície, em geral esfera ou disco, contra outra superfície plana, sob influência de uma força pré-definida, e, ao mesmo tempo, provocar o movimento relativo entre os dois corpos, estabelecendo-se *a priori* os valores da velocidade, da amplitude do movimento e da duração do ensaio.

Basicamente, o nanotribómetro (Figura 1-12) é composto por um cantilever, ao qual se encontra fixo o contra corpo (no presente caso, uma esfera de PMMA), constituído por uma dupla mola; o atuador piezoeléctrico, responsável pelos movimentos do cantilever e pela aplicação da força definida; o transdutor de força e os dois sensores de deslocamento de fibra ótica. O



coeficiente de atrito é determinado durante o ensaio através da medição da deflexão do braço do cantilever quando corpo e contra-corpo se encontram em movimento relativo. No presente caso os ensaios foram realizados em condições lubrificadas, usando uma célula de líquidos, para mimetizar as condições do olho.

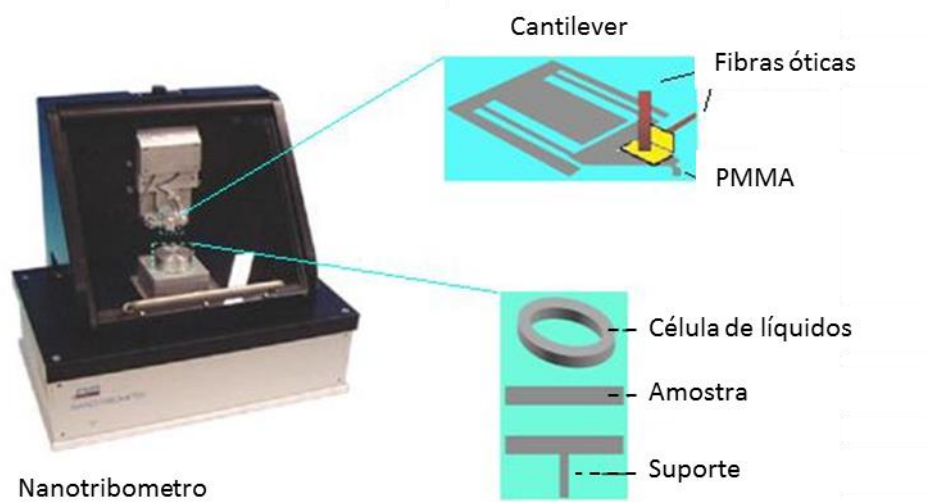


Figura 1-12. Nanotribômetro, detalhes de alguns dos componentes principais e do suporte das amostras adaptado de <sup>65</sup>.

## 1.4 ESTERILIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Como já se referiu, a esterilização de biomateriais constituintes de dispositivos médicos ou formulações destinadas a estar em contato direto com os fluídos/tecidos biológicos é essencial para garantir a sua segurança biológica. Para o controle de qualidade nesta área, torna-se importante definir previamente os termos limpeza, desinfecção e esterilização.

A limpeza corresponde à remoção de elementos indesejáveis das superfícies dos materiais (por exemplo, solo, sujidade, pó, materiais orgânicos e inorgânicos) <sup>66</sup>.

A limpeza completa (geralmente realizada com água com detergentes ou produtos enzimáticos) é crucial antes da desinfecção e esterilização de alto nível, uma vez que a presença de componentes inorgânicos e orgânicos nas superfícies pode interferir na eficácia destes processos <sup>66</sup>.

A desinfecção de um objeto, feita geralmente pelo uso de produtos químicos líquidos ou pasteurização húmida, consiste em remover/inativar a grande maioria dos microrganismos patogénicos, com exceção dos esporos bacterianos <sup>66</sup>.

A esterilização é um processo que promove a completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos. A esterilidade de qualquer item isolado de um determinado lote não pode ser demonstrada, pelo que se utilizam meios probabilísticos para definir garantia da esterilidade de um lote de produto. <sup>67</sup>.

O nível de garantia de esterilidade, ou *sterility assurance level* (SAL), de um processo de esterilização, traduz a segurança com que o processo em questão esteriliza um conjunto de itens <sup>68</sup>. Este valor expressa a probabilidade de um produto permanecer não estéril após o processo de esterilização. Dificuldades na interpretação deste conceito têm levado à adoção da terminologia direta de probabilidade de unidade não estéril (PNSU – *probability of non-sterile unit*) <sup>68</sup>.

Regra geral, o valor máximo de PNSU admitido para classificar um dispositivo médico, cuja aplicação compreenda contato direto com a corrente sanguínea, é de  $10^{-6}$ , o que significa que a probabilidade de o material não se encontrar estéril após o tratamento é de um em um milhão. <sup>69; 70; 71</sup>.

Um produto estéril pode ser obtido através de um processo de produção assético, ou por esterilização terminal. Num processo assético, todos os componentes do produto, tais como matérias-primas, fármacos, recipientes e lacres, são primeiro expostos a métodos de esterilização, separadamente. O produto final resulta da reunião de todos os componentes em condições operacionais assépticas, de modo a manter a esterilidade do produto e evitar contaminação microbiana <sup>68</sup>.

A produção assética, além encarecer todo o processo de produção, uma vez que requer pessoal treinado e ambientes de trabalho com especificidades bastante exigentes, não confere a segurança de um método de esterilização terminal <sup>68; 72</sup>.

Assim, esta metodologia apenas deverá ser considerada na eventualidade do produto provar ser incompatível com processos de esterilização terminal <sup>67; 73</sup>.

Na esterilização terminal, o produto é esterilizado no seu recipiente final, e não são necessárias etapas adicionais, obtendo-se um produto pronto a ser utilizado após o processo. Elimina-se assim o risco de re-contaminação do produto.

Os métodos de esterilização actualmente disponíveis (Figura 1-13) podem ser divididos em físicos, químicos e físico-químicos. Os primeiros incluem a esterilização pelo calor (húmido ou seco), esterilização por radiação ionizante (e.g. raios gama ou feixe de electrões), esterilização por filtração ou vibração (ultra-sons). Os métodos químicos envolvem a exposição a agentes químicos esterilizantes, e.g. peróxido de hidrogénio, óxido de etileno (EtO), ozono. Nos

métodos físico-químicos a esterilização é conseguida através da combinação da acção de agentes físicos e químicos, em simultâneo.

Em seguida, serão referidos com maior detalhe, os métodos de esterilização utilizados neste trabalho.

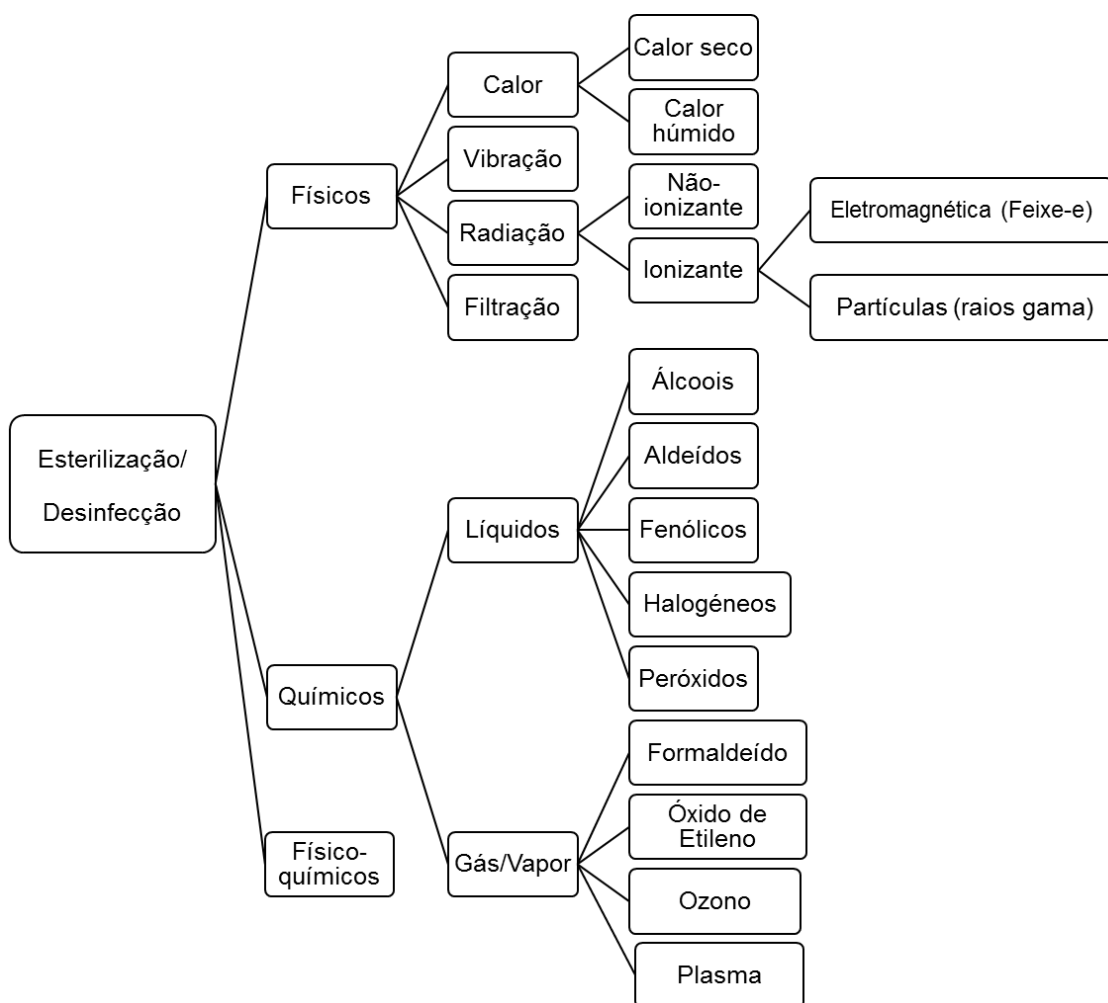


Figura 1-13. Métodos de esterilização e/ou desinfecção.

## 1.4.1 Processos de esterilização terminal

### 1.4.1.1 Esterilização por calor húmido

A esterilização por calor húmido é normalmente realizada numa autoclave (Figura 1-14) e consiste na exposição dos materiais a vapor de água saturado a

uma pressão superior a  $2 \times 10^5$  Pa e temperatura mínima de 121 °C, durante 15-30 min <sup>74</sup>. Estas condições levam à destruição de componentes metabólicos e estruturais de enzimas essenciais dos microrganismos. Este método é bastante utilizado na esterilização de instrumentos cirúrgicos e implantes metálicos, devido à sua eficácia, simplicidade, baixo custo e ausência de formação de resíduos tóxicos. As condições acima descritas, típicas de uma autoclavagem, podem ser flexibilizadas com alterações dos parâmetros, para compatibilizar com determinados grupos de materiais sensíveis. Neste sentido, é necessário determinar valores característicos para controlar o processo de esterilização e garantir a sua eficácia. e.g.:

- valor-D (min): tempo de exposição necessário para a redução de 90% da população microbiana;

- valor-Z (°C): elevação da temperatura necessária para reduzir o valor-D em 90%;

- $F_0$  (min): letalidade mínima requerida, ou número de minutos, a uma determinada temperatura, a que a carga deve ser aquecida <sup>68</sup>.

Estes parâmetros são calculados experimentalmente através da realização de testes de cinética de inativação e resistência de cargas biológicas conhecidas <sup>68</sup>

No entanto, ainda assim, na maioria dos casos persistem elevadas temperaturas e níveis de pressão significativos, impossibilitando a aplicabilidade do método quando os materiais que constituem os implantes/dispositivos e respetivos invólucros são polímeros ou adesivos que se podem degradar/alterar significativamente ou fundir nas condições de processamento. É o caso de muitos hidrogéis. Outra das desvantagens do processo de esterilização por calor

húmido reside no facto de conduzir a um aumento do teor de contaminantes orgânicos nas superfícies esterilizadas <sup>75; 76</sup>.

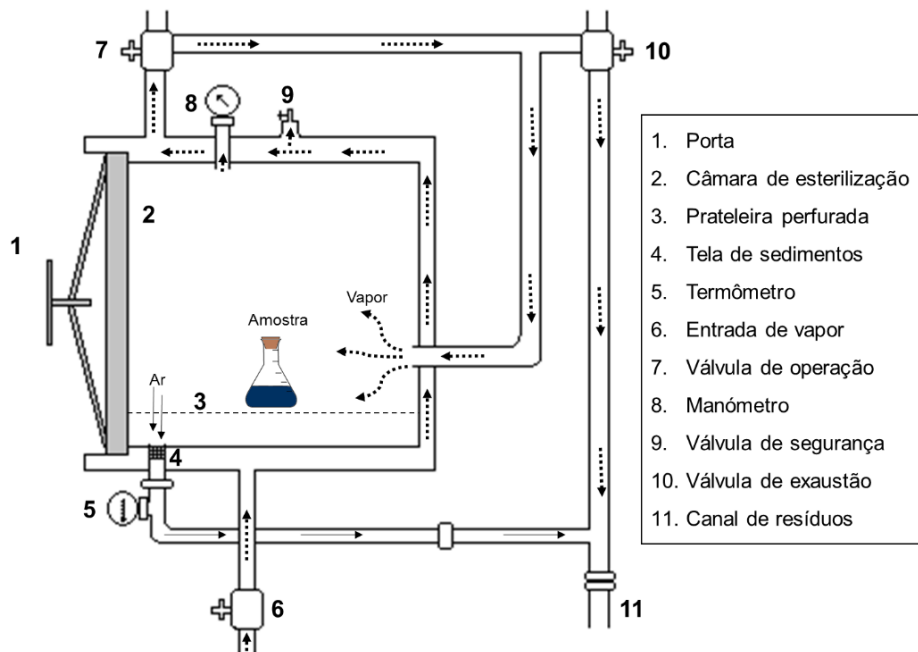


Figura 1-14. Representação esquemática do funcionamento de um equipamento de autoclavagem.

#### 1.4.1.2 Esterilização por irradiação gama

A esterilização com radiação gama é talvez o método mais utilizado para a esterilização terminal de materiais sensíveis à temperatura <sup>77</sup>. A radiação ionizante utilizada é produzida tipicamente com auxílio de uma fonte radioativa de cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ ). O decaimento dos átomos de  $^{60}\text{Co}$  origina a formação de  $^{60}\text{Ni}$ , a ejeção de elétrons e a emissão de raios gama. Os raios gama, com comprimento de onda entre 0,001 nm e 0,01 nm, apresentam uma elevada capacidade de penetração na matéria, pelo que permitem a esterilização dos dispositivos dentro de invólucros adequados. A elevada energia da radiação provoca a ionização dos ácidos nucleicos existentes nas células dos

microrganismos, resultando na sua morte <sup>74</sup>. A eficácia da esterilização depende da dose da radiação (energia depositada pela radiação ionizante por unidade de massa do material a esterilizar). A dose habitualmente utilizada para esterilizar dispositivos biomédicos é de 25 kGy<sup>⊥</sup> <sup>72</sup>, porém, a norma da Organização Internacional para Padronização (ISO *International Standard Organization*) recomenda que a dose seja definida tendo em conta o *bioburden* inicial do produto <sup>77</sup>.

Este método é utilizado, entre outras aplicações, para esterilizar lentes de contato de hidrogéis de silicone imersas em soluções salinas, tendo sido atestado que não afeta negativamente diversas propriedades essenciais ao desempenho destes dispositivos.

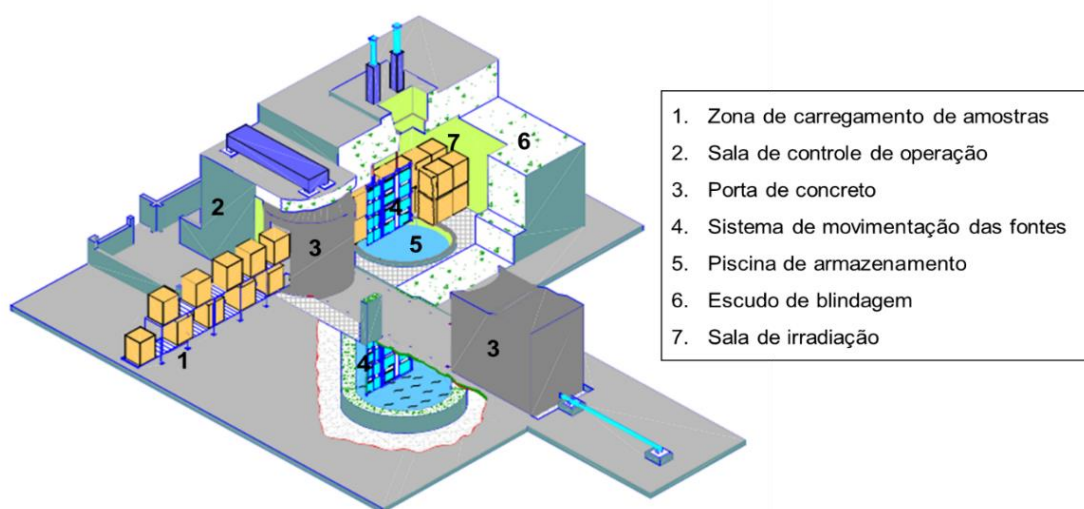


Figura 1-15. Representação das instalações do irradiador multipropósito do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Brasil). Imagem gentilmente cedida por Dr. Pablo Vásquez.

<sup>⊥</sup> Gy é a unidade de dose absorvida, 1 gray é equivalente à absorção de 1 joule por kilograma (=100 rad).

Embora a esterilização com raios gama seja simples, rápida e eficaz, e permita evitar problemas de toxicidade causados por agentes químicos ou a degradação térmica de materiais sensíveis à temperatura, a escolha deste método para esterilizar materiais como hidrogéis implica, necessariamente, a avaliação da compatibilidade com esses materiais e do impacto que possíveis alterações possam ter no comportamento dos mesmos. Fatores de ordem financeira deverão também ser levados em conta, já que o método é muito dispendioso, devido às infraestruturas necessárias (Figura 1-15) para manter em segurança a fonte radioativa de  $^{60}\text{Co}$  e à necessidade de pessoal especializado.

#### **1.4.1.3 Esterilização por ozono**

O ozono é um gás quase incolor (azul-pálido) de odor cáustico característico, instável e solúvel em água e que se destaca pelo seu poder oxidante <sup>78</sup>, que o torna um excelente candidato para uso como esterilizante <sup>78</sup>; <sup>79</sup>. A ação germicida do ozono foi evidenciada na Europa (França) no final do século XIX, altura em que este gás começou a ser utilizado no tratamento de água <sup>78</sup>; <sup>80</sup>. Desde então, tem sido estudado e aplicado intensamente na purificação e desinfecção de água <sup>80</sup>. No Brasil, a sua utilização enquanto método alternativo aos tratamentos com cloro começou a partir de 1983.

No início do século XX, a água ozonizada era usada no tratamento de numerosas doenças, e.g. anemia, diabetes, gripe <sup>81</sup>. Durante a segunda guerra mundial, utilizava-se ozono no tratamento de feridas, da gangrena e de alguns efeitos adversos provocados por gases tóxicos <sup>81</sup>.

Na condição gasosa e na presença de água, o ozono é capaz de eliminar vírus, bactérias, protozoários e fungos com alta eficiência e rapidez.



O seu mecanismo de ação ainda não está bem definido. Porém, estudos apontam para o facto do ozono destruir os microrganismos pela oxidação progressiva de componentes celulares vitais <sup>78</sup>. Pensa-se que a membrana celular deverá ser o principal alvo da ozonização. Na literatura, dois mecanismos são apontados como os principais meios de destruição de organismos-alvo pelo ozono <sup>82</sup>: o primeiro mecanismo é a oxidação de grupos sulfidríla, aminoácidos de enzimas, péptidos e proteínas; o segundo mecanismo é oxidação de ácidos gordos poli-insaturados a ácidos peróxidos <sup>82</sup>.

Ao contrário de outros desinfetantes/agentes oxidantes, o ozono não deixa resíduos nocivos, sendo o oxigénio o único produto que remanesce, facto que se apresenta como uma grande vantagem em termos de segurança, quando comparado com outros métodos químicos gasosos, como o EtO.

Devido ao seu odor pungente característico, possíveis fugas de ozono são facilmente detectadas pelos operadores dos equipamentos, muito antes de se atingirem concentrações nocivas.

No campo económico, este método também apresenta várias vantagens comparativamente às técnicas convencionais. Para a sua utilização são necessários: fonte de alimentação, água e oxigénio, elementos que estão facilmente disponíveis em qualquer ambiente médico-hospitalar ou industrial, o que torna este processo atrativo e com baixo custo associado <sup>83</sup>.

Outra vantagem desta técnica emergente é o facto de não ser necessário deixar o material arejar após a esterilização, como ocorre com o EtO (12-14 horas), evitando-se, assim, a necessidade de manter um grande inventário de material disponível nos centros médicos e tornando mais céleres os processos de esterilização a nível industrial.

O mercado para equipamentos esterilizadores por ozono tem vindo a evoluir positivamente desde 1991. No final do ano de 1999, deu-se início aos primeiros testes clínicos que culminaram na licença autorizada do primeiro esterilizador por ozono para dispositivos médicos, em 2002 pelo Canadá, e em 2003 pela agência americana – *Food and Drug Administration* (FDA) <sup>79</sup>.

Esta técnica já provou ser eficiente e compatível com diversos materiais com aplicações biomédicas, tais como aço inoxidável, titânio, alumínio anodizado, cerâmica, vidro, sílica, teflon, silicone, polipropileno, polietileno e acrílatos <sup>79; 83; 84</sup>.

No entanto a sua utilização na esterilização de hidrogéis não foi devidamente explorada e requer ainda desenvolvimento, pois a informação na literatura é muito escassa, embora bons resultados tenham sido obtidos com gelatina de origem animal <sup>85; 86</sup>.

Na (Figura 1-16) encontra-se representado o diagrama de funcionamento de um típico processo de esterilização a gás, como é o caso do ozono.

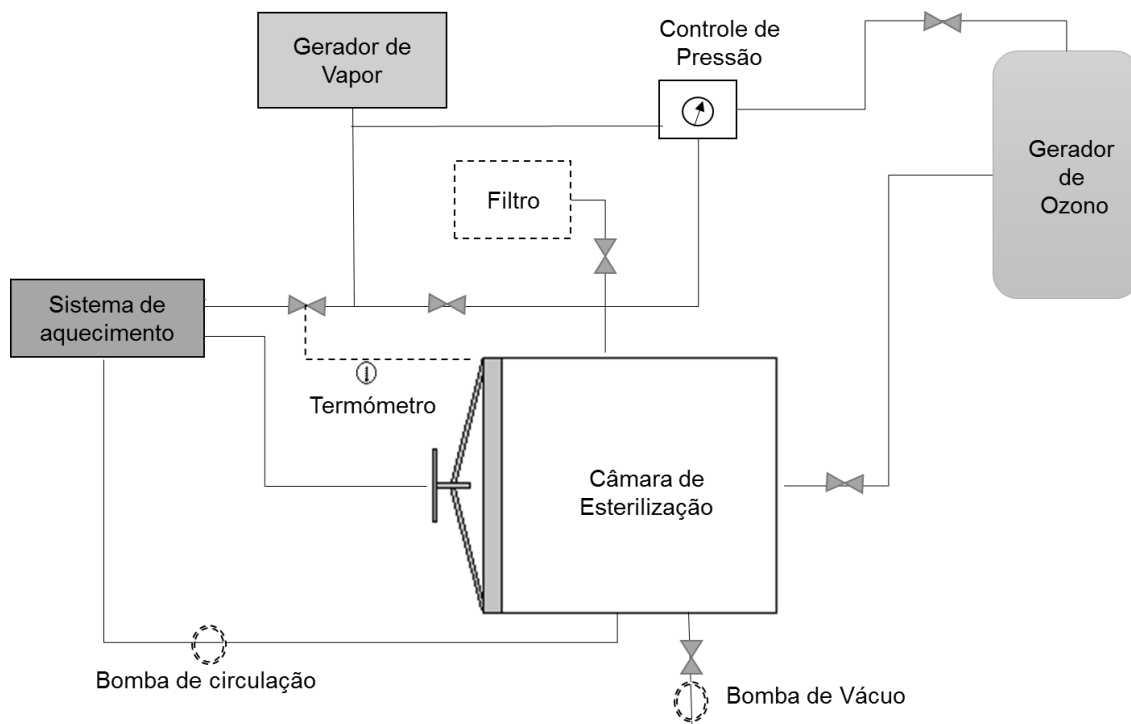


Figura 1-16. Diagrama do processo de funcionamento da esterilização por ozono.

#### 1.4.1.4 Outros métodos de esterilização

A esterilização com calor seco é feita, em geral, a 160°C durante 2 horas. Embora a aplicabilidade do método, tal como no caso do calor húmido, se restrinja a materiais termorresistentes, o que, em princípio, excluiria os hidrogéis, em certas situações este método revelou-se o mais adequado. Veja-se, por exemplo, os resultados obtidos por Bos et al. com hidrogéis de dextran com ligações cruzadas por formação de estereocomplexos, para aplicações *in vivo* 87.

A esterilização com EtO permite fazer face ao problema das altas temperaturas. O procedimento adotado consiste em manter os materiais numa atmosfera deste gás ou misturado com outro (e.g. CO<sub>2</sub> ou um clorofluorcarboneto) por um período que pode variar entre 2 e 48 horas, com

uma humidade relativa de 70% e uma temperatura não superior a 55°C<sup>88</sup>. O EtO é posteriormente removido, alternando vácuo com a introdução de ar ou gás inerte (e.g. N<sub>2</sub>) na câmara de esterilização. A inativação e morte dos microorganismos resulta do efeito alquilante do EtO sobre os grupos sulfidrílo, amino, carboxilo e hidroxilo existentes nas células<sup>74; 88</sup>. A eficácia da esterilização, associada à flexibilidade do processo, decorrente da existência de um número significativo de variáveis que é possível controlar (temperatura, humidade, concentração de EtO), fazem deste método um dos mais usados para esterilizar não só materiais termossensíveis, mas também uma vasta gama de outros materiais. Este procedimento é utilizado atualmente para esterilizar diversos dispositivos médicos e implantes constituídos total ou parcialmente por hidrogéis, como lentes intraoculares, dispositivos para reparação de ligamentos e tendões, válvulas cardíacas e enxertos vasculares<sup>89</sup>. A principal desvantagem associada ao método tem a ver com o facto de o EtO residual nos materiais esterilizados, ser tóxico e potencialmente carcinogénico<sup>88</sup>. Neste sentido, tem-se procurado reduzir os níveis de concentração do EtO sem comprometer a eficácia de todo o processo.

Na esterilização com feixe de eletrões, um gerador produz eletrões de elevada energia, com uma voltagem de aceleração 0,2 - 10 MeV, os quais são focados magneticamente num feixe de 1 a 5 cm de diâmetro que incide sobre o material a ser esterilizado durante o tempo necessário para acumular a dose de irradiação desejada. Tal como os raios gama, os eletrões conduzem à ionização de componentes chave das células dos micro-organismos e, conseqüentemente, à sua morte. No entanto, a capacidade de penetração dos eletrões é muito inferior à dos raios gama, pelo que este método de esterilização se revela

inadequado para produtos com espessura significativa ou densamente empacotados. A exposição a um feixe de elétrons pode ou não ter um efeito nefasto sobre os hidrogéis. Em diversos casos é considerado um método vantajoso, por permitir combinar a síntese (formação de ligações cruzadas) e esterilização num único passo, reduzindo os custos e tempo de produção.

Outra possibilidade alternativa para a produção de hidrogéis estéreis, caracterizada pela remoção mecânica dos microorganismos, consiste na filtração das soluções dos precursores dos hidrogéis ou das suspensões dos mesmos (quando se trata de microgéis ou nanogéis). Porém, surgem muitas vezes complicações neste último caso, devido a colmatação dos filtros ou quando a viscosidade da formulação é elevada, devido à adsorção dos polímeros nas membranas dos filtros <sup>90</sup>.

#### **1.4.2 Esterilização de hidrogéis para aplicações biomédicas**

A infecção é um dos principais problemas associados com dispositivos implantáveis <sup>91</sup>. Face ao aumento da complexidade e diversidade dos biomateriais, em particular dos hidrogéis, é necessário o desenvolvimento e validação de novos métodos de esterilização, seguros e reprodutíveis, que permitam esterilizá-los de forma eficaz após a sua manufatura, sem comprometer as suas propriedades e sem elevados custos associados.

A temática dos hidrogéis tem sido extensamente estudada, o que é facilmente comprovado pelo elevado número de publicações disponíveis sobre o assunto (cerca de 29 000 só na última década).

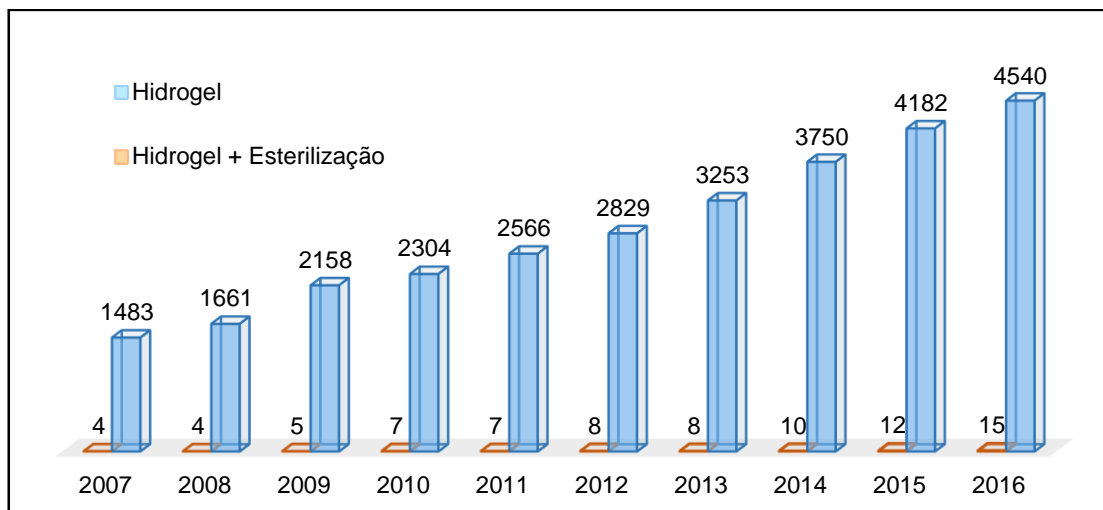


Figura 1-17. Número de publicações por ano referentes a hidrogéis (azul) comparativamente ao número de publicações referentes à sua esterilização (vermelho). Dados obtidos através do portal <http://apps.webofknowledge.com/>.

Uma compilação dos trabalhos publicados nesse período, envolvendo hidrogéis, obtida através do portal *Web of Science*, mostra que o número de publicações, tem vindo a aumentar ano após ano (Figura 1-17 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Quanto à esterilização deste tipo de materiais, apesar da sua importância do ponto de vista científico, clínico e económico/social, na última década, o número de trabalhos que abordam este tópico é muito pequeno, representando menos de 0.3% do total de publicações.

Isto evidencia que os efeitos dos métodos de esterilização sobre as propriedades intrínsecas dos hidrogéis permanecem pouco estudados.

A esterilização de materiais poliméricos, como os hidrogéis, deve ser feita com especial prudência. Em determinadas condições, a esterilização pode ser responsável pela degradação e/ou decomposição, descoloração, fragilização, geração de odor, por promover reticulação adicional ou até mesmo induzir efeitos tóxicos nos materiais submetidos ao processo <sup>92; 93; 94; 95</sup>.

No caso da irradiação gama, por exemplo, a cisão das cadeias poliméricas e os processos de reticulação podem ocorrer em simultâneo, o que dificulta a sua interpretação <sup>96</sup>. O trabalho realizado por Miller et al <sup>97</sup> propõe a regra que define a reticulação como o evento predominante quando os carbonos da cadeia polimérica principal estão ligados pelo menos a um átomo de hidrogénio, enquanto que no caso de os mesmos serem maioritariamente tetra-substituídos, a degradação do material passa a ser o principal evento.

A esterilização em altas temperaturas conduz geralmente a dois eventos principais: reação na cadeia principal que pode resultar em quebra ou posterior reticulação; reação nas cadeias laterais, que pode resultar em eliminação de grupos ou ciclização <sup>98</sup>.

Quanto aos processos oxidativos: os polímeros podem ser oxidados, parcialmente degradados ou pode, ainda, ocorrer reticulação adicional. Esta exposição é caracterizada por um período de indução durante o qual o polímero pode não revelar modificações óbvias. No entanto, existe a possibilidade de efeitos a longo prazo decorrentes da formação de hidroperóxidos <sup>99</sup>.

#### **1.4.2.1 Revisão da literatura**

Uma possível classificação dos hidrogéis, como já mencionado, consistem em separá-los pela sua origem sintética ou natural.

Os polímeros sintéticos, quando comparados aos de origem natural, têm maior grau de uniformidade entre os lotes. Isso permite o maior detalhe e reprodutibilidade no desenvolvimento e adaptação das propriedades do produto final <sup>100</sup>.

Por sua vez, os hidrogéis naturais, que podem ser produzidos a partir de polissacarídeos, proteínas ou ADN, podem ter várias origens naturais (e.g. mamíferos, insetos, exoesqueletos de marisco, bactérias, plantas, algas) <sup>101</sup>. A principal vantagem dos polímeros naturais, além da disponibilidade natural, é a sua maior semelhança fisiológica com a matriz extracelular *in vivo* <sup>94</sup>. Por outro lado, as suas propriedades são difíceis de controlar, a composição pode diferir entre lotes e apresentam potencial imunogenicidade.

Nas tabelas seguintes estão compilados os principais resultados de trabalhos publicados, na última década (alvo de um artigo de revisão recentemente submetido <sup>102</sup>), nos quais se aborda a esterilização de hidrogéis sintéticos e naturais (Tabela 1-4 e Tabela 1-5, respectivamente). Especial atenção foi dada a trabalhos com hidrogéis nanoestruturados (Tabela 1-6 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), e hidrogéis para libertação de fármacos (

Tabela 1-7), uma vez que estes sistemas terão especial destaque neste estudo.

Na sua vasta maioria, são utilizadas técnicas de esterilização convencionais, nomeadamente a radiação ionizante, o calor húmido e o óxido de etileno.

Dos trabalhos que estudam a aplicabilidade de técnicas alternativas, destaca-se o crescente interesse pela aplicação de fluidos supercríticos, em especial o dióxido de carbono.

Note-se também que, quando é verificada a eficácia da esterilização, nem sempre são utilizados microrganismos resistentes aos processos em estudo. O



trabalho realizado por Bernhardt et al. <sup>103</sup>, no entanto, é uma exceção interessante, em que é estudada a resistência ao dióxido de carbono super crítico (scCO<sub>2</sub>) de um vasto número e tipo de microrganismos, incluindo as espécies resistentes esporuladas *B. pumilus* e *G. stercorarium*.

Os hidrogéis nanoestruturados (Tabela 1-6) são os menos estudados. Na literatura recente, o trabalho de revisão, realizado por Vetten et al. <sup>104</sup>, refere os principais trabalhos sobre a esterilização de nanopartículas. Apesar de em alguns casos serem utilizados polímeros hidrofílicos (e.g. PEG) na composição das partículas, não é claro se as mesmas possuem características de um hidrogel.

Os hidrogéis para dispositivos médicos de libertação controlada (CRD) (

Tabela 1-7), são uma categoria de especial interesse. Embora exista uma literatura extensa relacionada com CRD, o número real de produtos efetivamente aprovados pela FDA é consideravelmente baixo <sup>105; 106</sup>. As explicações para este facto podem estar relacionadas com diversos aspectos, incluindo, por exemplo, a viabilidade económica e questões de segurança. A análise dos dados que se encontram sumarizados nas tabelas demonstra que o efeito dos diferentes métodos de esterilização sobre as propriedades dos hidrogéis depende de uma série de factores (e.g. natureza e composição dos hidrogéis, forma em que os mesmos se apresentam, agente e parâmetros de esterilização, tipo de propriedades avaliadas), pelo que não é possível generalizar. A situação torna-se mais complexa, quando os hidrogéis contêm outras moléculas para veiculação (por exemplo fármacos), cuja integridade/atividade se pretende manter.

De um modo geral, verifica-se que durante a fase de pesquisa científica são desconsiderados importantes aspectos vitais à aprovação e comercialização do produto final, revelando uma possível defasagem entre o processo de desenvolvimento e as necessidades para implementação no mercado. Por exemplo, se a segurança biológica não for possível de ser alcançada, o valor clínico e enorme potencial de um biomaterial novo e “inteligente” serão perdidos.

Neste sentido, a capacidade de se assegurar a esterilidade do material, sem deterimento das suas propriedades, é essencial.

Tabela 1-4 – Esterilização de hidrogéis sintéticos para aplicações biomédicas

Material	Aplicação	Condições/parâmetros de esterilização	Propriedades avaliadas	Principais resultados	Teste de esterilidade	Ref.	Ano
CyborgeI™	Engenharia de Tecidos / Cartilagem	GI: 30-35 KGy EB: 30-35 KGy	Intumescimento Prop. Mecânicas Estrutura química Tribologia	GI: - Sem alterações significativas EB: - Alteração química	NA	107	2016
Poli (ácido L-láctico)	Engenharia de Tecidos	scCO <sub>2</sub> + Aditivo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) - Pressão: 5-30 MPa - Temperatura: 30-40 °C - Tempo: 5 min a 20h	Morfologia Comportamento termotrópico Adesão celular	↓ Cristalinidade (20 h).	<i>E. coli</i> <i>S. coelicolor</i>	108	2016
PVA/PVP	Cartilagem	GI- 50, 100 e 150 kGy	Morfologia Estrutura química Teor de água Prop. Mecânicas Tribologia	GI(50 e 150 kGy) - Alterações coeficiente atrito, teor de água e prop. mecânicas	NA	109	2014
Hydromed™ HydroThane™	Sensores ópticos de oxigênio	GI/EB10,25,50 kGy SH: - Temperatura: 121 °C - Tempo: 20 min EtO: 6% de EtO e 94% de CO <sub>2</sub> . - Temperatura: 45 °C - Pressão: 1.7 bar. - Tempo: 12 h H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 35.3% - Temperatura: 25 °C - Humidade: 20%.	Resposta ao oxigênio	Alterações na resposta ao oxigênio.	NA	96	2013

		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> plasma: ~59% <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura máx.: 55°C</li> <li>- Tempo: 48 min</li> </ul>					
PEG	Modelo / hidrogel injetável	GI: 2.5 e 0.5 Mrad Débito/dose: 1,527 rad/min e 4,582 rad/min SH: 5 min at 132°C scCO <sub>2</sub> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura: 40 to 80°C</li> <li>- Pressão: 1 a 250 bar</li> <li>- Tempo: 1 a 6 h</li> </ul>	Morfologia Prop. mecânicas Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	GI/SH: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações significativas na morfologia, separação de fases, presença agregados.</li> </ul>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i> <i>B. subtilis</i>	110	2011
Sal de potássio poli (ácido acrílico-co-acrilamida) (PAAA)	Modelo / Engenharia de Tecidos	CO <sub>2</sub> líquido: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura: 25 °C</li> <li>- Pressão 6.9 MPa</li> <li>- Tempo: 20 a 180 min</li> </ul>	Curva de secagem Mecanismo de inativação microbiana.	Limitações a nível da transferência de massa.	<i>S. aureus</i>	111	2010
PEG	Modelo / Libertação de fármacos	GI: 25 kGy H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gás <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura Max: 40° C</li> <li>- Humidade Max: 95%</li> <li>- Tempo: 55 min</li> </ul> EtO: 100% EtO <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura: 57 °C</li> <li>- Tempo: 2 h</li> </ul>	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : ↑concentração de radicais livres a longo prazo.	NA	112	2009
Poli (ácido acrílico-co-acrilamida)	Modelo / Engenharia de Tecidos	scCO <sub>2</sub> + Aditivos (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão: 27.6 MPa</li> <li>- Temperatura: 40 °C</li> <li>- Tempo: 10 min a 4h</li> </ul>	Intumescimento Curvas de secagem Morfologia	NA	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	113	2008
↑: aumento; ↓diminuição; “Prop”: propriedades;GI: irradiação gama; EB: feixe de electrões; SH: calor húmido, “H2O2”: peróxido de hidrogénio; “scCO2”: dióxido de carbono supercrítico; “EtO”: óxido de etileno; NA: não avaliado; “Max”: máximo							

Tabela 1-5 - Esterilização de hidrogéis naturais para aplicações biomédicas

Material	Aplicação	Condições/parâmetros de esterilização	Propriedades avaliadas	Principais efeitos adversos	Teste de esterilidade	Ref.	Ano
Metilcelulose (MC) hidroxipropil Metilcelulose (HPMC) Carboximetilcelulose (CMC) Iota carragenanos (IC) A goma xantana (XG)	Modelo	SH: 121°C por 20 min	Reologia Textura pH Armazenamento Efeito da concentração iônica	MC: ↓ viscosidade, dureza, compressibilidade, poder de adesão.  CMC and HPMC: ↑ all parameters in a higher ionic strength environment.  IC: ↑ viscosidade, poder de adesão ↓ dureza, compressibilidade  XG: ↓ maioria dos parâmetros avaliados	NA	114	2016
Colagénio	Engenharia de Tecidos	scCO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 300 mg/L – Temperatura: 30-40°C – Pressão: 20.5 MPa – Tempo: ciclos de 30 min (3 a 6) GI: 25 kGy	Solubilidade Degradação por ação da tripsina Morfologia Comportamento termotrópico Prop. Mecânicas Citotoxicidade	GI: ↑ solubilidade, ↓ estabilidade física	<i>B. atrophaeus</i>	115	2015
Alginato/ Agarose	Engenharia de Tecidos	scCO <sub>2</sub> + Aditivos (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e anidrido acético)	Taxa de inativação microbiana	<i>B. pumilus</i> reportado como mais resistente.	<i>B. cereus</i> <i>B. atrophaeus</i> <i>B. pumilus</i>	103	2015

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão:8.5 MPa</li> <li>- Temperatura: 38°C</li> <li>- Tempo: 5, 15, 30 and 45min</li> </ul>			<p>G. <i>stereothermophilus</i>  Conidiospores  T  Conidiospores  <i>A brasiliensis</i>  <i>C. ablicans</i>,  <i>M. terrae</i>  <i>S. aureus</i>,  <i>E. faecium</i>  <i>E. hirae</i>  <i>K. pneumonia</i>  <i>S. marcescens</i>  <i>P. aeruginosa</i>  Phage MS2,  and Phage PhiX174.</p>		
Alginato / Alginato + Pluronic® F68	Pensos dérmicos	SH: 5 min a 250°C - Semi - seco - Imersão em 0.1 M CaCl <sub>2</sub>  Lavagem em etanol: 70% (v/v) por 20 min Luz Uv: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dose:75 a 100 μW/cm<sup>2</sup>.</li> <li>- λ: 250 nm</li> <li>- Tempo: 20 min</li> </ul>	Intumescimento Reologia	SH: ↓ intumescimento, alterações nas prop. Mecânicas. UV: esterilização ineficaz para amostras mais espessas.	<i>E. coli</i>	116	2014
Ácido Hialurônico	Modelo / Engenharia de Tecidos	SH: 121 °C por 20 min.	Reologia Alterações supramoleculares	Alterações estruturais irreversíveis para hidrogéis de baixa concentração de HA	NA	117	2013
Ácido Hialurônico	Engenharia de Tecidos /	SH: 121 °C por 15 min.	Reologia	NA	NA	118	2012

	“Enchimento dérmico”						
Xiloglucano	Modelo	<p>Lavagem em etanol: 70%</p> <p>Lavagem em isopropanol 70%</p> <p>GI:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 kGy; 5.6 kGy/h</li> <li>- Temperatura: ambiente e na presença de gelo seco</li> </ul> <p>SH: 121 °C por 20 min</p>	Reologia	<p>Lavagens em etanol e em isopropanol não foram eficazes.</p> <p>GI (temperatura ambiente): alterações severas.</p>	Testado (sem contaminações controladas)	119	2010
<p>Gelatina de peixe</p> <p>Gelatina de porco</p> <p>Colagénio de porco</p>	Modelo	GI: 1kGy	<p>Cromatografia de exclusão de tamanho</p> <p>Dispersão de luz laser multi-ângulo</p> <p>Viscosidade</p> <p>SDS-PAGE</p> <p>Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</p>	<p>Degradação da cadeia</p> <p>Reticulação</p>	NA	120	2010
Si-Hidroxiopropilmetilcelulose (Si-HPM)	Engenharia de Tecidos	SH: 121 °C por 20 min	<p>Prop. de gelificação</p> <p>Viscosidade</p> <p>Reologia</p>	↓ viscosidade	NA	121	2009
<p>↑: aumento; ↓diminuição; “Prop”: propriedades;; GI: irradiação gama; EB: feixe de electrões; SH: calor húmido, “H2O2”: peróxido de hidrogénio; “scCO2”: dióxido de carbono supercrítico; “EtO”: óxido de etileno; NA: não avaliado / Não se aplica; “Max”: máximo</p>							

Tabela 1-6 – Esterilização de hidrogéis nanoestruturados para aplicações biomédicas

Material	Aplicação	Condições/parâmetros de esterilização	Propriedades avaliadas	Principais resultados	Ref.	Year
Seda de aranha	NA	SH	Tamanho de partícula Distribuição de tamanho Morfologia Comportamento termotrópico Citotoxicidade	- Sem efeitos adversos - Estabilidade térmica aumentada após o tratamento autoclave	122	2015
Colagénio / PLGA carregado com gentamicina	Injetável	EtO GI Irradiação beta	Morfologia Topografia Peso molecular Comportamento termotrópico Estrutura química Formação de radicais livres Atividade dos fármacos Estabilidade	EtO: - Modificação química do fármaco - (Leve) ↓ Temperatura de transição vítrea - Colapso mecânico das micropartículas Irradiação GI / Beta: - ↓ Peso molecular - ↓ Temperatura de transição vítrea	123	2006



Tabela 1-7 - Esterilização de hidrogéis para libertação de fármaco.

Material	Aplicação	Ativo/Fármaco	Condições de esterilização	Propriedades avaliadas	Principais efeitos adversos	Teste de esterilidade	Ref.	Ano
Acrilamida N,N'-metilenobisacrilamida 3-acrilamido-fenilborónico N-(3-dimetilaminopropilacrilamida)	Sensor	Glucose	GI: 10Gy-25.7kGy	Respostas à glucose	↓ Resposta à glucose das amostras curadas por UV	NA	124	2014
Ácido hialurónico	Ortopedia	Vancomicina Tobramicina	SH: 121 °C por 20 min	Reologia Estrutura química Libertação	NA	NA	125	2013
PEG	Engenharia de Tecidos /Libertação	Ciclosporina Rodamina B	GI: 25 kGy H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EtO	Libertação Intumescimento Rugosidade Radicais livres	GI: - ↓Intumescimento - ↓Rugosidade - ↑Radicais livres EtO - ↓Intumescimento - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - ↑ Intumescimento - - ↓Rugosidade - ↑Radicais livres  Libertação de ciclosporina afetada em todos os casos	NA	126	2008

HEMA	Libertação transdérmica	Metotrexato Carboplatina Ácido etacrínico	SH: 121°C por 30 min GI: 25 kGy	Morfologia Análise térmica Inchaço Prop. Mecânicas Libertação de fármaco	SH <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑ Densidade</li> <li>- ↓ Incorporação de fármaco</li> <li>- Alterações morfológicas</li> <li>- ↑ Módulo de Young</li> </ul> EtO <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑ Densidade</li> <li>- ↓ Incorporação de fármaco</li> <li>- ↑ Módulo de Young</li> </ul>	NA	127	2007
<p>↑: aumento; ↓diminuição; "Prop": propriedades;; GI: irradiação gama; EB: feixe de elétrões; SH: calor húmido, "H2O2": peróxido de hidrogénio; "scCO2": dióxido de carbono supercrítico; "EtO": óxido de etileno; NA: não avaliado / não se aplica; "Max": máximo</p>								

## 1.5 REFERÊNCIAS

- 1 BERGMANN, C. P.; STUMPF, A. **Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation**. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- 2 CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **Eur. Polym. J.**, v. 65, p. 252-267,2015.
- 3 HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Adv. Drug Delivery. Rev.**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 18-23,2012.
- 4 PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, n. 1, p. 27-46,2000.
- 5 ULLAH, F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 57, p. 414-433,2015.
- 6 AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N. M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, n. 0,2015.
- 7 AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121,2015.
- 8 SLAUGHTER, B. V. et al. Hydrogels in regenerative medicine. **Adv. Mater.**, v. 21, n. 32-33, p. 3307-29,2009.
- 9 PEPPAS, N. A.; HOFFMAN, A. S. Chapter I.2.5 - Hydrogels. **Biomaterials Science (Third Edition)**: Academic Press, 2013. p.166-179.
- 10 WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117-118,1960.
- 11 WHEELER, J. C. et al. Evolution of hydrogel polymers as contact lenses, surface coatings, dressings, and drug delivery systems. **J. Long. Term Eff. Med. Implants**, v. 6, n. 3-4, p. 207-17,1996.
- 12 HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007,2008.
- 13 HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Delivery. Rev.**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649,2008.

- 14 VO, T. N. et al. Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 83, p. 1-11,2016.
- 15 NAMAZI, H. et al. Antibiotic loaded carboxymethylcellulose/MCM-41 nanocomposite hydrogel films as potential wound dressing. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 85, p. 327-334,2016.
- 16 MALAKOOTI, N.; ALEXANDER, C.; ALVAREZ-LORENZO, C. Imprinted Contact Lenses for Sustained Release of Polymyxin B and Related Antimicrobial Peptides. **J. Pharm. Sci.**, v. 104, n. 10, p. 3386-3394,2015.
- 17 STOCKE, N. A.; ARNOLD, S. M.; ZACH HILT, J. Responsive hydrogel nanoparticles for pulmonary delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, p. 143-151,2015.
- 18 ZAYATS, M.; BRENNER, A. J.; SEARSON, P. C. Protein imprinting in polyacrylamide-based gels. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8659-8668,2014.
- 19 FLOREN, M. et al. Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. **Acta Biomater.**, v. 31, p. 156-166,2016.
- 20 SIVASHANMUGAM, A. et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. **Eur. Polym. J.**, v. 72, p. 543-565,2015.
- 21 SASAKI, S.; MURAKAMI, T.; SUZUKI, A. Frictional properties of physically cross-linked PVA hydrogels as artificial cartilage. **Biosurface and Biotribology**,
- 22 BUWALDA, S. J. et al. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. **J. Control. Release**, v. 190, p. 254-73,2014.
- 23 CIRILLO, G. et al. Tunable thermo-responsive hydrogels: Synthesis, structural analysis and drug release studies. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 499-510,2015.
- 24 SERVICES, U. S. D. O. H. A. H.; ADMINISTRATION, F. A. D.; HEALTH, C. F. D. A. R. **Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process"**. FDA. EUA: 48-49 p. 2016.
- 25 SZE, A. et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 261, n. 2, p. 402-410,2003.

- 26 NICOLSON, P. C.; VOGT, J. Soft contact lens polymers: an evolution. **Biomaterials**, v. 22, n. 24, p. 3273-3283,2001.
- 27 EFRON, N.; MALDONADO-CODINA, C. 6.633 - Development of Contact Lenses from a Biomaterial Point of View – Materials, Manufacture, and Clinical Application. **Comprehensive Biomaterials**. Oxford: Elsevier, 2011. p.517-541.
- 28 MILTON, M. H.; BRUCE, A. S. Soft Lens Material. **Manual of Contact Lens Prescribing And Fitting**. 3: Elsevier Health Sciences, 2006. cap. 14, p.312-321.
- 29 MUNTZ, A. et al. Tear exchange and contact lenses: A review. **Journal of Optometry**, v. 8, n. 1, p. 2-11,2015.
- 30 NICHOLS, J. J. Contact Lenses Annual Report 2015, Strong growth in some segments and a few surprises highlight a year of modest gains overall. **Contact Lens Spectrum**, v. 31, n. January 2016, p. 18-23,2015.
- 31 MCDERMOTT, M. L.; CHANDLER, J. W. Therapeutic uses of contact lenses. **Surv. Ophthalmol.**, v. 33, n. 5, p. 381-394,1989.
- 32 PLAKA, A. et al. Efficacy of two silicone-hydrogel contact lenses for bandage use after photorefractive keratectomy. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 36, n. 5, p. 243-246,2013.
- 33 PARADISO, P. et al. Comparison of two hydrogel formulations for drug release in ophthalmic lenses. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 102, n. 6, p. 1170-80,2014.
- 34 GALANTE, R. et al. About the effect of eye blinking on drug release from pHEMA-based hydrogels: an in vitro study. **J. Biomater. Sci., Polym. Ed.**, v. 26, n. 4, p. 235-251,2015.
- 35 GARCÍA-MILLÁN, E.; KOPRIVNIK, S.; OTERO-ESPINAR, F. J. Drug loading optimization and extended drug delivery of corticoids from pHEMA based soft contact lenses hydrogels via chemical and microstructural modifications. **Int. J. Pharm.**, v. 487, n. 1–2, p. 260-269,2015.
- 36 PENG, C.-C. et al. Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. **J. Control. Release**, v. 162, n. 1, p. 152-158,2012.
- 37 ALVAREZ-LORENZO, C.; YAÑEZ, F.; CONCHEIRO, A. Ocular drug delivery from molecularly-imprinted contact lenses. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 237-248,2010.

- 38 XINMING, L. et al. Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 31, n. 2, p. 57-64,2008.
- 39 ROSA DOS SANTOS, J.-F. et al. Soft contact lenses functionalized with pendant cyclodextrins for controlled drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 7, p. 1348-1355,2009.
- 40 YAÑEZ, F. et al. Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery. **Acta Biomater.**, v. 7, n. 3, p. 1019-1030,2011.
- 41 JUNG, H. J.; CHAUHAN, A. Temperature sensitive contact lenses for triggered ophthalmic drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2289-2300,2012.
- 42 DAVIS, J. R. **Handbook of Materials for Medical Devices**. USA: ASM International, 2003. 341
- 43 CHANDLER, H. Ultraviolet absorption by contact lenses and the significance on the ocular anterior segment. **Eye Contact Lens**, v. 37, n. 4, p. 259-66,2011.
- 44 LIMITED, J. J. M. UV-blocking with ACUVUE®. 2015. Disponível em: <<https://www.jnjvisioncare.co.uk/education/uv-and-contact-lenses/uv-blocking-with-acuvue>>. Acesso em: 03/04/2017
- 45 PEPPAS, N. A. et al. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in Medicine and Biology. **Annual Reviews Biomedical Engineering**, v. 2, p. 9-29,2000.
- 46 WANG, Y. et al. Influence of water states in hydrogels on the transmissibility and permeability of oxygen in contact lens materials. **Appl. Surf. Sci.**, v. 255, n. 2, p. 604-606,2008.
- 47 FERREIRA, L.; VIDAL, M. M.; GIL, M. H. Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values. **Int. J. Pharm.**, n. 194, p. 169-180,2000.
- 48 FARIBA GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375-398,2010.
- 49 MORGAN, P. B.; EFRON, N. The oxygen performance of contemporary hydrogel contact lenses. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 21, n. 1, p. 3-6,1998.
- 50 ZHAO, Z. et al. The Relationship between Oxygen Permeability and Phase Separation Morphology of the Multicomponent Silicone Hydrogels. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 50, p. 14640-14647,2014.

- 51 JONES, L. **Modern Contact Lens Materials: A Clinical Performance Update**. Contact Lens Spectrum 2002.
- 52 AUSTIN, D.; KUMAR, R. V. Ionic conductivity in hydrogels for contact lens applications. **Ionics**, v. 11, n. 3, p. 262-268,2005.
- 53 POZUELO, J. et al. Oxygen and ionic transport in hydrogel and silicone-hydrogel contact lens materials: An experimental and theoretical study. **J. Membr. Sci.**, v. 452, p. 62-72,2014.
- 54 TRANOUDIS, I.; EFRON, N. Tensile properties of soft contact lens materials. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 27, n. 4, p. 177-191,2004.
- 55 LIN, M. C.; YEH, T. N. Mechanical complications induced by silicone hydrogel contact lenses. **Eye Contact Lens**, v. 39, n. 1, p. 115-24,2013.
- 56 FONN, D. et al. **Silicone Hydrogel Material and Surface Properties. Lens surface and movement, wettability, oxygen transmission and mechanical properties set these lenses apart**. Contact Lens Spectrum: PentaVision, Inc. 2002.
- 57 ALDERSON, A. Soft Contact Lens Material Properties. **Academy of vision care**, 2013. Disponível em: <  
<http://www.academyofvisioncare.com/files/documents/Contact%20Lens%20Article%20080513.pdf> >.
- 58 SANTOS, L. et al. The influence of surface treatment on hydrophobicity, protein adsorption and microbial colonisation of silicone hydrogel contact lenses. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 30, n. 3, p. 183-188,2007.
- 59 EFRON, N.; MALDONADO-CODINA, C. 6.633 - Development of Contact Lenses from a Biomaterial Point of View – Materials, Manufacture, and Clinical Application A2 - Ducheyne, Paul. **Comprehensive Biomaterials**. Oxford: Elsevier, 2011. p.517-541.
- 60 HOLLY, F. J. Wettability and Bioadhesion in Ophthalmology. **Modern Approaches to Wettability**: Plenum Press
- 61 GURYČA, V. et al. Surface morphology of contact lenses probed with microscopy techniques. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 30, n. 4, p. 215-222,2007.
- 62 M.B. JONES et al. Elastohydrodynamics of the EyelidWiper. **Bull. Math. Biol.**, n. 70, p. 323-343,2007.

- 63 RENNIE, A. C.; DICKRELL, P. L.; SAWYER, W. G. Friction coefficient of soft contact lenses: measurements and modeling. **Tribol. Lett.**, v. 18, n. 4, p. 499-504,2005.
- 64 ZHOU, B. et al. A study of the frictional properties of senofilcon-A contact lenses. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v. 4, n. 7, p. 1336-1342,2011.
- 65 INSTRUMENTS, C. The Nano Tribometer (NTR). Disponível em: < <http://www.csm-instruments.com/en/Nano-Tribometer> >.
- 66 WILLIAM A. RUTALA, D. J. W., HICPAC. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**. SERVICES, H. H. USA: 158 p. 2008.
- 67 5, E. P. E. **General texts on sterility**. Vol II. Starstbourg: Council of Europe: 445-449 p. 2005.
- 68 PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos** 4. Barueri, SP, Brazil: Manole, 2015. 416
- 69 KILLEEN, S.; MCCOURT, M. Decontamination and sterilization. **Surgery (Oxford)**, v. 30, n. 12, p. 687-692,2012.
- 70 LEROUGE, S. 1 - Introduction to sterilization: definitions and challenges. **Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices**: Woodhead Publishing, 2012. p.1-19.
- 71 RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. Elsevier Science, 2012.
- 72 ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Preparação de produtos estéreis. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 546 p. 2010.
- 73 DICK, H. B.; SCHWENN, O. Aseptic Production vs. Terminal Sterilization. **Viscoelastics in Ophthalmic Surgery**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p.97-99.
- 74 KANJICKAL, D. et al. Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 87, n. 3, p. 608-17,2008.
- 75 BAIER, R. E. et al. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. **Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 241-245,1982.
- 76 SERRO, A. P.; SARAMAGO, B. Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4749-60,2003.



- 77 TÜRKER, N. S. et al. The effect of gamma radiation sterilization on dental biomaterials. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 5, p. 341-349,2014.
- 78 GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453-460,2004.
- 79 DUFRESNE\*, S.; HEWITT, A.; ROBITAILLE, S. Ozone Sterilization: Another Option for Healthcare in the 21st Century. **Am. J. Infect. Control**, v. 32, n. 3, p. E26-E27,2004.
- 80 RICE, R. G. et al. Uses of ozone in drinking water treatment. . **Journal of the American Water Works Association**  
v. 73, p. 44-57,1981.
- 81 ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66-70,2011.
- 82 VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone. **Mutat. Res.**, v. 277, n. 3, p. 221-38,1992.
- 83 DUFRESNE, S.; LEBLOND, H.; CHAUNET, M. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer. **Am. J. Infect. Control**, v. 36, n. 4, p. 291-297,2008.
- 84 HICPAC. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities 2008. Centers for Disease Control and Prevention, 2014. Disponível em: <  
[http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection\\_Sterilization/13\\_10otherSterilizationMethods.html](http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/13_10otherSterilizationMethods.html)  
>. Acesso em: 21-04-2015.
- 85 CATALDO, F. On the action of ozone on proteins. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 82, n. 1, p. 105-114,2003.
- 86 CATALDO, F. On the action of ozone on gelatin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, n. 2, p. 210-216,2007.
- 87 BOS, G. W. et al. Tissue reactions of in situ formed dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation after subcutaneous implantation in rats. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3901-3909,2005.
- 88 MENDES, C. G.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Ethylene oxide (EO) sterilization of healthcare products. **Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices**: Woodhead Publishing 2012. cap. 4, p.352.
- 89 LAMBERT, B.; MARTIN, J. Practical Aspects of Biomaterials. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3: Academic Press, 2012. cap. III, p.1573.

- 90 ZAIDI, S. K.; KUMAR, A. Experimental studies in the dead-end ultrafiltration of dextran: analysis of concentration polarization. **Sep. Purif. Technol.**, v. 36, n. 2, p. 115-130,2004.
- 91 DOMB, A. J.; KHAN, W. **Focal Controlled Drug Delivery**. Springer, 2014. 717
- 92 VANICHVATTANADECHA, C. et al. Effect of gamma radiation on dilute aqueous solutions and thin films of N-succinyl chitosan. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 95, n. 2, p. 234-244,2010.
- 93 PHILLIP, E., JR. et al. Ethylene oxide's role as a reactive agent during sterilization: effects of polymer composition and device architecture. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 101, n. 4, p. 532-40,2013.
- 94 AHMED, M. et al. Effects of sterilization treatments on bulk and surface properties of nanocomposite biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 101, n. 7, p. 1182-90,2013.
- 95 MURRAY, K. A. et al. Effects of gamma ray and electron beam irradiation on the mechanical, thermal, structural and physicochemical properties of poly (ether-block-amide) thermoplastic elastomers. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v. 17, p. 252-68,2013.
- 96 ZAJKO, Š.; KLIMANT, I. The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 86-93,2013.
- 97 DAVID, C. Chapter 2 High Energy Degradation of Polymers. **Comprehensive Chemical Kinetics**: Elsevier, v.Volume 14, 1975. p.175-332.
- 98 \_\_\_\_\_. Chapter 1 Thermal Degradation of Polymers. **Comprehensive Chemical Kinetics**: Elsevier, v.Volume 14, 1975. p.1-173.
- 99 RABEK, J. F. Chapter 4 Oxidative Degradation of Polymers. **Comprehensive Chemical Kinetics**: Elsevier, v.Volume 14, 1975. p.425-538.
- 100 ÅGREN, M. **Wound Healing Biomaterials - Volume 2: Functional Biomaterials**. Elsevier Science, 2016.
- 101 SHI, Z. et al. Electroconductive natural polymer-based hydrogels. **Biomaterials**, v. 111, p. 40-54,2016.
- 102 GALANTE, R. et al. **Drug delivering silicone-hydrogel for therapeutic contact lenses: impact of sterilization methods on the system performance (Submitted)** 2017.
- 103 BERNHARDT, A. et al. Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129205,2015.

- 104 VETTEN, M. A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomed.**, v. 10, n. 7, p. 1391-9,2014.
- 105 LEE, S. C.; KWON, I. K.; PARK, K. Hydrogels for Delivery of Bioactive Agents: A Historical Perspective. **Adv. Drug Delivery. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 17-20,2013.
- 106 RAŽEM, D.; KATUŠIN-RAŽEM, B. The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 77, n. 3, p. 288-344,2008.
- 107 TOHFAROSH, M. et al. Effects of gamma and e-beam sterilization on the chemical, mechanical and tribological properties of a novel hydrogel. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v. 53, p. 250-256,2016.
- 108 LANZALACO, S. et al. Sterilization of macroscopic poly(l-lactic acid) porous scaffolds with dense carbon dioxide: Investigation of the spatial penetration of the treatment and of its effect on the properties of the matrix. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 83-90,2016.
- 109 SHI, Y.; XIONG, D.; ZHANG, J. Effect of irradiation dose on mechanical and biotribological properties of PVA/PVP hydrogels as articular cartilage. **Tribology International**, v. 78, p. 60-67,2014.
- 110 KARAJANAGI, S. S. et al. Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 7, p. 1716-1725,2011.
- 111 TARAFI, P. J. et al. Compressed carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) for decontamination of biomaterials and tissue scaffolds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, n. 1–3, p. 192-199,2010.
- 112 KANJICKAL, D. et al. Electron spin resonance studies of the effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 88, n. 2, p. 409-18,2009.
- 113 JIMÉNEZ, A.; ZHANG, J.; MATTHEWS, M. A. Evaluation of CO<sub>2</sub>-based cold sterilization of a model hydrogel. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 101, n. 6, p. 1344-1352,2008.
- 114 TICHÝ, E.; MURÁNYI, A.; PŠENKOVÁ, J. The Effects of Moist Heat Sterilization Process and the Presence of Electrolytes on Rheological and Textural Properties of Hydrophilic Dispersions of Polymers-Hydrogels. **Adv. Polym. Technol.**, v. 35, n. 2, p. 198-207,2016.

- 115 MEYER, M. et al. Sterilisation of collagen materials using hydrogen peroxide doted supercritical carbon dioxide and its effects on the materials properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 102, p. 32-39,2015.
- 116 STOPPEL, W. L. et al. Terminal sterilization of alginate hydrogels: Efficacy and impact on mechanical properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 4, p. 877-884,2014.
- 117 SZABÓ, A. et al. Structural elucidation of hyaluronic acid gels after heat sterilisation. **Polym. Test.**, v. 32, n. 8, p. 1322-1325,2013.
- 118 YAN, X. M. et al. Improved synthesis of hyaluronic acid hydrogel and its effect on tissue augmentation. **J. Biomater. Appl.**, v. 27, n. 2, p. 179-86,2012.
- 119 ANDRIOLA SILVA BRUN-GRAEPP, A. K. et al. The effect of sterilization methods on the thermo-gelation properties of xyloglucan hydrogels. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 95, n. 2, p. 254-259,2010.
- 120 HARA, M. et al. Cross-linking and depolymerisation of gamma-irradiated fish gelatin and porcine gelatin studied by SEC-MALLS and SDS-PAGE: a comparative study. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 21, n. 6-7, p. 877-92,2010.
- 121 FATIMI, A. et al. Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. **Acta Biomater.**, v. 5, n. 9, p. 3423-3432,2009.
- 122 LUCKE, M.; WINTER, G.; ENGERT, J. The effect of steam sterilization on recombinant spider silk particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 481, n. 1-2, p. 125-131,2015.
- 123 FRIESS, W.; SCHLAPP, M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 176-187,2006.
- 124 MAGDA, J. et al. Effects of gamma rays and neutron irradiation on the glucose response of boronic acid-containing "smart" hydrogels. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 99, p. 219-222,2014.
- 125 PITARRESI, G. et al. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. **Int. J. Pharm.**, v. 449, n. 1-2, p. 84-94,2013.
- 126 KANJICKAL, D. et al. Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 3, p. 608-617,2008.

- 127 ELJARRAT-BINSTOCK, E. et al. Preparation, characterization, and sterilization of hydrogel sponges for iontophoretic drug-delivery use. **Polym. Adv. Technol.**, v. 18, n. 9, p. 720-730,2007.



## 2 ESTERILIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS DE HIDROGEL DE QUITOSANO

*A informação contida neste capítulo foi parcialmente publicada em dezembro de 2016, no periódico PLOS ONE 11(12) - (conceito A2, segundo a avaliação Qualis de 2016).*

**Referência:** Galante R, Redigueri CF, Kikuchi IS, Vasquez PAS, Colaço R, et al. *About the Sterilization of Chitosan Hydrogel Nanoparticles.* 2016: PLOS ONE 11(12). doi: 10.1371/journal.pone.0168862





## 2.1 ENQUADRAMENTO

O quitosano (CS) (Figura 2-1), um polímero natural, é dos materiais que mais interesse tem despertado na área dos biomateriais. Este facto deve-se às suas propriedades físico-químicas e biológicas de elevado interesse biomédico e farmacêutico, nomeadamente a biocompatibilidade, não toxicidade, mucoadesividade e atividade antibacteriana <sup>1; 2</sup>.

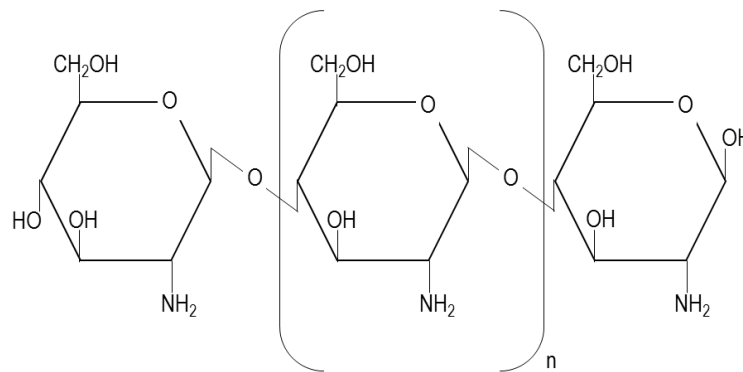


Figura 2-1. Estrutura química do quitosano.

A sua natureza catiónica permite a formação de complexos iónicos estáveis com iões aniónicos polivalentes ou com polímeros de carga oposta, originando compostos distintos que podem assumir diferentes formas físicas, e.g. géis, esponjas, grânulos, filmes e micro/nanopartículas <sup>3</sup>.

Os hidrogéis nanoestruturados (ou nanogéis), como já referido no Capítulo 1, constituem uma classe de materiais promissores que compreendem simultaneamente as vantagens de serem nanoestruturados (e.g. propriedades físico-químicas únicas atribuídas à sua elevada área superficial, forma e estrutura superficiais) com as características dos hidrogéis (e.g. elevada capacidade de retenção de água, biocompatibilidade) <sup>4; 5</sup>.

Um dos métodos amplamente utilizados na obtenção de nanopartículas de quitosano é a gelificação iônica. As primeiras nanopartículas produzidas por esta técnica foram desenvolvidas nos anos 90, utilizando-se como agente reticulante o polianião tripolifosfato de potássio (TPP) <sup>6</sup>. Durante o processo, as nanopartículas formam-se espontaneamente após a adição de TPP à solução de quitosano. Este método tem a grande vantagem de dispensar aditivos durante a produção das nanopartículas de hidrogel, facto que, aliado às características do quitosano, torna estas partículas especialmente atrativas quando se tem em mente aplicações biomédicas ou farmacêuticas. Na literatura é possível encontrar uma grande variedade de estudos elaborados com este tipo de sistemas.<sup>7; 8; 9; 10; 11</sup>.

Apesar de ainda não estarem disponíveis no mercado produtos com nanopartículas de hidrogel de CS/TPP (CS-HNP, do inglês *chitosan hydrogel nanoparticles*), estas têm sido o foco de vários trabalhos, no que diz respeito a aplicações para o fornecimento de fármacos destinados à superfície ocular e à administração intravenosa de medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas <sup>12; 13</sup>.

De acordo com as farmacopeias brasileira, europeia e americana, a esterilidade é condição necessária em ambos os casos acima referidos <sup>14; 15; 16</sup>. Uma extensa revisão bibliográfica realizada por Vetten *et al.* revela que as metodologias convencionais de esterilização, como a filtração, a autoclavagem, a irradiação ou o tratamento químico, podem ser utilizadas na descontaminação/esterilização de nanopartículas <sup>17</sup>.

A esterilização por filtração é talvez o método mais amplamente utilizado, pois não parece ter quaisquer efeitos adversos sobre as nanopartículas <sup>18; 19; 20</sup>.

No entanto, há que considerar aspetos que limitam a recuperação do produto, tais como: a afinidade da nanoestrutura em relação ao filtro, que causa a sua retenção, e a limitação no tamanho de partícula, já que os filtros esterilizantes têm dimensão de poro esterilizante  $\leq 200$  nm<sup>20; 21</sup>. Mesmo que se ultrapassem estes aspetos, há que ter em conta que nem o processo de filtração nem o processo assético de produção conduzem a resultados tão seguros de esterilização quanto os seus congéneres de esterilização terminal<sup>22</sup>, pelos que os últimos são, na medida do possível, aconselháveis e preferíveis.

Quando as metodologias de esterilização terminal convencionais são aplicadas (autoclave, irradiação ou EtO), as alterações no tamanho, no potencial zeta, na dispersão ou no pH são as mais frequentemente observadas, enquanto efeitos secundários resultantes da esterilização<sup>17</sup>. Note-se, ainda, o facto de serem poucos os estudos que efetivamente confirmam a esterilidade do produto final ou que realizam testes de validação com microrganismos resistentes.

A informação disponível sobre a esterilização de nanopartículas de quitosano é escassa, o que reforça a importância deste trabalho, uma vez que são sistemas fortemente estudados e com grande potencial em aplicações farmacêuticas e biomédicas. A evolução para uma possível fase clínica está intimamente ligada ao facto de ser ou não possível a sua esterilização, sem que haja comprometimento da sua integridade e desempenho.

Assim sendo, neste capítulo do trabalho pretendeu-se estudar os efeitos de diferentes métodos de esterilização sobre CS/HNP. Como tal, produziram-se partículas a partir do método da gelificação iónica. Em seguida, sujeitaram-se as amostras a esterilização por autoclave, irradiação gama e exposição a ozono. Estudaram-se os efeitos de tais metodologias procedendo a extensos protocolos

de caracterização antes e depois da etapa de esterilização, nos quais foram avaliadas propriedades como o tamanho de partículas, dispersão de tamanho, o potencial zeta, a estrutura química, a morfologia e a citotoxicidade. Além disso, foram realizados testes de validação da esterilização utilizando-se indicadores biológicos.

## 2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.2.1 Materiais

Apresenta-se, infra, a lista dos principais reagentes utilizados no decorrer do trabalho realizado para este capítulo:

- Quitosano de baixo peso molecular (CS), *medical grade* (purificado) (peso molecular 296 kDa, grau de desacetilação 82%), gentilmente cedido por Altakitin S.A;
- Ácido acético (Glacial) 100%, Merck;
- Ácido clorídrico 37%, P.A.-A.C.S, Qhemis;
- Tripolifosfato de sódio (TPP) TG 85%, Sigma-Aldrich;
- D-manitol  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich;
- Glucose, P.A.-A.C.S., Synth®;
- Cloreto de sódio (NaCl), P.A.-A.C.S., Synth®;
- Hidróxido de sódio (NaOH), P.A.-A.C.S., Synth®;
- Caldo de soja tríptica, (TSB), BACTO®;
- Ágar de soja tríptica (TSA), Difco®;
- Indicador biológico *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, 3M Attest;
- Linha celular de fibroblastos NCTC clone 929 (CCIAL 020), ATCC—CCL;
- Corante vital vermelho neutro, National Aniline Division;
- Meio de cultura Eagle, Sigma Aldrich.

## 2.2.2 Produção das nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP)

A produção da suspensão de nanopartículas foi realizada através da adaptação do método da gelificação iônica, muito utilizado e bem descrito na literatura <sup>6</sup>. Preparou-se uma solução de 0,1% de quitosano (em solução de 0,45% NaCl e 0,5% ácido acético) à qual se adicionou, por gotejamento e com agitação magnética, uma solução de TPP 0,1% (em solução de NaCl 0,9%) (Figura 2-2), até se obter a proporção final de 3:1 (v/v) (CS/TPP). Quando necessário, o pH foi reajustado com NaOH 1M ou HCl 1M.

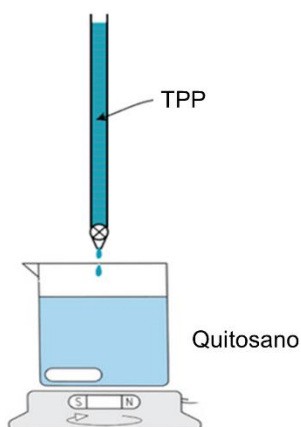


Figura 2-2. Esquema representativo do método de produção das nanopartículas de hidrogel de quitosano.

Este processo envolveu uma fase de otimização prévia, em que se estudou a proporção ideal de CS/TPP, de modo a originar partículas com propriedades adequadas (e.g. tamanho médio aproximado de 300 nm, boa dispersão) e um nível de reprodutibilidade aceitável. Após a adição de TPP, deixou-se a suspensão permanecer em agitação durante uma hora.

Para inferir sobre o eventual efeito protetor de açúcares nos processos de esterilização, manitol ou glucose foram posteriormente adicionados à mistura,

em quantidades definidas, até à obtenção de uma concentração final de 2,5 ou 5%.

Todas as soluções iniciais foram preparadas com água destilada e desionizada e em seguida filtradas (filtro de acetato de celulose, tamanho de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ).

Após preparação e estabilização, as CS-HNP foram armazenadas a 4°C, até à sua futura utilização.

### **2.2.3 Caracterização das nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP)**

#### **2.2.3.1 Estrutura química – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.**

Para o estudo das amostras CS-HNP, recorreu-se a um espectrômetro Perkin-Elmer FTIR (Spectrum 1000). Previamente à análise, foi necessário proceder à diálise da suspensão de CS-HNP (tempo: 18h, meio: água destilada e desionizada, membrana: celulose, peso molecular de corte de 14.000 Da) para remover os sais presentes. Após 2 horas a -80°C, as partículas foram liofilizadas durante 72h a uma pressão negativa de 100 microns<sup>1</sup> e a uma temperatura de -70°C, utilizando-se o sistema FTS System Dura-Dry MP.

Pequenas quantidades do material foram colocadas diretamente em contato com o cristal de ATR. Realizaram-se varrimentos entre os comprimentos de onda 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

---

<sup>1</sup> Mícron = 0,001 mmHg

### **2.2.3.2 Tamanho, índice de dispersão e potencial zeta**

Para a determinação destes parâmetros utilizou-se o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido, He–Ne laser  $\lambda = 633 \text{ nm}$ , ângulo de dispersão  $90^\circ$ ). Amostras de 1 mL da suspensão de nanopartículas preparada segundo o descrito em 2.3.1, foram analisadas à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , antes e após os procedimentos de esterilização.

O cálculo dos parâmetros foi realizado diretamente pelo software Malvern Zetasizer v7.10. Neste estudo foram utilizados valores de viscosidade (0,89 cP), índice de refração (1,33) e constante dielétrica (78,3) da água a  $25^\circ\text{C}$ , por se considerar a que a suspensão é extremamente diluída. As medições foram feitas pelo menos em triplicado.

Foram, ainda, efetuados testes de estabilidade, analisando-se em tempos determinados (1, 24, 48 e 72 horas; 1 e 7 meses) as amostras em armazenamento.

### **2.2.3.3 Condutividade e pH**

Variações de pH e condutividade podem estar associadas à degradação do material como resultado da esterilização. Neste sentido, foram efetuadas medições com sensores de bancada apropriados (inoLab® pH 7110 (WTW) e Cond 340i/SET (WTW), respetivamente), após calibração com soluções padrão.

### **2.2.3.4 Morfologia**

#### ***Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)***

A avaliação morfológica das CS-HNP por SEM foi realizada num equipamento Hitachi S2400 15 KeV.

As amostras foram preparadas de duas maneiras diferentes: o primeiro envolveu a secagem de uma gota das CS-HNP, à temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sobre uma lamela de vidro; o segundo realizou-se utilizando o protocolo de lavagem e liofilização referido na secção 2.2.3.1, acrescido de uma etapa de revestimento com ouro-paládio (4 nm de espessura) para tornar as tornar condutoras e permitir a sua visualização.

#### ***Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)***

A análise das CS-HNP por TEM foi realizada num microscópio eletrónico de transmissão Hitachi H-8100, a 200 kV. As amostras foram previamente preparadas à semelhança da secção 2.2.3.1, i.e. lavagem por diálise. Após a lavagem, pequenas quantidades da suspensão foram depositadas numa grelha (*grid*) metálica de cobre (3 mm de diâmetro, *mesh* 200: *pitch* 127 $\mu\text{m}$ ), procedendo-se em seguida à liofilização nas condições mencionadas na mesma secção.

#### **2.2.3.5 Absorvância**

A monitorização de possíveis alterações no espectro de absorção UV-Vis das suspensões de CS-HNP foi realizada com recurso a um espectrómetro Thermo Scientific – Evolution 20. A absorvância (Abs) é dada por (Eq. 2-1):

$$Abs = \log\left(\frac{100}{\%T}\right) \quad \text{Eq. 2-1}$$



Onde %T é a transmitância. Os espectros foram obtidos em triplicado, em cuvetes de 1 cm de lado contendo 1mL de amostra, sem recurso a diluições e utilizando uma solução salina de NaCl 0,9%, para linha de base.

### **2.2.3.6 Reatividade biológica**

Os ensaios de reatividade biológica foram realizados por difusão de agar, seguindo os procedimentos descritos pelas farmacopeias brasileira, europeia e americana (USP<87>).

Células de fibroblastos L929, foram cultivadas em monocamada em placas de 60 mm de diâmetro, revestidas com ágar e coradas com um corante vital (vermelho neutro). Em cada placa colocou-se 7 mL da suspensão de células com uma concentração de  $3,5 \times 10^5$  células/mL.

Discos de filtro de papel estéril com uma área de superfície de aproximadamente  $0,2 \text{ cm}^2$  foram imersos durante 30s na suspensão de nanopartículas de hidrogel.

Fragmentos de látex e discos de papel de filtro não tóxico foram utilizados como controlos positivos e negativos, respectivamente.

As amostras (controlo e CS-HNP) preparadas conforme acima descrito, foram colocadas em contato com a camada de ágar solidificado, e incubadas 24 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Este procedimento foi realizado numa incubadora humidificada, contendo 5% de dióxido de carbono. As placas foram analisadas, macro e microscopicamente, e de acordo com a zona afetada que se estende das amostras, a reatividade biológica foi classificada numa escala de grau N=0 (sem reatividade) até grau N=4 (reatividade severa). Todos os testes foram realizados em triplicado.

## 2.2.4 Esterilização

### 2.2.4.1 Esterilização por Ozono

Para a realização da esterilização por Ozono seguiu-se o procedimento validado em conformidade com a norma *ISO 14937*, para esterilização a gás de dispositivos médicos. Para tal, recorreu-se a um equipamento protótipo (fabricado pela Ortosíntese, São Paulo, Brasil) desenvolvido pela empresa Brasil Ozônio, incubada no Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia (CIETEC). O equipamento (Figura 2-3) consiste numa câmara, com capacidade para 125 litros, no interior da qual se faz difundir o gás por meio de um sistema pulsátil. Durante o processo, são atingidos picos de concentração de 40 g/m<sup>3</sup> e 50 g/m<sup>3</sup>. O gás é gerado fora da câmara, a partir do ar atmosférico (concentradores de oxigênio), através de descargas elétricas.

Cada pulso de ozonização é composto de quatro etapas:

- 1ª Etapa: estabelecimento de vácuo no interior da câmara;
- 2ª Etapa: enchimento da câmara com gás ozono com humidade de entre 91-95% e temperatura entre 30-35°C;
- 3ª Etapa: estabilização das condições durante 20 minutos (*plateau*);
- 4ª Etapa: esvaziamento e vácuo.



Figura 2-3. Esterilizador de Ozono desenvolvido pela Brasil Ozônio. Detalhe evidenciando o interior da câmara de esterilização e o acondicionamento das amostras.

As amostras de CS-HNP foram sujeitas a 2, 4, 8 e 10 pulsos de ozonização, na presença e ausência de açúcares (glucose e manitol). O acondicionamento foi feito em recipientes de plástico, contendo 4mL da suspensão. As tampas foram deixadas em separado, de modo a facilitar a difusão do gás (detalhe à direita na Figura 2-3). Após o término do processo, sem retirar as amostras da câmara, as tampas foram recolocadas, com o máximo cuidado, afim de evitar uma possível contaminação.

#### **2.2.4.2 Esterilização por calor húmido**

Para esta etapa do trabalho, utilizou-se uma Autoclave Sercon, representada na Figura 2-4.



Figura 2-4. Equipamento utilizado na esterilização por calor húmido.

As amostras (4 mL) foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro, com tampas de rosca levemente apertadas. A exposição ao calor húmido foi realizada a 100, 110 e 121°C, variando o tempo de autoclavagem (5, 10 e 15). Todos os testes foram realizados em triplicado.

### **2.2.4.3 Esterilização por irradiação gama**

A esterilização por irradiação gama das CS-HNP foi realizada no Irradiador Multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN), São Paulo (Figura 2-5)



Figura 2-5. Irradiador Multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. (Retirado de [www.ipen.br](http://www.ipen.br)).

A suspensão de partículas foi acondicionada em tubos de ensaio de vidro, contendo 4 mL da suspensão, e sujeita a doses de 8, 13 e 25 kGy, com débito/dose entre 5 e 6 kGy/h. A dose absorvida foi monitorizada com recurso a dosímetros (Harwell-Red), como o da Figura 2-6.



Figura 2-6. Dosímetro de *perspex* utilizado na determinação da dose absorvida.

Durante o procedimento as amostras foram mantidas a baixa temperatura, com recurso a bolsas de gelo. Todas as condições foram testadas, no mínimo, em triplicado.

## **2.2.5 Avaliação da esterilidade**

A submissão a processo de esterilização não obrigatoriamente resulta em produto estéril. Desta forma, optou-se por caracterizar a esterilidade das amostras em função da letalidade de esporos resistentes, em níveis que representassem, com segurança, a biocarga (bioburden). Assim, procedeu-se à contaminação prévia das amostras com o microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 na forma esporulada (3M Attest), uma vez que este mostrou ser resistente à esterilização por ozono <sup>23</sup>. Como tal, seguiu-se o procedimento experimental, adaptado de <sup>23</sup> e descrito sumariamente em seguida.

### **2.2.5.1 Quantificação do microrganismo pelo método das diluições decimais sucessivas.**

Este método consiste na realização de diluições sucessivas da suspensão bacteriana em condições assépticas e posterior transferência de quantidades conhecidas das mesmas para placas de petri (Figura 2-7). O crescimento dos microrganismos em meio sólido dá origem à formação de colónias (crescimento macroscopicamente visível resultante da multiplicação celular) a partir do qual é possível fazer uma contagem e daí obter a estimativa da quantidade de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) existentes na solução inicial.

Para obter a suspensão inicial removeu-se a fita impregnada com o microrganismo, contida no interior do frasco do indicador biológico comercial autocontido (Figura 2-8).

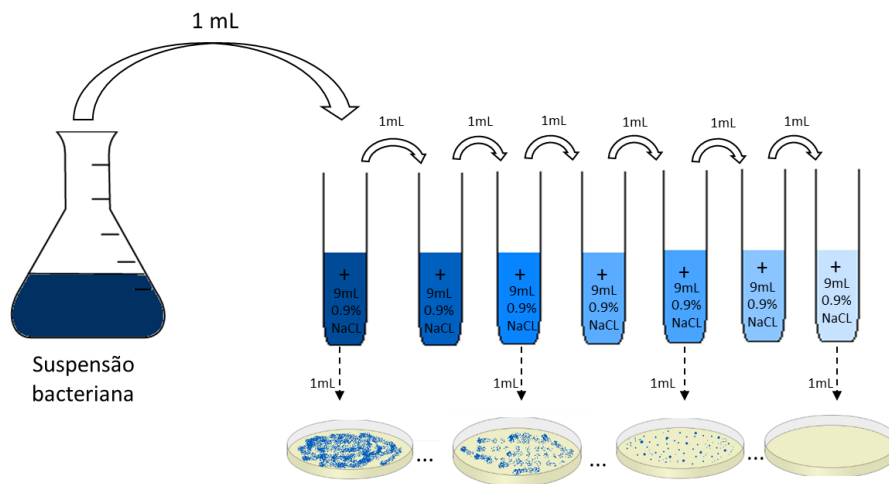


Figura 2-7. Ilustração do método das diluições decimais sucessivas.

Com auxílio de um aparelho de vórtex e esferas de vidro de pequenas dimensões (~ 2 mm de diâmetro), procedeu-se à completa dissociação das suas fibras celulósicas em 9 mL de solução salina (0,9% NaCl). Seguiu-se o procedimento, ilustrado na Figura 2-7, i.e. diluições decimais sucessivas. 1 mL de cada diluição foi então transferido para placas de petri, contendo meio de cultura TSA, e sujeito depois a um período de incubação a 52-56°C, durante 7 dias. Terminada a incubação, realizou-se a contagem das UFC.



Figura 2-8. Indicadores biológicos (BI) autocontidos de *Geobacillus stearothermophilus*. À direita, o BI como é comercializado, dispendo de uma fita celulósica impregnada de microrganismos e uma ampola azulada contendo o meio de cultura. À esquerda: os BI, depois de submetidos a processos de

esterilização. A ampola é quebrada e o meio de cultura entra em contacto com a fita. Após o período de incubação, o meio de cultura permanece azul, indicando a ausência de microrganismos viáveis, ou tornar-se-á amarelo indicando crescimento bacteriano.

### 2.2.5.2 Contaminação dos hidrogéis e teste de esterilidade

Antes da esterilização, às amostras de CS-HNP, acondicionadas nos recipientes de plástico, foi adicionada uma determinada quantidade de suspensão bacteriana de modo a perfazer os 4 mL e obter concentrações de  $10^4$ ,  $10^3$  ou  $10^2$  UFC por mL.

Após o processo de esterilização foi efetuada a transferência, em ambiente assético, de 1 mL das CS-HNP para tubos de ensaio contendo 9 mL de meio TSB (Figura 2-9). Finalmente, deixaram-se os tubos incubados por 14 dias, a 52-56°C, verificando-se diariamente a turbidez do meio, por análise visual.

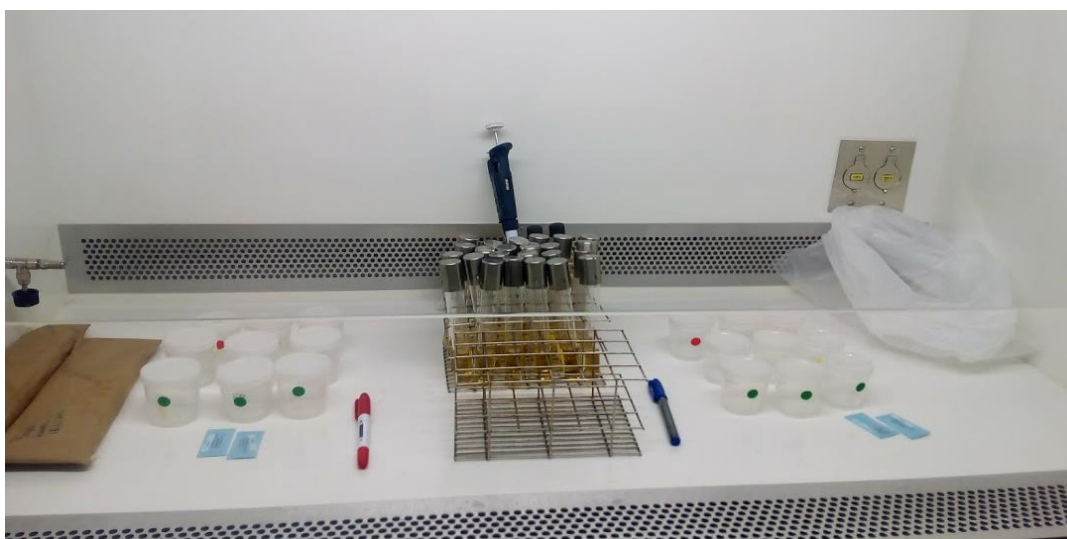


Figura 2-9. Foto tirada à câmara de fluxo laminar durante o estudo da letalidade de esporos, com vistas a caracterizar a esterilidade das amostras.



## **2.2.6 Tratamento estatístico**

A análise estatística foi realizada usando o software R Project, versão 3.2.0. As medições são apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão, salvo indicação em contrário. O teste ANOVA foi utilizado para determinar se as médias dos vários grupos são estatisticamente diferentes. Utilizou-se o teste de Bonferroni para a realização de comparações múltiplas. Para os dados que não seguem uma distribuição normal (comprovada pela aplicação do teste de normalidade de Shapiro Wilk, com  $\alpha = 5\%$ ), foi usado o teste de Kruskal-Wallis para decidir se as distribuições da população seriam idênticas. O nível de significância escolhido foi  $\alpha = 5\%$ .

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Nanopartículas de hidrogel de quitosano (CS-HNP)**

Fatores como o pH, o peso molecular do CS e o seu grau de desacetilação, podem afetar as propriedades físico-químicas das nanopartículas e, em última instância, influenciar a sua estabilidade <sup>24; 25; 26</sup>. Além disso, como já referido, os procedimentos de esterilização podem originar alterações nas propriedades intrínsecas destes materiais. Assim sendo, e como ponto de partida, realizou-se uma caracterização extensa das principais propriedades das CS-HNP, antes de qualquer esterilização.

Após uma fase de otimização para obter nanopartículas de quitosano com propriedades de hidrogel, que abrangueu o desenvolvimento da técnica de produção e procurou o estabelecimento das condições mais adequadas (agitação, temperatura, proporção de CS/TPP), fixou-se o protocolo de

preparação anteriormente descrito. Apesar do método de produção ser aparentemente de fácil execução, observaram-se algumas dificuldades em alcançar uma reprodutibilidade aceitável, também reportadas por Abdel-Hafez *et al.* <sup>26</sup>.

Visualmente a nanosuspensão de CS-HNP apresentou um aspecto opalescente, levemente azulado, que pode ser observado na Figura 2-10.

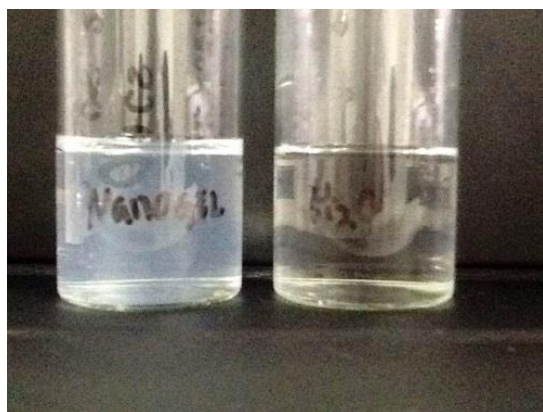


Figura 2-10. Aspecto visual opalescente da suspensão de CS-HNP (esquerda), comparativamente ao aspecto visual da água (direita).

Numa primeira abordagem avaliou-se a formação de nanopartículas por análise FTIR (Figura 2-11). Para fins comparativos, obtiveram-se também os espectros do CS puro e do TPP, onde se podem identificar como principais bandas características:

- CS: a banda intensa a  $3361\text{ cm}^{-1}$  (correspondente à vibração de alongamento dos grupos O-H e/ou N-H), as bandas de absorção a  $1156\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C), a  $1072$  e a  $1024\text{ cm}^{-1}$  (correspondentes a vibrações de alongamento do grupo C-O) <sup>24</sup>;
- TPP: a presença dos grupos P-O e P=O devido às bandas  $1210\text{ cm}^{-1}$  e  $1094\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

A formação de CS-HNP pôde ser confirmada pelo aparecimento das bandas de absorção dos grupos P-O ( $1215\text{ cm}^{-1}$ ) e por vibrações de deformação dos grupo N-H ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ), que por sua vez são indicativos de interação entre CS e TPP <sup>24</sup>.

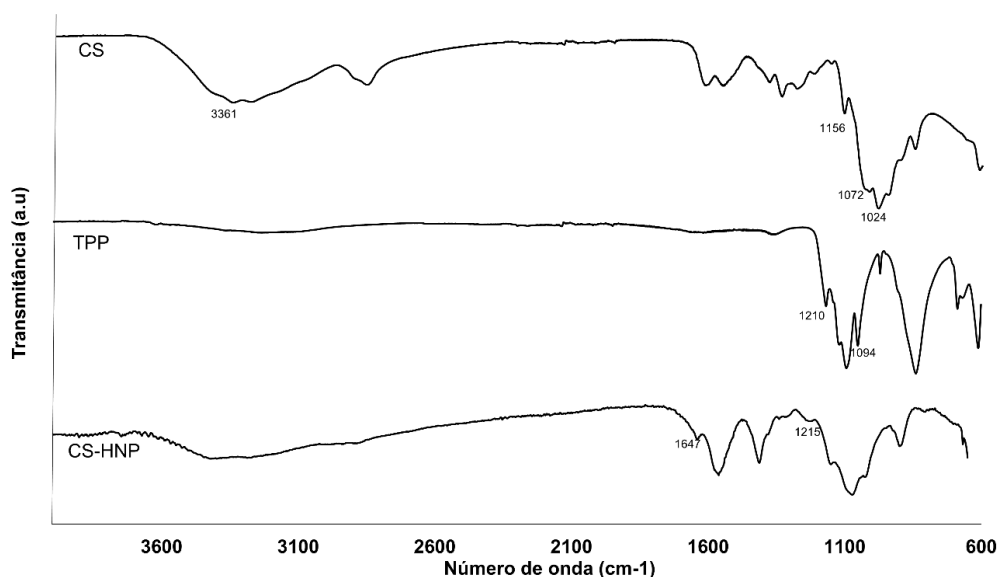


Figura 2-11. Espectro de análise FTIR-ATR obtido para CS puro, TPP puro e para CS-HNP, confirmando-se a presença das principais bandas características dos compostos em estudo.

### 2.3.1.1 Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

Determinou-se o tamanho, o PDI, o potencial zeta, a condutividade e o pH, imediatamente após a produção e a diferentes tempos até 7 meses de armazenamento.

No geral, obtiveram-se suspensões de nanopartículas com dimensões médias a variar entre 230-370 nm. O PDI, parâmetro adimensional utilizado para descrever a variação de dimensões das partículas, calculado pelo *software* do equipamento, pode variar entre 0 e 1. Valores menores que 0,05 são dificilmente observados, salvo em padrões de elevada monodispersão. Valores superiores a

0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanhos muito ampla. No caso da suspensão de CS-HNP, o valor de PDI permaneceu abaixo de 0,2, característico de uma suspensão bastante homogénea e monodispersa, situação desejável para aplicações farmacêuticas.

Tabela 2-1 - Tamanho médio das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção.

<b>Tempo pós-produção</b>				
<b>1h</b>	<b>24h</b>	<b>72h</b>	<b>30 dias</b>	<b>7 meses</b>
<b>(nm)</b>				
288±15	367±5	372±6	366±6	314±2

Tabela 2-2 - PDI das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção.

<b>Tempo pós-produção</b>				
<b>1h</b>	<b>24h</b>	<b>72h</b>	<b>30 dias</b>	<b>7 meses</b>
<b>PDI</b>				
0,129±0,021	0,178±0,034	0,141±0,024	0,135±0,041	0,185±0,03

A Tabela 2-1 e a Tabela 2-2 apresentam a variação do tamanho médio das partículas e o PDI ao longo de 7 meses. Com o tempo de armazenamento pode-se observar o ligeiro aumento do tamanho (de 288 para 314), e do PDI (de 0,129 para 0,185) o que sugere que ocorre alguma agregação embora em baixo grau.

O aumento de tamanho das partículas, observado no decorrer das primeiras 24 horas, encontra-se documentado na literatura <sup>27</sup> e é decorrente da agregação de partículas menores presentes, formando-se, assim, uma população mais homogénea <sup>27</sup>. Na Figura 2-12 apresenta-se, a título de

exemplo, um gráfico de distribuição de tamanhos das CS-HNP (tempo de armazenamento de 24 h), obtido pelo Zetasizer.

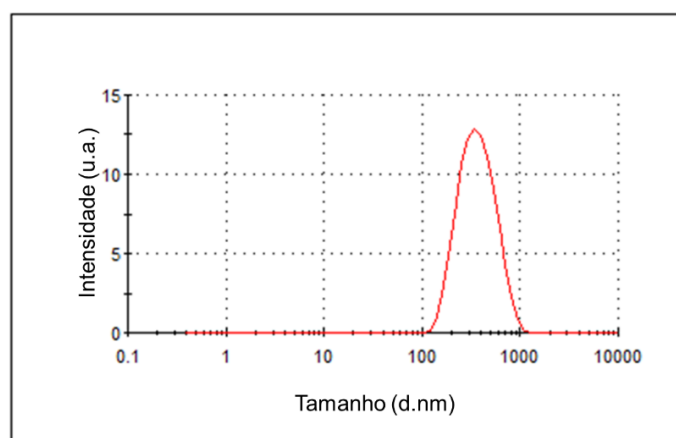


Figura 2-12. Gráfico de distribuição de tamanhos de uma amostra armazenada por 24 horas, obtido pelo Zetasizer.

Em relação ao potencial zeta, amplamente utilizado para prever a estabilidade a longo prazo, sabe-se que, quando o polímero catiónico quitosano e o polianião TPP entram em contato, formam-se, de maneira espontânea, complexos compactos (partículas) com uma carga superficial positiva <sup>27</sup>. Sabe-se ainda que as nanopartículas tendem a aglomerar-se para minimizar a energia superficial, consequência da sua elevada área superficial <sup>28</sup>.

Como esperado, os valores de potencial zeta, obtidos pelo equipamento Zetasizer, para as CS-HNP em estudo, revelaram uma carga superficial positiva, na ordem dos  $25 \pm 2$  mV (Tabela 2-3). Este valor manteve-se estável ao longo dos estudos de estabilidade, apesar de se verificarem pequenas variações, da ordem dos 5%. Os resultados sugerem a predominância de forças de repulsão entre as partículas, o que, por sua vez, contribui para uma suspensão estável <sup>28</sup>.

Tabela 2-3 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosano, em diferentes tempos, após a respectiva produção.

Tempo pós-produção				
1h	24h	72h	30 dias	7 meses
Potencial zeta				
25±1	24±2	25±2	26±1	25±2

Normalmente, as suspensões estáveis de partículas catiónicas (como o quitosano), estão associados valores de potencial zeta acima de 30 mV <sup>28</sup>. Contudo, a estabilização de nanopartículas poliméricas pode também resultar da estrutura estereoquímica, devido ao elevado peso molecular das cadeias do polímero, neste caso, ao quitosano <sup>28</sup>.

A condutividade e o pH permaneceram constantes ao longo do tempo de armazenamento (12±1 mS/cm e 3,9±0,10, respectivamente).

### 2.3.1.2 Morfologia

A análise por TEM revelou a presença de partículas com forma arredondada irregular, cujas dimensões no eixo maior estão entre 100-200 nm. Imagens de TEM das CS-HNP. Ponto de difração representado no canto superior esquerdo (Figura 2-13). O ponto de difração (detalhe no canto superior esquerdo da figura) demonstrou que as CS-HNP, fortemente aglomeradas por estarem liofilizadas, são totalmente amorfas, sem vestígios de cristalinidade.

Relativamente à análise por SEM (Figura 2-14), numa primeira abordagem, a morfologia das partículas foi avaliada após secagem de uma gota da suspensão sobre uma lamela de vidro. Os resultados obtidos através desta análise (tamanho médio >20 nm) divergem dos conseguidos pelo Zetasizer (tamanho médio > 200 nm), uma vez que as imagens correspondentes são de estruturas desidratadas e aglomeradas (Figura 2-14 A). Este facto também se encontra relatado na literatura <sup>29</sup>.

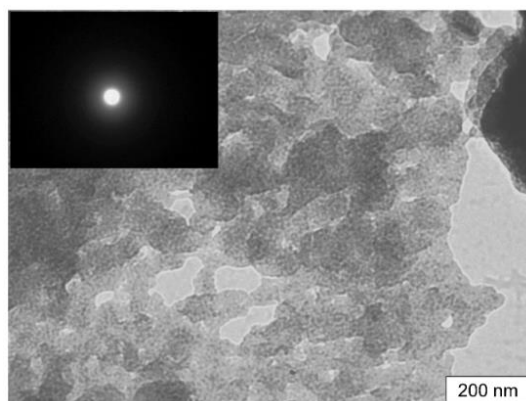


Figura 2-13. Imagens de TEM das CS-HNP. Ponto de difração representado no canto superior esquerdo.

Tornou-se, então, necessário estabelecer outro tratamento de secagem, como o recurso à liofilização, na tentativa de conservar a conformação da estrutura hidratada (Figura 2-14 B). Deste modo, foi então possível observar aglomerados de nanopartículas onde se podem individualizar algumas com tamanho médio a variar entre 200-300 nm.

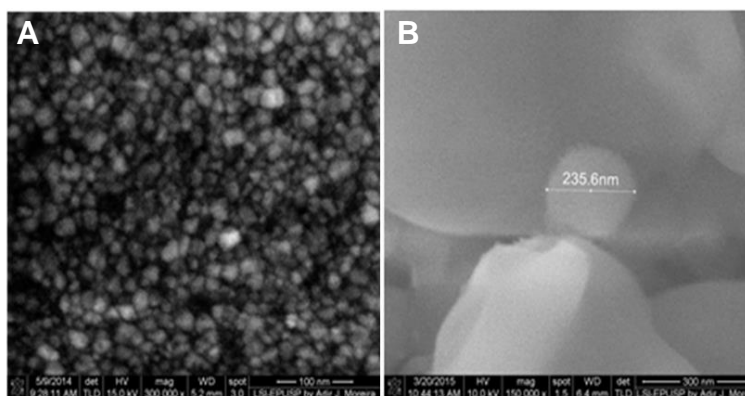


Figura 2-14. Imagens de SEM das CS-HNP submetidas a secagem por evaporação ao ar, (A- ampliação 300 000x) e a liofilização (B – ampliação 150 000x).

### 2.3.2 Efeito da esterilização por calor húmido

As suspensões de CS-HNP foram autoclavadas a diferentes temperaturas (121, 110 e 100 ° C) e durante diferentes tempos (5, 10, 15 e 30 min). Em todos os casos, os sinais de degradação foram evidentes, uma vez que as amostras tratadas perderam quer a sua característica cor azulada, quer o seu aspecto opalescente.

Para as autoclavagens realizadas a 121°C e 110°C, o grau de degradação impossibilitou a análise por Zetasizer.

Apenas foi possível avaliar as amostras tratadas a 100°C (Figura 2-15), para as quais a medições comprovaram a sua baixa qualidade, revelando uma taxa de contagem de partículas por segundo muito baixa (<90kcps), quando comparadas às amostras de controlo não esterilizadas, (> 300 kcps) (Figura 2-15 A). Os resultados demonstraram, ainda, o aumento da heterogeneidade da amostra com o aumento do tempo de tratamento, comprovado quer pelo aparecimento de populações de partículas de diferentes tamanhos (Figura 2-15 B), quer pelo aumento considerável do PDI (Figura 2-15 C).

Foi, ainda, avaliado o possível efeito da adição de açúcares, já que na literatura existem dados que sugerem o seu efeito protetor durante a autoclavagem de soluções de quitosano <sup>30</sup>. No entanto, nas condições estudadas, não se observou qualquer efeito protetor dos açúcares adicionados (glucose e manitol).

Perante a total degradação das CS-HNP, não se prosseguiu com as restantes caracterizações das amostras esterilizadas por autoclave.



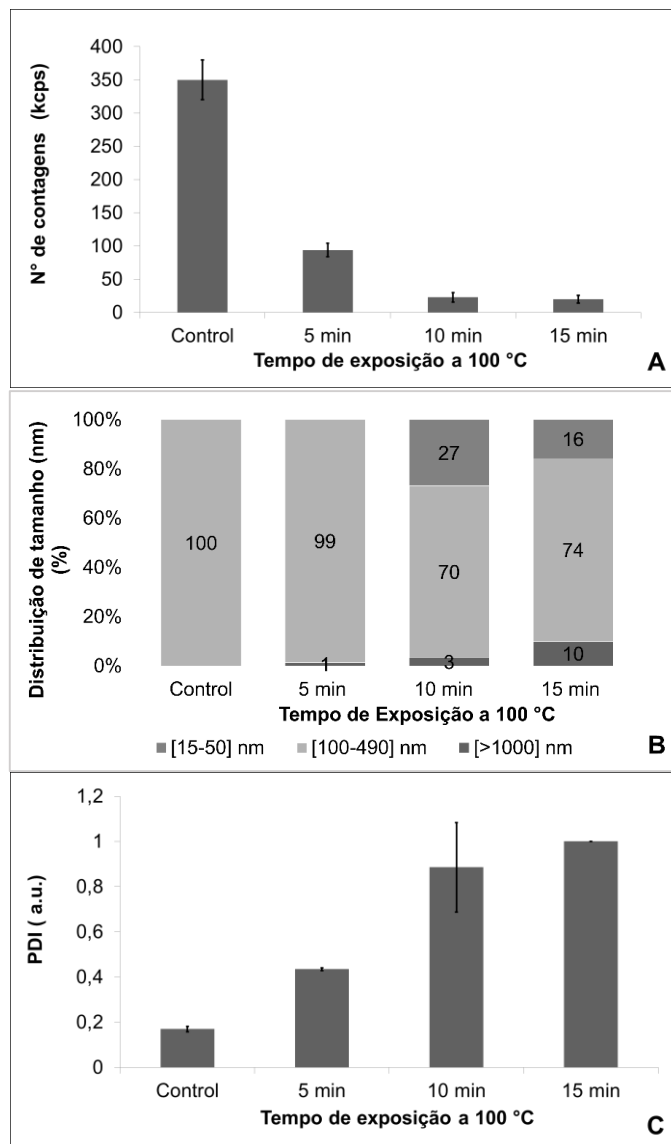


Figura 2-15. Dados da análise por Zetasizer relativos as CS-HNP autoclavadas a 100°C: A - Contagem de partículas por segundo; B - distribuição de tamanho; C - PDI. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3).

### 2.3.3 Efeito da esterilização por irradiação gama

A esterilização por irradiação gama foi realizada de duas formas. Em primeiro lugar procurou-se irradiar as amostras após a sua estabilização, sem recurso a qualquer tratamento intermediário ou aditivo. Apesar de o espectro UV-Vis das amostras demonstrar apenas alterações ligeiras (Figura 2-16 A),

constatou-se que as nanopartículas, mesmo após a irradiação com pequenas doses (2, 8 e 13 kGy – na figura, destas, apenas se apresenta o espectro da última) perdiam o aspeto de suspensão, ficando evidente, a olho nu, a presença de aglomerados macroscópicos que se acumulavam no fundo do recipiente (imagem no canto superior direito da Figura 2-16 A).

As medições de Zetasizer mostraram, ainda, efeitos adversos consideráveis no que diz respeito ao tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta, como se pode observar na Figura 2-17. Os resultados obtidos sugerem degradação severa das CS-HNP. O tamanho das partículas aumentou significativamente (*valor-p*<0,001), bem como o PDI (*valor-p*<0,001) (Figura 2-17 A e B). Já o potencial zeta diminuiu comparativamente às amostras de controlo para todas as doses de irradiação (*valor-p*<0,001) (Figura 2-17 C). Todos estes factos estão concordantes com a maior propensão à aglomeração observada.

Os valores de condutividade e pH permaneceram sem alterações significativas, relativamente às amostras não esterilizadas.

Perante os resultados observados, procedeu-se a uma segunda forma de esterilização por irradiação gama, na qual se procurou minimizar os efeitos adversos, adicionando à suspensão quantidades definidas de açúcares, com o intuito de que estes componentes atuassem como protetores. É possível encontrar na literatura referências sobre este efeito, em casos da irradiação de fármacos e outros materiais contendo polímeros <sup>31</sup>.

Os resultados obtidos expressaram um aumento significativo da resistência das CS-HNP à exposição à radiação gama, a começar pelo aspecto visual inalterado das suspensões irradiadas.

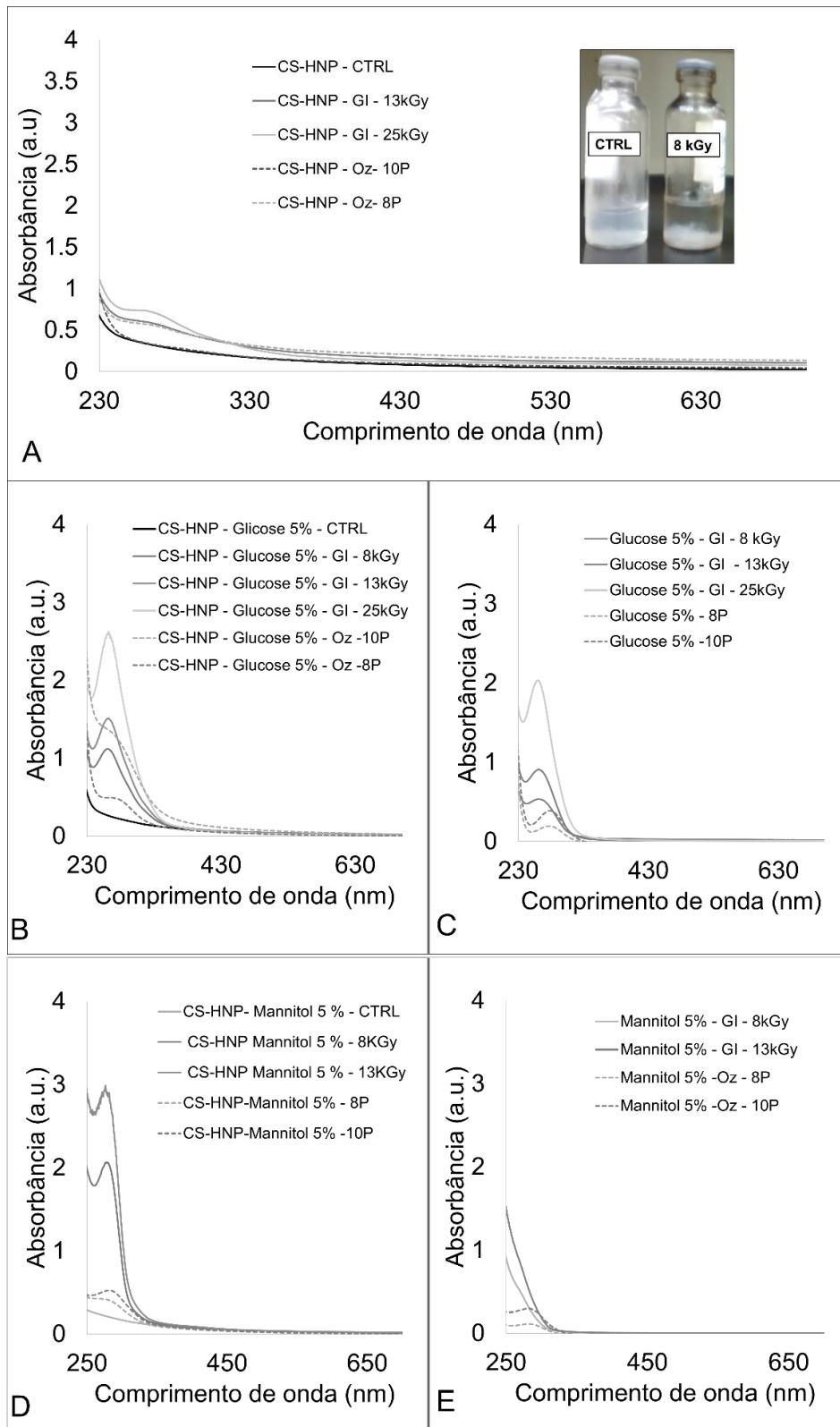


Figura 2-16. Espectros de absorvância UV-Vis: A- CS-HNP sem adição de açucares; B- CS-HNP na presença de glucose; C- soluções de glucose; D- CS-

HNP na presença de manitol; E- soluções de manitol. CTRL- não esterilizado; GI: esterilizado por irradiação gama; OZ- esterilizado por ozonização.

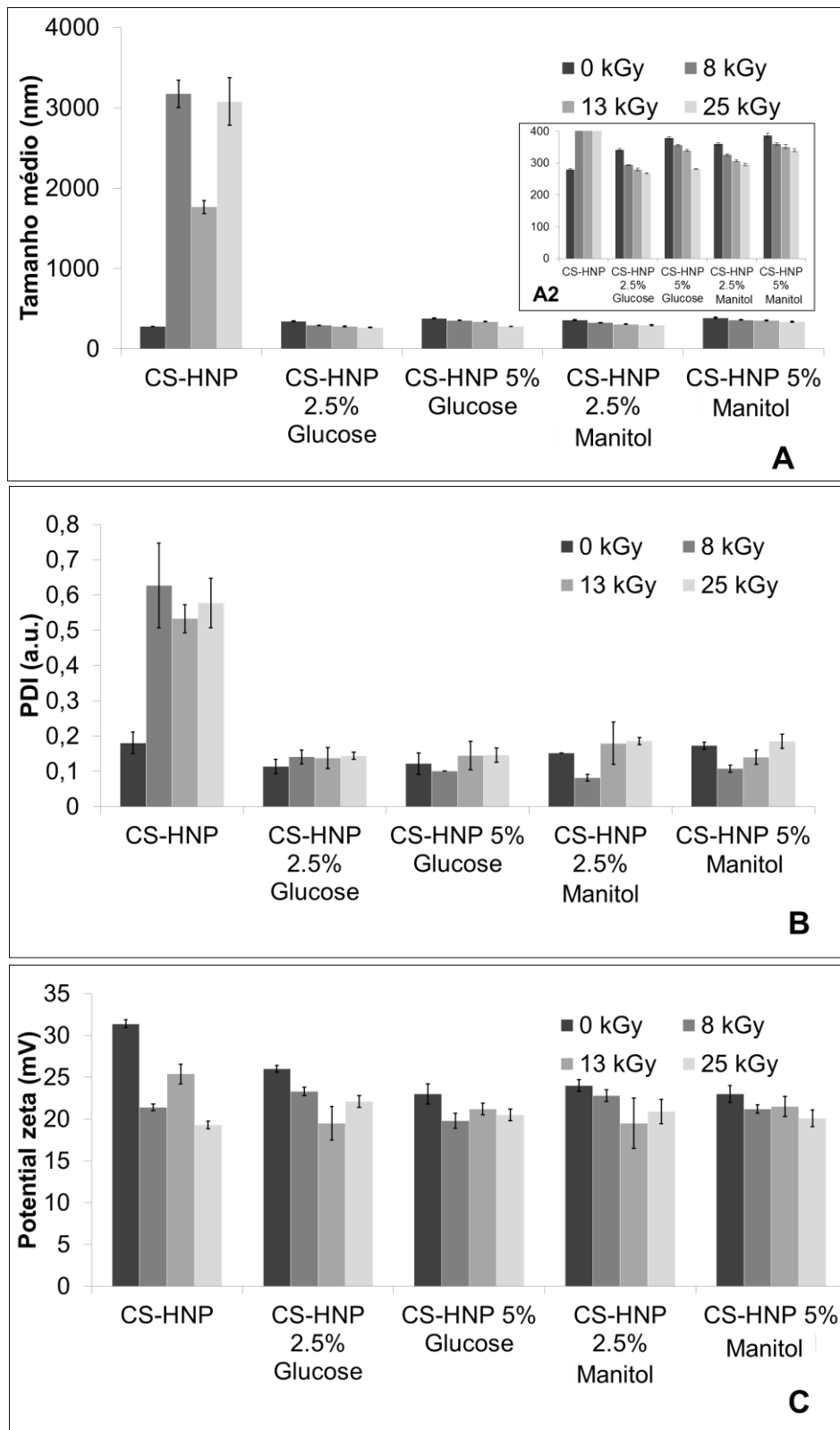


Figura 2-17. Dados da análise por Zetasizer das CS-HNP irradiadas na ausência e presença de açúcares: A- tamanho médio de partícula; B- PDI e C- potencial zeta. As barras de erro correspondem aos desvios padrão ( $n \geq 3$ ).

Após a irradiação, as variações observadas no tamanho médio de partícula e no PDI, relativamente às amostras não tratadas, foram significativamente menores (Figura 2-17 A e B). A presença de açúcares na suspensão de CS-HNP evitou a formação de agregados e a consequente sedimentação. Pode-se observar, no entanto, uma diminuição no tamanho de partícula perante o aumento da dose de radiação (*valor-p* < 0,001, para todas as hipóteses analisadas) (ampliação no canto superior direito da Figura 2-17 A).

Em relação ao potencial zeta, constatou-se uma tendência de diminuição após a irradiação (Figura 2-17 C), embora em menor grau do que aquela observada sem a presença de açúcares. No entanto, os valores mantiveram-se acima de 20 mV, o que, tendo em conta o mecanismo de estabilização por esterificação anteriormente referido, pode ainda considerar-se ser aceitável.

Relativamente as amostras irradiadas de CS-HNP com adição de glucose, os espectros de absorbância UV-Vis obtidos apresentaram alterações na faixa de comprimento de onda 260 – 280 nm, na qual surgiu um pico bem definido (Figura 2-16 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** B). Para esta alteração podem ter contribuído dois fatores distintos: por um lado possíveis alterações sofridas pelo açúcar decorrentes da irradiação, uma vez que os espectros relativos às soluções de glucose pura apresentaram comportamentos semelhantes (Figura 2-16 C). Por outro, a possível formação, por ação da radiação, de um complexo quitosano-glucose. Na literatura é possível encontrar trabalhos com relatos que apontam para o elevado poder antioxidante desta

substância <sup>32; 33</sup>. Este poder antioxidante pode, por sua vez, ser o responsável pelo efeito protetor observado contra a radiação.

No caso das amostras irradiadas de CS-HNP, com adição de manitol, a irradiação também originou alterações nos espectros UV-Vis, com a formação de um pico aos 280 nm (Figura 2-16 D). Porém, não se observou o mesmo comportamento nos espectros de soluções de manitol puro (Figura 2-16 E), os quais apresentaram, no entanto, um aumento da absorbância com a maior dose de radiação. Estes dados apontam para o facto de, quer as CS-HNP, quer os açúcares manitol, sofrerem alterações de alguma natureza.

As mesmas tendências foram observadas para a concentração mais baixa de açúcar (2,5%) tanto para a glucose como para o manitol.

A irradiação gama pode produzir, como espécies primárias, radicais H<sup>·</sup> e OH<sup>·</sup> e eletrões solvatados <sup>34</sup> que, por sua vez, podem interagir quimicamente com a glucose e o manitol. A identificação dos possíveis produtos desta interação não foi realizada para este trabalho, porém, considera-se que a presença dos mesmos deverá ser responsável pelas alterações observadas nos espectros UV-Vis.

De acordo com o autor Helmut Heusinger <sup>34</sup>, um dos principais produtos resultantes da radiólise da glucose consiste no composto malondialdeído. No seu trabalho, Heusinger utilizou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para identificar outros produtos de fragmentação: e.g. D-gliceraldeído, ácido D-glicérico, hidroximalondialdeído, ácido 2,3-dihidroxi-4-oxo-butanóico, tetrodialdose, ácido D-arabinoico, D-xilose, ácido 2,3,4-Trihidroxi-5-oxo-pentoico, D-arabinose.

Relativamente ao manitol, a sua exposição à radiação gama conduz à oxidação dos grupos de álcool primários, produzindo D-manose, seguida da formação secundária de arabinose <sup>35</sup>.

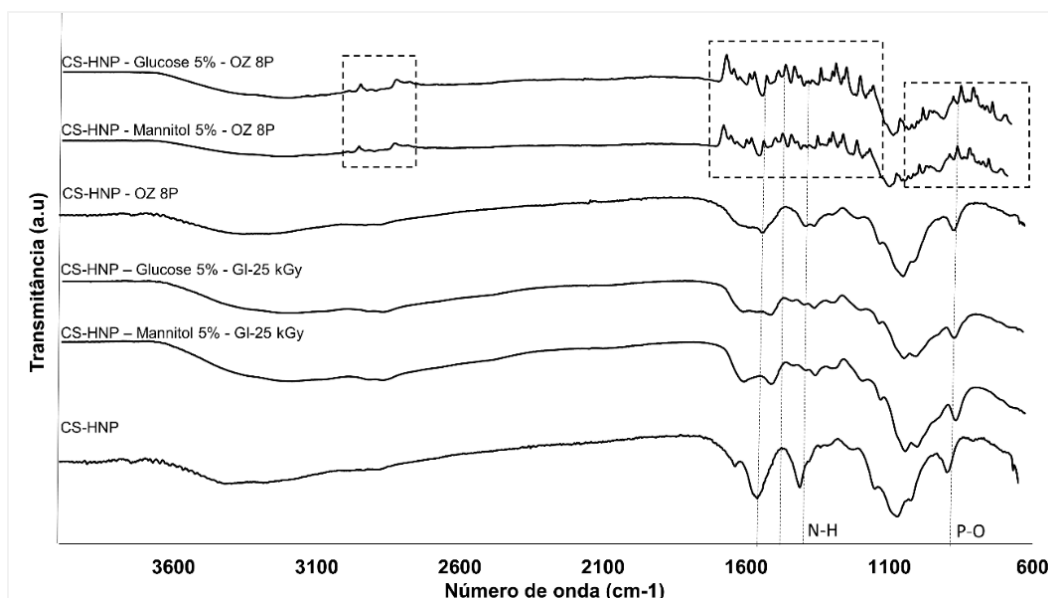


Figura 2-18. Espectros de análise por FTIR-ATR das amostras CS-HNP antes e após a esterilização (GI: irradiação gama, Oz: ozonização).

A partir dos espectros obtidos por FTIR-ATR (Figura 2-18), foi possível concluir que, embora com efeitos protetores significativos, a presença de açúcares não evitou a ocorrência de alterações químicas, decorrentes da irradiação. Os grupos amins e fosfato foram os mais afetados por este método.

A análise morfológica por SEM não permitiu a identificação de diferenças entre as amostras não esterilizadas e as irradiadas (imagens não apresentadas).

Relativamente à eficácia das condições de esterilização, no teste de esterilidade realizado não se observaram evidências de crescimento microbiano em nenhuma das amostras irradiadas e testadas (Tabela 2-4).

Tabela 2-4 - Resultados referentes aos testes de esterilidade e citotoxicidade.

Amostra	Crescimento microbiológico			Grau de reatividade
	10 <sup>2</sup> UFC/mL	10 <sup>3</sup> UFC/mL	10 <sup>4</sup> UFC/mL	N
Ctrl positivo	CB (dia 1)	CB (dia 1)	CB (dia 1)	3
Ctrl negativo	Estéril	Estéril	Estéril	0
Ozono 2 Pulsos	CB (dia 1)	CB (dia 1)	CB (dia 1)	[N/A]
Ozono 4 Pulsos	CB (dia 1)	CB (dia 2)	CB (dia 1)	[N/A]
Ozono 8 Pulsos	Estéril	Estéril	CB (dia 1)	1
Ozono 10 Pulsos	Estéril	Estéril	Estéril	1
Ozono 8 Pulsos (Glucose/Manitol)	Estéril	Estéril	CB (dia 1)	0
Ozono 10 Pulsos (Glucose/Manitol)	Estéril	Estéril	Estéril	0
Irradiação- $\gamma$ (Glucose/Manitol) 8 kGy	Estéril	Estéril	Estéril	0
Irradiação- $\gamma$ (Glucose/Manitol) 13 kGy	Estéril	Estéril	Estéril	0
Irradiação- $\gamma$ (Glucose/Manitol) 25 kGy	Estéril	Estéril	Estéril	0

**Estéril:** ausência de crescimento bacteriano por 14 dias; **CB (dia X):** crescimento bacteriano detectado no dia X; **N/A:** Não avaliado; (N=0): Ausência de resposta, (N=1): leve reatividade (N=2):

suave reatividade, (N=3) moderada reatividade, (N=4): forte reatividade”



Finalmente, no que diz respeito aos testes de reatividade biológica, não foi registada qualquer resposta citotóxica decorrente da exposição à radiação (Tabela 2-4).

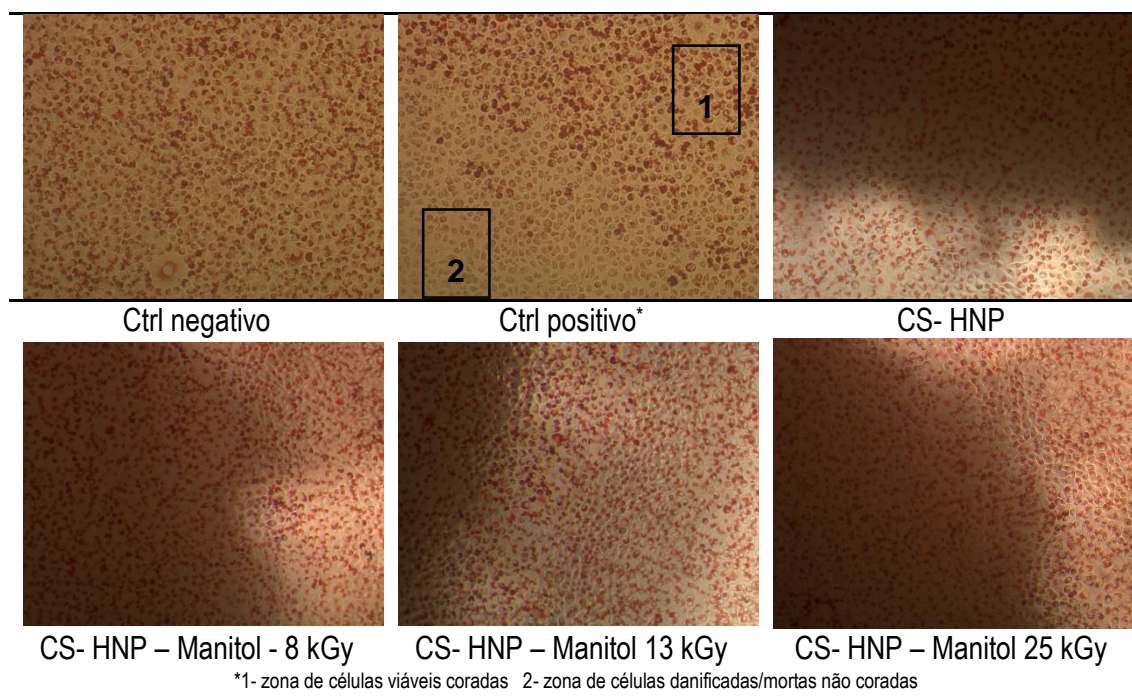
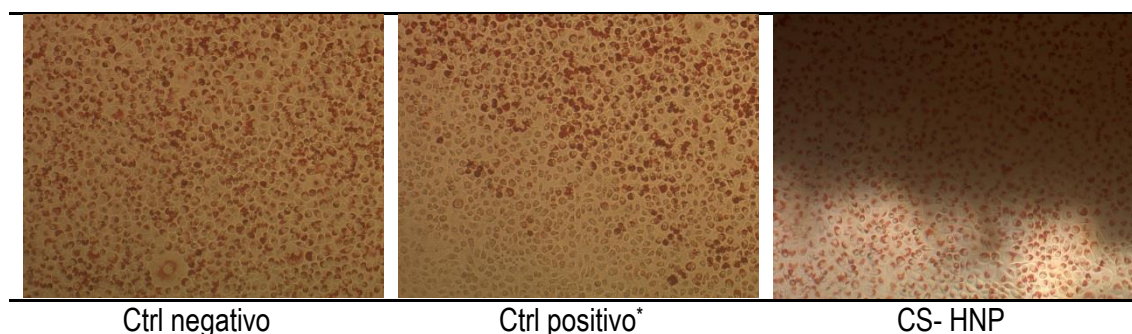


Figura 2-19. Imagens das placas de cultura durante a avaliação do grau de reatividade celular.

A Finalmente, no que diz respeito aos testes de reatividade biológica, não foi registada qualquer resposta citotóxica decorrente da exposição à radiação (Tabela 2-4).



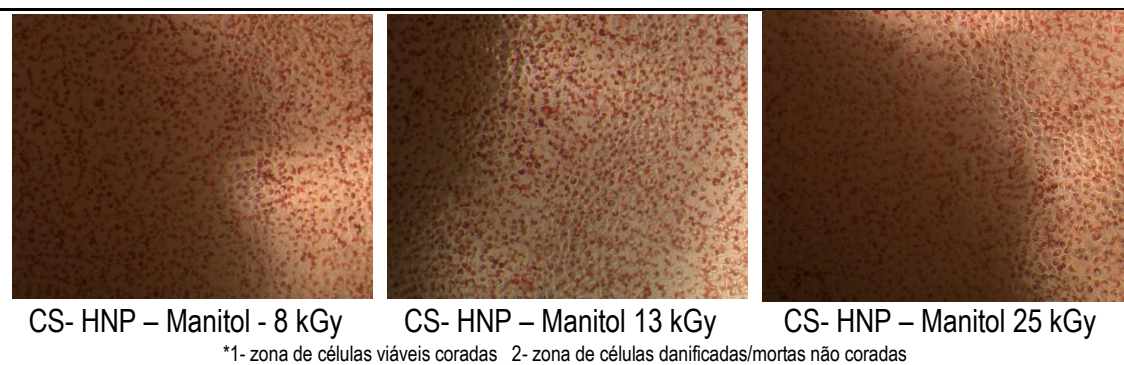


Figura 2-19 apresenta algumas imagens resultantes dos testes de toxicidade, onde, na referência do controlo negativo, é facilmente notável a diferença entre células viáveis (1) e as células mortas (2).

#### **2.3.4 Efeito da esterilização por ozono**

A esterilização por ozono originou uma ligeira tendência para a diminuição do tamanho médio das partículas, com exceção das amostras sujeitas a 10 pulsos de ozonização (Figura 2-20 A).

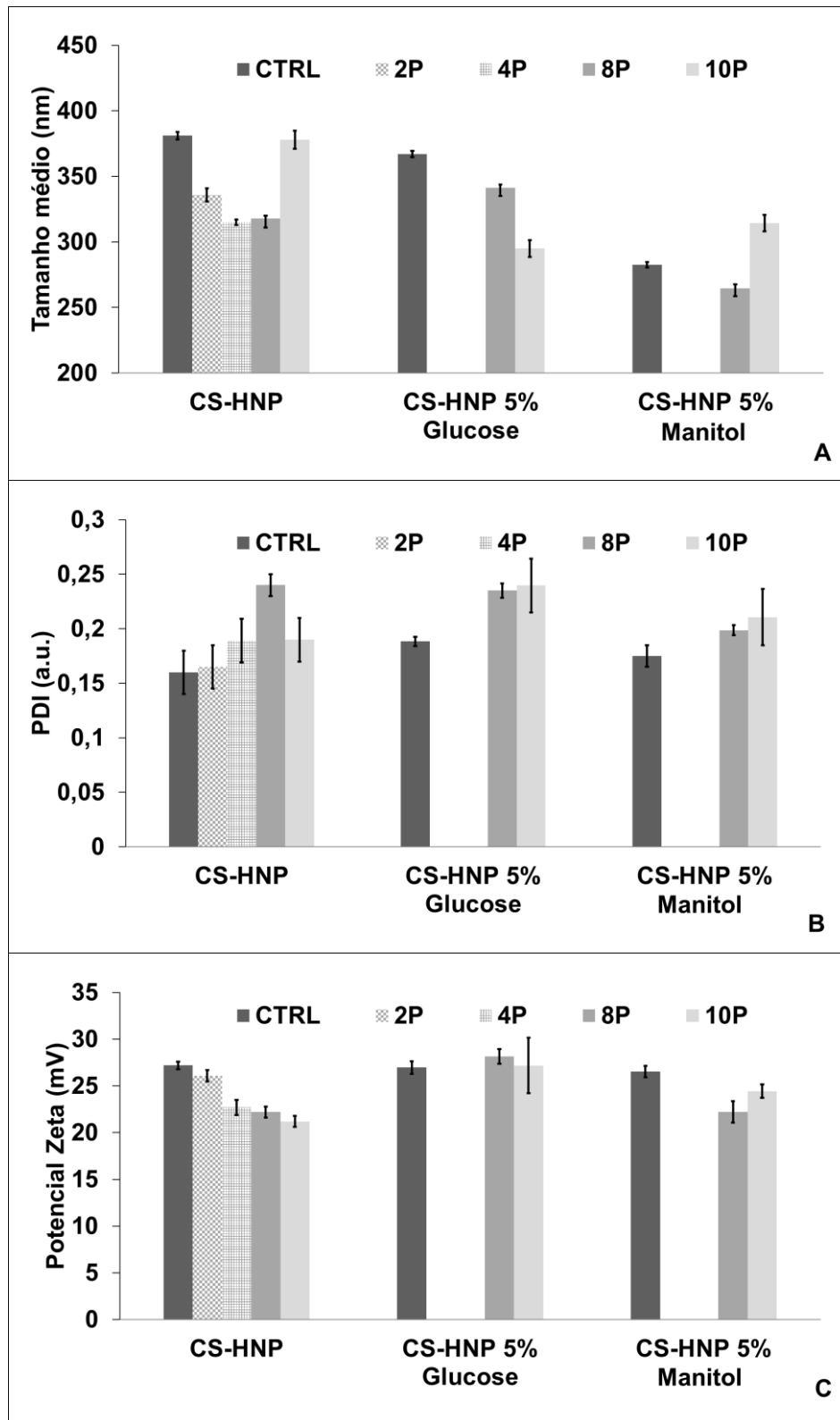


Figura 2-20. Dados da análise por Zetasizer das CS-HNP ozonizadas na presença e ausência de açúcares: A- tamanho médio de partícula; B- PDI e C- potencial zeta. As barras de erro correspondem aos desvios padrão (n≥3).

O parâmetro PDI sofreu um aumento do seu valor médio, todavia a significância estatística só foi observada para exposição a 8 pulsos (*valor-p*= 0,0025), caso em que o aumento foi cerca de 50% (Figura 2-20 B). No entanto, em todos os casos o PDI permaneceu inferior a 0,3.

O potencial zeta diminuiu com o aumento no número de pulsos de ozono (Figura 2-20 C), embora o seu valor tenha permanecido acima de 20 mV, o que permite antever que as amostras deverão ser bastante estáveis.

À semelhança da secção anterior, os parâmetros pH e condutividade não sofreram alterações significativas após a exposição ao ozono.

Os espectros de FTIR-ATR (Figura 2-18) não evidenciaram a formação de novos grupos químicos nem alterações significativas nos picos pré-existentes. A análise de absorvância UV-Vis também não mostrou alterações nos espectros (Figura 2-16 A).

Adicionalmente, não foi possível identificar diferenças entre a morfologia das partículas não esterilizadas e as ozonizadas.

A eficácia do tratamento com ozono não foi tão evidente quanto a da irradiação gama (Tabela 2-4). A esterilidade das amostras contaminadas com  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL apenas foi possível com a exposição a 8 pulsos de ozonização. Já a exposição mais longa (10 pulsos) permitiu alcançar a esterilidade das amostras contaminadas com  $10^4$  UFC/mL. Porém, sinais de reatividade biológica leve (N=1, segundo USP<87>) foram observados para 8 e 10 pulsos de ozonização.

Dado a ineficácia das exposições mais curtas (2 e 4 pulsos), os testes para aferir o efeito protetor dos açúcares (glucose e manitol) foram realizados apenas para 8 e 10 pulsos de ozonização.

No caso das CS-HNP com adição de glucose, observou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, do tamanho médio das partículas (8 pulsos,  $valor-p = 0,0026$  e 10 pulsos,  $valor-p=7,6e-06$ ) (Figura 2-20 A). O parâmetro PDI, por sua vez, aumentou cerca de 25% em ambos os casos, permanecendo, mais uma vez, abaixo da referência aceitável de 0,3. (Figura 2-20 B). Já no caso do potencial zeta, não foram observadas alterações significativas (Figura 2-20 C).

Quanto às CS-HNP com adição de manitol, a exposição a 8 pulsos levou a uma diminuição do tamanho médio das partículas ( $valor-p=0,014$ ), enquanto que a exposição a 10 pulsos resultou num aumento ( $valor-p=0,00078$ ). Este comportamento revelou-se semelhante ao observado para as amostras ozonizadas sem a adição de açúcares. As alterações observadas para o parâmetro PDI não apresentaram significância estatísticas. Observou-se, no entanto, uma diminuição do potencial zeta com a exposição a 8 pulsos de ozonização ( $valor-p=0,0065$ ).

A análise estrutural feita por FTIR-ATR (Figura 2-18) demonstrou a formação de diversos grupos químicos, indicando que ambos os açúcares interagem quimicamente com as CS-HNP, quando se procede à ozonização. Pode-se afirmar, no entanto, que estas interações não conduziram a efeitos adversos no que diz respeito à reatividade biológica, uma vez que não foram observados sinais de citotoxicidade nas amostras ozonizadas na presença de açúcares (Tabela 2-4).

A partir dos resultados obtidos nos testes de esterilidade (Tabela 2-4), pode-se concluir que a adição dos açúcares não teve influência na eficácia do processo de ozonização.

Conclusões semelhantes foram obtidas para a exposição a 10 pulsos, relativamente à análise ATR-FTIR (não apresentada, devido à semelhança com o espectro obtido para 8 pulsos), eficácia de esterilização e efeitos citotóxicos.

Para concluir, é importante ressaltar que, de maneira a poder esterilizar as amostras, o gás ozono tem de se fazer difundir através da fase aquosa das CS-HNP. Uma vez solubilizado em água, o ozono poderá agir tendo em conta dois mecanismos distintos: ação direta, enquanto molécula, e ação indireta através da formação de radicais OH<sup>36, 37</sup>.

No caso de formulações ácidas, como é o caso das CS-HNP em estudo (pH 4), a ação direta é predominante, uma vez que há mais íons H<sup>+</sup> disponíveis<sup>38</sup>.

A fase aquosa das CS-HNP dificulta a esterilização, já que a difusão do ozono faz-se melhor pelo o ar, comparativamente à água. Portanto, as condições de acondicionamento, como a geometria do recipiente (que, por sua vez, determinará o caminho de difusão a ser percorrido pelo gás) são críticas.

## **2.4 CONCLUSÕES**

A esterilização é um passo crucial na produção de materiais para aplicações biomédicas. Para materiais sensíveis, tais como os bionanogéis, é importante definir procedimentos/condições de esterilização que não danifiquem os materiais e permitam que a integridade das partículas e propriedades desejadas permaneçam aceitáveis. No trabalho realizado neste capítulo, avaliou-se o efeito de vários métodos de esterilização (calor húmido, irradiação gama e ozono) nas principais propriedades de CS-HNP.

Os resultados, obtidos, permitiram concluir que o calor húmido não é um método adequado para a esterilização deste material, uma vez que conduz a

uma degradação severa, caracterizada pelo o aparecimento de populações múltiplas de tamanhos diferentes, grandes agregados e sedimentos. Para este método de esterilização, a adição de açúcares não demonstrou efeito protetor.

A exposição aos raios gama deu origem à formação imediata de sedimentos visíveis. Contudo, após a adição de açúcares protetores (glucose e manitol) foi observado um aumento significativo da resistência das nanopartículas à radiação. Este efeito protetor pode estar relacionado com a formação de um complexo com elevado poder antioxidante.

O processo de ozonização não afetou significativamente as propriedades das nanopartículas. No entanto, demonstrou não ser tão eficaz quanto a irradiação gama, tendo originado, ainda, para a exposições a 8 e 10 pulsos, sinais de citotoxicidade fraca. A adição de açúcares reprimiu os efeitos de citotoxicidade, sem afetar a eficácia da esterilização. Porém, a análise FTIR-ATR mostrou alterações nos espectros, indicando interações entre os açúcares e as CS-HNP, promovidas pela ozonização. Para este método, em particular, as condições de embalagem são especialmente críticas, uma vez que irão determinar o caminho de difusão do agente esterilizante (ozono) através da barreira que constitui o meio aquoso das CS-HNP.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- 1 WANG, J. J. et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 765-74,2011.
- 2 KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11,2010.
- 3 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632,2006.
- 4 HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Delivery. Rev.**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649,2008.
- 5 JIANG, Y. et al. Click hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 35, n. 18, p. 4969-85,2014.
- 6 CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132,1997.
- 7 VIMAL, S. et al. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta tropica**, v. 128, n. 3, p. 486-93,2013.
- 8 HOU, Y. et al. Chitosan-based nanoparticles as a sustained protein release carrier for tissue engineering applications. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 100, n. 4, p. 939-47,2012.
- 9 LOH, J. W. et al. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 249, n. 2, p. 148-57,2010.
- 10 WANG, S. L. et al. Selection of optimal sites for TGFB1 gene silencing by chitosan-TPP nanoparticle-mediated delivery of shRNA. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 190, n. 1, p. 8-14,2009.
- 11 DE CAMPOS, A. M. et al. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 5, p. 803-10,2004.
- 12 DE CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. A. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 159-168,2001.



- 13 AZADI, A.; ROUINI, M. R.; HAMIDI, M. Neuropharmacokinetic evaluation of methotrexate-loaded chitosan nanogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 326-35,2015.
- 14 PHARMACOPEIA, U. S. **USP-39 NF-34. <771> Ophthalmic Products - Quality tests**. Rockville: 589-595 p. 2016.
- 15 PHARMACOPEIA, U. S.; . **USP-39 NF-34. <71> Sterility Test**. Rockville: 136-143 p. 2016.
- 16 PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos 4**.Barueri,SP,Brazil: Manole, 2015. 416
- 17 VETTEN, M. A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomed.**, v. 10, n. 7, p. 1391-9,2014.
- 18 MASSON, V. et al. Influence of sterilization processes on poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres. **Biomaterials**, v. 18, n. 4, p. 327-335,1997.
- 19 KONAN, Y. N. et al. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 115-124,2003.
- 20 TSUKADA, Y. et al. Particle size control of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications. **Int J Pharm**, v. 370, n. 1-2, p. 196-201,2009.
- 21 VETTEN, M. A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, n. 0,
- 22 ANVISA. **Farmacopeia Brasileira. Preparação de produtos estéreis**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 546 p. 2010.
- 23 DUFRESNE, S.; LEBLOND, H.; CHAUNET, M. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer. **Am. J. Infect. Control**, v. 36, n. 4, p. 291-297,2008.
- 24 VIMAL, S. et al. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: Preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta tropica**, v. 128, n. 3, p. 486-493,2013.

- 25 XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226,2003.
- 26 ABDEL-HAFEZ, S. M.; HATHOUT, R. M.; SAMMOUR, O. A. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 334-340,2014.
- 27 RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 219-228,2013.
- 28 HONARY, S. A. F. Z. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273,2013.
- 29 LI, J.; HUANG, Q. Rheological properties of chitosan–tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1670-1677,2012.
- 30 JARRY, C. et al. Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: effect on thermogelling chitosan-beta-glycerophosphate systems. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 50, n. 10, p. 1335-40,2002.
- 31 SILINDIR, M.; OZER, Y. The effect of radiation on a variety of pharmaceuticals and materials containing polymers. **PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA**, v. 66, n. 2, p. 184-99,2012.
- 32 GAO, P.; ZHU, Z.; ZHANG, P. Effects of chitosan–glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 371-378,2013.
- 33 KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan glucose complex – A novel food preservative. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 521-528,2008.
- 34 HEUSINGER, H. A comparison of the product formation induced by ultrasonic waves and -rays in aqueous D-glucose solution **Z Lebensm Unters Forsch** v. 185, p. 106-110,1987.
- 35 PHILLIPS, G. O. 47. Radiation chemistry of carbohydrates. Part XII. Action of ionising radiations on aqueous solutions of D-mannitol. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 297-303,1963.
- 36 CECEN, F.; AKTAS, Ö. **Activated Carbon for Water and Wastewater Treatment: Integration of Adsorption and Biological Treatment**. Wiley, 2011.

- 37 HOIGNÉ, J. et al. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—III. Inorganic compounds and radicals. **Water Research**, v. 19, n. 8, p. 993-1004, 1985.
- 38 MATA-ALVAREZ, J. **Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes**. IWA, 2003.

### 3 ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA LENTES DE CONTATO

A informação contida neste capítulo foi parcialmente publicada no periódico Materials Science and Engineering C (conceito Qualis 2016: A2 (Farmácia), A1(Materiais)) a 21 de novembro de 2016.

**Referência:** Galante R, Ghisleni D, Paradiso, P, Alves VD, Pinto, TJA, Colaço R and Serro AP. Sterilization of silicone-based hydrogels for biomedical application using ozone gas: Comparison with conventional techniques, 2017. Mater. Sci. Eng. C (78) 389-397. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.073.



### 3.1 ENQUADRAMENTO

As lentes de contato à base de HEMA chegaram ao mercado pela primeira vez, na Europa Ocidental, em 1962. Todavia, só viriam a ser populares uma década mais tarde, depois de adquirida a sua licença pela *Bausch & Lomb* que, por sua vez, conseguiu a aprovação pela FDA do material sob o nome de *Polymacon* <sup>1</sup>.

Desde então novos compostos poliméricos com propriedades de hidrogel vêm sendo introduzidos no mercado, no esforço de encontrar o material ideal para lentes de contato, i.e., material que cumpra os requisitos específicos, em especial no que diz respeito à permeabilidade ao oxigénio.

No ano de 1998, no México, verificou-se um importante desenvolvimento com o lançamento do primeiro silicone-hidrogel (SiHy), com patente *Ciba Vision* <sup>1</sup>.

O surgimento dos SiHy permitiu a junção das vantagens do conforto e da performance dos hidrogéis convencionais, com a elevada permeabilidade ao oxigénio, resultante da componente de silicone. Mesmo assim, esta nova geração de lentes ainda revela algumas desvantagens: os monómeros hidrofílicos e os compostos de silicone são muitas vezes imiscíveis, daí a necessidade de introdução de co-solventes e aplicação de outras técnicas laboratoriais que permitam a mistura possível, mantendo-se, em alguns casos, a necessidade acrescida de tratamentos de superfície. Estes processos, naturalmente, encarecem a produção das lentes de contato <sup>2</sup>.

Como referido no Capítulo 1, a esterilidade é um pré-requisito obrigatório para as lentes de contato (ISO 14534:2011 *Ophthalmic optics -- Contact lenses and contact lens care products -- Fundamental requirements*).

Na seleção do método de esterilização mais adequado devem pesar não só os fatores como a compatibilidade do método com o material em questão, como os fatores económicos (e.g. equipamentos, instalações, além de formação, experiência e segurança do pessoal). Outro aspecto essencial a ser considerado é a necessidade de utilizar tecnologias de esterilização não poluentes e com baixo impacto ambiental (*environmental-friendly*). Existe, portanto, a necessidade de novos métodos que sejam simultaneamente mais económicos, mais reprodutíveis, mais ecológicos e mais seguros de descontaminação e esterilização, que possam ser aplicados como processo de esterilização pós-fabricação, sem que com isso comprometam as propriedades e funcionalidade dos materiais <sup>3; 4</sup>. Neste sentido, a esterilização por ozono surge como uma técnica recente e promissora já que, para além das vantagens do gás enquanto agente esterilizante, estão ainda associados baixos custos de operabilidade, assim como o facto de não remanescerem produtos tóxicos <sup>5</sup>. É, pois, indispensável que o conhecimento acerca do comportamento destes, e de outros biomateriais, perante as técnicas de esterilização, consiga acompanhar a constante evolução e complexidade da área.

O objetivo deste capítulo é o de estudar a aplicabilidade da técnica de ozonização na esterilização dos hidrogéis para lentes de contato. Para tal, foram escolhidas duas composições de hidrogel, cujos monómeros constituintes estão entre os mais utilizados na indústria de lentes de contato. O primeiro, à base do monómero hidrofílico hidroxietilmetacrilato (HEMA) e de polivinilpirrolidona

(PVP), constitui um paradigma de um hidrogel convencional, enquanto que o segundo, à base do componente hidrofóbico de silicone, 3-Tris(trimetilsiloxi)sililpropil metacrilato (Tris), mas contendo também os monómeros hidrofílicos hidroxietilmetacrilato e N-vinilpirrolidona (NVP), é um exemplo da mais recente geração de hidrogéis de silicone utilizados na produção de lentes de contato (Figura 3-1).

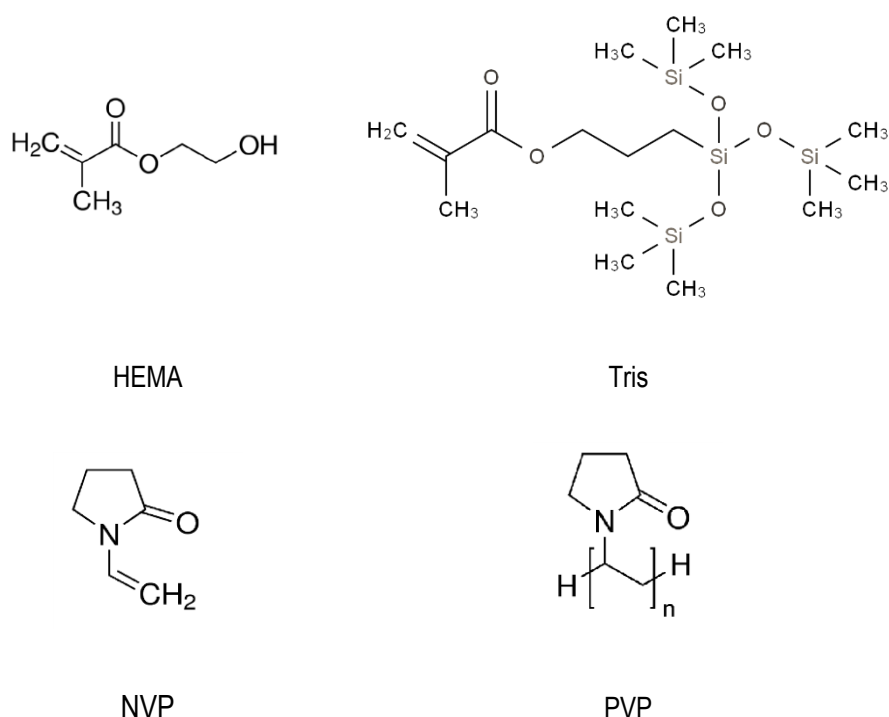


Figura 3-1. Estrutura molecular dos compostos utilizados na produção dos hidrogéis.

Os hidrogéis preparados foram caracterizados relativamente a propriedades relevantes ao bom desempenho enquanto lente de contato, nomeadamente no que se refere a capacidade de intumescimento, transmitância, molhabilidade e morfologia/topografia da superfície, permeabilidade iónica, propriedades mecânicas, coeficiente de atrito e citotoxicidade.



Em seguida, submeteram-se as amostras à técnica de esterilização alternativa, já mencionada no capítulo 1, esterilização por ozono. Para efeitos de comparação foram também testadas duas técnicas de esterilização convencional: irradiação gama e calor húmido. Finalmente, reavaliaram-se as propriedades do material, de modo a inferir sobre o efeito dos respectivos métodos e condições aplicadas.

Em todos os casos, testes de validação, com indicadores biológicos, foram conduzidos no sentido de garantir a eficácia das condições testadas.

## **3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Materiais**

Apresenta-se, infra, a lista dos principais reagentes utilizados no decorrer do trabalho realizado para este capítulo:

- 2-(hidroxietil)-metacrilato (HEMA) (HPLC grade) 98%, Sigma-Aldrich
- Etilenoglicol-dimetacrilato (EGDMA) 98%, Sigma-Aldrich
- 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) 98%, Sigma-Aldrich
- 3-Tris(trimetilsiloxi)sililpropil metacrilato (Tris), 98%, Sigma-Aldrich
- 1-vinil-2-pirrolidona (NVP) 99%, BASF
- Polivinilpirrolidona (PVP) Kollidon® 30 – peso molecular 44,000-54,000 (PVP-K30), gentilmente cedido pela BASF
- Cloreto de Sódio (NaCl) P.A.-A.C.S., Synth
- Diclorometano estabilizado em amileno, PA, Sigma Aldrich;
- Tetracloroeto de carbono, Riedel-de Haen
- Dimetildiclorosilano ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ ) 99,5% GC, Fulka
- *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (3M Attest)
- *Bacillus pumillus*, NAMSA STP-06
- Caldo de soja triptica (TSB) (trypticase soy broth), Bacto®

- Agar de soja tríptica (TSA) (Trypticase soy agar), Difco®.
- Corante Vital Vermelho Neutro, National Aniline Division
- Meio de cultura Eagle, Sigma Aldrich

### 3.2.2 Preparação dos hidrogéis

Preparam-se duas formulações diferentes de hidrogéis: HEMA/PVP (98/2, p/p) e Tris/NVP/HEMA (40/40/20, p/p/p), utilizando os protocolos definidos num trabalho anterior <sup>6</sup>.

No primeiro caso (as amostras doravante referidas por PHEMA), procedeu-se do seguinte modo: adicionou-se o agente *crosslinker* EGDMA ao monómero hidrofílico HEMA, de forma a obter uma concentração de 80 mM do primeiro. Num segundo momento, a mistura foi submetida a desgaseificação por ultrassom durante 5 minutos e ao borbulhar de um de fluxo brando de azoto, durante 15 minutos. No passo seguinte, adicionou-se o iniciador AIBN (10mM), sob agitação magnética e juntou-se o segundo componente, PVP, com o objetivo de obter uma concentração final do mesmo de 0,02 g/ml, mantendo-se a agitação magnética até ser alcançada a completa dissolução e homogeneidade dos componentes.

No segundo caso, para o hidrogel Tris/NVP/HEMA (as amostras doravante referidas por TRIS), os componentes Tris (monómero hidrofóbico de silicone), NVP (aditivo hidrofílico), HEMA e EGDMA foram adicionados de modo obter uma mistura com concentrações finais de 0.94M, 3.58M, 1.53mM e 30 mM, respectivamente. Procedeu-se, depois, ao o mesmo processo de desgaseificação previamente à adição do iniciador AIBN (15 mM), após o qual se manteve a agitação, como anteriormente. Ambas as formulações foram

introduzidas num molde composto de duas placas de vidro silanizado, separadas por um espaçador de poliuretano de 0,45 mm (Figura 3-2). A silanização dos vidros foi executada seguindo-se o protocolo relatado em <sup>7</sup>. Decorrido um curto espaço de tempo (cerca de 1 hora) submeteu-se os vidros em submersão numa solução 2% dimetildiclorosilano em tetracloreto de carbono, durante 1 hora, lavando-se depois os mesmos com diclorometano e secando-os convenientemente.

Seguiu-se a fase de polimerização (PHEMA: 12 horas a 50°C e mais 24h a 70°C; TRIS: 24h a 60°C). Depois do necessário arrefecimento do molde as amostras foram retiradas para lavagem e remoção dos possíveis monómeros/componentes não reagidos. Note-se que lavagem foi realizada ao longo de 5 dias, durante os quais os hidrogéis permaneceram imersos em água destilada e desionizada, renovada 2 vezes por dia.

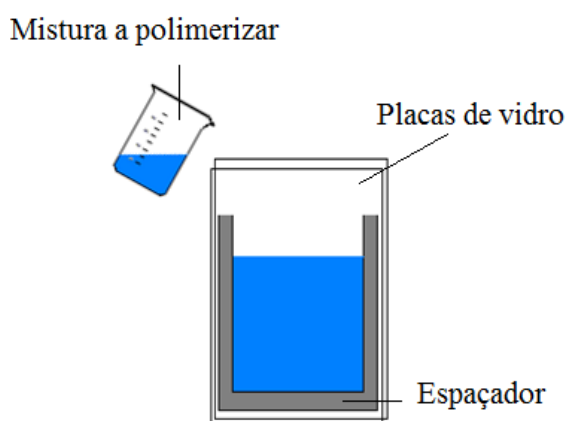


Figura 3-2. Esquema da preparação do molde com a mistura polimérica antes da polimerização.

Finalmente, as folhas de hidrogel foram cortadas em discos de 10 ou 12 mm de diâmetro e secas a 50°C, até evaporação total da água e consequente estabilização do seu peso.

### **3.2.3 Caracterização dos hidrogéis**

#### **3.2.3.1 Transmitância**

As medidas de transmitância dos hidrogéis em estudo foram realizadas com recurso ao equipamento referido no capítulo 2, espectrómetro Thermo Scientific – Evolution 201. As amostras foram analisadas no estado hidratado, seguindo os protocolos definidos na literatura <sup>6; 8</sup>. Como controle, utilizou-se uma solução de NaCl (0,9%). As amostras hidratadas foram introduzidas numa célula de quartzo, com o cuidado de as fixar e manter junto à parede mais próxima da luz incidente. Analisou-se o espectro entre os 200 e 700 nm. Todas as medidas foram efetuadas em triplicado, alterando-se a cada medida a zona de irradiação, de modo a garantir uma apreciação do hidrogel em toda a sua extensão.

#### **3.2.3.2 Intumescimento**

Após a produção, lavagem, corte e secagem das diferentes amostras foram registados os valores do peso seco.

Posteriormente, estas amostras foram depositadas em recipientes individuais, devidamente identificados, contendo cerca de 3 mL de solução salina (NaCl 0,9%). O processo de hidratação foi realizado à temperatura ambiente. Em intervalos de tempo determinados, os hidrogéis foram retirados dos respectivos recipientes, secando-se cuidadosamente o excesso de líquido

aderente à sua superfície, com ajuda de papel de filtro, e procedendo-se de imediato à sua pesagem. Este procedimento foi repetido até que se alcançasse o estado de equilíbrio a partir do qual as amostras apresentassem um peso estável. Dos dados recolhidos foi possível calcular os respetivos grau de intumescimento (%SC) e teor de água no equilíbrio (%EWC) (Eq 1.5 e 1.6 respectivamente) <sup>9; 10</sup>.

### **3.2.3.3 Molhabilidade**

As medições dos ângulos de contato foram efetuadas com o material hidratado, com recurso ao método da bolha cativa.

As amostras hidratadas foram colocadas na posição horizontal numa câmara de ensaio, submersas em água destilada e desionizada. Uma bolha de ar foi depositada sob a superfície das amostras, com auxílio de uma seringa micrométrica, cuja ponta foi modificada para o efeito. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente. A variação do ângulo de contato foi monitorizada ao longo de 60 segundos. As imagens foram adquiridas em intervalos de tempo definidos, com auxílio de uma câmara de vídeo JAI CV-A50, montada num microscópio WildM3Z e ligada a um sistema de captura de imagem Data Translation modelo DT3155.

### **3.2.3.4 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram aferidas num texturómetro TA XT Plus (Figura 1.8). As amostras foram cortadas em secções com cerca de 10x5 mm<sup>2</sup>. As medições foram realizadas com uma força de 5 mN,

a uma velocidade de 0,3 m/segundo. A aquisição dos dados da curva de Tensão-Deformação foi efetuada com o software Exponent Stable Micro Systems, a partir da qual foi possível calcular o módulo de Young ( $\epsilon$ ) (declive do segmento linear inicial da curva de tensão-deslocamento (Figura 1.8 C)). Para cada condição em estudo foram analisadas pelo menos seis amostras.

### 3.2.3.5 Morfologia

A análise morfológica por SEM das amostras dos hidrogéis foi realizada num equipamento Hitachi S2400 com uma tensão de aceleração de 5 e 15 keV (MicroLab-IST). As amostras foram secas, durante 48h a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Imediatamente antes da análise por SEM e dado que não são condutoras, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro/paládio (cerca de 4 nm). Analisaram-se as superfícies dos hidrogéis antes e depois de submetidos aos procedimentos de esterilização.

### 3.2.3.6 Topografia

A topografia dos hidrogéis foi observada através de microscopia de força atómica (AFM, Nanosurf Easyscan 2) no modo *tapping*, utilizando um cantilever de silício revestido a ouro (Nanosensor PPP NCLAuD), com uma ponta de raio de curvatura inferior a 10 nm e frequência de ressonância própria de 190 kHz. Todas as observações foram realizadas em amostras hidratadas, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os valores quadráticos médios da rugosidade de superfície ( $R_a$ ) foram obtidos a partir de imagens AFM de pelo menos dez regiões de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .

### **3.2.3.7 Estrutura Química**

A análise química estrutural foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR - fourier transform infrared spectroscopy) no mesmo equipamento descrito no capítulo 2.

Previamente à análise FTIR, prepararam-se as amostras nesta conformidade: através da sua secagem por 24 horas a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , por moagem com recurso a um almofariz de porcelana, de modo a obter um pó o mais homogêneo possível, seguindo-se mais uma secagem em forno de vácuo por aproximadamente 3 horas. Foram analisadas as varreduras de absorção de entre os comprimentos de onda  $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.2.3.8 Reatividade biológica**

A reatividade biológica foi aferida pelo protocolo já mencionado no capítulo anterior. As amostras hidratadas foram cortadas em discos de 5 mm de diâmetro e colocadas sobre o ágar. Todas as análises foram realizadas em triplicado, antes e depois da exposição aos métodos de esterilização.

### **3.2.3.9 Coeficiente de atrito**

O coeficiente de atrito foi determinado num nanotribómetro da CSM, com o *cantilever* de carga intermédia (0.048 - 156,4 mN). Como contracorpo foram utilizadas esferas de PMMA de 2 mm de diâmetro. As amostras foram fixadas num recipiente que permitiu efetuar os ensaios, mantendo-se os hidrogéis sempre hidratados (lubrificante utilizado: NaCl 0.9%). A amplitude total de varrimento foi de 1 mm e os ensaios foram concretizados à temperatura

ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com aplicação de uma força normal de 10 mN, à velocidade 0,7 cm/s.

A força aplicada foi escolhida para maximizar a aproximação às tensões induzidas pelo movimento da pálpebra *in vivo* (3-5 KPa)<sup>11</sup>, que na geometria escolhida corresponde 1,6 MPa. Devido às limitações do equipamento, não foi possível atingir a velocidade média de deslizamento da pálpebra relatada na literatura (cerca de 120 mm/s)<sup>11</sup>. A aquisição e tratamento de dados foi conseguida através do software TriboX. Para todas as condições, realizaram-se no mínimo três medições independentes.

### **3.2.3.10 Permeabilidade iónica**

A permeabilidade iónica foi determinada numa célula de difusão, desenvolvida para o efeito no âmbito da presente tese e já mencionada no Capítulo 1 (Figura 1.7). As amostras hidratadas, de 12 mm de diâmetro, foram colocadas no separador central, entre os compartimentos dador e receptor da célula, contendo 25 mL NaCl 0.9% e 32 mL água desionizada, respetivamente. Após a calibração pertinente, o sensor foi colocado no compartimento receptor e as medidas de condutividade foram registadas periodicamente ao longo de aproximadamente 12 horas. Por fim, a permeabilidade foi calculada através da Eq. 1.5. Para cada condição em estudo foram analisadas três amostras.

### **3.2.3.11 Tratamento estatístico**

A análise estatística foi realizada à semelhança do capítulo anterior.



## **3.2.4 Esterilização**

### **3.2.4.1 Ozono**

A ozonização foi realizada no mesmo equipamento já mencionado anteriormente. As amostras de SiHy (discos de 10-12 mm) foram sujeitas a 8 e 10 pulsos de ozonização. O acondicionamento foi feito em recipientes de plástico (polipropileno), contendo 4mL de solução salina (0.9% NaCl). As tampas ficaram em separado, de modo a facilitar a difusão do gás. À semelhança do capítulo anterior, após o término do processo, sem retirar as amostras da câmara, as tampas foram recolocadas, com o máximo cuidado, afim de evitar uma possível contaminação.

### **3.2.4.2 Esterilização por calor húmido**

A esterilização por calor húmido foi realizada no laboratório de Engenharia Biomolecular e de Bioprocessos (LEBB) do Instituto Superior Técnico. Utilizou-se um esterilizador a vapor vertical UNICLAVE 88/75L. As amostras foram acondicionadas em tubos plásticos apropriados (4 mL NaCl, 0.9%) e sujeitas a 121°C durante 60 min. Todos os testes foram realizados em triplicado.

### **3.2.4.3 Esterilização por irradiação gama**

A esterilização por irradiação gama dos hidrogéis foi realizada no Instituto Superior Técnico – Unidade de Tecnologias da Radiação, Portugal (Figura 3-3). Trata-se de uma instalação semi-industrial de irradiação contínua de  $^{60}\text{Co}$ . O

irradiador tem uma atividade nominal de  $1,5 \times 10^{16}$  Bq<sup>φ</sup> e apresentava, em maio de 2001, uma atividade média de  $0,2 \times 10^{16}$  Bq.

Os materiais em estudo foram expostos a três doses distintas: 5, 15 e 25 kGy. As amostras foram acondicionadas no estado hidratado, em tubos de polipropileno, contendo cerca de 3 mL de solução salina (NaCl 0,9%).

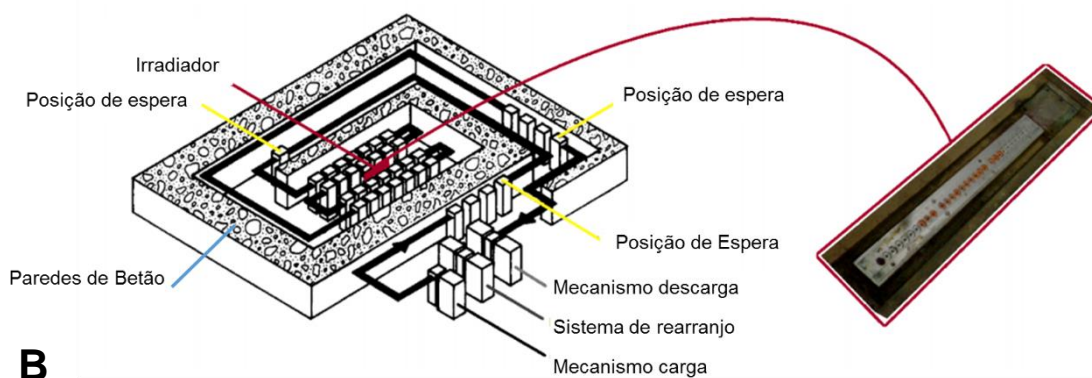


Figura 3-3. Vista exterior da Unidade de Tecnologias da Radiação do Instituto Superior Técnico (A); Esquema da câmara de irradiação e respectivo labirinto (B) adaptado de <sup>12</sup>.

<sup>φ</sup> Becquerel é a unidade de medida no Sistema Internacional (SI) para radioatividade.

#### 3.2.4.4 Avaliação da esterilidade

A eficácia de esterilização foi avaliada seguindo-se o mesmo procedimento explicado no capítulo anterior. Foram efetuadas contaminações controladas com diferentes cargas dos indicadores biológicos apropriados (calor húmido e ozonização: *Geobacillus stearothermophilus*, irradiação gama: *Bacillus pumillus*). Após a exposição às diferentes condições de esterilização, os hidrogéis foram transferidos para tubos, contendo meio de cultura TSB e com incubação a 52° e 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) (*Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus pumillus*, respetivamente), de acordo com as indicações dos fornecedores.

### 3.3 RESULTADOS

Em primeiro lugar, é importante justificar a escolha dos monómeros para este trabalho. Como referido anteriormente, o HEMA é um dos compostos utilizados na produção de hidrogéis para aplicações biomédicas, sobretudo pelo facto de ser biocompatível, inerte em ambientes biológicos, possuir boas características mecânicas e óticas e ser resistente à degradação <sup>6; 13</sup>. A adição de NVP ou PVP ao HEMA permite diminuir o coeficiente de atrito, devido às propriedades lubrificantes destes compostos, situação que reflete uma maior comodidade no uso das lentes <sup>6; 10</sup>

Para efeitos comparativos, produziu-se também um hidrogel modelo à base de silicone. Neste caso, o componente hidrofóbico Tris proporciona uma melhor transmissibilidade ao oxigênio, enquanto a componente de hidrogel (HEMA e NVP) resultava num melhor conforto e hidratação <sup>2</sup>.

### 3.3.1 Efeito da esterilização na transmitância

A transparência é um requisito importante para hidrogéis com aplicações oftálmicas, pelo que é desejável que os processos de esterilização não afetem adversamente esta propriedade <sup>14</sup>.

A Figura 3-4 mostra os efeitos da esterilização nos espectros de transmitância das amostras PHEMA e TRIS, os quais permaneceram, em todas as condições estudadas, acima dos 95% e a partir dos 430 nm.

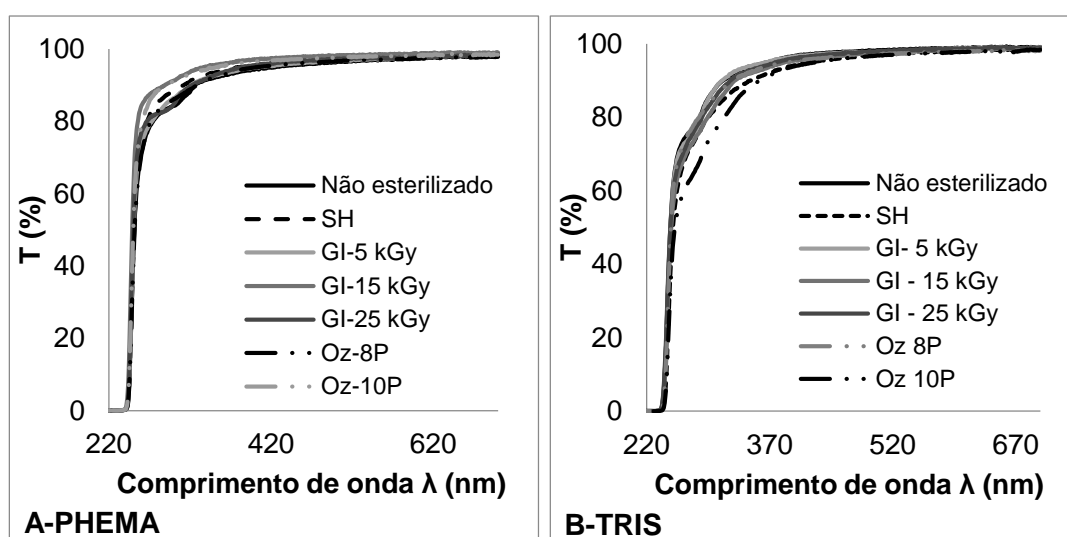


Figura 3-4. Espectro de transmitância dos hidrogéis em estudo, antes e depois de sujeitos aos processos de esterilização (A: formulação PHEMA, B: formulação TRIS). (N≥3. Desvio padrão < 1,5%).

Na decorrência das técnicas de esterilização estudadas, como é possível constatar pela Figura 3-4 A, a formulação convencional PHEMA não sofreu alterações significativas na sua transparência. Em todos os casos, as amostras esterilizadas apresentaram transmitâncias acima dos 94% em praticamente todo o espectro visível (400 a 700 nm), resultado bastante satisfatório para materiais de lentes de contato <sup>6</sup>.

O mesmo comportamento foi observado no caso do silicone-hidrogel TRIS (Figura 3-4 B). Apenas as amostras sujeitas a uma ozonização com 10 pulsos evidenciaram uma ligeira tendência para a diminuição da transmitância entre os 250-300 nm. Estes valores estão de acordo com os requisitos necessários no que diz respeito a esta propriedade (valores iguais ou superiores a 90%)<sup>2</sup>.

### **3.3.2 Efeito da esterilização na capacidade de intumescimento**

Relativamente à capacidade de absorção de água, o monitoramento do perfil de intumescimento demonstrou que, ao final de aproximadamente 2 horas, ambas as formulações atingem o seu estado de equilíbrio. Apesar do TRIS possuir o componente de silicone (Tris) com características hidrofóbicas, a sua capacidade de intumescimento é mais elevada (aproximadamente 24 % a mais). Este facto deve-se à menor concentração do agente reticulante EDGMA, presente na composição (cerca de um terço comparativamente à quantidade do mesmo agente presente na composição PHEMA). Uma menor quantidade deste componente resulta numa estrutura menos compacta, com menos ligações cruzadas, logo com maior capacidade de absorção de água<sup>6</sup>.

A Figura 3-5 mostra o efeito das diferentes condições de esterilização na capacidade de intumescimento.

A formulação convencional PHEMA não sofreu alterações drásticas, salvo uma ligeira tendência para a diminuição da %SC com a exposição a 10 pulsos de ozonização (aproximadamente 5%). Já a formulação TRIS apresentou um aumento estatisticamente significativo de 10% após a exposição à esterilização por calor húmido (de 72 para 82%, *valor-p*=0.038). Este aumento pode afetar a

permeabilidade ao oxigênio. Ao contrário do que acontece em lentes de contato de hidrogel convencionais, a presença de água nas SiHy é considerada um fator limitante ao transporte de oxigênio <sup>15</sup>. Nas lentes de SiHy é a presença do composto de silicone que determina o transporte deste gás, pelo que quanto maior o teor de água, maior será a dificuldade do oxigênio se mover através do material <sup>15</sup>.

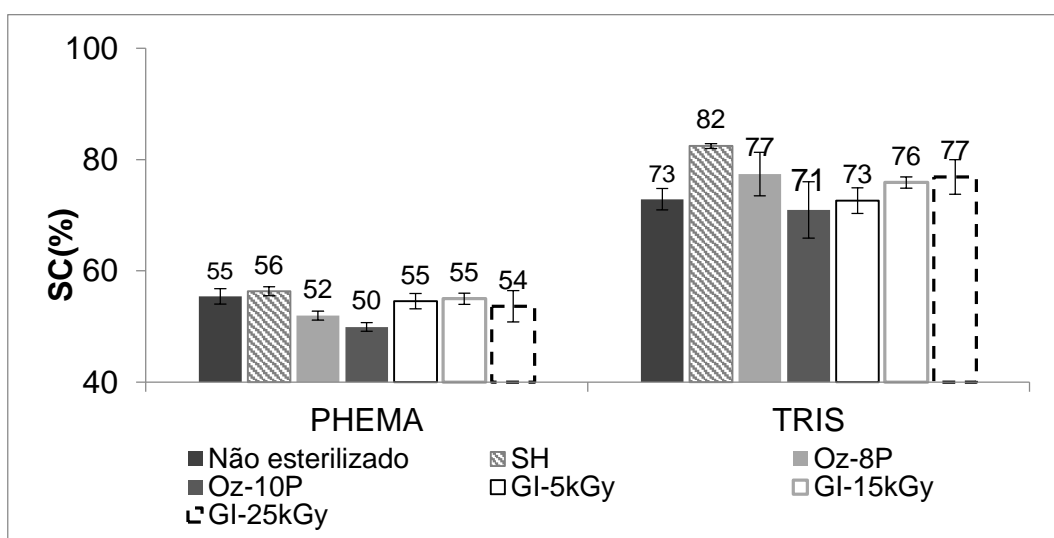


Figura 3-5. Efeito da esterilização na capacidade de intumescimento (SC%) PHEMA (N=4) e TRIS (N=4). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão.

### 3.3.3 Efeito da esterilização na molhabilidade

As propriedades de superfície de uma lente de contato, como é o caso da molhabilidade, têm grande influência na interação do material com o filme lacrimal e as biomoléculas que o constituem. A monitorização deste parâmetro ajuda a prever o desempenho clínico do material enquanto lente de contato <sup>2</sup>.

Os resultados referentes à molhabilidade das amostras são apresentados na Figura 3-6. Para o PHEMA, observou-se uma tendência para a diminuição do

ângulo de contato, após a esterilização por calor húmido (de 52 para 41°), enquanto que o comportamento inverso foi observado depois da exposição a 8 pulsos de ozonização (de 52° para 68°) (*valor-p*=0,04).

Relativamente à formulação TRIS, apenas se constatou uma alteração estatisticamente significativa para as amostras sujeitas a autoclavagem, a qual consistiu na diminuição do valor do ângulo de contato (de 39 para 31°) (*valor-p*=0,02).

Embora se tenha observado algumas alterações indicativas de efeitos das condições de esterilização sobre a superfície dos materiais estudados, todos os valores do ângulo de contato permaneceram concordantes com os dados reportados na literatura referente a formulações semelhantes <sup>6</sup>.

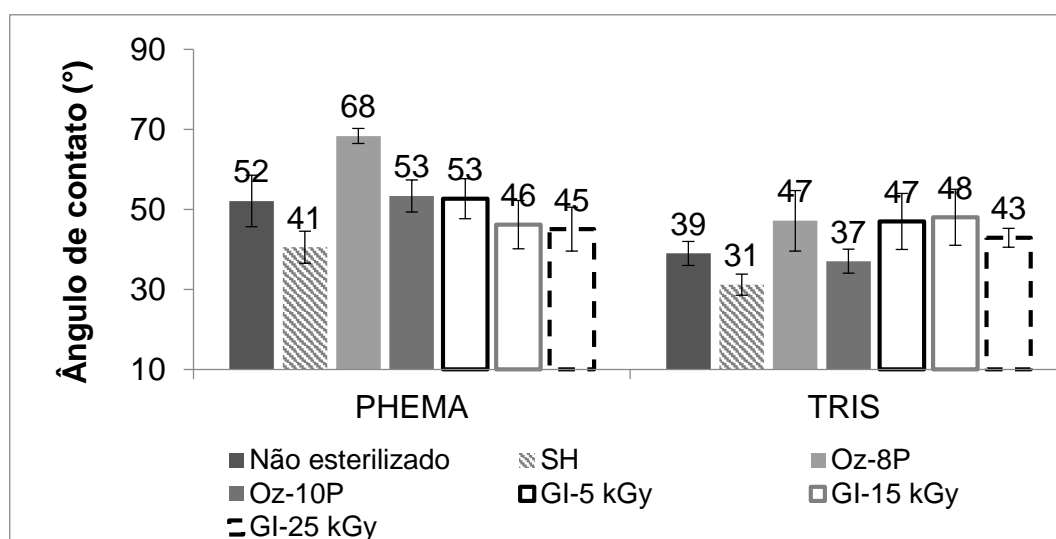


Figura 3-6. Efeito da esterilização na molhabilidade das amostras PHEMA (N=10) e TRIS (N=10). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão.

### 3.3.4 Efeito da esterilização propriedades mecânicas

A aplicação e a remoção das lentes de contato e o constante movimento ocular exigem do material propriedades mecânicas adequadas, nomeadamente

no que respeita à sua elasticidade (medida pelo módulo de Young) e resistência mecânica (medida pela tensão de cedência). Assim, as estas propriedades mecânicas do hidrogel são determinantes, requerendo especial atenção durante o desenvolvimento e o processo de controle de qualidade <sup>16</sup>.

O módulo de Young (diretamente proporcional à rigidez da lente) é clinicamente relevante, considerando que uma excessivamente baixa rigidez dificultaria o manuseio do hidrogel, assim como a sua mobilidade durante o pestanejar. Tal resultaria necessariamente num fluido lacrimal de fraca qualidade, já que a sua correta renovação ficaria comprometida. Por outro lado, um módulo de Young demasiado elevado compromete o conforto e poderá mesmo chegar a induzir patologias oculares <sup>17</sup>.

A Figura 3-7 apresenta os resultado referentes ao efeito da esterilização no módulo de Young das amostras PHEMA e TRIS. Relativamente à primeira formulação, quer o calor húmido quer o método por ozono não provocaram alterações significativas no parâmetro. O material revelou mais sensibilidade à irradiação gama com exceção da dose mais baixa (5 kGy), facto que levou ao aumento do módulo de Young (*valor-p*<0.05). Este resultado indica a provável ocorrência de ligações cruzadas por ação da irradiação, fenómeno já reportado para materiais à base do monómero HEMA <sup>18</sup>.

No caso da segunda formulação TRIS, o calor húmido e a ozonização a 8 pulsos não alteraram o valor do módulo de Young. Já a ozonização a 10 pulsos originou uma diminuição significativa do parâmetro (*valor-p*=0,0008), o que aponta para uma possível degradação do material.



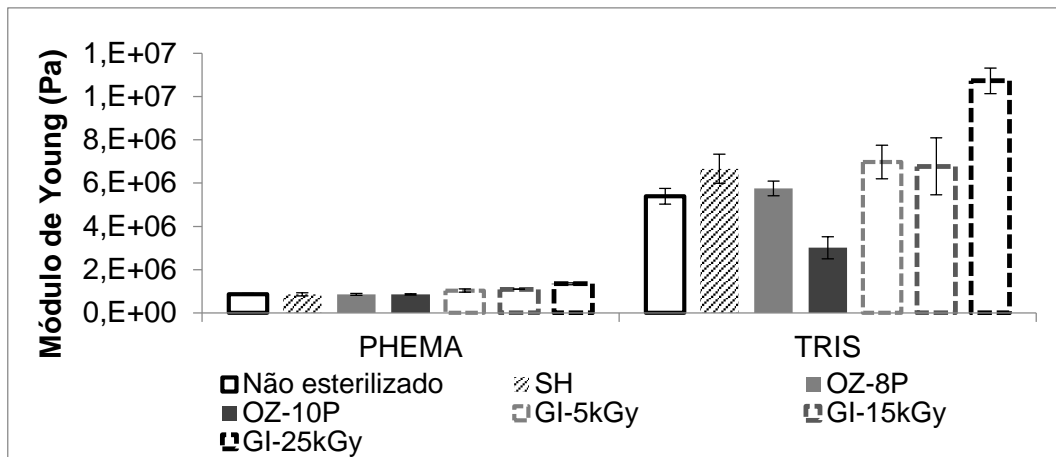


Figura 3-7. Efeito da esterilização no módulo de Young das amostras PHEMA e TRIS

Relativamente à irradiação gama, apenas a dose mais elevada causou alterações relevantes, i.e., um aumento do valor do módulo de Young (*valor-p*=0.0014). Mais uma vez, a irradiação deverá causar ligações cruzadas adicionais, o que explicaria o aumento observado <sup>18</sup>.

### 3.3.5 Efeito da esterilização na morfologia e topografia

A Figura 3-8 apresenta os resultados referentes à análise morfológica das amostras PHEMA E TRIS por microscopia electrónica de varrimento. As amostras não esterilizadas apresentaram, em ambos os casos, superfícies homogêneas e regulares. Como se pode observar, apenas a irradiação gama, na dose mais elevada (25kGy), produziu efeitos adversos significativos. Tanto para as amostras PHEMA como para as amostras TRIS foi possível visualizar superfícies irregulares e heterogêneas, com a presença de detritos. Estas observações indicam a degradação superficial das amostras em decorrência da exposição à dose elevada de 25 kGy.

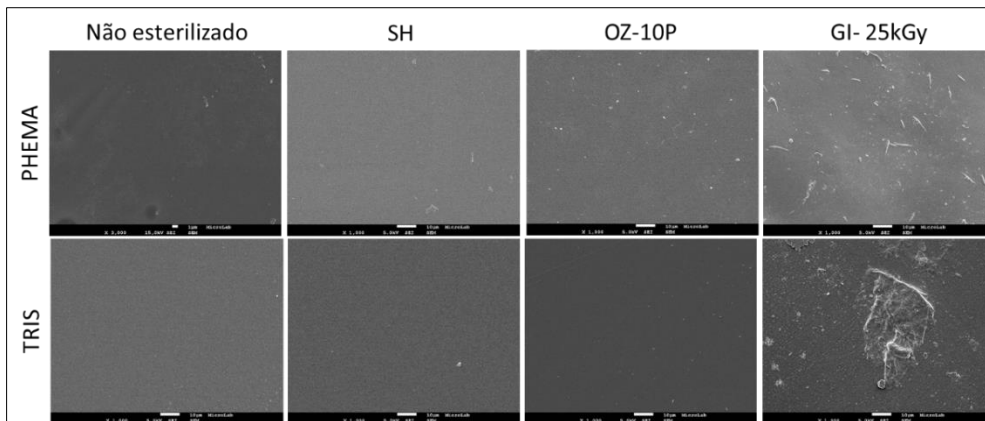


Figura 3-8. Efeito da esterilização na morfologia dos hidrogéis PHEMA e TRIS (ampliação x 1000).

No que se refere à análise por microscopia de força atômica dos efeitos da esterilização na topografia das amostras, apresentada na Figura 3-9, para a formulação PHEMA não esterilizada, a topografia apresentou uma rugosidade média de  $8,4 \pm 1,4$  nm, sem a presença de poros, o que está de acordo com resultados reportados na literatura <sup>6</sup>. Verificou-se, após a esterilização por calor húmido, uma ligeira diminuição da rugosidade (de 8,4 para 6,8). Observou-se ainda que apenas a irradiação gama, com a dose de 25 kGy produziu efeitos relevantes. No caso concreto, um aumento da rugosidade superficial (de 8.4 para 17.5 nm).

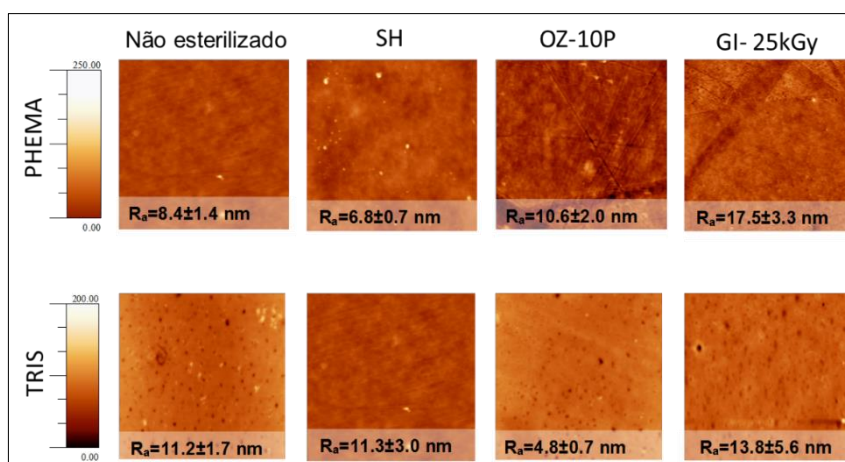


Figura 3-9. Efeito da esterilização na topografia dos hidrogéis PHEMA e TRIS.

Relativamente à formulação TRIS, a topografia das amostras não esterilizadas apresentou uma rugosidade média de  $11.2 \pm 1.7$  nm, com a presença de poros, o que está concordante com os dados da literatura referentes a formulações idênticas <sup>6</sup>. Após a esterilização por calor húmido, observou-se uma tendência para o desaparecimento dos poros. Este fenómeno poderá estar relacionado com o facto de a temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$ , atingida durante a esterilização, ser superior à temperatura de transição ( $T_g$ ) do material (aproximadamente  $108^{\circ}\text{C}$ ) (Anexo 1). Nestas circunstâncias, as cadeias poliméricas ganham maior mobilidade, o que poderá resultar no fechamento dos poros.

No que diz respeito à ozonização, verificou-se uma diminuição da rugosidade média (de 11,2 para 4.8 nm) como consequência da exposição a 10 pulsos, indicando alterações na superfície, nomeadamente degradação do material.

### **3.3.6 Efeito da esterilização na estrutura química**

A avaliação da estrutura química de ambas as formulações, realizada por FTIR-ATR, não indicou alterações estruturais decorrentes da exposição à esterilização. Em todos os casos permaneceram inalterados os grupos químicos existentes, além de que não se observou a formação de grupos novos (Figura 3-10). Porém, foi possível constatar as bandas características de ambas as formulações: para o PHEMA banda larga ao redor de  $3400\text{ cm}^{-1}$  (água) e pico a  $1702\text{ cm}^{-1}$  (vibração e estiramento dos grupos  $-\text{OH}$ ) <sup>19</sup>.

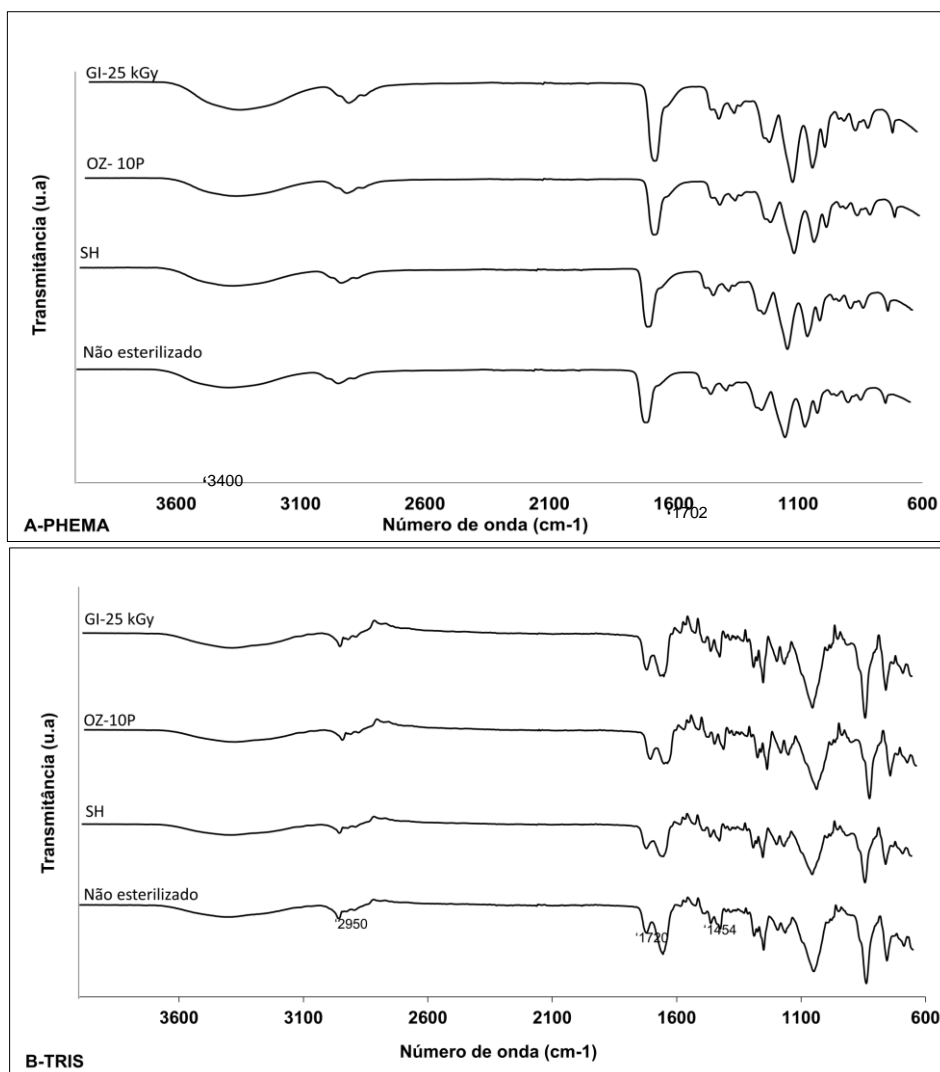


Figura 3-10. Espectros FTIR-ATR das amostras PHEMA (A) e TRIS (B), antes e depois da esterilização

Já para a formulação TRIS, foi possível identificar o pico característico a  $2950\text{ cm}^{-1}$  (vibração de estiramento das ligações C-H); os picos a  $1720$  e  $1454\text{ cm}^{-1}$  (correspondentes à vibração e estiramento das ligações C=O e C-H, respetivamente)<sup>20</sup>.

### 3.3.7 Efeito da esterilização na reatividade biológica

Na Tabela 3.1, apresentam-se os resultados relativos ao efeito da esterilização na resposta biológica. Em geral, a esterilização não induziu

respostas citotóxicas. A única exceção observada refere-se ao caso da exposição a 10 pulsos de ozono. Nesta condição, quer para a formulação PHEMA quer para a formulação TRIS, observou-se a morte celular sob a amostra, caracterizando, assim, uma resposta citotóxica de grau 2, segundo as farmacopeias (europeia, brasileira e americana USP <87>).

Tabela 3.1 Efeito da esterilização na reatividade biológica

Amostra	Grau de reatividade biológica (N)	
	PHEMA	TRIS
Controle Positivo		3
Controle Negativo		0
Não esterilizado		
SH	0	0
Oz-4P	0	0
Oz-8P	0	0
Oz-10P	2	2
GI-5 kGy	N/A	N/A
GI-15 kGy	N/A	N/A
GI-25 kGy	0	0

N/A: Não avaliado, (N=0): Ausência de resposta, (N=1): leve reatividade (N=2): suave reatividade, (N=3) moderada reatividade, (N=4): forte reatividade

### 3.3.8 Efeito da esterilização no coeficiente de atrito

O desconforto muitas vezes relatado por utilizadores de lentes de contato é, em parte, associado ao atrito ocorrido durante o movimento da pálpebra sobre a lente <sup>21</sup>. O coeficiente de atrito é sensível a um conjunto diverso de fatores (e.g. composição do material, rugosidade superficial, presença/ausência de agente lubrificante, força aplicada, velocidade do movimento), pelo que as condições em que são executados os ensaios são fundamentais.

Apresenta-se, na Figura 3-11, os coeficientes de atrito das amostras PHEMA e TRIS, medidos antes e após a exposição aos métodos de esterilização.

Relativamente ao PHEMA: a amostra não esterilizada revelou, à partida, valores muito elevados para o coeficiente de atrito ( $\mu=1,1$ ), e, portanto, inapropriados para materiais de lentes de contato. A esterilização por calor húmido levou a uma diminuição do valor médio do coeficiente (de 1,1 para 0.52), para a qual as alterações observadas na rugosidade podem ter contribuído.

No que diz respeito à segunda formulação em estudo, TRIS: as amostras não esterilizadas apresentaram um coeficiente de atrito de 0,2, o que é bastante satisfatório. Constatou-se a mesma tendência para o PHEMA, de diminuição do valor médio após a esterilização por calor húmido ( $\mu=0.04$ ). Por sua vez, a ozonização a 8 pulsos não resultou em alterações significativas, enquanto o aumento da exposição para 10 pulsos resultou num expressivo aumento do valor  $\mu$  de para 0.9 (valor- $p= 0,0007$ ). Por fim, a irradiação gama (na dose de 15 e 25 kGy) levou ao aumento significativo do valor deste parâmetro ( $\mu = 0,4$  e  $0,9$ ; valor  $p<0.05$ ).

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos referentes a esta propriedade, que a formulação PHEMA não esterilizada não cumpre de maneira satisfatória os requisitos necessários para o bom desempenho enquanto lente de contato, embora, após a esterilização por calor húmido, resultem valores aceitáveis. Neste sentido, optou-se por cessar a caracterização desta formulação, não prosseguindo o estudo dos eventuais efeitos da esterilização noutras propriedades.

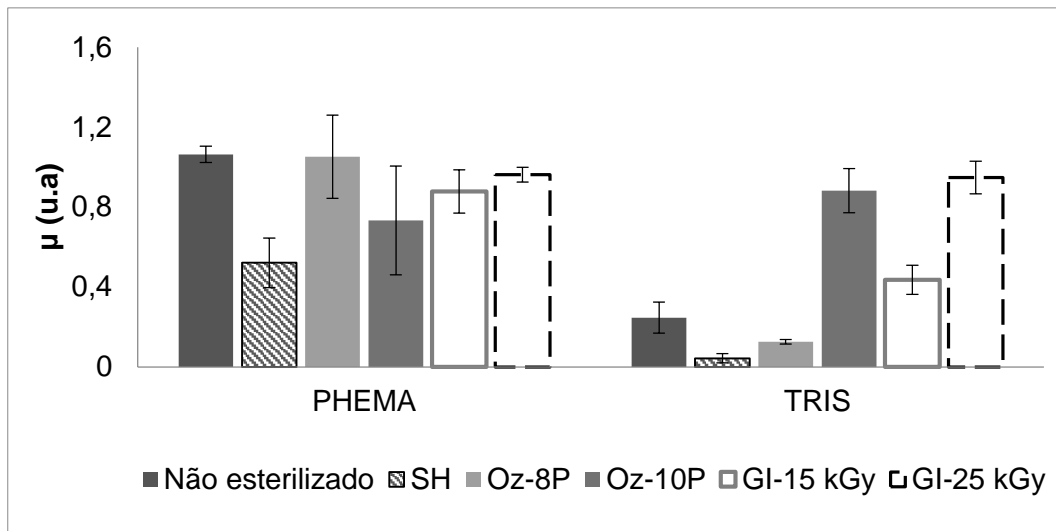


Figura 3-11. Efeito da esterilização no coeficiente de atrito dos hidrogéis PHEMA e TRIS.

Relativamente ao TRIS, constatou-se que a esterilização por calor húmido, por ozonização com exposição a 8 pulsos e a irradiação gama com dose de 5 kGy, não afetaram negativamente o coeficiente de atrito, uma vez que os valores obtidos são considerados aceitáveis e concordantes com os valores da literatura, obtidos para formulações semelhantes <sup>21</sup>.

### 3.3.9 Efeito da esterilização na permeabilidade iónica

A última propriedade a ser avaliada foi a permeabilidade iónica ( $D_{ion}$ ), cujos respectivos resultados são apresentados na (Figura 3-12). O valor mínimo, reportado na literatura, necessário a uma boa mobilidade de iões e da própria lente é de  $2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  <sup>6</sup>. Este valor foi alcançado e/ou ultrapassado para todas as condições estudadas.

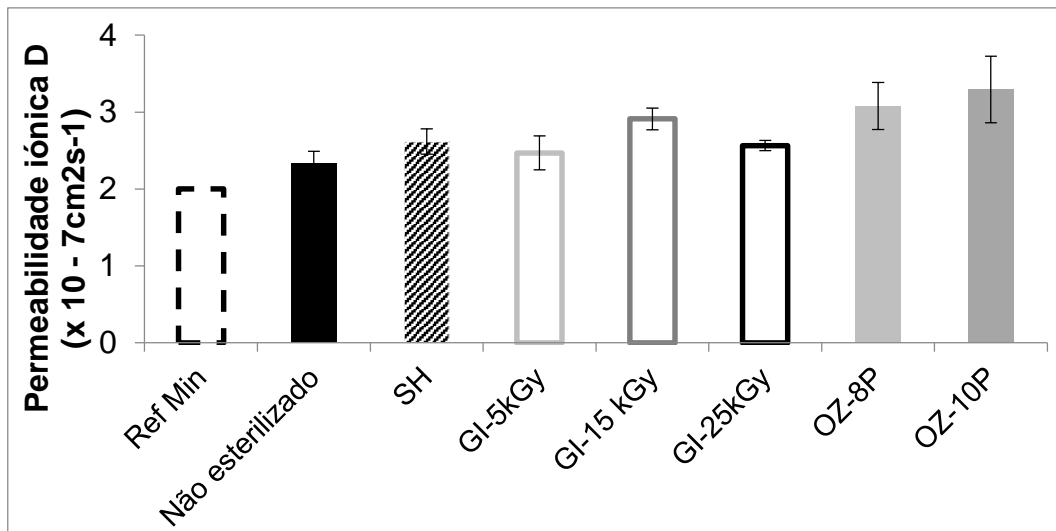


Figura 3-12. Efeito da esterilização na permeabilidade iônica do silicone-hidrogel TRIS. Ref Min: valor mínimo, reportado na literatura, necessário a uma boa mobilidade de iões e da própria lente.

Somente o aumento observado para ozonização a 10 pulsos originou resultados estatisticamente significativos (*valor-p*=0.031), concluindo-se que esta não é uma propriedade especialmente sensível aos métodos/condições de esterilização estudados.

### 3.3.10 Avaliação da esterilidade

Como descrito anteriormente (Capítulo 2), foi realizada a quantificação dos microrganismos contidos nos indicadores utilizados (pelo método das diluições sucessivas), de modo a garantir a confiabilidade do procedimento de contaminação adoptado (Figura 3-13). As condições da esterilização por calor húmido são consideradas “sobremorte” pelo que a sua eficácia era esperada.

No caso da irradiação gama, verificou-se que a dose de 5 kGy não se mostrou eficaz na eliminação completa das contaminações efetuadas, já que em todos os casos o resultado foi o crescimento bacteriano nas primeiras 48h de



incubação. Já com doses superiores de 15 e 25 kGy foi possível a eliminação completa dos microrganismos viáveis.

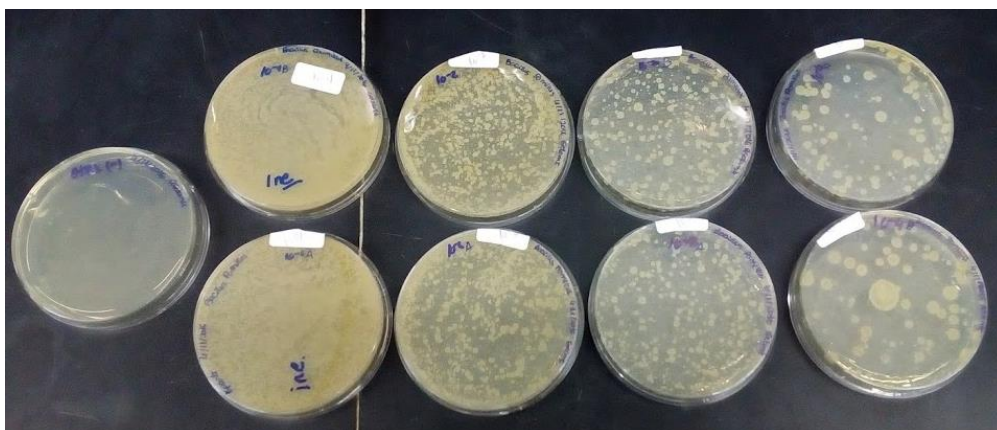


Figura 3-13. Exemplo ilustrando algumas placas de cultura durante o procedimento de quantificação de UFC de *Bacillus pumilus* (contagem das placas contendo entre 50-250 UFC).

A esterilização por exposição ao gás ozono não se revelou tão eficaz quanto a irradiação gama. A completa eliminação de viáveis só foi alcançada com a exposição mais longa (10 pulsos). Porém, importa lembrar que esta condição originou uma resposta citotóxica N=2. Com 4 pulsos foi possível eliminar cargas da ordem de  $10^2$  UFC/mL, enquanto que com 8 pulsos foi possível a eliminação completa de *bioburdens*  $\leq 10^3$  UFC/mL.

Tabela 3.2 - Eficácia das condições de esterilidade

Amostra	Crescimento microbiológico		
	Contaminação inicial (CFU/mL)		
	$10^2$ CFU/mL	$10^3$ CFU/mL	$10^4$ CFU/mL
Controlo negativo		Estéril	
Controlo positivo		Bg (dia 1)	
SH		Estéril	
GI 5 kGy	Bg (dia 1)	Bg (dia 1)	Bg (dia 1)
GI 15 kGy		Estéril	
GI 25 kGy		Estéril	

Oz 4 Pulsos	Estéril	Bg (dia 1)	Bg (dia 1)
Oz 8 Pulsos	Estéril	Estéril	Bg (dia 1)
Oz 10 Pulsos	Estéril	Estéril	Estéril

Estéril: ausência de crescimento bacteriano por 14 dias; Bg (dia X): crescimento bacteriano detectado no dia X; N/A:

Não avaliado;

### 3.4 CONCLUSÕES

O objetivo do trabalho realizado para este capítulo consistiu no estudo da aplicabilidade de um método recente e promissor, baseado na exposição ao gás ozono, na esterilização de hidrogéis para lentes de contato. Para este desiderato analisou-se o efeito do método nas principais propriedades de dois materiais modelo: um representativo do hidrogel convencional ainda muito utilizado na produção de lentes (PHEMA), e uma segunda formulação representativa da nova geração de silicone-hidrogel (TRIS). Para efeitos de comparação complementou-se o estudo, avaliando também o efeito de duas técnicas de esterilização convencionais, muito utilizadas na esterilização de lentes de contato comerciais (calor húmido e irradiação gama).

No geral, pode-se afirmar que a exposição a 8 pulsos de ozonização foi eficaz na eliminação de cargas  $10^3$  CFU/mL, permitindo em simultâneo a manutenção das principais propriedades dos materiais dentro de valores aceitáveis para o seu bom desempenho, enquanto lentes de contato. Embora com a exposição mais longa (10 pulsos) tenha sido possível um grau de eficácia mais elevado ( $10^4$  CFU/mL), observaram-se alterações significativas em propriedades importantes, nomeadamente a diminuição do módulo de Young, o aumento do coeficiente de atrito, evidências de degradação superficial (morfologia/topografia) e a ocorrência de resposta biológica de grau N=2.

Apesar de muito utilizada, a esterilização por calor húmido também causou algumas alterações nos dois materiais estudados (PHEMA: diminuição do coeficiente de atrito e da rugosidade; TRIS: um aumento da capacidade de intumescimento, o que poderá ter repercussões negativas em termos de transporte de oxigénio através do material; diminuição do ângulo de contato).

Quanto à irradiação gama: registou-se a ineficácia da dose de 5kGy na eliminação de pequenas cargas microbianas. Porém, o aumento da dose, embora tenha conduzido à esterilidade, originou um aumento do coeficiente de atrito do hidrogel, no caso de 15 kGy, e a efeitos mais drásticos no caso da dose de 25 kGy, na qual foi possível observar degradação da superfície e um aumento significativo do módulo de Young.

Além de fornecer uma visão importante sobre a compreensão dos principais efeitos de diferentes métodos de esterilização terminal (ozono, calor de vapor e irradiação gama) nos materiais estudados, este trabalho também demonstra que a ozonização é uma alternativa interessante para a sua esterilização, uma vez que nas condições apropriadas é possível obter um resultado eficaz sem o comprometimento das propriedades do material. Estes são proveitos motivadores, tendo presente tratar-se de um método de baixo custo e com baixo impacto ambiental. Estudos posteriores permitirão avaliar a possibilidade de utilizar este método para outros sistemas.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- 1 PHILLIPS, A. J.; SPEEDWELL, L. **Contact Lenses**. Butterworth-Heinemann, 1997.
- 2 EFRON, N.; MALDONADO-CODINA, C. 6.633 - Development of Contact Lenses from a Biomaterial Point of View – Materials, Manufacture, and Clinical Application A2 - Ducheyne, Paul. **Comprehensive Biomaterials**. Oxford: Elsevier, 2011. p.517-541.
- 3 VETTEN, M. A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomedicine**, v. 10, n. 7, p. 1391-1399,2014.
- 4 KARAJANAGI, S. S. et al. Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 7, p. 1716-25,2011.
- 5 DUFRESNE, S.; LEBLOND, H.; CHAUNET, M. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer. **Am. J. Infect. Control**, v. 36, n. 4, p. 291-297,2008.
- 6 PARADISO, P. et al. Comparison of two hydrogel formulations for drug release in ophthalmic lenses. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 102, n. 6, p. 1170-1180,2014.
- 7 VAZQUEZ, R. et al. Stability of triglyceride liquid films on hydrophilic and hydrophobic glasses. **J. Colloid Interface Sci** , n. 299, p. 274-282,2006.
- 8 GALANTE, R. et al. About the effect of eye blinking on drug release from pHEMA-based hydrogels: an in vitro study. **J Biomater Sci Polym Ed n**, v. 26, n. 4, p. 235-51,2015.
- 9 FERREIRA, L.; VIDAL, M. M.; GIL, M. H. Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values. **Int. J. Pharm.**, n. 194, p. 169-180,2000.
- 10 YAÑEZ, F.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Macromolecule release and smoothness of semi-interpenetrating PVP–pHEMA networks for comfortable soft contact lenses. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 69, n. 3, p. 1094-1103,2008.
- 11 ROBA, M. et al. Friction Measurements on Contact Lenses in Their Operating Environment. **Tribol. Lett.**, v. 44, n. 3, p. 387,2011.
- 12 MENDES, C. M. et al. The Portuguese gamma irradiation facility. **Int J Rad Appl Instrum. C. Radiat Phys Chem**, v. 35, n. 4, p. 576-579,1990.

- 13 PEPPAS, N. A.; HOFFMAN, A. S. Chapter I.2.5 - Hydrogels. **Biomaterials Science (Third Edition)**: Academic Press, 2013. p.166-179.
- 14 HU, X. et al. Hydrogel Contact Lens for Extended Delivery of Ophthalmic Drugs. **Int J Polym Sci**, v. 2011, p. 9,2011.
- 15 EFRON, N. et al. Oxygen Permeability and Water Content of Silicone Hydrogel Contact Lens Materials. **Optom. Vis. Sci.**, v. 84, n. 4, p. E328-E337,2007.
- 16 TRANOUDIS, I.; EFRON, N. Tensile properties of soft contact lens materials. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 27, n. 4, p. 177-191,2004.
- 17 LIN, M. C.; YEH, T. N. Mechanical complications induced by silicone hydrogel contact lenses. **Eye Contact Lens**, v. 39, n. 1, p. 115-24,2013.
- 18 TOMIĆ, S. L. et al. Swelling and drug release behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) copolymeric hydrogels obtained by gamma irradiation. **Radiat Phys Chem**, v. 76, n. 5, p. 801-810,2007.
- 19 GUPTA, V. K. et al. Experimental study of surfaces of hydrogel polymers HEMA, HEMA–EEMA–MA, and PVA as adsorbent for removal of azo dyes from liquid phase. **J Mol Liq.**, v. 206, p. 129-136,2015.
- 20 BUGA, M.-R. et al. Surface modification of silk fibroin fibers with poly(methyl methacrylate) and poly(tributylsilyl methacrylate) via RAFT polymerization for marine antifouling applications. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 51, p. 233-241,2015.
- 21 SILVA, D. et al. The effect of albumin and cholesterol on the biotribological behavior of hydrogels for contact lenses. **Acta Biomater**, v. 26, p. 184-194,2015.

## **4 EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGÉIS NA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

*A informação contida neste capítulo foi parcialmente submetida para publicação no periódico Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (conceito Qualis 2016: A2 Farmácia, A1 Materiais).*



## 4.1 ENQUADRAMENTO

O desenvolvimento de dispositivos de libertação controlada de fármacos (ou outras moléculas), utilizando hidrogéis, tem sido extensivamente estudado, o que pode ser facilmente confirmado pelo considerável volume de trabalhos publicados sobre o tema <sup>1;2</sup>.

O efeito dos métodos de esterilização nas propriedades destes sistemas torna-se especialmente crítico, uma vez que, a par da integridade do material outros fatores como a degradação do ativo e as possíveis alterações do seu perfil de libertação precisam ser consideradas <sup>3;4</sup>. Como já mencionado no capítulo 1, a literatura sobre tema da esterilização de hidrogéis é escassa. Pode-se, no entanto, destacar o trabalho conduzido por Eljarrat-Binstock et al. <sup>5</sup>, no qual se estudou o efeito de métodos convencionais (GI, EtO e SH) nas propriedades de hidrogéis à base de HEMA, cuja aplicação pretendida seria a libertação transdérmica de metotrexato, carboplatina e ácido etacrínico. No trabalho em causa, os autores relatam uma maior compatibilidade dos sistemas estudados com a esterilização por radiação gama.

Outro exemplo presente na literatura seria o estudo de Pitarresi et al. <sup>6</sup>, no qual hidrogéis de ácido hialurónico se revelaram resistentes à esterilização por calor húmido, sendo que as suas propriedades mecânicas permaneceram inalteradas, bem como os perfis de libertação dos dois fármacos testados (vancomicina e tobramicina).

Kanjickal et al. <sup>7</sup>, por sua vez, estudou hidrogéis de polietilenoglicol (PEG) esterilizados por GI, EtO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foram aferidos os efeitos destes métodos no perfil de libertação de ciclosporina e rodamina B. As conclusões do trabalho



revelaram uma maior sensibilidade da ciclosporina enquanto que o perfil de liberação da rodamina B permaneceu inalterado.

Entre as inúmeras áreas de aplicação dos dispositivos de libertação controlada à base de hidrogeis, destaca-se o uso de lentes de contato como veículos promissores de libertação controlada <sup>8; 9</sup>.

A fisiologia do olho humano apresenta diversos desafios à administração convencional de fármacos (aplicação tópica) <sup>10</sup>. A constante renovação do filme lacrimal e os mecanismos de drenagem diluem rapidamente os ativos, tornando necessário um maior número de aplicações.

As lentes de contato surgem como uma alternativa à aplicação tópica, capaz de aumentar a biodisponibilidade dos fármacos em pelo menos 50% quando comparada, por exemplo, com colírios (1-5%) <sup>9</sup>.

Como anteriormente referido, a esterilidade é uma exigência importante para estes biomateriais, dado o permanente contato direto com a superfície ocular <sup>11</sup>.

O trabalho experimental realizado neste capítulo vem na continuidade do desenvolvido no capítulo anterior.

Neste sentido, selecionou-se a formulação TRIS, como material modelo para simular um dispositivo de libertação de fármacos, representante da nova geração de silicone-hidrogel. Para tal, foram escolhidos quatro fármacos, recorrentemente utilizados no tratamento de patologias oculares (levofloxacina, diclofenac, timolol e clorhexidina) <sup>12; 13; 14; 15</sup>. A incorporação dos mesmos foi feita intumescendo o hidrogel diretamente em soluções de cada fármaco.

O principal objetivo deste capítulo foi compreender como esses diferentes pares de matriz+fármaco se comportariam perante diferentes condições de

esterilização. Deste modo, os perfis de libertação e as principais propriedades do material foram avaliados antes e depois da esterilização.

## **4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.2.1 Materiais**

Os materiais utilizados na preparação do hidrogel TRIS, ensaios de esterilidade e testes de citotoxicidade estão enunciados na seção 3.3. Assim, listam-se abaixo os materiais e reagentes adicionais ainda não mencionados.

- Diclofenac sódico (DCF), Sigma-Aldrich
- Levofloxacina (LVF), Sigma-Aldrich
- Diaceacetato monohidratado de clorhexidina (CHX), AppliChem
- Maleato de Timolol (TML), gentilmente cedido pela empresa farmacêutica portuguesa Edol.
- Acetonitrilo, Fisher Scientific
- Tampão fosfato monobásico, Sigma-Aldrich
- Ácido ortofosfórico, Fisher Scientific
- Metanol, Fisher Scientific
- Trietilamanina, Sigma-Aldrich

### **4.2.2 Preparação do hidrogel**

A síntese detalhada da formulação do silicone-hidrogel (SiHy) está descrita na seção 3.3.1 do presente trabalho.

### **4.2.3 Incorporação do fármaco**

A incorporação foi realizada intumescendo as amostras de hidrogel (discos de 10 ou 12 mm) em recipientes contendo solução de fármaco (6 mL).

De modo a facilitar a comparação entre os diferentes sistemas em estudo, foram mantidas, para todos os casos, as mesmas condições de temperatura (35°C) e duração total do período de carregamento (5 dias).

As soluções de cada fármaco foram preparadas à concentração de 1 mg/mL, em solução salina (0.9% NaCl), no caso da LVF, DCF e TML e em água destilada e desionizada no caso da CHX (dada a sua fraca solubilidade em solução salina).

#### **4.2.4 Caracterização do hidrogel carregado**

##### **4.2.4.1 Transmitância**

A transmitância das amostras foi aferida ao final ao período de carregamento, antes e depois do processo de esterilização. Seguiu-se o mesmo procedimento descrito da secção 3.2.3.1 do capítulo 3. Foram efetuadas pelo menos três medições, para cada condição estudada.

##### **4.2.4.2 Intumescimento**

Os hidrogéis secos foram pesados e o seu peso novamente aferido ao final do período de carregamento em solução de fármaco (antes e depois da esterilização). O cálculo da capacidade de intumescimento realizado segundo descrito da secção 3.2.3.2 do capítulo 3. Todas as medições foram realizadas, pelo menos, em triplicado.

#### **4.2.4.3 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas foram determinadas ao final do processo de carregamento de fármaco, seguindo-se o mesmo procedimento descrito da secção 3.2.3.4 do capítulo 3.

#### **4.2.4.4 Morfologia**

A morfologia dos hidrogéis carregados com fármaco foi analisada segundo o protocolo mencionado e descrito da secção 3.2.3.5 do capítulo 3.

#### **4.2.4.5 Reatividade biológica**

A reatividade biológica das amostras carregadas, antes e após a exposição aos métodos de esterilização foi aferida seguindo o procedimento descrito da secção 3.2.3.8 do capítulo 3.

### **4.2.5 Esterilização do hidrogel carregado**

A esterilização das amostras com fármaco incorporado, foi realizada no último dia de carregamento (5º dia), sendo que o hidrogel hidratado foi acondicionado na própria da solução de fármaco.

#### **4.2.5.1 Esterilização por calor húmido**

Concretizou-se a autoclavagem das amostras carregadas segundo o protocolo descrito da secção 3.2.4.2 do capítulo 3.

#### **4.2.5.2 Esterilização por ozono**

Expuseram-se as amostras carregadas a 8 pulsos de ozonização, seguindo-se procedimento descrito da secção 3.2.4.1 do capítulo 3.

#### **4.2.5.3 Esterilização por irradiação gama**

As amostras foram sujeitas a uma radiação de 10 kGy, seguindo o procedimento descrito na secção 2.2.3.4.do capítulo 2.

#### **4.2.5.4 Avaliação da esterilidade**

A realização dos testes de esterilidade consistiu apenas com amostras placebo (sem fármaco) irradiadas, já que a eficácia das restantes condições de esterilização foi abordada no capítulo anterior. Optou-se por fazer a validação da dose 10 kGy, usando amostras hidratadas em solução salina, *i.e.*, sem a presença de fármaco, de modo a evitar possíveis interações na viabilidade dos microrganismos. Seguiu-se o protocolo mencionado em detalhe na secção 3.2.4.4. capítulo 3.

#### **4.2.6 Ensaios de libertação**

Após o período de incorporação os hidrogéis hidratados foram retirados da solução de carregamento. Seguiu-se uma lavagem rápida com água destilada e desionizada, com a pretensão de retirar apenas o excesso superficial de solução de fármaco. As amostras foram imediatamente transferidas para recipientes contendo 6 mL de solução salina (0.9% NaCl) e mantidas numa estufa de bancada (Figura 4.1), a 35° C, com agitação de 180 rpm, ao longo de quatro dias.

Em intervalos de tempo determinados, alíquotas do sobrenadante (0.6 mL) foram retiradas, sendo o mesmo volume repostado com solução salina. Nos casos de impossibilidade de quantificação imediata do fármaco libertado, as amostras foram guardadas a 4°C, por um período máximo de 3 dias.



Figura 4.1. Estufa de bancada onde se realizaram os ensaios de libertação, ao abrigo da luz.

Os ensaios de libertação foram realizados em triplicado, antes e depois da exposição às condições de esterilização.

#### **4.2.6.1 Quantificação de fármaco libertado**

Neste contexto a cromatografia ocupa lugar de destaque devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas <sup>16</sup>. A modalidade mais comum de utilização desta técnica é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (HPLC-RP). Este método consiste numa fase estacionária de menor polaridade (e.g. C<sub>18</sub>), que preenche uma coluna, e uma fase móvel de maior polaridade que se faz passar pelo interior da coluna.

Os compostos com polaridade elevada permanecem preferencialmente na fase móvel, sendo eluídos antes dos materiais não polares, pois estes revelam maior afinidade para a fase estacionária. Com este método torna-se

possível a identificação e quantificação dos fármacos, como também a identificação da presença de eventuais compostos de degradação.

Neste trabalho usou-se um equipamento *Accella Thermo Scientific* com detector UV-vis acoplado (Figura 4.2). A coluna utilizada foi uma *Hypersil C<sub>18</sub>* (12.5 cm x 4 mm, 5 µm) e o fluxo mantido a 1 mL/min.



Figura 4.2 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para cada fármaco utilizou-se uma fase móvel distinta:

- LVF: água, acetonitrilo, ácido fosfórico e trimetilamina (86/14/0,6/0,3 em volume) para LVF, adaptado do método descrito por Wong et al. <sup>17</sup>);
- DCF: acetonitrilo, ácido fosfórico (0,05 M) e metanol (48/40/12 em volume) (adaptado do método descrito por Shaalan et al. <sup>18</sup>
- TML: solução tampão fosfato (pH 3,5) e metanol (60/40 em volume), adaptado do método descrito por Laddha et <sup>19</sup>
- CHX: acetonitrilo e fosfato de potássio monobásico (0,02 mg / mL a pH 2,5) (40/60 em volume), adaptado a partir do método descrito por Zhu et al. <sup>20</sup>.

As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 295 nm para LVF, 275 nm para DCF, 300 nm para TML e 255 nm para CHX.

#### 4.2.6.2 Mecanismo de libertação do fármaco

Com o intuito de aferir possíveis alterações do mecanismo de libertação, os dados experimentais dos perfis de libertação foram ajustados ao modelo matemático, proposto por Peppas <sup>21</sup>:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. 4-1}$$

$M_t$  e  $M_\infty$  representam a quantidade de fármaco libertada no tempo  $t$  e no equilíbrio, respetivamente; a constante de proporcionalidade,  $k$ , compreende informações referentes a características da matriz polimérica; o expoente,  $n$ , diz respeito ao mecanismo de transporte do fármaco através da matriz. Assim,  $n=0,5$  indica que o processo de libertação ocorre por difusão Fickiana;  $0,5 < n < 1$  corresponde a transporte anómalo, e  $n=1$  ao transporte do caso II.

A qualidade dos ajustes foi avaliada a partir do valor dos coeficientes de correlação,  $r^2$ .

#### 4.2.7 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados experimentais foi realizado segundo a metodologia descrita no capítulo 2.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os hidrogéis para aplicações de libertação de fármacos a partir de lentes de contato terapêuticas devem, idealmente, cumprir os mesmos requisitos de qualidade e segurança exigidos para lentes de contato convencionais <sup>22</sup>.



Assim, espera-se que, quer a esterilização quer a simples incorporação do fármaco no material não alterem significativamente as principais propriedades do material, de modo a comprometer o seu desempenho clínico.

#### **4.3.1 Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na transmitância do hidrogel**

Uma das principais propriedades de hidrogéis para lentes de contato é a sua transparência <sup>23</sup>. Apesar de não se tratar de uma prioridade para os casos de lentes de contato terapêuticas, ainda assim, é desejável que esta propriedade se mantenha dentro dos valores pré-estabelecidos, após a incorporação dos fármacos e posterior processo de esterilização.

Observando a Figura 4.3, na qual se encontram representados os espectros de transmitância do hidrogel nas diferentes condições estudadas, constata-se que para todos os casos não esterilizados a transparência do hidrogel carregado com fármaco permaneceu acima do valor de referência (90%) <sup>24</sup>.

A esterilização por calor húmido não causou alterações significativas na transmitância do hidrogel carregado. Ainda assim, as amostras contendo DCF pareceram ligeiramente mais sensíveis (Figura 4.3 B).

A irradiação gama provocou os efeitos mais evidentes, não só nos espectros como visualmente (Figura 4.4.).

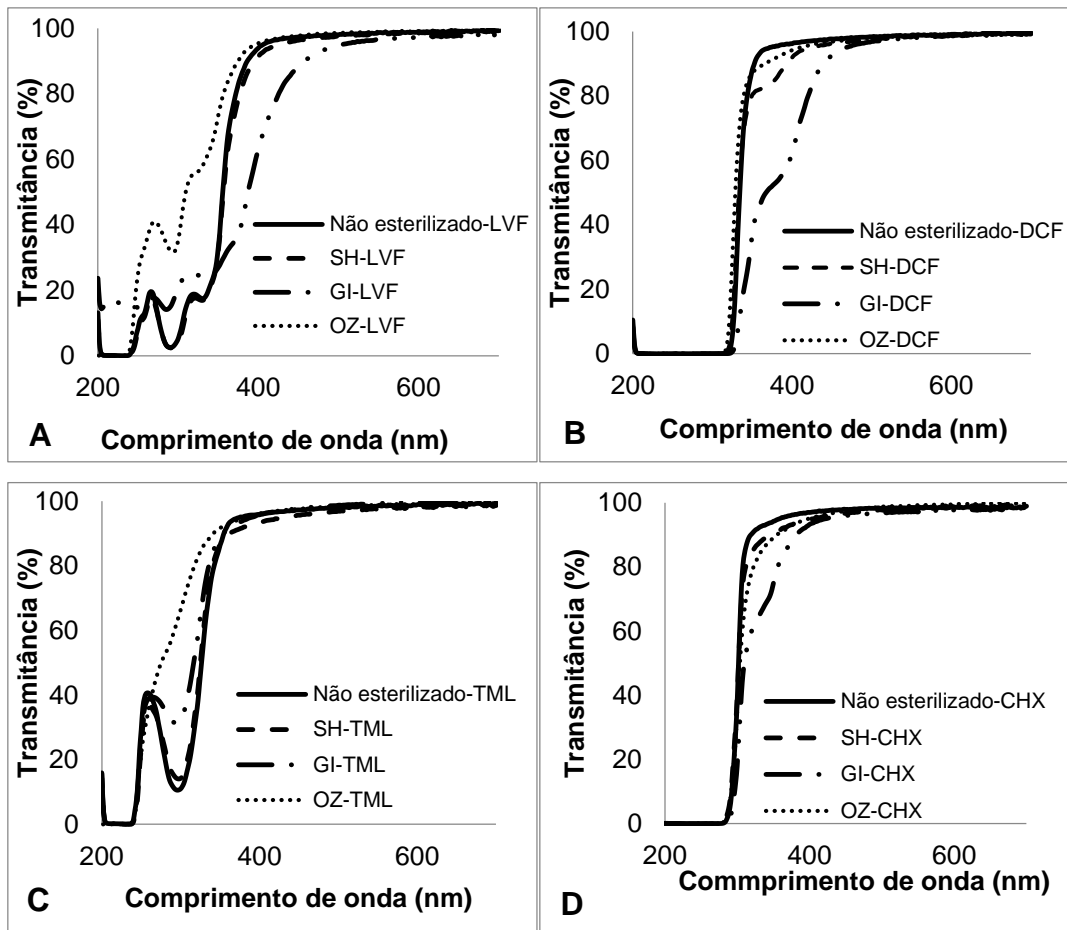


Figura 4.3 – Transmitância do hidrogel carregado com levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) clorhexidina (D), antes e depois dos diferentes processos de esterilização: calor húmido (SH), irradiação gama (GI) e ozonização (OZ).



Figura 4.4 – Aspecto visual do hidrogel carregado com diclofenac antes (CTRL) e depois de esterilizado por calor húmido (SH), irradiação gama (GI) e ozonização (OZ).

Com exceção do hidrogel contendo TML, as restantes amostras carregadas escureceram após a esterilização por irradiação gama, levando à diminuição da transmitância.

Relativamente à esterilização por ozono, este processo pareceu afetar pouco a transparência do material. Amostras contendo DCF e CHX permaneceram inalteradas, enquanto que para LVF e TML se observaram alterações no espectro apenas na região ultravioleta (250-350 nm).

#### **4.3.2 Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na capacidade de intumescimento**

Os resultados referentes ao intumescimento do hidrogel nas diferentes condições estudadas, são apresentados na Figura 4.5.

Após a incorporação de fármaco, observaram-se diferenças significativas no intumescimento das amostras ainda antes da exposição aos diferentes processos de esterilização. Foi o caso, nomeadamente, do DCF, na presença do qual o hidrogel apresentou um aumento da capacidade de intumescimento (73 para 114%) (*valor-p*=0,00183). Este facto pode estar relacionado com a possível ocorrência de interações específicas entre a molécula do fármaco e a matriz polimérica do hidrogel (e.g. adsorção específica, interações eletroestáticas) <sup>14</sup>.

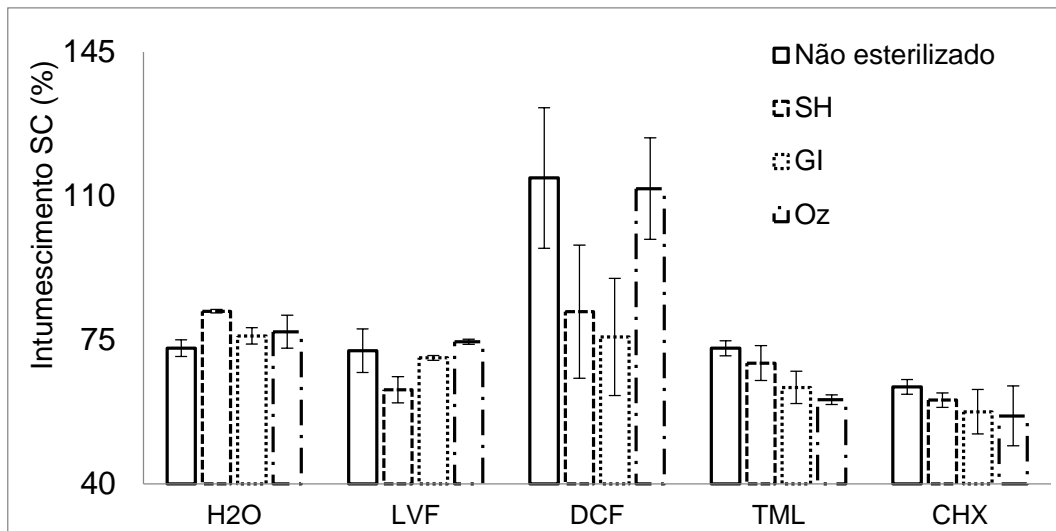


Figura 4.5. Capacidade de intumescimento do hidrogel, em água (H<sub>2</sub>O) e nas diferentes soluções de fármaco (LVF: levofloxacina, DCF: diclofenaco; TML: timolol, CHX: clorhexidina), antes e após os diferentes processos de esterilização (SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro representam  $\pm$  desvio padrão.

Como já mencionado no capítulo anterior, o aumento da capacidade de intumescimento nos SiHy poderá, eventualmente, dificultar a permeabilidade ao oxigénio no material <sup>25</sup>.

Os hidrogéis hidratados em soluções de LVF, CHX e TML, não esterilizados, não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

O hidrogel contendo LVF (SiHy-LVF) não se revelou sensível às condições de esterilização, no que se refere ao parâmetro em estudo (*valor-p*= 0,098). Porém, observou-se uma ligeira tendência para a diminuição da capacidade de intumescimento após a esterilização por SH e GI.

Os resultados relativos ao hidrogel, contendo DCF (SiHy-DCF), também não demonstraram significância estatística, mas mais uma vez foi constatou-se a tendência de diminuição da %SC após a exposição aos diferentes métodos de esterilização (*valor-p*=0,052).

O sistema carregado com TML (SiHy-TML), apenas se revelou sensível à exposição ao ozono, após a qual apresentou uma diminuição de 13% na capacidade de intumescimento (73-60%, quando comparado às amostras não esterilizadas) (*valor-p*=0,023).

Por último, o hidrogel hidratado em solução de CHX, (SiHy-CHX), demonstrou ser o menos afetado, uma vez que nenhuma alteração ou tendência significativa foi observada.

### **4.3.3 Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização nas propriedades mecânicas**

A relevância clínica das propriedades mecânicas dos hidrogeis para lentes de contato já foi extensivamente analisada ao longo deste trabalho (vide secção 1.3.2.5 do capítulo 1 e secção 3.3.4 capítulo 3). Os resultados referentes a estes parâmetros apresentam-se em seguida (Figura 4.6).

A hidratação do hidrogel em soluções de LVF, CHX e TML levou a um aumento significativo do módulo de Young, quando comparado ao valor obtido para amostras hidratadas em NaCl 0.9% (Figura 4.6 A) (*valor-p* <0,0005). Estes resultados apontam para a possível ocorrência de interações entre as moléculas dos fármacos e a matriz polimérica do hidrogel, nos três casos.

A exposição ao calor húmido provocou um aumento do módulo de Young para os casos SiHy-DCF (*valor-p*= 0,007) e SiHy-TML (*valor-p*=0,012), indicando interações decorrentes das condições de esterilização.

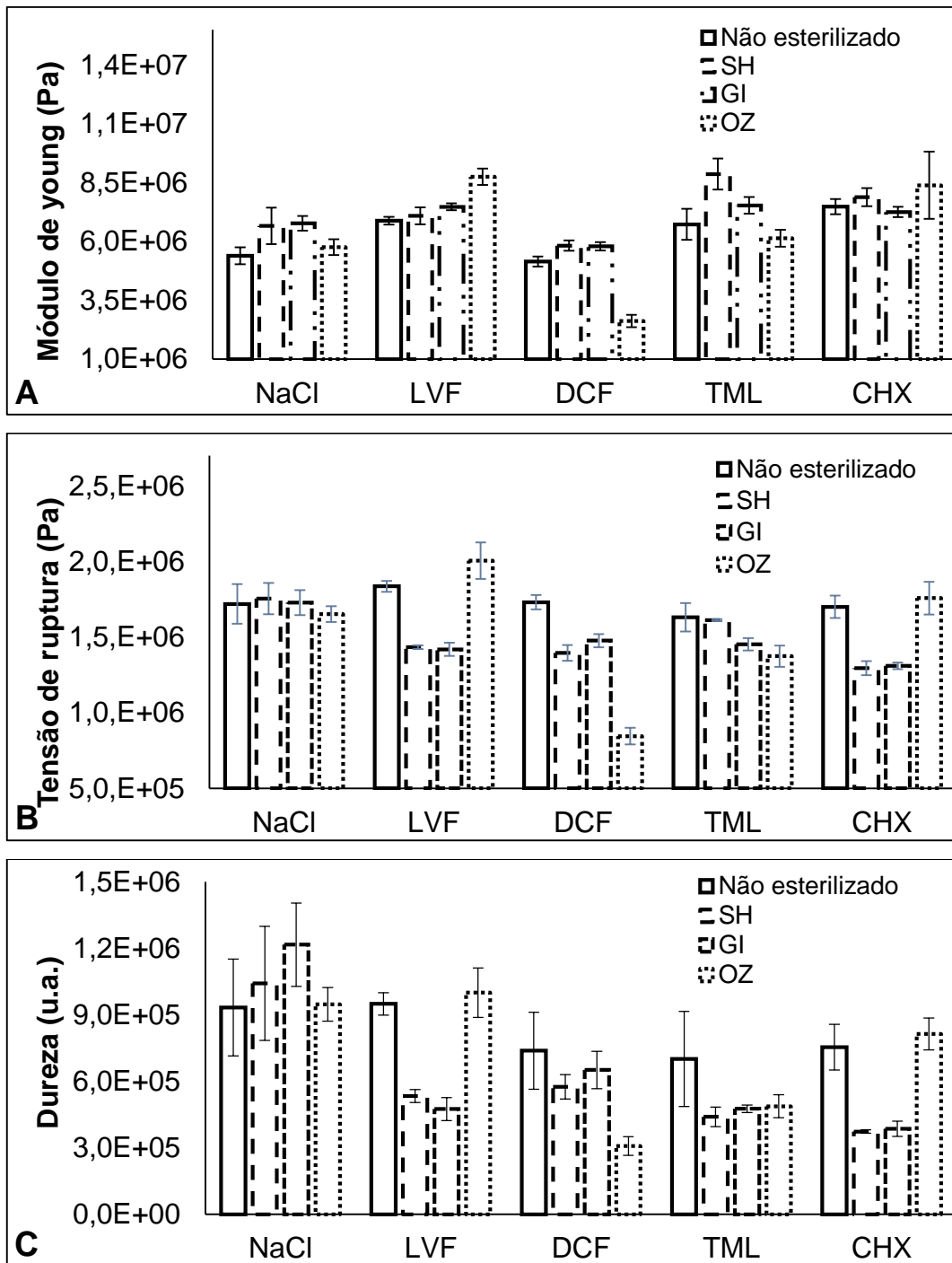


Figura 4.6 – Módulo de Young (A), Tensão de ruptura (B) e Dureza (C) dos hidrogéis hidratados (NaCl: em solução salina 0.9%; LVF: em solução de levofloxacina; DCF: em solução de diclofenac; TML: em solução de timolol; CHX: em solução de clorhexidina) antes e depois da esterilização (SH: calor húmido, GI: irradiação gama; OZ: ozonização). As barras de erro representam  $\pm$  desvio padrão).

Contrariamente, os sistemas SiHy-LVF e SiHy-CHX não apresentaram variações acentuadas após a autoclavagem. A tensão de ruptura diminuiu para os casos dos sistemas SiHy-LFV, SiHy-DCF e SiHy-CHX (*valor-p*<0,0001), enquanto que para o SiHy-TML permaneceu inalterada. A exposição ao método de esterilização influenciou ainda o parâmetro da dureza das amostras, o qual sofreu aumentos significativos para os casos dos sistemas SiHy-LVF (*valor-p*=2.1e-05) e SiHy-CHX (*valor-p* = 3.9e-05).

A irradiação gama apenas induziu o aumento do módulo de Young nas amostras SiHy-DCF (*valor-p*=0,016). No entanto, observaram-se alterações referentes à tensão de ruptura e dureza em todos os sistemas (*valor-p*<0,03), sendo a única exceção o valor da dureza do sistema SiHy-DCF que, apesar de seguir a mesma tendência, não apresentou significância estatística.

A ozonização levou a um aumento significativo do módulo de Young para o sistema SiHy-LVF (*valor-p*=6,7e-05), enquanto que o efeito oposto foi observado para o par SiHy-DFC, (*valor-p*=3,6e-10). Estes resultados podem apontar para a predominância do efeito reticulante no primeiro caso enquanto que para o segundo, seria a degradação o evento de maior peso. Relativamente ao efeito da irradiação na tensão de ruptura: o par SiHy-LVF sofreu um aumento deste parâmetro (*p-valor*=0,013), enquanto os pares SiHy-DCF e SiHy-TML apresentaram diminuições. O mesmo comportamento foi verificado no que se refere ao efeito da irradiação na dureza destes sistemas.

Analisando, de uma forma geral, os resultados, pode-se afirmar a ocorrência de interações específicas entre as moléculas dos fármacos e a matriz polimérica do hidrodrel. A esterilização induz em todos os casos a algum tipo de degradação e/ou alteração nas propriedades mecânicas. No entanto, levando

em consideração o módulo de Young, em todos os casos, os valores obtidos permanecem dentro da mesma ordem de magnitude esperada para materiais com composição similar ( $10^6$  Pa) <sup>26</sup>.

#### 4.3.4 Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na morfologia

A incorporação de fármacos e a exposição aos processos de esterilização, nas condições estudadas, não produziram alterações significativas na morfologia dos sistemas em estudo. As amostras apresentaram superfícies regulares e homogêneas (Figura 4.7).

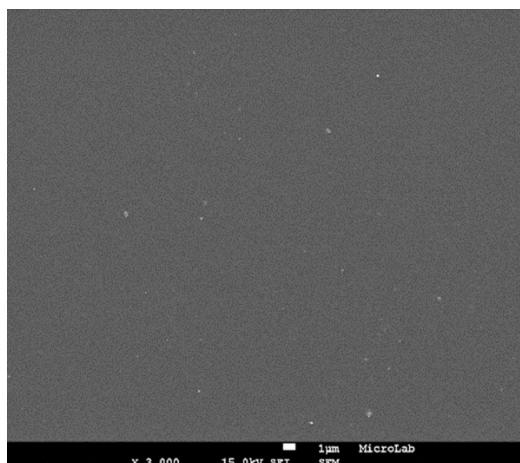


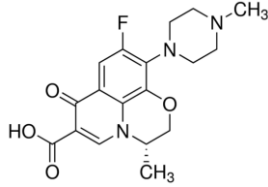
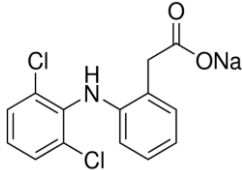
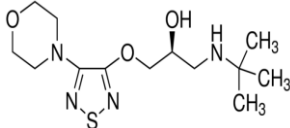
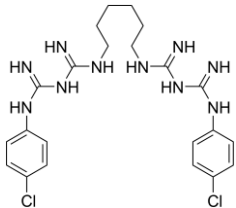
Figura 4.7 - Imagem SEM do hidrogel de silicone (Ampliação x3000).

#### 4.3.5 Efeito da esterilização no perfil de libertação do fármaco

Na Tabela 4.1 encontram-se descritas as principais características dos fármacos estudados neste capítulo. A sua escolha consistiu no facto de serem substâncias de uso recorrente no tratamento e na profilaxia de patologias oculares <sup>12; 13; 14; 15</sup>.

Tabela 4.1 – Principais características dos fármacos em estudo. Adaptado de <sup>14</sup>.



Fármaco	Estrutura	Ionicidade	Solubilidade em água (mg/mL a 20°C)	Peso molecular (g/mol)
Levofloxacina (LVF)		Zwitteriônica	25	361.37
Diclofenac (DCF)		Aniônica	2.37	318.13
Timolol (TML)		Catiônica	2.74	432.49
Clorhexidina (CHX)		Catiônica	19	643.57

O comportamento de cada par fármaco+matriz, quer durante o carregamento, quer durante a liberação, depende de diversos fatores (e.g. interações entre as moléculas do fármaco e as cadeias poliméricas, tempo de carregamento, temperatura, concentração da solução de carregamento, condições hidrodinâmicas do ensaio de liberação). Com o intuito de facilitar a comparação entre os sistemas, os testes foram realizados mantendo-se iguais o maior número de condições possível. Especificamente, concentração e volume da solução de carregamento, temperatura, agitação, duração e condições dos ensaios de liberação.

### **Levofloxacin**

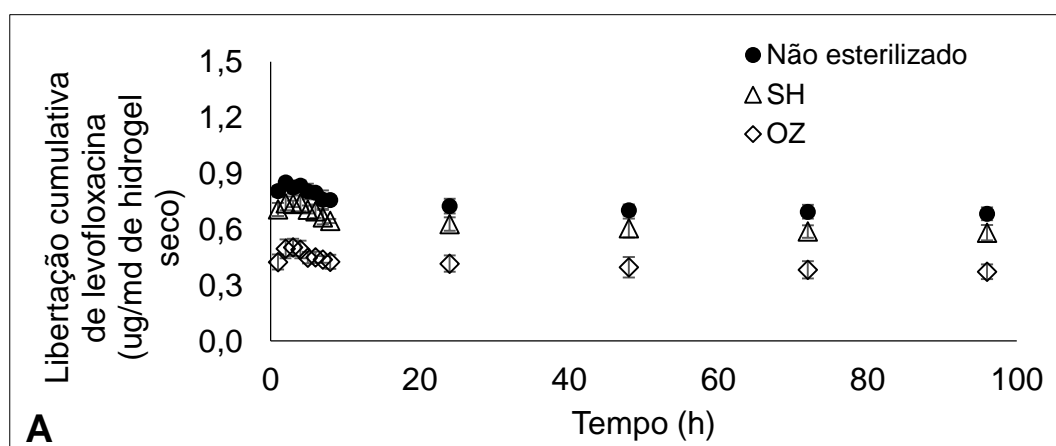
Os colírios à base de fluorquinolonas, como a LVF, são utilizados no tratamento de infecções oculares, tendo presente que se trata de antibióticos muito eficientes e de largo espectro de ação <sup>27</sup>. A molécula da LVF possui carácter lipofílico intermédio e a sua forma zwitteriónica predomina em solução aquosa e pH fisiológico <sup>28</sup>. O perfil de libertação de LVF a partir do SiHy (Figura 4.8 A), antes da esterilização, revelou um comportamento típico dos casos em que o fármaco se apresenta acumulado à superfície da matriz. A completa libertação verificou-se em menos de 2h, com o característico efeito “burst”. A ligeira diminuição que se observa no perfil não esterilizado poderá está relacionada com a degradação por hidrólise sofrida pelo fármaco <sup>29</sup>. Porém esta degradação não foi detetada na análise cromatográfica (Figura 4.9 A). Possíveis explicações para esse facto poderão constar na concentração dos eventuais produtos de degradação abaixo do limite de deteção do método ou na retenção dos mesmos na coluna cromatográfica.

A esterilização por calor húmido não provocou alterações drásticas no perfil, além de uma muito ligeira diminuição da quantidade de fármaco libertada. Esta redução pode ser indicativa de interações adicionais entre a molécula do antibiótico e a matriz polimérica, já que não foram identificados mais produtos de degradação. No geral, este par, SiHy-LVF, parece resistir à autoclavagem sem efeitos adversos significantes.

A irradiação gama degradou por completo o fármaco incorporado, pelo que não foi possível obter o respetivo perfil de libertação. Assim, conclui-se que este método de esterilização é inadequado para o par Si-Hy-LVF.

Após a ozonização, notou-se uma diminuição significativa da quantidade de fármaco libertada (redução de cerca de 50%). A análise cromatográfica revelou a formação de diversos produtos de degradação (Figura 4.9 A). A análise HPLC-RP do sobrenadante de amostras Si-Hy ozonizada, sem fármaco, descartou a possibilidade de os produtos de degradação observados terem origem na deterioração da matriz e não do fármaco. Paralelamente, analisou-se também a uma solução ozonizada de LVF, a qual se revelou totalmente degradada. Assim, pode-se concluir que o perfil de libertação de LVF observado, após a ozonização, decorre de uma pequena percentagem do antibiótico que resistiu ao método por se encontrar protegida no interior da matriz polimérica.

Os perfis de libertação obtidos apresentaram comportamentos, à partida, sem interesse clínico por caracterizarem uma libertação não controlada e de curta duração. Por este motivo, não se prosseguiu com a caracterização do sistema SiHy-LVF.



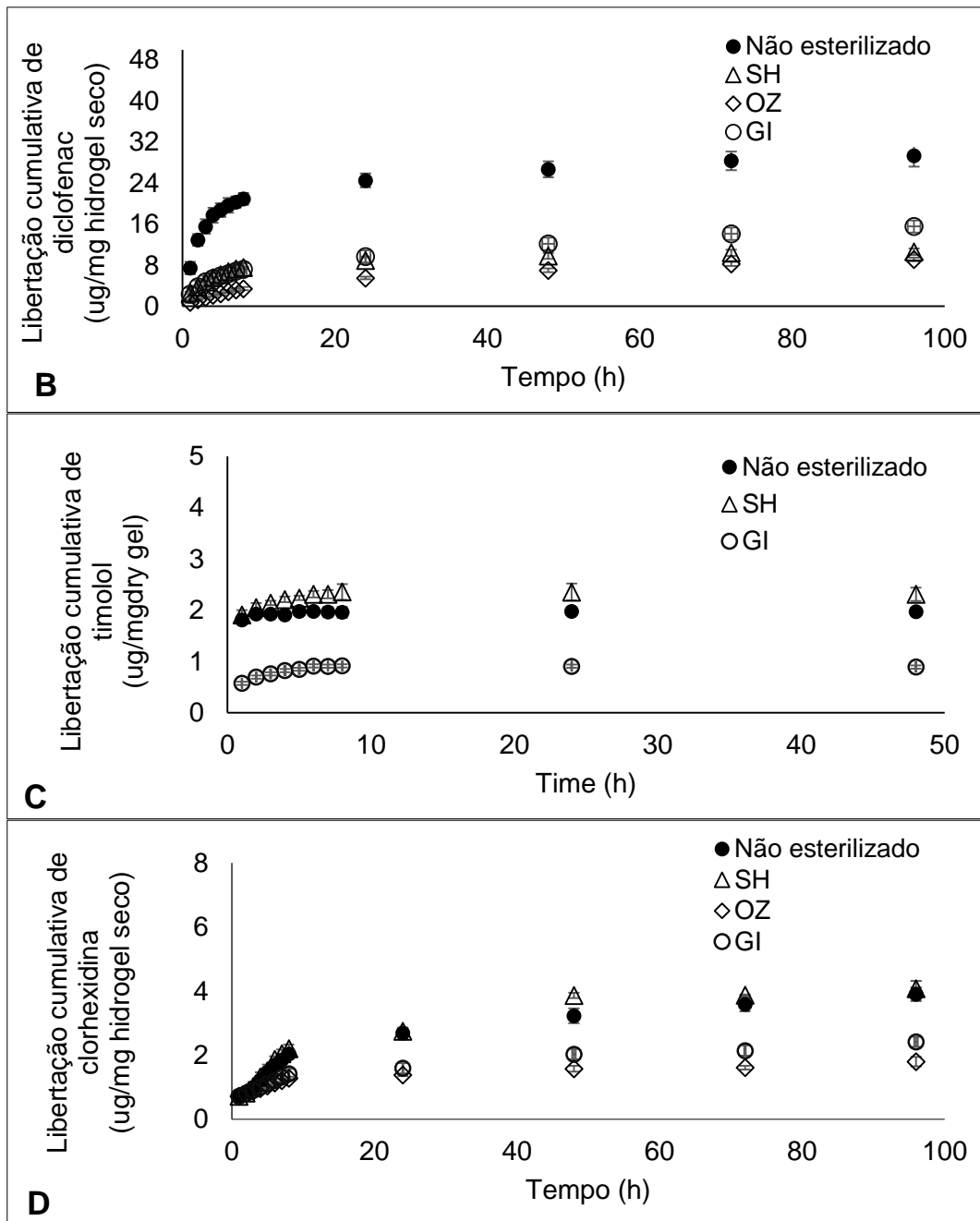
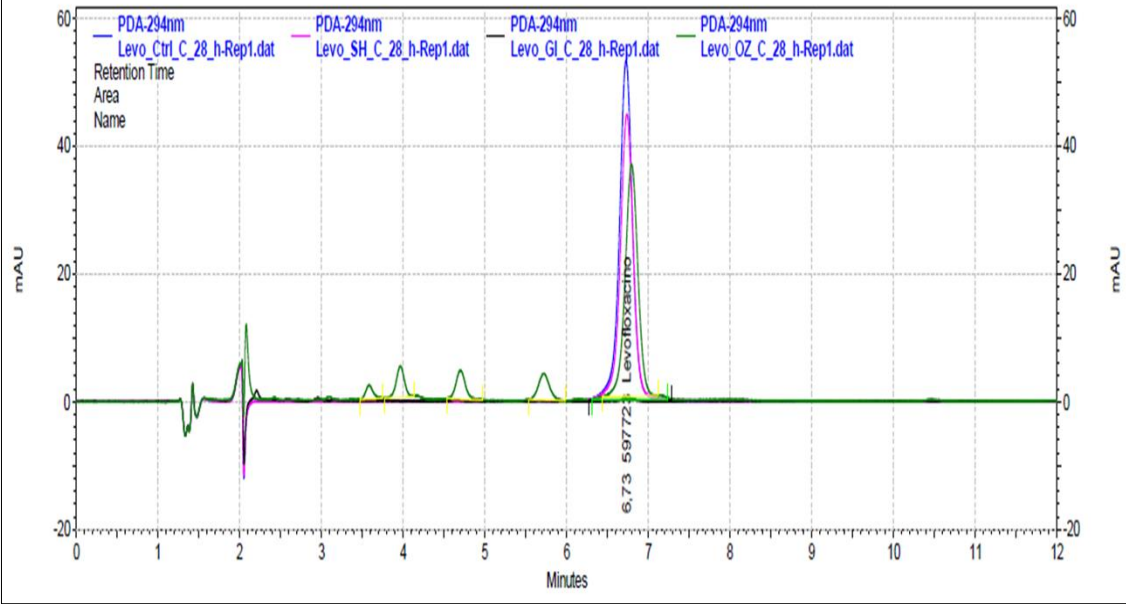
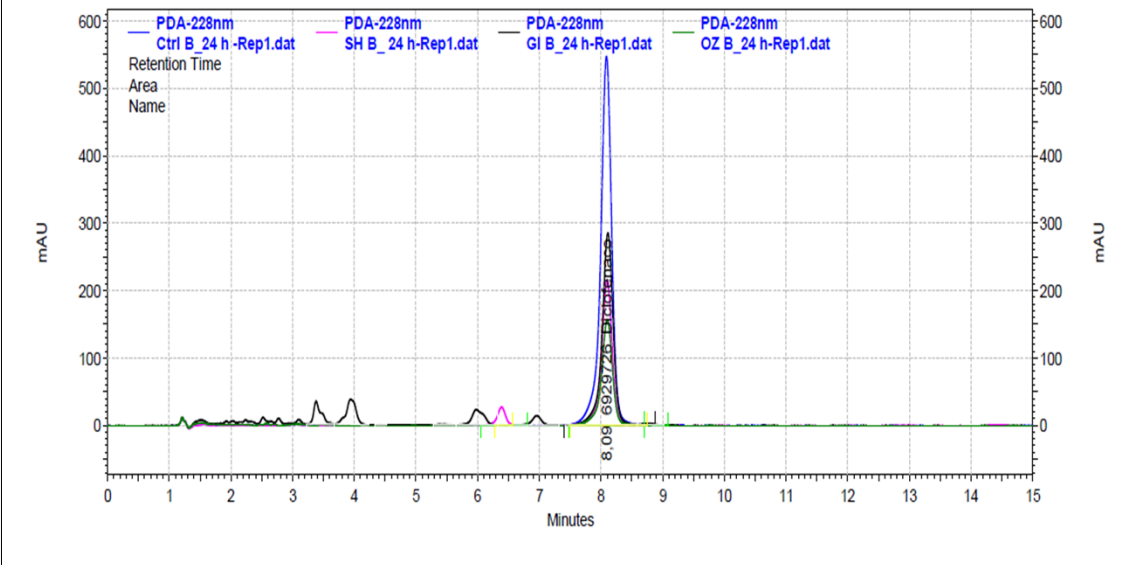


Figura 4.8 – Perfis de liberação: levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) e clorhexidina, antes e depois da exposição aos diferentes métodos de esterilização ( SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão.

# A - LEVOFLOXACINA



# B - DICLOFENAC



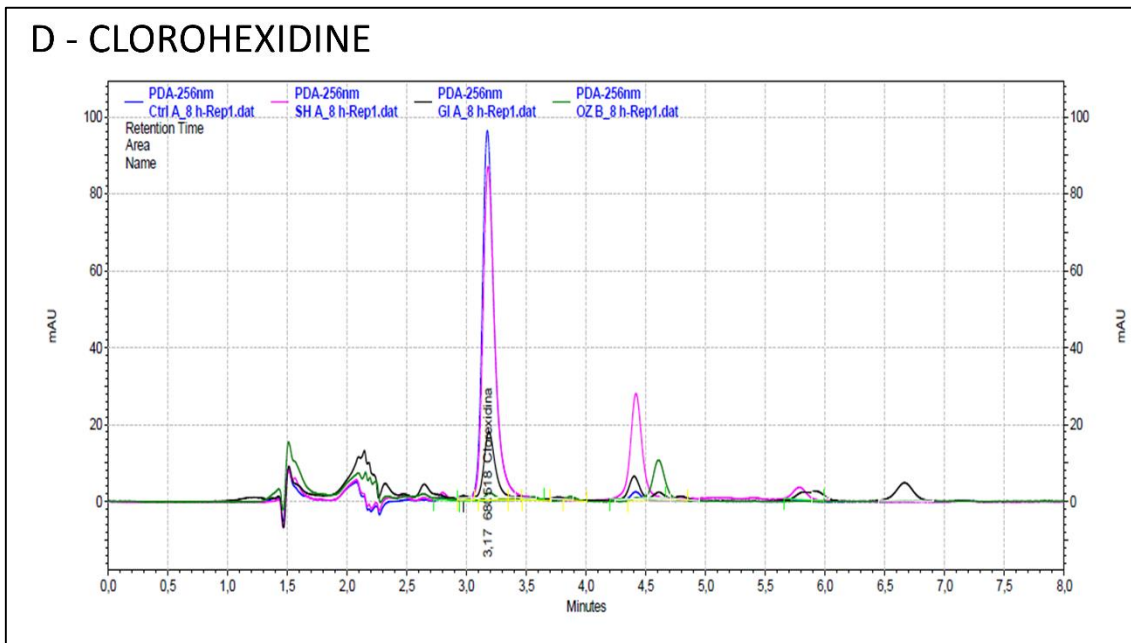
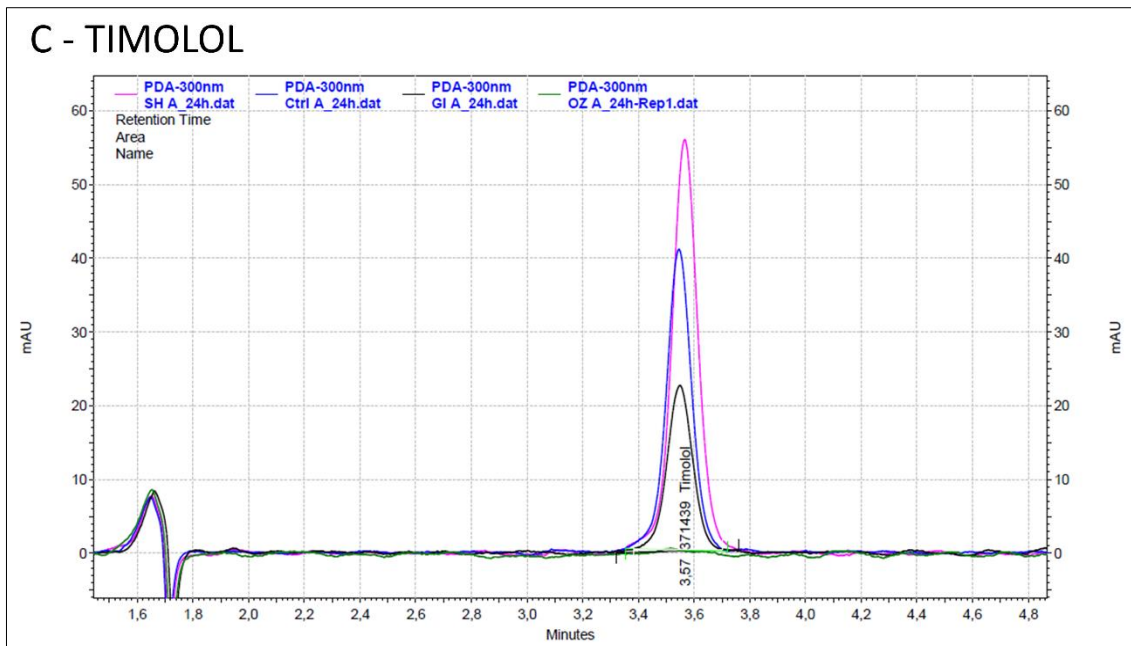


Figura 4.9 - Cromatogramas referentes à liberação de levofloxacina (A), diclofenac (B), timolol (C) e clorhexidina, antes e depois da exposição aos diferentes métodos de esterilização ( SH: calor húmido, GI: irradiação gama, OZ: ozonização). As barras de erro correspondem  $\pm$  ao desvio padrão.

## ***Diclofenac***

O DCF, molécula aniónica, é um fármaco anti-inflamatório, não esteroide, com atividade analgésica, amplamente utilizado no tratamento de patologias oculares<sup>30</sup>.

O comportamento dos perfis de libertação de DCF a partir de SiHy (Figura 4.8 B) diferiu muito do caso anterior (LVF). Em primeiro lugar, porque a quantidade de fármaco libertada foi muito maior (30 ug/mg hidrogel seco para o sistema SiHy-DCF, enquanto que para o sistema SiHy-LVF foi de apenas 0,8 ug/mg hidrogel seco). Este facto apontou para uma relação de maior afinidade entre o DCF e a matriz do hidrogel, situação não observada para o caso anterior. Em segundo lugar, o perfil apresentou uma libertação de DCF controlada e sustentada ao longo das 96h.

A esterilização por calor húmido levou a uma diminuição muito significativa da quantidade de fármaco libertada (de 30 para 9 ug/mg). Na análise cromatográfica (Figura 4.9 B) foi possível notar o surgimento de um pico de pequenas dimensões (tempo de retenção: 6.4 min), provavelmente proveniente da formação de algum produto durante a esterilização, o que indica alguma sensibilidade do sistema para este processo. Esta intensa diminuição da quantidade libertada de DCF pode estar relacionada com as interações fármaco-polímero promovidas pelas condições de esterilização. A diminuição da capacidade de intumescimento e as alterações mecânicas verificadas também suportam esta hipótese.

A irradiação gama e a ozonização conduziram a uma redução significativa nas quantidades libertadas de DCF (passando para 10,6 e 15,5 ug/mg de hidrogel seco, respectivamente, o que corresponde a uma perda de fármaco de

aproximadamente 44 e 67%, quando comparada à quantidade libertada a partir de amostras não esterilizadas).

No caso da irradiação gama, foi possível constatar, pelos cromatogramas de HPLC, a formação de diversos produtos de degradação (Figura 4.9 C), indicando, portanto, a inadequação deste método relativamente ao SiHy-DCF.

Quanto às amostras ozonizadas, não se observou a presença de picos adicionais na análise cromatográfica, o que sugere a possibilidade do hidrogel oferecer alguma proteção ao fármaco contido no seu interior.

Para avaliar o efeito dos métodos de esterilização nos mecanismos de libertação do fármaco, os dados experimentais obtidos foram ajustados ao modelo cinético proposto por Peppas. Na sua maioria, os processos de transporte de fármacos através de polímeros situam-se, geralmente, entre dois casos limitantes: a difusão fickiana e o transporte II (sendo que neste último predominam fatores como a relaxação das cadeias poliméricas e a influência do processo de intumescimento). A equação de Peppas compreende os mecanismos na mesma expressão simples, a partir da qual é possível ainda inferir os casos intermediário entre a difusão fickiana e transporte II, referidos como transporte anómalo.

A aproximação feita através da equação de Peppas é válida para os primeiros 60% da quantidade normalizada de fármaco libertada <sup>31</sup>, e, como tal, foram considerados apenas os dados experimentais correspondentes.

Os valores conseguidos para o coeficiente de correlação  $r^2$  e para o expoente  $n$ , são apresentados na Tabela 4.2. Os ajustes foram considerados aceitáveis, considerando-se que os coeficientes  $r^2$  obtidos apresentaram valores  $\geq 0,967$ . As amostras não esterilizadas e as autoclavadas apresentaram valores



para  $n$  próximos de 0.5, valor de referência para sistemas onde a difusão fickiana é o mecanismo de transporte predominante.

Tabela 4.2 – Valores obtidos, a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto por Peppas, para o coeficiente de correlação  $r^2$  e expoente  $n$ .

Sistema	$r^2$	$n$
DCF-não esterilizado	0.979	0.476
DCF-SH	0.999	0.545
DCF-GI	0.957	0.439
DCF-OZ	0.975	0.596
CHX-não esterilizado	0.960	0.539
CHX-SH	0.942	0.580
CHX-GI	0.951	0.331
CHX-OZ	0.966	0.223

Após a irradiação gama, o valor de  $n$  diminuiu ligeiramente para 0.44. Já no caso da libertação de DCF após a ozonização, obteve-se  $n \approx 0.6$ , característico dos casos de transporte anômalo, indicando, por sua vez, alterações dos mecanismos de libertação devido ao método de esterilização.

### ***Timolol***

O TML é um agente bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, não seletivo, utilizado para diminuir uma pressão intraocular elevada, nos casos associados ao glaucoma, assim como nos restantes. Esta molécula pode atuar no sentido de reduzir a

produção de humor aquoso, através do bloqueio de receptores  $\beta$ , ou mesmo diminuindo o seu fluxo <sup>13</sup>.

Tal como no caso da LVF, a libertação de TML (Figura 4.8 C) a partir do SiHy não esterilizado, completou-se ao fim das primeiras duas horas do ensaio.

A libertação de TML, após a esterilização por calor húmido, apresentou um comportamento similar às amostras não esterilizados porém, com uma ligeira tendência para um comportamento mais controlado. Após a autoclavagem, observou-se, ainda, um ténue aumento da quantidade de TML libertado (de 2,0 para 2.4 ug/mg hidrogel seco), evidenciando-se o facto para a não formação de produtos de degradação (Figura 4.9 C). Estes resultados indicam que o sistema SiHy-TML é capaz de suportar, sem alterações drásticas, a esterilização por calor húmido.

A irradiação gama reduziu, em cerca de 55%, a quantidade de fármaco libertada (de 2,0 para 0.9 ug/mg hidrogel hidratado). Ainda assim, a análise cromatográfica não detectou evidências de degradação (Figura 4.9 C). Estes resultados poderão apontar para interações específicas entre o TML e a matriz SiHy, como consequência da exposição à radiação.

Relativamente à esterilização por ozono, observou-se a degradação completa do fármaco, pelo que não foi possível o respetivo perfil de libertação.

À semelhança do caso do sistema SiHy-LVF, o perfil de libertação do sistema SiHy-TML não se mostrou promissor, uma vez que a libertação completa do fármaco ocorreu em menos de duas horas. Neste sentido, também não foi possível realizar o ajuste dos dados experimentais ao modelo de cinética de libertação Peppas.

### **Clorhexidina**

A clorhexidina, em combinação com outros agentes, é utilizada no tratamento de queratites causadas por infeções resultantes da *Acanthamoeba*<sup>32; 33</sup>. Trata-se de uma molécula catiónica cujo mecanismo de ação se pressupõe decorrer da ligação às paredes celulares bacterianas carregadas negativamente, onde atuará tanto como agente bacteriostático quanto como bactericida<sup>34</sup>.

A libertação de CHX (Figura 4.8 D), antes e depois da esterilização por calor húmido, permaneceu praticamente inalterada. Todavia, após a autoclavagem, foram detectados nos cromatogramas dois pequenos picos de degradação (tempo de retenção de 4,4 e 5,8 min) (Figura 4.9 D).

A libertação conduzida após a exposição à irradiação gama e ao ozono resultou em perfis semelhantes entre si. Em ambos os casos, observou-se uma diminuição significativa da quantidade libertada do fármaco (de 4,1 para 2,4 µg/mg hidrogel gel seco no caso GI; e para 1,8 µg/mg hidrogel seco no caso OZ; o que corresponde a perdas de aproximadamente 42 e 56%, respetivamente). Evidências de degradação foram detetadas também em ambos os casos, indicando, assim, a provável inadequação dos dois métodos relativamente à esterilização do sistema SiHy-CHX. Estudos de estabilidade da CHX, realizados por Zong et al.<sup>35</sup>, relatam possíveis vias de degradação do fármaco, com formação de diversos produtos deteriorados, que devem, por sua vez, ser os responsáveis pelo surgimento dos picos visíveis nos cromatogramas.

O estudo dos efeitos da esterilização no mecanismo de libertação apresentou ajustes com coeficientes de correlação  $r^2 > 0,942$ , considerados satisfatórios.

O perfil de libertação obtido a partir de amostras não esterilizadas apresentou um comportamento próximo da difusão fickiana ( $n=0,54$ ). Já o calor húmido levou a um ligeiro aumento de  $n$  ( $n=0,58$ ), o que pode expressar alterações provocadas pelas condições de esterilização, induzindo a um mecanismo de transporte anómalo.

As variações mais significativas ocorreram após a esterilização por irradiação gama e ozonização ( $n= 0,33$  e  $0,22$ , respetivamente). Estes resultados sugerem alterações mais relevantes no mecanismo de libertação, decorrentes das condições de esterilização (GI e OZ).

#### **4.3.6 Efeito da incorporação de fármaco e da esterilização na reatividade biológica.**

Foram realizados testes de reatividade biológica, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos citotóxicos, em consequência dos métodos de esterilização.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3. O hidrogel, não carregado, não desencadeou respostas biológicas adversas após a exposição às condições de esterilização em estudo.

O sistema SiHy-DCF, não esterilizado, apresentou uma reatividade biológica moderada ( $N=3$ ), muito provavelmente devido à quantidade elevada de fármaco presente na amostra. Contudo, esta reatividade não se alterou após os processos de esterilização por calor húmido e por ozono. Este resultado indica que os produtos de degradação formados não agravam a resposta biológica inicial. Contrariamente, as amostras irradiadas induziram a uma resposta severa ( $N = 4$ ), o que poderá ser atribuído à ação de vários produtos de degradação que

se formaram após a esterilização. Estes resultados confirmam inadequação deste método de esterilização para o sistema SiHy-DCF.

Os métodos de esterilização estudados não tiveram qualquer efeito sobre a citotoxicidade do sistema SiHy-TML.

Quanto ao sistema SiHy-CHX, as amostras não esterilizadas, autoclavada e irradiadas demonstraram uma ligeira reação biológica (N=2), isto também, provavelmente, devido à quantidade de fármaco presente. Após a ozonização, não se observou qualquer efeito citotóxico, o que está de acordo com os dados dos estudos de liberação, uma vez que este sistema mostrou a menor quantidade liberada de fármaco. Note-se ainda que a análise cromatográfica da liberação de CHX revelou, em todos os casos, a presença de produtos de degradação após a esterilização. No entanto, os testes de citotoxicidade não mostraram o agravamento da reatividade celular.

Tabela 4.3 – Resultados dos testes de reatividade biológica (N) e dos testes de esterilidade após as contaminações controladas com diferentes cargas do indicador biológico (UFC/mL).

Condição de estudo	Reatividade biológica				Crescimento microbiológico (UFC/mL)		
	N				10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
	NaCl	DCF	TML	CHX			
Não esterilizado	0	3	0	2	N/A		
Calor húmido	0	3	0	2	Estétil		
Irradiação gama	0	4	0	2	Estétil	Estétil	Estétil
Ozonização	0	3	0	0	Estétil	Estétil	Bg (dia 1):

Estétil: ausência de crescimento bacteriano por 14 dias; Bg (dia X): crescimento bacteriano detectado no dia X; N/A: Não avaliado;

É possível obter sistemas SiHy-DCF e SiHy-CHX de menor grau de reatividade biológica, por exemplo, diminuindo a quantidade de fármaco na solução inicial de carregamento. Contudo, seriam necessários testes *in vivo* para comprovar a eficácia de cada sistema, assunto que está fora do âmbito deste trabalho.

#### **4.3.7 Avaliação da esterilidade**

Por último, avaliou-se a eficácia das condições de esterilização, testando o processo de irradiação pelo teste às amostras de SiHy contaminadas com diversas cargas biológicas do indicador biológico indicado como resistente. Em todos os casos as amostras não apresentaram crescimento após exposição à radiação, pelo que se conclui que a condição estudada (10 kGy) foi eficaz em esterilizar o hidrogel hidratado.

### **4.4 CONCLUSÕES**

As lentes de contato são amplamente utilizadas e aceites como dispositivos de correção de visão, cosméticos e terapêuticos, sendo agora extensivamente estudadas como possíveis veículos de libertação controlada de fármacos. As lentes de contato SiHy são especialmente interessantes devido a sua elevada permeabilidade ao oxigénio, e têm vindo a apresentar resultados encorajadores no que diz respeito à libertação de fármacos. No entanto, a influência dos métodos de esterilização nestes sistemas fármaco+matriz nunca foi previamente avaliada.

Neste capítulo, foi investigado o efeito de dois métodos convencionais (calor húmido e irradiação gama) e um alternativo (ozonização) em amostras de

SiHy carregadas com diferentes fármacos, utilizados no tratamento de patologias oculares.

A esterilização por calor a vapor revelou-se como o método menos agressivo, embora várias alterações tenham sido observadas, a exemplo do aumento significativo do módulo de Young para DCF e SiHy-TML. O calor de vapor também levou a uma diminuição da quantidade de fármaco libertada para sistemas contendo LFV e DCF, sendo visível a formação de produtos de degradação no último caso. Os perfis de CHX e TML não foram significativamente afetados, no entanto, a formação de produtos de degradação também foi observada no caso de SiHy-CHX.

A irradiação gama (10 kGy) levou ao escurecimento do SiHy carregado e a um aumento do módulo de Young do sistema SiHy-DFC. Relativamente aos estudos de libertação, a irradiação gama conduziu à degradação completa da LVF. Para os restantes fármacos, registou-se a sua diminuição na quantidade libertada e a formação de produtos de degradação.

A esterilização por ozônio afetou a capacidade de intumescimento do sistema SiHy-TML e as propriedades mecânicas dos SiHy-LVF e SiHy-DFC, aumentando o módulo de Young no primeiro caso e diminuindo-o no último. A ozonização conduziu também à degradação completa do TML e a reduções significativas da quantidade de fármaco libertada para LFV, DCF e CHX, com a formação de produtos de degradação na maioria dos casos.

Em relação à reatividade biológica, não houve qualquer agravamento da resposta citotóxica após a exposição a métodos de esterilização, exceto para o caso do sistema SiHy-DCF irradiado. Quanto à eficácia dos processos, a dose de 10 kGy mostrou-se eficaz na esterilização no SiHy hidratado.

Considerando a escassa informação disponível sobre a esterilização de sistemas de libertação de fármacos, os presentes resultados proporcionam uma contribuição importante para o desenvolvimento de novas lentes de contato terapêuticas.

As consequências dos procedimentos de esterilização são difíceis de prever, portanto, cada sistema deve ser avaliado, caso a caso, para então se selecionar o método que mantém as propriedades essenciais do material dentro dos requisitos para a aplicação específica.





## 4.5 REFERÊNCIAS

- 1 HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007,2008.
- 2 LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nat Rev Mater**, v. 1, p. 16071,2016.
- 3 ABUHANOĞLU, G.; ÖZER, A. Y. Radiation sterilization of new drug delivery systems. **Interv Med Appl Sci** , v. 6, n. 2, p. 51-60,2014.
- 4 SAKAR, F. et al. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization. **Pharm. Dev. Technol.**, p. 1-10,2016.
- 5 ELJARRAT-BINSTOCK, E. et al. Preparation, characterization, and sterilization of hydrogel sponges for iontophoretic drug-delivery use. **Polym. Adv. Technol.**, v. 18, n. 9, p. 720-730,2007.
- 6 PITARRESI, G. et al. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. **Int. J. Pharm.**, v. 449, n. 1–2, p. 84-94,2013.
- 7 KANJICKAL, D. et al. Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. **J Biomed Mater Res A**, v. 87A, n. 3, p. 608-617,2008.
- 8 MAULVI, F. A.; SONI, T. G.; SHAH, D. O. A review on therapeutic contact lenses for ocular drug delivery. **Drug delivery**, v. 23, n. 8, p. 3017-3026,2016.
- 9 HSU, K. H.; GAUSE, S.; CHAUHAN, A. Review of ophthalmic drug delivery by contact lenses. **J Drug Deliv Sci Technol**, v. 24, n. 2, p. 123-135,2014.
- 10 SHORT, B. G. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 1, p. 49-62,2008.
- 11 (ISO), I. S. O. **Ophthalmic optics — Contact lenses and contact lens care products — Fundamental requirements**. ISO 14534:2011(en) 2011.
- 12 HIRATANI, H. et al. Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses. **Biomaterials**, v. 26, n. 11, p. 1293-1298,2005.
- 13 JUNG, H. J. et al. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. **J. Controlled Release**, v. 165, n. 1, p. 82-89,2013.

- 14 PIMENTA, A. F. R. et al. Controlled drug release from hydrogels for contact lenses: Drug partitioning and diffusion. **Int. J. Pharm.**, v. 515, n. 1–2, p. 467-475,2016.
- 15 PARADISO, P. et al. Controlled Release of Antibiotics From Vitamin E–Loaded Silicone-Hydrogel Contact Lenses. **J. Pharm. Sci.**, v. 105, n. 3, p. 1164-1172,2016.
- 16 SIGMA-ALDRICH. HPLC Troubleshooting Guide: How to identify, isolate, and correct the most common HPLC problems. **Bulletin 826E**, St. Louis, 2010. Disponível em: < sigma-aldrich.com >.
- 17 GAO, X. X. et al. A simple and rapid high performance liquid chromatography method to determine levofloxacin in human plasma and its use in a bioequivalence study. **Drug Discov Ther**, v. 1, n. 2, p. 136-40,2007.
- 18 SHAALAN, R. A.; BELAL, T. S. Validated Stability-Indicating HPLC-DAD Method for the Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and Diflunisal in Their Combined Dosage Form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 3, p. 713-731,2013.
- 19 UMESH D. LADDHA et al. Development and validation of stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for Timolol Maleate. **Int J PharmTech Res** v. 6, n. 5, p. 1429-1435, 2014.
- 20 ZHU, Y.; YANG, Y.; QI, Q. [Determination of chlorhexidine acetate in disinfectant by high performance liquid chromatography]. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 32, n. 1, p. 51-2, 87,2003.
- 21 SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **Int. J. Pharm.**, v. 418, n. 1, p. 6-12,2011.
- 22 DUCHEYNE, P. et al. **Comprehensive Biomaterials**. Elsevier Science, 2015.
- 23 HU, X. et al. Hydrogel Contact Lens for Extended Delivery of Ophthalmic Drugs. **Int J Polym Sci**, v. 2011, p. 9,2011.
- 24 EFRON, N.; MALDONADO-CODINA, C. 6.633 - Development of Contact Lenses from a Biomaterial Point of View – Materials, Manufacture, and Clinical Application. **Comprehensive Biomaterials**. Oxford: Elsevier, 2011. p.517-541.
- 25 EFRON, N. et al. Oxygen Permeability and Water Content of Silicone Hydrogel Contact Lens Materials. **Optom. Vis. Sci.**, v. 84, n. 4, p. E328-E337,2007.
- 26 TRANOUDIS, I.; EFRON, N. Tensile properties of soft contact lens materials. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 27, n. 4, p. 177-191,2004.

- 27 SUZUKI, T.; YAMAMOTO, T.; OHASHI, Y. The antibacterial activity of levofloxacin eye drops against staphylococci using an in vitro pharmacokinetic model in the bulbar conjunctiva. **J. Infect. Chemother.**, v. 22, n. 6, p. 360-365,2016.
- 28 LAMBERT, A.; REGNOUF-DE-VAINS, J.-B.; RUIZ-LÓPEZ, M. F. Structure of levofloxacin in hydrophilic and hydrophobic media: Relationship to its antibacterial properties. **Chem. Phys. Lett.**, v. 442, n. 4–6, p. 281-284,2007.
- 29 LALITHA DEVI, M.; CHANDRASEKHAR, K. B. A validated stability-indicating RP-HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related impurities and identification of oxidative degradant. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 50, n. 5, p. 710-717,2009.
- 30 GOA, K. L.; CHRISP, P. Ocular diclofenac. A review of its pharmacology and clinical use in cataract surgery, and potential in other inflammatory ocular conditions. **Drugs Aging**, v. 2, n. 6, p. 473-86,1992.
- 31 PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; THOMAS, J. B. **Nanotechnology in Therapeutics: Current Technology and Applications**. Horizon Bioscience, 2007.
- 32 MATHERS, W. Use of higher medication concentrations in the treatment of acanthamoeba keratitis. **Arch. Ophthalmol.**, v. 124, n. 6, p. 923,2006.
- 33 HEREDERO-BERMEJO, I. et al. In vitro anti-Acanthamoeba synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. **Int. J. Pharm.**, v. 509, n. 1–2, p. 1-7,2016.
- 34 ZENG, P. et al. Solubility properties of chlorhexidine salts. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 35, n. 2, p. 172-6,2009.
- 35 ZONG, Z.; KIRSCH, L. E. Studies on the Instability of Chlorhexidine, Part I: Kinetics and Mechanisms. **J. Pharm. Sci.**, v. 101, n. 7, p. 2417-2427,2012.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esterilidade de biomateriais destinados a estar em contato direto com os fluídos/tecidos biológicos (e.g. lentes de contato, formulações oftálmicas, preparações injetáveis) é essencial para garantir a sua segurança biológica, e como tal, um requisito obrigatório, exigido pelas diferentes agências reguladoras.

A esterilização terminal é, sempre que possível, a escolha aconselhada, embora a produção asséptica se apresente como uma alternativa, apesar das desvantagens económicas associadas e de não obrigatoriamente conferir o mesmo grau de segurança.

Nas áreas da farmácia e da biomedicina, os hidrogéis revelam um indiscutível potencial de aplicação, graças à sua semelhança com os tecidos biológicos e/ou inúmeras propriedades atrativas (e.g. elevada biocompatibilidade, capacidade de absorção e retenção de água/fluídos, maleabilidade). Atualmente, assiste-se ao constante aumento da diversidade de possíveis aplicações e da complexidade destas estruturas poliméricas.

Apesar da notória importância do ponto de vista científico, clínico, económico e social destes materiais, a sua esterilização é raramente abordada na literatura, permanecendo pouco estudados os efeitos dos métodos de esterilização sobre as propriedades intrínsecas dos hidrogéis.

Este facto contribui para o atraso da entrada no mercado de novos produtos biomédicos.

Aprofundar o conhecimento sobre os efeitos dos métodos convencionais, e desenvolver e validar novos processos de esterilização, torna-se, portanto, uma necessidade.

Neste sentido, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito e a eficácia de diferentes métodos de esterilização sobre três formulações de hidrogéis: um hidrogel natural nanoparticulado à base de quitosano (CS-HNP), com um largo espectro de possíveis aplicações (e.g. formulações oftálmicas, injectáveis), e dois hidrogéis sintéticos para lentes de contato (um convencional e um da nova geração de silicone-hidrogel), com e sem fármacos incorporados (levofloxacina, diclofenac, timolol e clorhexidina).

Além dos métodos convencionais de esterilização (calor húmido e irradiação gama), também foi testada a esterilização com gás ozono, um processo recente, de baixo custo e ecologicamente sustentável.

Em todos os casos, extensos protocolos de caracterização, abordando as principais propriedades de cada sistema, foram realizados antes e depois dos processos de esterilização.

Verificou-se que, para as CS-HNP, o calor húmido constituiu o método mais agressivo, levando à degradação das partículas, enquanto que, a irradiação gama demonstrou ser um método viável, na presença de açúcares protetores (glucose e manitol) que foram responsáveis por um considerável aumento da resistência das nanopartículas. A ozonização não conduziu a efeitos adversos físicos significativos, porém, observaram-se algumas alterações químicas e ligeiros sinais de toxicidade.

Relativamente aos hidrogéis sintéticos para lentes, foi possível demonstrar que a ozonização é uma alternativa interessante para a sua esterilização, uma vez que, nas condições apropriadas, é possível obter um resultado eficaz sem o comprometimento das propriedades do material.

O desafio da esterilização de biomateriais torna-se ainda maior quando estes se destinam à libertação controlada de fármacos e, como tal, contêm ativos incorporados. Considerando os sistemas estudados, a esterilização por calor húmido revelou-se como o método menos agressivo, embora várias alterações tenham sido observadas.

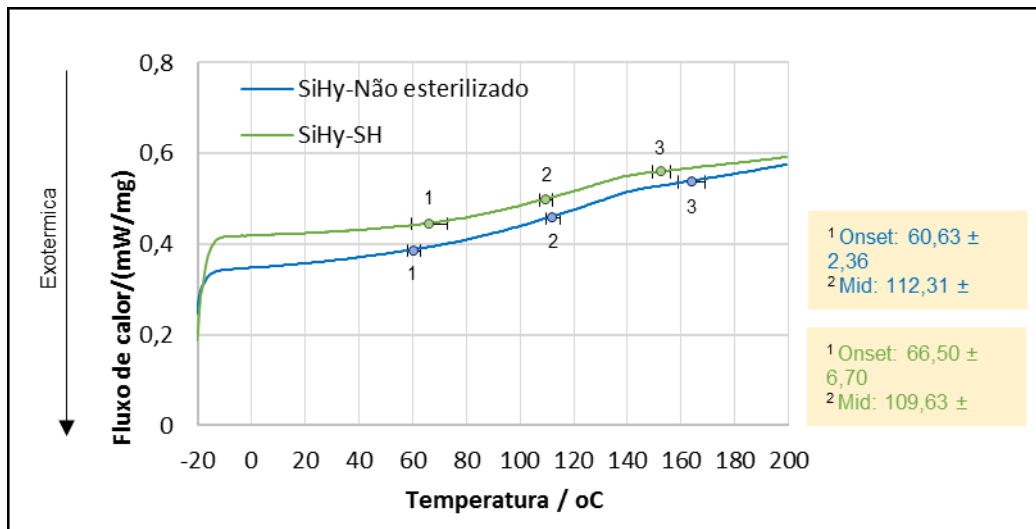
Em última análise, a evidente complexidade dos fatores envolvidos (e.g. natureza, composição e propriedades dos materiais, estabilidade dos fármacos, condições e parâmetros dos processos esterilização), torna extremamente difícil prever as consequências dos procedimentos de esterilização. A generalização de conceitos é também uma tarefa problemática.

Assim, a seleção do método de esterilização eficaz, e que permita manter as propriedades essenciais dos sistemas dentro dos requisitos para a aplicação específica, deve ser feita caso a caso.





## 6. ANEXOS



**Anexo I.** Comportamento termotrópico da amostra de SiHy (TRIS) hidratada em NaCl 0.9%, antes e após a esterilização por calor húmido.