



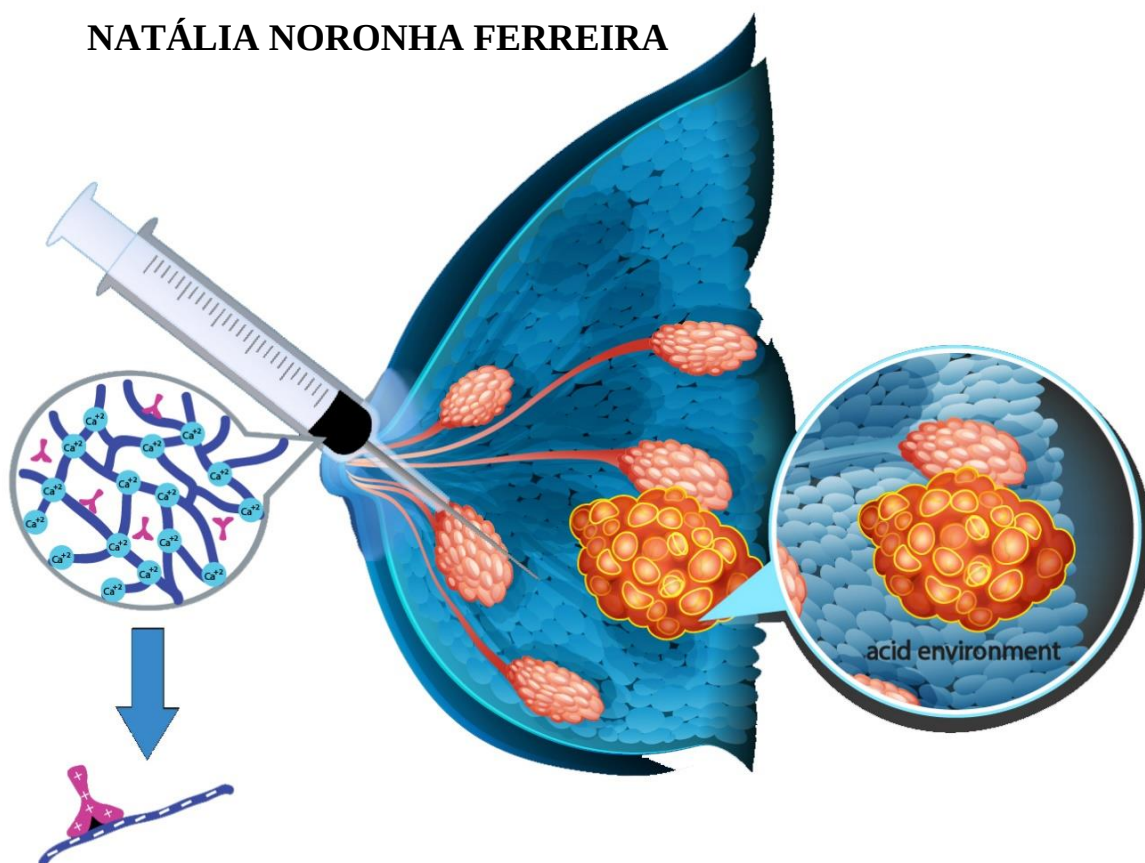
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

HIDROGÉIS pH RESPONSIVOS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO DE BEVACIZUMABE

NATÁLIA NORONHA FERREIRA



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA- SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

HIDROGEIS pH RESPONSIVOS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO DE BEVACIZUMABE

NATÁLIA NORONHA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião

Araraquara- SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F383h

Ferreira, Natália Noronha

Hidrogéis ph responsivos como potenciais sistemas de liberação para administração de bevacizumabe / Natália Noronha Ferreira. – Araraquara, 2015

132 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

1. Hidrogéis de alginato de cálcio. 2. Hidrogéis pH responsivos. 3. Sitemas de liberação modificada. 4. Bevacizumabe. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

A Deus

*Que nos criou como seres pensantes.
Seu fôlego de vida me sustentou e
forneceu coragem para questionar as
realidades e propor sempre um novo
mundo de possibilidades.*

Aos meus pais

*Rosângela Noronha Ferreira e José
Antônio Ferreira que não mediram
esforços para contribuir com minha
formação pessoal e intelectual.*

À minha orientadora

*Prof. Dr^{ca}. Maria Palmira Daflon
Gremião pelos longos anos de sua vida
dedicados à pesquisa e formação de
alunos. Uma das pessoas mais humanas
que já conheci.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **José Antônio Ferreira e Rosângela Noronha Ferreira**, exemplos da minha vida, base de tudo que me tornei hoje, que sempre se dedicaram a minha felicidade e de meu irmão. Que tornaram possível através de amor, carinho, incentivo e respeito, o sucesso de meus estudos até o presente momento. Vocês são o espelho que carrego em minha vida e, sem dúvida, minha principal motivação para progredir nesta caminhada.

Ao meu futuro marido **Bruno Franco Naddeo**, a pessoa que escolhi para passar o resto de minha vida, capaz de me tornar a mulher mais feliz e realizada deste mundo. Obrigada por cada palavra de consolo, carinho e todo suporte emocional nos momentos em que mais precisei.

Ao meu irmão **Rafael Noronha Ferreira** pelo apoio e palavras de incentivo, amor e fé nos momentos mais difíceis. Por compartilhar comigo a família maravilhosa em que crescemos e fomos educados.

À **minha família** pelo incentivo diário, seja na forma de orações, seja na forma de palavras carinhosas, que nunca me deixaram desistir dos meus sonhos.

À minha orientadora e amiga **Maria Palmira Daflon Gremião**, pela oportunidade confiança depositada, por me tornar um membro de seu grupo de pesquisa, por ampliar meu conhecimento de uma maneira tão admiradora e cativante, por mostrar-se sempre muito disposta a ajudar e respeitar as minhas decisões, obrigada por me tornar uma pessoa melhor.

Às minhas amigas **Maria Lucia Ribeiro e Mary Rosa Rodrigues de Marchi** grandes pesquisadoras que me iniciaram na vida científica e estiveram presentes em todos os momentos torcendo pelo meu mestrado. Vocês sempre foram minha inspiração.

Aos docentes do departamento de Fármacos e Medicamentos, pelo auxílio e indispensável contribuição para o enriquecimento do meu trabalho.

Às professoras **Dra. Ruth Meri Lucinda da Silva, Dra. Cristina Helena Bruno e Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury** por contribuírem com sugestões relevantes para o aperfeiçoamento do trabalho.

Às amigas especiais que encontrei no laboratório e que tornaram as longas jornadas de trabalho mais alegres. Sempre dispostas, nunca mediram esforços ao transmitir conhecimento, auxiliar na execução de experimentos e no fornecimento daquele conselho amigo que precisamos nos momentos de angústia. Obrigada **Fabíola**

Garavello Prezotti, Fernanda dos Santos Kolenyak, Liliane Neves Pedreiro, Maíra Lima Gonçalves, Márcia Helena Oyafuso, Roberta Balansin Rigon, Jéssica Bernegossi, Giovana Calixto, Ana Luiza Ribeiro de Sousa, Charlene Priscila Kill, Mariana Fonseca e Suzy Sayuri.

Ao **Leonardo Miziara**, pessoa que admiro muito por sua competência e dedicação. Muito obrigada por todos os conselhos, todas as palavras de incentivo e todo conhecimento transmitido. Juntos vamos muito longe, meu amigo!

Aos professores **Dr. Tiago Venâncio e Dr. Antônio Gilberto Ferreira**, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, pelo auxílio prestado nas análises de RMN ^1H .

Ao professor **Dr. Júlio Cesar Borges**, do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos- USP, e **Thiago Seraphim** pelo auxílio na realização das análises de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência.

Agradeço às agências de fomento **FAPESP** (processos 2013/21824-1 e 2015/04734-4) e **CAPES** pelas bolsas concedidas, que possibilitaram o desenvolvimento, divulgação e concretização deste trabalho.

Ao **LMA-IQ** pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara** - Grupo de Físico-química de Materiais, em especial à **Danúbia**, pelo auxílio prestado nas análises reológicas.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, em especial à técnica de Laboratório **Natália Gonçalves dos Santos**, pela disponibilidade e boa vontade auxiliando sempre na realização de experimentos, além de proporcionar apoio e incentivo nas boas conversas.

À Seção de Pós-graduação, agradeço toda atenção e auxílio nos serviços prestados com tanta agilidade. Em especial à **Cláudia, Daniela e Joyce**.

Ao professor **Dr. Rui Manuel Vieira Reis e Dra. Fátima Baltazar**, por possibilitarem a minha estada, em um período de estágio de três meses, na **Universidade do Minho-Portugal**, onde fui capaz de adquirir práticas laboratoriais diferenciadas e conhecimentos que contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional e a qualidade de meu trabalho de mestrado. A todos os amigos que fiz durante minha estada na Universidade do Minho – Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), em especial à **Vera Miranda Gonçalves** que, além de mostrar-se muito amiga, ajudou-me muito na execução de meus experimentos.

*Keep your thoughts positive, because your thoughts
became your words. Keep your words positive
because your words became your behavior. Keep
your behaviors positive because your behaviors
become your habits. Keep your habits positive,
because your habits become your values. Keep your
values positive because your values became your
destiny.*

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O processo de angiogênese desempenha um papel importante no desenvolvimento de tumores, invasão e metástase. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) apresenta-se como peça chave em patologias que envolvem neovascularização, como o câncer. O bevacizumabe (BVZ), que tem como alvo o VEGF, é um anticorpo monoclonal (mAbs) que atua impedindo o processo de angiogênese tumoral, resultando na inibição do suprimento sanguíneo necessário ao desenvolvimento das células tumorais. No entanto, o elevado peso molecular, hidrofília e a complexa estrutura tridimensional dos mAbs dificultam sua passagem pelas barreiras biológicas. Além disso, eles apresentam baixa estabilidade físico-química nas formulações e nos fluídos biológicos, bem como baixa biodisponibilidade e potencial imunogênico, fatores que requerem a busca por estratégias capazes de contornar esses problemas. A terapia localizada, além de possibilitar altas concentrações locais do fármaco, pode contornar os problemas tecnológicos referentes à estabilidade desses agentes terapêuticos, reduzir efeitos adversos e a necessidade de altas doses e altas frequências de administração. Hidrogéis de alginato de cálcio são sistemas biocompatíveis, capazes de interagir ionicamente com BVZ, especialmente em pH ácido, como o microambiente de diversos tumores. Desta maneira, a utilização destes sistemas pode fornecer um perfil de liberação adequado ao fármaco frente às condições fisiológicas da região tumoral. O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de hidrogéis de alginato de cálcio pH responsivos para aplicação localizada e liberação modificada de BVZ. Dispersões aquosas de alginato de sódio (27 mg/mL) contendo BVZ (3 mg/mL) e cloreto de cálcio (5 mg/mL) foram utilizadas para a obtenção de hidrogéis de alginato quimicamente reticulados com cálcio. Os estudos de pré-formulação demonstraram que a co-injeção entre cloreto de cálcio e alginato de sódio nessas concentrações produzem hidrogéis estáveis, com alta eficiência de associação polímero: proteína, especialmente em pH ácido. As análises de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria exploratória diferencial demonstraram a estabilidade proteica em diferentes valores de pH e na presença do alginato de sódio, que pode conferir, ainda, estabilidade adicional ao BVZ. Os sistemas produzidos são capazes de absorver grandes quantidades de líquidos em diferentes valores de pH. O conjunto de dados reológicos sugerem que os hidrogéis desenvolvidos podem apresentar uma organização estrutural diferenciada frente aos valores de pH da microrregião tumoral. O estudo morfológico utilizando microscopia eletrônica de varredura demonstrou que os hidrogéis possuem uma superfície rugosa, contendo poros de tamanhos e formas variadas. A atividade antiangiogênica de hidrogéis contendo BVZ foi avaliada utilizando modelo membrana carioalantóica de embrião de galinha (CAM). Posteriormente, avaliou-se a inibição do crescimento tumoral de microtumores implantados na CAM. Os resultados evidenciam que os hidrogéis contendo BVZ são capazes de promover a redução da densidade vascular de maneira mais significativa que o medicamento comercial. Além disso, esses sistemas tendem a promover a redução da vascularização, área e perímetro de micro tumores implantados na CAM. Desta maneira, o sistema de liberação desenvolvido neste estudo será de potencial utilidade para o controle da liberação de fármacos proteicos, podendo, ainda, melhorar as suas propriedades terapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: hidrogéis de alginato de cálcio; hidrogéis pH responsivos; sistemas de liberação modificada; bevacizumabe.

ABSTRACT

Angiogenesis plays an important role in tumor growth, invasion and metastasis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) appears to be a key element in pathological situations involving neovascularization. Bevacizumab (BVZ), which targets VEGF, is a monoclonal antibody (mAbs) that acts against tumoral angiogenesis, resulting in inhibition of the necessary supply for tumor growth. However, the high molecular weight, hydrophilicity and the complex tridimensional structure of mAbs hinder their ability to cross biological barriers. Furthermore, they exhibit low physicochemical stability in formulations and biological fluids, low bioavailability and immunogenic potential, factors that require new strategies to overcome these problems. Site-specific therapy may allow high drug local concentrations and avoid technical problems related to the stability of these agents in addition to reduce side effects and administration frequencies. Calcium alginate hydrogels are biocompatible systems able to interact ionically with BVZ, especially in acidic pH, as found on tumor microenvironments. Thus, the use of these systems may provide an appropriate drug release profile across pathological condition at the region. The aim of the present work was the developing and characterization of pH responsive systems for localized therapy able to promote bevacizumab release. Aqueous dispersions of sodium alginate (27 mg/mL) containing BVZ (3 mg/mL) and calcium chloride (5 mg/mL) were used to obtain chemically cross-linked calcium alginate hydrogels. Pre-formulation studies have shown that co-injection system of calcium chloride and sodium alginate, in these concentrations, produced stable hydrogels with high efficiency association between polymer and protein ($\pm 60\%$), especially at acidic pH values. Circular dichroism, fluorescence spectroscopy and exploratory microcalorimetry demonstrated protein stability at different pH values and also, against sodium alginate polymer, which can also confer additional drug stability. Hydrogel systems are able to absorbing large amounts of liquids at different pH values. Rheological data suggest that developed hydrogels may have a different structural organization against pH values found on tumor microenvironment. Morphology studies using scanning electron microscopy (SEM) showed that the hydrogels have a rough surface containing pores of varying sizes and formats. The effectiveness of bevacizumab release was evaluated in the angiogenic process, using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. The effect of tumor inhibition was assessed using CAM bearing glioma microtumors. Our results showed that hydrogels containing BVZ could promote further reduction on vascular density compared to commercial anti-VEGF therapy (BVZ) alone. Furthermore, the developed system tends to promote reduction of blood vessels, tumor area and tumor perimeter in CAM implanted glioma tumors. Overall, the drug release system developed here will be broadly useful for controlling release rates of protein drugs in addition to provide improvements on therapeutic effect.

KEYWORDS: calcium alginate hydrogels; pH responsive hydrogels; drug delivery system; bevacizumab.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ligação da família de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores.	19
Figura 2: Representação esquemática da estrutura de BVZ: cadeias leves (214 aa) e cadeias pesadas (453aa). .	23
Figura 3: Representação da estrutura do alginato:(a) conformação em cadeia e (b) distribuição sequencial dos blocos.	27
Figura 4: Representação ilustrativa do modelo "egg box"	28
Figura 5: Diferenças metabólicas entre células normais e células tumorais. Em condições aeróbicas, células normais processam a glicose através da fosforilação oxidativa; por outro lado, as células tumorais em intensa proliferação convertem glicose a lactato, ainda na presença de oxigênio, fenômeno conhecido como “efeito Warburg”.....	30
Figura 6: Representação esquemática do preparo dos hidrogéis. Sistema de co-injeção de alginato de sódio e cloreto de cálcio.....	41
Figura 7: Representação do dispositivo utilizado para determinação do trabalho de seringabilidade.....	42
Figura 8: Dispositivo de Enslin para determinação da capacidade de absorção de líquidos.	43
Figura 9: Representação esquemática do ensaio de atividade antiangiogênica dos sistemas utilizando CAM. ...	47
Figura 10: Determinação da massa molecular média (Mw) utilizando Static Light Scattering	50
Figura 11: Espectro de absorção por infravermelho do alginato de sódio com as suas principais bandas de absorção marcadas.....	51
Figura 12: Espectro de absorção por infravermelho do alginato de sódio e alginato de cálcio	52
Figura 13: Espectro RMN ¹ H do alginato de sódio em D ₂ O	54
Figura 14: Potencial zeta e eficiência de associação em pH 7,4, para as diferentes proporções estudadas.....	57
Figura 15: Medidas de diâmetro médio (nm) dos complexos polieletrólíticos estudados	60
Figura 16: Polidispersidade (PDI) para os complexos polieletrólíticos estudados	60
Figura 17: Eficiência de associação (%) em relação à massa total de polieletrólitos (polímero + proteína) adicionada ao meio.	62
Figura 18: Eficiência de associação entre polímero (alginato) e proteína (BVZ) em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de massa total.	63
Figura 19: Espectro de Dicroísmo Circular: BVZ em diferentes valores de pH	65
Figura 20: Espectro dicroísmo circular: BVZ na presença do alginato em diferentes proporções e diferentes valores de pH.....	67
Figura 21: Espectros de fluorescência intrínseca ao triptofano: efeito do pH sobre a estrutura terciária do BVZ. Dados normalizados.	69
Figura 22: Espectros de fluorescência intrínseca ao triptofano: BVZ na presença de alginato em diferentes proporções e valores de pH. Dados normalizados para (A) Fração 1:9 , (B) Fração 5:5 e (C) Fração 9:1.....	70
Figura 23: Aspecto macroscópico dos hidrogéis produzidos em pH 7,4 com diferentes concentrações de polímero (10, 20 e 30mg/mL) e diferentes concentrações de reticulante (5, 10 e 15 mg/mL).	75
Figura 24: Estabilidade dos hidrogéis após o processo de centrifugação.....	76
Figura 25: Perfil de absorção de líquido de hidrogéis contendo ou não BVZ em diferentes valores de pH após 3 horas. (A) pH 5,8 e (B) pH 7,4	79

Figura 26: Perfil de absorção de líquido de hidrogéis contendo ou não BVZ em diferentes valores de pH após 24 horas.	80
Figura 27: (A) Reograma: tensão de cisalhamento (Pa) x taxa de cisalhamento (1/s) para os diferentes sistemas estudados: curvas ascendentes e descendentes. (B) viscosidade aparente (Pa.s) x taxa de cisalhamento (1/s) para os diferentes sistemas estudados.....	83
Figura 28: Variação dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para os hidrogéis contendo ou não BVZ.	87
Figura 29: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R) com e sem BVZ.....	95
Figura 30: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_3R) com e sem BVZ.....	96
Figura 31: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R_NaCl) com e sem BVZ.	98
Figura 32: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R) antes e depois do processo de diálise	99
Figura 33: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 5,8_5R_Ac. láctico) com e sem BVZ	99
Figura 34: Imagens adquiridas <i>in ovo</i> após três dias de tratamento (12º dia desenvolvimento embrionário). Os grupos experimentais DMEM (controle negativo), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ (controle positivo) foram analisados em (A) pH7,4 e (B) pH5,8.	101
Figura 35: Imagens adquiridas <i>in ovo</i> demonstram mudanças na densidade vascular em função do tempo. Grupos tratados com alginato_BVZ e BVZ (controle positivo) ambos em pH 7,4.	103
Figura 36: Avaliação da atividade antiangiogênica em diferentes grupos experimentais: DMEM (controle negativo), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ (controle positivo). Imagens adquiridas <i>ex ovo</i>	104
Figura 37: Quantificação de vasos sanguíneos <i>ex ovo</i> sete dias após o tratamento. Os resultados representam a média de ao menos 10 replicatas para os grupos tratados em pH 7,4.....	105
Figura 38: Quantificação de vasos sanguíneos <i>ex ovo</i> sete dias após o tratamento (Os resultados representam a média de ao menos 10 replicatas para os grupos tratados em pH 5,8)	106
Figura 39: Quantificação de vasos sanguíneos <i>ex ovo</i> sete dias após o tratamento. Comparação entre grupos tratados em pH 7,4 e 5,8.....	106
Figura 40: Quantificação macroscópica de vasos sanguíneos <i>ex ovo</i> após 4 dias de tratamento antiVEGF. Os resultados representam contagem do número médio de vasos sanguíneos realizada por observadores independentes (n=3).	108
Figura 41: Inibição do crescimento tumoral e angiogênese: fotografias tiradas <i>ex ovo</i> após quatro dias de tratamento com hidrogéis contendo BVZ pH 5,8 (n=3).	109
Figura 42: Área (cm ²) e perímetro (cm) do tumor antes e após o tratamento com hidrogel_BVZ. Dia 1 refere-se às dimensões do tumor antes do tratamento e dia 5 refere-se às dimensões do tumor 3 dias após o tratamento.	110
Figura 43: Fotografias adquiridas em microscópio de luz polarizada (400x): ensaio de imuno-histoquímica para cortes histológicos de CAM contendo microtumores. As amostras foram marcadas com SNA-lectina para vasos sanguíneos.	110
Figura 44: Fotografias adquiridas em microscópio de luz polarizada (400x): ensaio de imuno-histoquímica para cortes histológicos de CAM contendo microtumores. As amostras foram marcadas com Ki-67 para avaliação da proliferação celular.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das formulações empregadas no estudo de comportamento reológico.	44
Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no ensaio da CAM: avaliação da atividade antiangiogênica dos hidrogéis contendo BVZ em diferentes valores de pH.	46
Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos na análise de ^1H RMN de alginato de sódio	55
Tabela 4: Parâmetros estruturais do BVZ em diferentes valores de pH e em diferentes proporções polímero: proteína.....	66
Tabela 5: Espectroscopia de fluorescência: parâmetros estruturais avaliados em diferentes valores de pH e na presença de diferentes proporções de alginato	71
Tabela 6: Parâmetros calorimétricos do BVZ em diferentes valores de pH, na presença e ausência do alginato.	72
Tabela 7: Trabalho de seringabilidade das formulações a 25°C.....	78
Tabela 8: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para os hidrogéis analisados.	84
Tabela 9: Valores de G' e G'' do teste oscilatório para os sistemas estudados (tensão 0,5 Pa e frequência 1 Hz)	91
Tabela 10: Valores da regressão linear (r), expoente viscoelástico (n) e da resistência do gel (S) para os hidrogéis analisados.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EA	Eficiência de associação
Alginato-Ca	Alginato de cálcio
BCA	Ácido bicinconínico
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos
BVZ	Bevacizumabe
CAM	Modelo membrana corioalantóica de embrião de galinha
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dynamic Light Scattering
D ₂ O	Água deuterada
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment crystallizable
FEG-MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução
FDA	Food and Drug Administration
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
kDa	Kilodalton
M	β -D-manuronila / ácido manurônico
mAbs	Anticorpos monoclonais
M/G	Ácido manurômico / Ácido gulurômico
MMPs	Metaloproteinases de matriz
M _w	Massa molecular média
Nano DSC	Microcalorimetria Exploratória Diferencial
PDI	Índice de polidispersidade
PI	Ponto Isoelétrico
RVL	Região viscoelástica linear
SAXS	Espalhamento de raios-X à baixo ângulo
SLS	Static Light Scattering
TMSP-d4	2,2,3,3-D4-trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGF-A	Fator de permeabilidade vascular
ZP	Potencial zeta

LISTA DE SÍMBOLOS

A_2	Segundo coeficiente virial
G'	Modo elástico
G''	Módulo viscoso
σ	Tensão de cisalhamento
γ	Taxa de cisalhamento
K	Coeficiente de consistência
n	Índice de comportamento do fluxo
t	Tempo de retenção
θ	Elipticidade molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de emissão máxima
λ_i	Comprimento de onda de emissão
R^2	Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	CÂNCER	17
2.2	ANGIOGÊNESE E TERAPIA ANTI-VEGF	17
2.3	ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	20
2.4	BEVACIZUMABE	22
2.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO E A POSSIBILIDADE DE UMA TERAPIA LOCALIZADA	24
2.6	HIDROGÉIS	26
2.7	ALGINATO	27
2.8	MICRORREGIÃO TUMORAL	29
3	OBJETIVO.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	MATERIAL	33
4.2	MÉTODOS.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ALGINATO DE SÓDIO	49
5.2	ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	56
5.3	PREPARO DOS HIDROGÉIS	72
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	76
5.5	ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS HIDROGÉIS	100
6	CONCLUSÕES	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema global responsável por aproximadamente 13 % das causas de morte no mundo todo. Estima-se que a partir de 2020, haverá entre 15 a 17 milhões de novos casos de câncer por ano (MURRAY e LOPEZ, 1997; LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 2013). Esta neoplasia maligna é caracterizada pelo crescimento desordenado de células anormais, de comportamento agressivo e incontrolável, e com a capacidade de se desprender do seu local de origem, migrar e adentrar vasos sanguíneos, colonizando outros tecidos ou órgãos, originando metástase.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) possui um papel primordial nas vias de sinalização que mediam o processo de angiogênese, sendo indispensável no desenvolvimento das células tumorais, crescimento de tumores e ocorrência de metástases. Assim, as terapias que possuem um mecanismo de ação sob VEGF ou de seus receptores são importantes no tratamento do câncer (FERRARA *et al.*, 2003).

O bevacizumabe (BVZ), comercializado sob o nome de Avastin®, é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, cujo mecanismo de ação está relacionado à inibição de VEGF-A em todas as suas isoformas (FOLKMAN, 2007). Anticorpos monoclonais (mAbs) são macromoléculas proteicas que apresentam dificuldade de permeação através das várias barreiras fisiológicas, como mucosas e membranas biológicas, além de serem química e fisicamente instáveis e suscetíveis a fatores ambientais como degradação enzimática e desnaturação (SCHWEIZER *et al.*, 2014).

A administração do BVZ é realizada pela via endovenosa e são requeridas altas e múltiplas doses para que se tenha a adequada distribuição sistêmica. Tendo em vista o alto custo e os problemas de instabilidade do fármaco, alternativas que possibilite a redução da dose e frequência de administração e, ainda, possam contornar problemas tecnológicos e biofarmacêuticos são extremamente interessantes. Inovações que promovam a liberação controlada e efetiva, aumentando a eficácia terapêutica dos mAbs representam um grande desafio à pesquisa e ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação modificada (GRAINGER, 2004). O uso da terapia localizada pode proporcionar altas concentrações locais do fármaco, contornando os problemas referentes à administração de altas dosagens como a toxicidade, efeitos adversos e a necessidade de altas frequências de administração.

Hidrogéis de alginato de cálcio representam uma alternativa promissora para a liberação modificada de fármacos proteicos, principalmente pelas condições brandas em que são produzidos, alta biocompatibilidade. Esses sistemas podem ainda proporcionar altas concentrações locais do fármaco por um período prolongado com mínima exposição de outros tecidos. Além disso, a cinética de liberação de fármacos a partir de hidrogéis de alginato pode ser modulada através de interações eletrostáticas entre fármaco-alginato (AUGST *et al.*, 2006).

Schweizer e colaboradores reportaram o desenvolvimento de hidrogéis de alginato de cálcio para liberação modificada de anticorpos monoclonais aplicados localmente. Neste estudo, constatou-se que a interação anticorpo-hidrogel é pH dependente, sendo mais evidente em valores de pH mais baixos que o pH sanguíneo (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

Durante a progressão do câncer, as células tumorais estão em intensa e descontrolada proliferação tornando-se necessários ajustes no metabolismo energético que irão possibilitar o aporte energético necessário para este evento. Um desses processos adaptativos consiste na passagem da fosforilação oxidativa para a glicólise, como principal fonte de adenosina trifosfato (ATP), mesmo na presença de oxigênio, processo este conhecido como efeito Warburg (GATENBY e GILLIES, 2004; VANDER HEIDEN *et al.*, 2009). As altas taxas do metabolismo glicolítico produzem altos níveis de lactato/ácido láctico que precisam ser externalizados para a manutenção do pH fisiológico, evitando acidose e a morte celular. Neste sentido, as células contam com sistemas de regulação presente na membrana plasmática que inclui os transportadores de monocarboxilatos (MCTs), principais responsáveis pelo efluxo do ácido láctico e regulação do pH intracelular (BALTAZAR *et al.*, 2014). Com a externalização do ácido láctico produzido, verifica-se, na microrregião tumoral, um pH ácido em diversos tipos de tumores (TANNOCK e ROTIN, 1989; MIRANDA-GONCALVES *et al.*, 2013).

Com base nos fatos expostos, hidrogéis de alginato de cálcio pH responsivos representam matrizes interessantes no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para a veiculação de bevacizumabe na terapia localizada do câncer. Desta forma, a proposta deste estudo foi o desenvolvimento de um sistema de liberação através da utilização de interações supramoleculares entre o polímero alginato e a proteína BVZ ativados pelo pH ácido da microrregião tumoral, com o objetivo de promover a liberação modificada do fármaco localmente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

O câncer é um problema global responsável por aproximadamente 13 % das causas de morte no mundo todo. Estima-se que a partir de 2020, haverá entre 15 a 17 milhões de novos casos de câncer por ano (MURRAY e LOPEZ, 1997; LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 2013). Esta neoplasia maligna é caracterizada pelo crescimento desordenado de células anormais, de comportamento agressivo e incontrolável, e com a capacidade de se desprender do seu local de origem, migrar e adentrar vasos sanguíneos, colonizando outros tecidos ou órgãos, originando metástase (MITCHELL *et al.*, 2012).

No Brasil, o câncer representa a segunda maior causa de morte da população em geral, constituindo assim, um dos principais problemas de saúde pública (CASTRO, 2009). Estatísticas demonstram que os tumores mais frequentes, para o sexo masculino são próstata, pulmão, estômago, cólon, reto e esôfago. Em mulheres, predominam o câncer de pele, mama, seguido pelos cânceres de colo uterino, cólon e reto, pulmão e estômago.

Dentre as diversas especialidades médicas, a oncologia está entre as que lidam com as maiores dificuldades no manejo da terapêutica. Essas dificuldades fundamentam-se principalmente na sua complexidade, sua capacidade de afetar qualquer tipo celular e quase todos os órgãos, por apresentarem grande heterogeneidade intra e intertumoral e por constituir uma doença não estática, capaz de acumular mutações ao longo do tempo (DUFFY, 2013).

No momento do diagnóstico, uma das características avaliada é a presença de metástase. Apesar da sua reconhecida importância na evolução do processo patológico, nem todos os mecanismos moleculares da formação de metástase estão completamente estabelecidos (DREWES, 2011). No entanto, sabe-se que tanto para inicialização e crescimento da massa tumoral primária, quanto para a ocorrência dos processos de invasão e metástases, é necessário o crescimento de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral que viabilizam o aporte de nutrientes e oxigênio às células.

2.2 Angiogênese e terapia anti-VEGF

Por várias décadas, a quimioterapia tem sido o tratamento de escolha para o combate ao câncer. Embora os agentes quimioterápicos possam curar ou prolongar a vida dos pacientes, em sua grande maioria, desencadeiam severos efeitos tóxicos não específicos que limitam a dose a ser utilizada podendo, ainda, comprometer seriamente a qualidade de vida dos doentes (BURISH e TOPE, 1992).

Nos últimos anos, estamos vivenciando o surgimento de uma nova geração de agentes terapêuticos capazes de atuar diretamente em células malignas ou, ainda, em mediadores e células relacionadas ao processo de crescimento tumoral (FERRARA, 2004; HICKLIN e ELLIS, 2005).

A angiogênese é um fenômeno fundamental para o desenvolvimento do tumor. O processo consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e envolve a migração de células através da matriz extracelular, proliferação e diferenciação celular, além de interações entre células que resultam na formação de estruturas multicelulares em resposta a mediadores químicos secretados (ZEITLIN *et al.*, 2012).

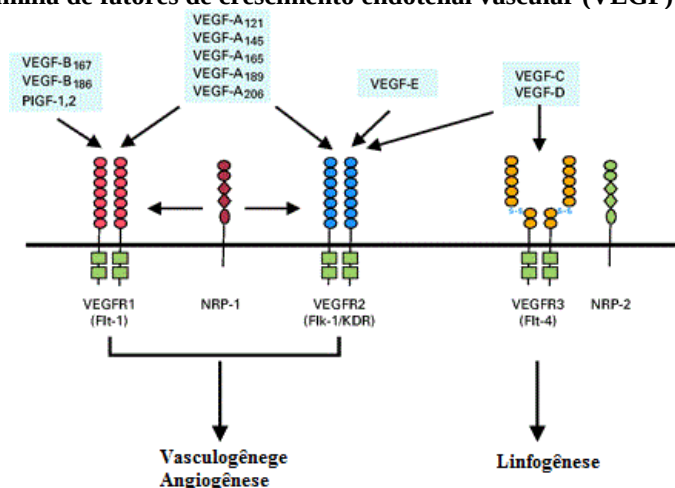
As principais células envolvidas nesse processo são endoteliais, que constituem basicamente a totalidade dos capilares sanguíneos. Inicialmente, as células necessitam migrar de sua localização através do rompimento de sua membrana basal. Em seguida, migram em resposta a fatores antigênicos secretados pelas células tumorais, linfócitos ativados e macrófagos (AUERBACH *et al.*, 2003).

Uma vez iniciada, a angiogênese tumoral não apenas permite o crescimento do tumor primário, como também oferece uma rota para a disseminação metastática das células cancerígenas individuais. Trata-se de um processo altamente complexo e dinâmico regulado por uma série de moléculas pró e anti-angiogênicas (HICKLIN e ELLIS, 2005).

Estratégias voltadas a inibição do processo de angiogênese tumoral têm sido foco de extensa pesquisa ao longo das últimas décadas, tornando-se mais evidente após a observação de que o crescimento e a disseminação das células tumorais são processos dependentes do desenvolvimento de um suplemento vascular (FOLKMAN, 1971). O crescimento do tumor requer a elaboração de um sistema que possibilite a absorção de oxigênio e nutrientes. A terapia antiangiogênica inibe o crescimento do tumor promovendo a morte das células tumorais por falta de suprimento nutricional e energético, o qual é indispensável à proliferação (FERRARA, 2004).

Diversos fatores estão envolvidos no processo de angiogênese, como fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), que são altamente específicos para células endoteliais, enquanto que outros, tais como o fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e as metaloproteinases de matriz (MMPs), possuem uma gama muito mais ampla de ação (FERRARA *et al.*, 2003; FERRARA, 2004; CEBE-SUAREZ *et al.*, 2006). Entretanto, na ocorrência da angiogênese destaca-se a família do VEGF e seus receptores (Figura 1) (FERRARA, 2002; HICKLIN e ELLIS, 2005).

Figura 1: Ligação da família de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores.



Fonte: HICKLIN e ELLIS (2005).

A família VEGF compreende seis glicoproteínas nomeadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF. O processo de angiogênese é governado principalmente mediante a ligação da VEGF-A, também conhecido como fator de permeabilidade vascular, com seus receptores tirosina-quinase Flt-1 (VEGFR1) e KDR (VEGFR2), que são predominantemente encontrados na superfície das células endoteliais, e estão superexpressos nas células tumorais (FERRARA, 2004).

A VEGF-A pode ainda estar associado a várias condições patológicas em que observa-se a ocorrência de angiogênese incluindo artrite reumatoide, psoríase, degeneração macular e retinopatia diabética (FERRARA *et al.*, 2003; HICKLIN e ELLIS, 2005).

Por outro lado, VEGF-C e VEGF-D e o receptor VEGFR-3 desempenham papéis fundamentais na formação de vasos linfáticos (HICKLIN e ELLIS, 2005). A ativação dos receptores pela VEGF leva a fosforilação de um grande número de proteínas que são ativadas na cascata de transdução de sinal que irão ativar uma série de eventos bioquímicos e, por fim, resultar no crescimento de novos vasos sanguíneos. Diante do crescimento das células tumorais, uma grande quantidade de VEGF é produzida permitindo a formação dos vasos sanguíneos necessários para o crescimento do tumor o que, por sua vez, resulta no aumento da secreção de VEGF. A permeabilidade induzida por VEGF leva à deposição de proteínas no interstício que também irão facilitar o processo de angiogênese (HICKLIN e ELLIS, 2005). Além disso, a angiogênese tumoral recruta células da medula óssea precursora de células endoteliais, um processo que também é dependente de VEGF e pode ser bloqueado com o rompimento da transdução de sinal na inibição de VEGFR-1 e VEGFR-2 (FERRARA, 2004).

A interferência na via de sinalização do VEGF-1 é a principal estratégia no estabelecimento da terapia anti-angiogênica no câncer. De maneira geral, o aumento da vascularização do tumor e a

expressão de fatores pré-angiogênicos têm sido associados ao estágio avançado do tumor com prognóstico severo em uma variedade de tumores sólidos (HICKLIN e ELLIS, 2005; TRÉDAN *et al.*, 2014). É importante salientar que a utilização clínica potencial da inibição do VEGF em oncologia não está limitada aos tumores sólidos. Há uma crescente evidência de que os receptores de VEGF-A estão presentes em uma variedade de leucemias e outras doenças malignas hematológicas, sugerindo que esta estratégia pode ser interessante também nestes casos (FERRARA *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação da terapia anti-VEGF ainda não está completamente descrito. Dentre os mecanismos explorados que demonstraram evidências clínicas estão: a capacidade de diminuir os vasos tumorais e matar uma fração de células cancerígenas pela falta de nutrientes; a normalização da vascularização e do microambiente tumoral aumentando a eficácia de quimioterápicos; ou ainda, a redução do número de células endoteliais progenitoras (FALK *et al.*, 2015).

A busca incansável por agentes com atividade anti-VEGF em sinergia com os avanços da tecnologia do hibridoma possibilitou a descoberta dos anticorpos monoclonais capazes de blindar a ação de VEGF e VEGFR, além da criação de VEGF e VEGFR híbridos.

Em meados de 1990, diversos fármacos com atividade antiangiogênica foram submetidos a ensaios clínicos. Esses fármacos começaram a receber aprovação da Food and Drug Organization (FDA) por volta de 2003. Até 2007, havia dez medicamentos aprovados e, ainda, em torno de quarenta outros fármacos em fase de estudo clínicos (FOLKMAN, 2007).

Em 2014, ao menos trinta moléculas endógenas foram relatadas como inibidoras do processo de angiogênese, atuando como fármacos potenciais à terapia anti-VEGF. Além disso, inibidores de angiogênese de origem natural provenientes de casca de árvore, fungos, músculo e cartilagem de tubarão, corais, chá verde e outros extratos vegetais (alcaçuz, ginseng, cominho, alho) também foram descritos, constituindo um montante de mais de 300 substâncias com atividade antiangiogênica relatada (FENG *et al.*, 2010).

A terapia antiangiogênica representa hoje um dos avanços mais significativos na oncologia clínica, despertando o interesse não somente dos grandes centros acadêmicos de pesquisa como também das grandes indústrias farmacêuticas no mundo todo (FENG, 2014).

2.3 Anticorpos monoclonais

Inicialmente descritos por Kohler e Milstein em 1975, a descoberta dos anticorpos monoclonais (mAbs) possibilitaram aos cientistas além do prêmio Nobel em 1980, o aparecimento de novas alternativas na área da imunologia (KOHLE e MILSTEIN, 1975; FUNARO *et al.*, 2000).

Desde a sua descoberta, pesquisas focadas no estudo de uma variedade de linhagens celulares puderam revelar o potencial diagnóstico e terapêutico desta nova classe de fármacos, especialmente no tratamento do câncer (FUNARO *et al.*, 2000).

As primeiras gerações de mAbs foram produzidas utilizando tecnologia do hibridoma. O processo consiste na imunização de camundongos com antígenos de interesse; posteriormente esses animais são sacrificados e de seu baço, órgão que apresenta alta concentração de linfócitos B, é removida uma parcela de linfócitos capazes de produzir anticorpos que reconhecem epítomos específicos para um determinado antígeno (WALSH, 2003).

O OKT3, produzido por Kung e Goldstein em 1979, foi o primeiro mAb murino específico para CD3 humano, pioneiro em práticas clínicas aplicadas aos transplantes. Aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1986, em regime único de tratamento, foi utilizado por sua capacidade de induzir tolerância imunológica inibindo a rejeição de tecidos após transplantes de rim (CHATENOUD, 2003; DAUGHERTY e MRSNY, 2006).

Toda a expectativa depositada nos estudos de mAbs como novos agentes terapêuticos, resultaram em avanços na engenharia tecnológica que possibilitaram a produção de anticorpos parcialmente humanizados ou quiméricos (contendo cerca de 33% de aminoácidos murinos e 67% de fragmentos humanos) ou, ainda, a produção de mAbs totalmente humanizados, em substituição aos inicialmente produzidos em roedores (murinos). Desta maneira, foi possível, além da redução da imunogenicidade, um considerável aumento na meia vida sérica e na especificidade desses biofármacos (FUNARO *et al.*, 2000; ROSS *et al.*, 2005; SAPRA e SHOR, 2013).

Em sinergia a esses eventos, a produção desses agentes em larga escala a um custo acessível, tornou essa área extremamente atraente à indústria farmacêutica (DAUGHERTY e MRSNY, 2006). A maior parte dos mAbs utilizados na terapêutica são imunoglobulinas do tipo IgG principalmente pelas características únicas que estas moléculas apresentam (GRAINGER, 2004; CONGY-JOLIVET *et al.*, 2007).

IgG são proteínas glicosiladas constituídas por duas cadeias leves idênticas, e duas cadeias pesadas organizadas em formato 'Y'. As cadeias leves possuem uma massa de aproximadamente 25KDa, enquanto que as cadeias pesadas são de 50kDa. Essas cadeias estão unidas em um arranjo tridimensional através de ligações covalentes, pontes dissulfeto, ou ainda, ligações de hidrogênio (BAKHTIAR, 2012).

A organização tridimensional das cadeias leves e pesadas geram duas regiões distintas no anticorpo, originando uma molécula bifuncional. O segmento Fab (Fragment antigen-binding) da molécula, consiste no domínio do anticorpo responsável pela ligação específica com o antígeno e que carrega uma sequência variável de aminoácidos. O segmento Fc (Fragment crystallizable), é

responsável por funções efetoras carregando uma sequência constante de aminoácidos (CONGY-JOLIVET *et al.*, 2007).

Em meados de 2003, havia cerca de 120 biofármacos aprovados no mercado americano e europeu, incluindo hormônios, fatores sanguíneos e trombolíticos, vacinas e anticorpos monoclonais, movimentando um montante de 15 bilhões de dólares no mercado farmacêutico representando, de longe, a maior categoria de fármacos sob investigação (WALSH, 2003).

Atualmente, a terapia baseada no uso dos mAbs consiste em uma das estratégias mais bem sucedidas e interessantes para pacientes com neoplasias hematológicas e tumores sólidos (SCOTT *et al.*, 2012). Entretanto, ainda que diversos avanços tenham possibilitado a descoberta de uma série de moléculas com potencial terapêutico, diversas dificuldades ainda limitam a sua utilização.

O alto peso molecular dos mAbs, a alta hidrofília, além da instabilidade físico-química e potencial imunogênico dessas moléculas, limitam o desenvolvimento de medicamentos, a administração e a permeação desses agentes através das barreiras biológicas. Portanto, o desafio hoje consiste não somente na descoberta de novos fármacos, mas também na criação de sistemas capazes de contornar esses problemas de natureza tecnológica e biofarmacêutica possibilitando o fornecimento destes fármacos de maneira adequada para que se alcance o efeito terapêutico desejado.

A via de administração dos mAbs é tipicamente endovenosa na forma de solução e requer a utilização de altas e múltiplas doses para que se tenha a adequada distribuição sistêmica. Tendo em vista o alto custo e os problemas de instabilidade desses sistemas, alternativas que possibilitem a redução da dose administrada e ainda possam contornar tais problemas tecnológicos e biofarmacêuticos são extremamente interessantes para o mercado farmacêutico. O uso da terapia localizada pode proporcionar altas concentrações no sítio de ação ou absorção, contornando os problemas referentes à administração de altas dosagens como a toxicidade, além da necessidade de altas frequências de administração. Neste sentido, sistemas de liberação modificada projetados para os mAbs podem permitir a terapia localizada além de outras potenciais vantagens à terapêutica (SALTZMAN, 1993; GRAINGER, 2004).

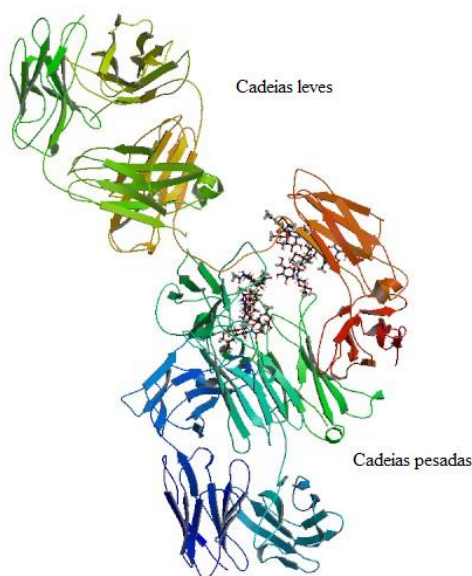
2.4 Bevacizumabe

O bevacizumabe (BVZ), comercializado sob o nome de Avastin®, é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, cujo mecanismo de ação está ligado à inibição de fatores angiogênicos (FOLKMAN, 2007). A ação do BVZ consiste na capacidade de reconhecer epítomos englobando o domínio da ligação do antígeno para o seu próprio receptor. Neste caso, o BVZ se liga com alta afinidade a todas as isoformas de VEGF-A impedindo a ligação deste fator angiogênico com seus

receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 conduzindo a um efeito anti-angiogênico e antitumoral (CONGY-JOLIVET *et al.*, 2007).

Falk e colaboradores acreditam que a ação anti-VEGF de BVZ combina diferentes mecanismos. Entretanto, ainda não se sabe se as ocorrências de alguns mecanismos possuem relação direta com a dose administrada do medicamento (FALK *et al.*, 2015). O BVZ é composto por duas cadeias leves contendo 214 resíduos de aminoácidos e duas cadeias pesadas com 453 resíduos de aminoácidos, o que origina uma massa molecular de 149 kDa (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura de BVZ: cadeias leves (214 aa) e cadeias pesadas (453aa).



Fonte: http://www.drugbank.ca/system/protein_structures. Acesso em 07/05/2015

Aprovado desde 2004 pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de câncer de colón avançado, o BVZ vem sendo amplamente avaliado como agente único ou em combinação com outros agentes quimioterápicos intravenosos ou radioterápicos, resultando em importantes avanços na terapia antitumoral (FERRARA *et al.*, 2004; FERRARA *et al.*, 2005; PAVLIDIS e PAVLIDIS, 2013).

A farmacocinética do bevacizumabe já foi descrita e é consistente com a farmacocinética apresentada pela classe dos anticorpos monoclonais (LIN *et al.*, 1999). Ainda que o BVZ tenha mostrado sua eficácia em estudos clínicos, sua farmacodinâmica ainda não é totalmente conhecida e a relação dose-efeito ainda não se encontra comprovada *in vivo*. Entretanto, duas doses são hoje aprovadas pela FDA e Agência Europeia de Medicamentos (EMA): 2.5 mg/kg/semana e 5 mg/kg/semana. Além disso, considerando os potenciais mecanismos de ação do BVZ, diferentes

doses podem ser necessárias de acordo com o estágio do tumor, o seu subtipo histológico e a combinação terapêutica a ser utilizada (FALK *et al.*, 2015).

A preocupação com alguns efeitos adversos, tais como hipertensão, tromboembolismo venoso, disfunção ventricular esquerda, infarto do miocárdio, perfuração gastrointestinal, proteinúria, epistaxe e hemorragia geraram polêmicas sobre o uso do BVZ como agente terapêutico (SASICH e SUKKARI, 2012). Entretanto, seu uso em associação com diversos quimioterápicos tem sido amplamente explorado, mostrando benefícios que se sobrepõem à toxicidade, quando apresentada (KRUSE *et al.*, 2013).

Hoje seu uso clínico é aprovado e recomendado pela FDA para tratamento de câncer do cólon com ocorrência de metástase em conjunto com a quimioterapia padrão (5-fluorouracil); para o tratamento de câncer de pulmão avançado, a recomendação é de uso combinado com carboplatina e paclitaxel; como agente único no tratamento de pacientes adultos com glioblastoma ou, ainda, em conjunto com IFN α no tratamento de câncer de rim quando constatado metástase (SCOTT *et al.*, 2012).

A literatura ainda destaca o uso “*off-label*” do BVZ como agente anti-VEGF em doenças como degeneração macular e retinopatia diabética em alternativa ao fármaco ranibizumab, aprovado pela FDA, frente ao maior custo deste medicamento quando comparado ao BVZ (GUNTHER e ALTAWHEEL, 2009; CHU *et al.*, 2012; MESSORI, 2014).

Neste caso, o BVZ vem sendo utilizado através de injeções intra-oculares (intravitreal) tento em vista as dificuldades presentes quando se pretende atingir regiões mais profundas do olho. Para esta aplicação, a eficácia terapêutica requer uma alta frequência de administração, frente à meia vida reduzida, o que pode ocasionar complicações como a ocorrência de infecções, hemorragia vítrea ou, ainda, descolamento de retina. Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas de liberação pode proporcionar a proteção do fármaco, possibilitar a sua liberação de forma diferenciada, aumentando a eficácia dessas terapias localizadas, além de descartar a necessidade de altas frequências de administração (ABRISHAMI *et al.*, 2009; ANDREW *et al.*, 2010).

2.5 Sistemas de liberação e a possibilidade de uma terapia localizada

Os principais objetivos dos estudos na área de sistemas de liberação de fármacos são o desenvolvimento de sistemas capazes de manter a estrutura e atividade de biomoléculas, reduzir o aparecimento de reações imunológicas, liberar o fármaco de maneira previsível ao longo do tempo e serem degradados em metabolitos não tóxicos, que sejam rapidamente absorvidos ou excretados (RICHARDSON *et al.*, 2001).

No geral, sistemas de liberação para proteínas consistem em formulações estratégicas e sofisticadas com características específicas. Os sistemas de liberação controlada para os mAbs buscam a liberação desses agentes em níveis terapêuticos diretamente em seus sítios de ação ou absorção (GRAINGER, 2004). A pesquisa de sistemas de liberação para o carreamento do BVZ ainda é escassa, e o foco desta aplicação está principalmente relacionado à sua administração intravítreal em degeneração macular.

Andrew e colaboradores (2010) desenvolveram filmes de sílica porosa nanoestruturados como matrizes aniônicas capazes de proporcionar uma liberação sustentada do BVZ por períodos superiores a trinta dias. Hidrogéis poliméricos termorresponsíveis produzidos por DERWENT e MIELER (2008) foram capazes de proporcionar a liberação sustentada de IgG por um período de aproximadamente três semanas, mostrando-se uma alternativa interessante para administração de BVZ no tratamento de degeneração macular. Wang e colaboradores sintetizaram hidrogéis termorresponsíveis e biodegradáveis capazes de encapsular e promover a liberação BVZ por um período superior a 20 dias (WANG *et al.*, 2012). Os estudos de Li e colaboradores demonstraram que micro e nano partículas de PLGA e PLGLA podem proporcionar a liberação sustentada de BVZ por mais de 90 dias (LI *et al.*, 2012).

A meia vida do BVZ administrado via endovenosa em seres humanos é de 17 a 21 dias (FERRARA, 2004). O longo tempo de meia vida do BVZ no tratamento do câncer explica a atenção limitada no desenvolvimento de sistemas de liberação para esse mAb. Entretanto, existem diversos argumentos que remetem à necessidade do estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para os mAbs humanizados como a necessidade de altas frequências de administração.

Terapias baseadas em anticorpos requerem altas concentrações locais para serem efetivas (SCHWEIZER *et al.*, 2013). Neste sentido, a terapia localizada pode representar uma alternativa interessante, tendo em vista os problemas de permeação, estabilidade e efeitos inespecíficos que esta classe de biofármacos apresenta. O uso da terapia localizada proporciona alta concentração no local de ação, além de contornar os problemas referentes à administração de altas doses, como a toxicidade, os efeitos adversos e a necessidade de aumentar frequência de administração, o que pode contribuir para melhorar a eficácia da terapia e a qualidade de vida dos pacientes.

No desenvolvimento de sistemas de liberação é extremamente importante definir uma estratégia para a aplicação que se pretende. Para a degeneração macular, os sistemas são desenvolvidos com o objetivo de contornar a meia vida limitada que esses mAbs apresentam quando administrados pela via ocular. Para o tratamento do câncer, é importante que o fármaco seja capaz de chegar ao sítio de ação e ainda, que ele permaneça nesse local conferindo um efeito prolongado.

Neste sentido, alguns autores relatam o uso de vias de administração alternativas que possibilitam a terapia localizada, tais como injeções intratumorais ou locorregionais, principalmente em tumores facilmente palpáveis, como os mamários (MENDES, 2008; YANG, Y. *et al.*, 2009; HOHENFORST-SCHMIDT *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2013; ANDRE *et al.*, 2014). Para viabilizar a terapia localizada, existe a necessidade do desenvolvimento de matrizes capazes de promover a proteção do agente terapêutico, cumprir as exigências necessárias à aplicação parenteral e ainda promover a liberação do fármaco de maneira adequada à finalidade que se deseja.

2.6 Hidrogéis

A utilização de polímeros para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem recebido considerável atenção nos últimos anos. As matrizes poliméricas podem apresentar um padrão diferenciado como sistemas de liberação, proporcionando a liberação inicial do fármaco adsorvido em sua superfície, em um segundo momento, a liberação promovida pela difusão do agente através da matriz polimérica e, em uma terceira etapa, uma liberação relacionada à degradação do polímero (PAN *et al.*, 2011).

Os hidrogéis são formados por redes de polímeros hidrofílicos, química ou fisicamente reticulados, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos devido à presença de grupos como -OH, -COOH, -CONH₂, -SO₃H, sem perderem sua forma tridimensional (ESCOBAR *et al.*, 2002; LYRA *et al.*, 2007; YOON e JANG, 2010).

Desde o desenvolvimento dos hidrogéis, em 1960, eles representam matrizes de grande interesse na engenharia de tecidos e biomateriais, uma vez que sua natureza permite a proteção de células e fármacos proteicos (DERWENT e MIELER, 2008).

A estrutura reticulada dos hidrogéis pode ser resultante de interações do tipo covalentes, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas. Tendo em mente as interações que governam sua organização estrutural, os hidrogéis podem ser denominados supramoleculares ou covalentes (YOON e JANG, 2010).

Hidrogéis apresentam particularidades únicas quando utilizados como matrizes para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Sua estrutura porosa, controlada através da densidade de reticulação, proporciona a proteção e o carregamento de fármacos, podendo conferir a eles um perfil de liberação específico. Essas matrizes podem ainda se comportar como sistemas depot, proporcionando a liberação tempo-dependente do fármaco, garantindo altas concentrações locais por períodos prolongados (HOARE e KOHANE, 2008).

Para sincronizar a liberação do fármaco com condições fisiológicas específicas, mecanismos de resposta ativados por condições fisiológicas específicas tornam-se extremamente atrativos. Neste

sentido, um sistema de liberação de fármacos ideal deve regular o perfil de liberação do fármaco, respondendo a um determinado estímulo fisiológico.

Atendendo a estes requisitos, hidrogéis supramoleculares como sistemas de liberação de fármacos podem representar uma estratégia interessante. Hidrogéis inteligentes, conhecidos como “smart hydrogels”, são sistemas que possuem as características dos hidrogéis convencionais, constituindo matrizes capazes de promover a liberação de fármacos, respondendo a diferentes estímulos internos ou externos ao organismo (YOON e JANG, 2010; QIU e PARK, 2012).

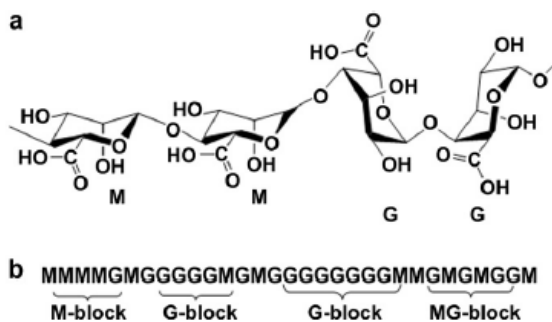
Dependendo da sua natureza polimérica, os hidrogéis inteligentes podem apresentar mudanças em sua estrutura frente a alterações de temperatura, variações de pH, presença de determinadas biomoléculas no organismo, presença de luz ou, ainda, variações de pressão (LEE e YUK, 2007).

2.7 Alginato

O alginato é um biopolímero de ocorrência natural que vem sendo amplamente utilizado como matéria prima na indústria farmacêutica e biotecnológica (GOMBOTZ e WEE, 1998). São extraídos principalmente das algas marrons da família *Phaeophyceae*, podendo representar de 10% a 45% de sua matéria seca (AGULHON *et al.*, 2014).

Também conhecido como ácido algínico, possui uma estrutura linear de massa molar variável, composta de dois monômeros de base β -D-manuronila (M) e α -L-guluronila (G), conectados entre si por ligações glicosídicas, que variam em quantidade e distribuição sequencial ao longo da cadeia, dependendo da fonte. Os monômeros encontram-se arranjados na forma de blocos homopoliméricos ou ainda, heteropoliméricos, constituídos de frações M e G dispostas de maneira alternada como ilustrado na Figura 3 (HANG *et al.*, 1969; AUGST *et al.*, 2006; HORI *et al.*, 2009).

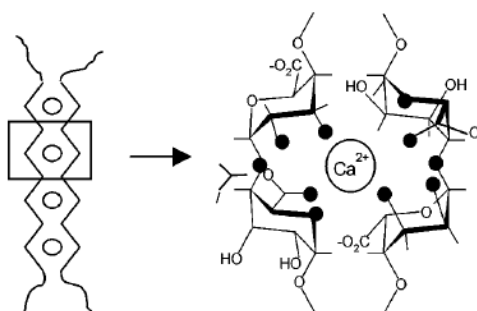
Figura 3: Representação da estrutura do alginato: (a) conformação em cadeia e (b) distribuição sequencial dos blocos.



Fonte: PAWAR e EDGAR (2012).

O alginato possui a capacidade de formar géis na presença de cátions divalentes ou trivalentes, sendo esta a chave de sua utilização e aplicações biológicas. As interações entre os grupos carboxílicos do ácido algínico presentes na fração G e cátions divalentes como o cálcio (Ca^{2+}) induz a formação de géis em soluções aquosas. Neste caso, a rede polimérica tridimensional, descrita na literatura como “egg box model” (Figura 4), é identificada como alginato de cálcio (alginato-Ca), muito utilizado no transplante de células e na imobilização de enzimas (MOE *et al.*, 1992; GEORGE e ABRAHAM, 2006; HORI *et al.*, 2009; TSIFTSOGLU *et al.*, 2013).

Figura 4: Representação ilustrativa do modelo "egg box"



Fonte: BRACCINI e PÉREZ (2001).

Elucidar a estrutura química e física do alginato de maneira detalhada não é simples. A literatura reporta diversos métodos com para finalidade, no entanto, cada um desses apresenta suas limitações. Como as propriedades dos hidrogéis de alginato produzidos através da reticulação química são claramente dependentes de sua composição, é extremamente importante determinar a fração M/G que constitui o alginato utilizado, bem como a disposição de sua estrutura de blocos (GACESA, 1988).

Diante de sua alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e condições brandas em que são produzidos, os hidrogéis de alginato vêm sendo muito utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica como agente doador de viscosidade aos alimentos, biomateriais, ou ainda, no desenvolvimento de matrizes que constituem sistemas de liberação de fármacos e biomoléculas (SHAPIRO e COHEN, 1997; AUGST *et al.*, 2006; BERTAGNOLLI, *et al.*, 2014).

Hidrogéis de alginato podem representar uma alternativa interessante na liberação modificada de fármacos. A administração localizada de maneira controlada, permite altas concentrações locais por um período prolongado, com mínima exposição de outros tecidos. Além disso, a cinética de liberação de fármacos a partir de hidrogéis de alginato pode ser modulada através de interações supramoleculares entre o fármaco e o alginato (AUGST *et al.*, 2006).

LE RENARD e colaboradores (2010) verificaram que hidrogéis de alginato produzidos através de co-injeção entre alginato de sódio com cloreto de cálcio possuem seringabilidade, viabilizando sua utilização na produção de sistemas de liberação modificada para a administração parenteral.

Recentemente, Schweizer e colaboradores reportaram o desenvolvimento de hidrogéis de alginato quimicamente reticulados com cálcio para liberação modificada de anticorpos monoclonais. Neste estudo constatou-se que a interação anticorpo-hidrogel é pH dependente, sendo mais evidente em valores de pH mais baixos que o pH sanguíneo (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

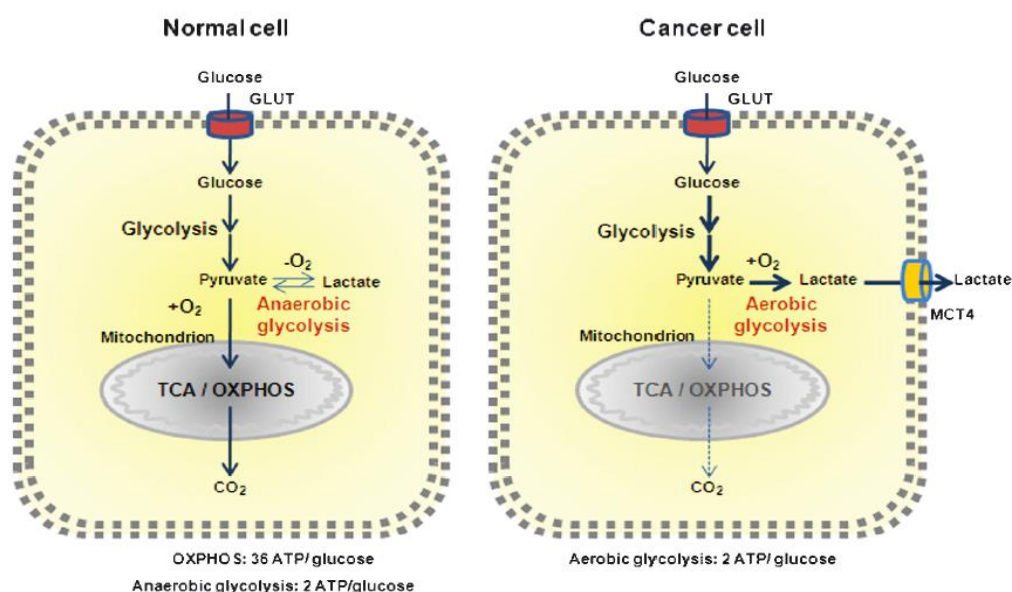
2.8 Microrregião tumoral

Em condições aeróbicas, células normais processam glicose inicialmente a piruvato via glicólise no citosol e, posteriormente, a dióxido de carbono na mitocôndria, através de um processo conhecido como fosforilação oxidativa gerando 32 moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). Este processo é a via de escolha à produção energética de células normais. Alternativamente, na ausência de oxigênio, condições de hipóxia, a glicose é rapidamente convertida a piruvato e tem como subproduto destas reações o ácido láctico, gerando a produção de duas moléculas de ATP (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

O metabolismo das células tumorais apresenta diferenças significativas em relação aos seus tecidos de origem. Ao evoluir progressivamente a um estado neoplásico, as células normais adquirem uma sucessão de adaptações metabólicas que possibilitam o seu desenvolvimento de maneira acelerada. Entretanto, a intensa e descontrolada proliferação, bem como a resistência à morte celular, exige vias de produção de energia e biomassa capazes de possibilitar e suplementar este processo (CURTARELLO *et al.*, 2015). Nesse sentido, as células tumorais em intensa proliferação convertem, rapidamente, grande parte da glicose em lactato, ainda que na presença de oxigênio, para dar aporte energético à fosforilação oxidativa mitocondrial, fenômeno conhecido como efeito Warburg, descrito por Otto Warburg (Figura 5).

Trata-se de alterações genéticas que ainda não são completamente compreendidas (SONVEAUX *et al.*, 2008). Entretanto, esse fenótipo metabólico alterado vem sendo amplamente explorado como alvo no combate às células tumorais (WARBURG, 1956; GATENBY e GILLIES, 2004; VANDER HEIDEN *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2012).

Figura 5: Diferenças metabólicas entre células normais e células tumorais. Em condições aeróbicas, células normais processam a glicose através da fosforilação oxidativa; por outro lado, as células tumorais em intensa proliferação convertem glicose a lactato, ainda na presença de oxigênio, fenômeno conhecido como “efeito Warburg”.



Fonte: (MARIE e SHINJO, 2011).

As altas taxas do metabolismo glicolítico produzem altos níveis de lactato/ ácido láctico que precisam ser externalizados para a manutenção do pH fisiológico, evitando acidose e morte celular (AMORIM *et al.*, 2015). Essas células contam com sistemas de regulação presentes na membrana plasmática, que incluem os transportadores de monocarboxilatos (MCTs), principais responsáveis pelo efluxo do ácido láctico e regulação do pH, garantindo um fenótipo resistente ao ambiente ácido, condição essencial à sobrevivência das células tumorais (PINHEIRO *et al.*, 2012).

A família dos MCTs é atualmente composta por 14 membros; entretanto, apenas os MCTs 1-4 estão relacionados ao transporte de prótons e controle do pH fisiológico. Em resposta a atividade desses transportadores, especialmente MCT-1 e MCT-4, na microrregião tumoral, verifica-se a formação de um pH ácido em diversos tipos de tumores (TANNOCK e ROTIN, 1989; MIRANDA-GONCALVES *et al.*, 2013). Além de suas funções metabólicas normais, os MCTs podem também exercer um papel importante sob o transporte de alguns fármacos através da membrana plasmática (HALESTRAP e PRICE, 1999). Desta maneira, uma vez expresso em células tumorais, eles podem atuar como mediadores da entrada de agentes quimioterápicos ocasionando a morte seletiva de células cancerígenas (BALTAZAR *et al.*, 2014).

Embora o lactato tenha sido considerado por muito tempo subproduto, hoje já se sabe que ele constitui um substrato importante que alimenta o metabolismo oxidativo das células tumorais. Ocorre,

portanto, uma espécie de simbiose entre as células tumorais glicolíticas e oxidativas, proporcionando o acesso dessas aos metabólitos energéticos. É importante ressaltar ainda que o MCT-1 constitui um componente crucial a ocorrência dessa simbiose (SONVEAUX *et al.*, 2008). Além do importante papel funcional do MCT-1 no metabolismo tumoral, a sua expressão em diversos tumores vem sendo associada à rápida progressão da doença e a prognósticos severos (PINHEIRO *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2010; MIRANDA-GONCALVES *et al.*, 2013)

Assim, a inibição da atividade ou expressão dos MCTs irá promoverá o desequilíbrio intra e extracelular das células tumorais afetando a homeostase e pH fisiológico, induzindo a morte celular por apoptose, reduzindo a angiogênese tumoral e a ocorrência de metástase (BALTAZAR *et al.*, 2014; BOLA *et al.*, 2014).

Existem hoje algumas moléculas capazes de promover a inibição dos MCTs, como α -ciano-4-hidroxycinamato (CHC), e bioflavonóides, como a quercetina e phloretin. Entretanto, a sensibilidade desses diferentes inibidores é variável, de acordo com a isoformas dos MCTs. Além disso, a inibição não ocorre de maneira específica, podendo afetar outras moléculas (HALESTRAP e PRICE, 1999).

Utilizando o modelo corioalantóica do embrião da galinha (CAM), Miranda-Gonçalves e coautores verificaram que o tratamento com CHC foi capaz de promover a redução no tamanho de gliomas, diminuir a proliferação celular e reduzir a densidade de vasos sanguíneos associados ao tumor (MIRANDA-GONCALVES *et al.*, 2013).

A exploração desses transportadores (MCTs), bem como a utilização de novas características no microambiente tumoral geradas por modificações adaptativas como alvos terapêuticos no tratamento do câncer, tornaram-se estratégias interessantes no combate às células tumorais, especialmente em função da resistência que elas vêm apresentando aos quimioterápicos comercialmente disponíveis.

Por outro lado, o microambiente ácido que se forma em torno da região tumoral pode ser uma estratégia interessante no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada capazes de promover a liberação do fármaco em função dos valores de pH da região tumoral, proporcionando, desta maneira, a ação seletiva do fármaco às células tumorais, poupando os tecidos saudáveis (GERWECK e SEETHARAMAN, 1996; GANTA *et al.*, 2008).

3 OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar hidrogéis pH responsivos de alginato ionicamente reticulados com cálcio para a administração intratumoral ou locorregional de bevacizumabe.

.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Principais matérias-primas e reagentes

Acetato de sódio anidro P.A. - Dinâmica (50469);
Ácido acético glacial P.A.- Chemis (35733);
Ácido cítrico monohidratado - Synth (42783);
Ácido clorídrico 37% – Impex (060611-UQ);
Água deuterada – Cambridge Isotope Laboratories (61-372);
Alginato de sódio - Sigma-Aldrich (#MKBN7680V);
Bevacizumabe - Genentech (H0136B11);
Brometo de potássio - Synth (161600);
Cloreto de cálcio dihidratado - Vetec (1105782);
Cloreto de sódio - Synth (11563);
Fosfato de potássio monobásico anidro – Chemis (Q0037);
Fosfato de potássio bibásico anidro – Chemis (Q0001);
Fosfato de sódio dibásico hepta hidratado - Ecibra;
Hidróxido de sódio – Merck (UN1823);
Kit BCA Protein Assay Pierce - Thermo Scientific (AUTO040860);
Membrana de diálise MWCO 1KDa- Spectrum Labs (3267770);
Seringa hipodérmica – BD (4150090);
Tolueno – Panreac (0000202632);
Tubos cônicos tipo Falcon –BD.

4.1.2 Principais equipamentos

Agitador magnético (Quimis®);
Agitador de tubos AT 56 (Phoenix);
Analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®);
Avance-III 400 MHz NMR Spectrometer (Bruker);
Banho ultrassônico- Ultrasonic Cleaner (Unique);
Condutivímetro DM32 (Digimed);

Espectrofotômetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies);
Espectropolarímetro J-815 (Jasco);
Fluorescence Spectrophotometer F4500 (Hitachi);
Incubadora (Termaks);
Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução-JSM7500F (Joel);
Nano-DSC (TA Instruments);
Peagômetro DM 23 (Digimed);
Reômetro AR 2000ex (TA Instruments);
Ultracentrífuga 16M (Labnet);
Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments (Malvern).

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização do alginato de sódio

4.2.1.1 Determinação da massa molecular média do polímero utilizando Static Light Scattering (SLS)

O equipamento empregado para a determinação da massa molecular do alginato foi o Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (UK), que é capaz de determinar a massa molecular do polímero através de um processo denominado espalhamento estático de luz (*Static Light Scattering*).

As amostras foram estudadas em diferentes concentrações a 25 °C aplicando-se a equação de Rayleigh (Equação 1) que descreve a intensidade da luz dispersa a partir das moléculas do polímero em solução aquosa (PUSKÁS *et al.*, 2013).

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad \text{Equação 1}$$

Em que R_{θ} é a fração de Rayleigh determinada pela proporção entre luz dispersa e luz incidente na amostra; M_w é o peso molecular da amostra; A_2 o segundo coeficiente virial; C a concentração do polímero; $P(\theta)$ a dependência angular da intensidade de espalhamento na amostra; K a constante ótica definida de acordo com a Equação 2:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo N_A a constante de Avogadro; λ o comprimento de onda do laser; n_0 o índice de refração do solvente; $\frac{dn}{dc}$ é o incremento do índice de refração diferencial (MURPHY, 1997).

Para correta determinação do peso molecular utilizando a técnica SLS, é essencial o conhecimento do dn/dc do polímero no solvente a ser utilizado. Para a dispersão de alginato de sódio em meio aquoso, adotou-se um dn/dc de 0,165 (HARDING, 2005).

Desta maneira, preparou-se uma solução estoque de concentração 1 mg/mL que ficou em agitação magnética por 24 horas, garantindo a adequada dispersão do polímero. A partir dessa dispersão estoque, foram preparadas diferentes dispersões cujas concentrações variaram de 0,1 mg/mL a 1 mg/mL. Para evitar interferentes que poderiam resultar em medidas incorretas, todas as dispersões foram filtradas em membrana 0,22 µm (Milipore®) e preparadas em fluxo laminar. O

alinhamento óptico do equipamento foi verificado por meio de uma medição da variação angular da intensidade de espalhamento de uma solução de tolueno de elevada pureza utilizada como padrão interno (BANTLE *et al.*, 1982).

4.2.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O equipamento empregado para as análises de absorção no infravermelho foi o Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo IR Prestige-21 com transformada de Fourier. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} , com intervalos de 2 cm^{-1} .

Para o preparo das pastilhas, utilizou-se brometo de potássio (KBr) dessecado à 120 °C até peso constante. Pesou-se cerca de 2 mg de alginato de sódio, que foi devidamente homogeneizado com 148 mg de KBr, perfazendo a massa total da pastilha de 150 mg de acordo com metodologia utilizada por TÓTOLI (2013). Para uma análise comparativa, posteriormente pesou-se cerca de 2 mg de alginato de cálcio liofilizado, que foi homogeneizado com 148 mg de KBr. Na confecção das pastilhas, utilizou-se prensa hidráulica Shimadzu (Kyoto, Japão). A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do software *IR Solution*.

4.2.1.3 Determinação da fração M/G por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

Para a caracterização e isolamento das frações que compõem o alginato de sódio, o polímero foi submetido a um tratamento de pré-hidrólise de acordo com a metodologia adaptada de DAVIS e colaboradores (2004). O tratamento despolimeriza o alginato e reduz sua viscosidade para níveis aceitáveis a análise de RMN ^1H (GRASDALEN *et al.*, 1979; GRASDALEN, 1983; DAVIS *et al.*, 2004).

Cerca de 50 mg do polímero foram dispersos em 100 mL de água purificada. A dispersão ficou em agitação magnética por 4 horas. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,6 com a utilização de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. A solução foi mantida em banho termostatzado a 90 °C por uma hora. Após esse período, ajustou-se o pH para 3,8 e a amostra retornou para o banho, 90 °C por 45 min. Para finalizar o processo, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M e liofilizada.

O alginato de sódio liofilizado (10mg) foi dissolvido em 600 μL de água deuterada (D_2O) para análise em equipamento Bruker Avance III 400, operando em um campo magnético de 400.13 MHz para o núcleo de ^1H , utilizando uma sonda de detecção inversa para tubos de 5 mm. O espectro foi

obtido em 353 K (70 °C) com o uso de uma janela de 8012,82 Hz e um tempo de aquisição de 4,09 s. 2,2,3,3-D4-trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado (TMSP-d4) foi utilizado como referência interna. Foram obtidos 32 espectros com tempo de reciclo de 1s. A aquisição e o processamento dos dados foram feitos com o uso do software Topspin®. Os espectros foram processados com uma função de apodização exponencial com fator (lb) de 1,0 Hz.

4.2.2 Estudos de pré-formulação

4.2.2.1 Avaliação da interação polímero (alginato): proteína (BVZ)

Quando polieletrólitos de cargas opostas são misturados em meio aquoso, verifica-se a formação de complexos polieletrólíticos também denominados coacervados. A formação desses complexos esta diretamente relacionada a fatores como peso molecular, concentração do polímero, razão entre os polieletrólitos que irão interagir, força iônica, pH da solução e temperatura (CHOLLAKUP *et al.*, 2010).

Para determinar a melhor razão polímero: proteína a ser utilizada no preparo dos hidrogéis utilizou-se uma metodologia adaptada de Chollakup e colaboradores (2010) na construção de um gráfico de resposta utilizando diferentes razões da mistura entre a dispersão polimérica e aquela contendo a proteína (1:9 a 9:1), considerando sempre uma massa total de 0,5 mg/mL. Para o preparo das amostras, realizou-se sequencialmente à adição do polímero, a adição do volume de água MiliQ necessário para completar 1 mL e o volume de Avastin® correspondente a massa de proteína.

Como parâmetros de resposta, avaliou-se o potencial zeta (ZP) dos complexos formados, o diâmetro das partículas formadas, o índice de polidispersidade (PDI) e a eficiência de associação (%EA) polímero proteína. Todas as amostras foram preparadas em triplicata calculando-se a média e o desvio padrão (DP).

4.2.2.1.1 Análise do potencial zeta

O ZP foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.1.2 Análise do diâmetro de partículas

O movimento browniano de partículas em suspensão faz com que a luz de um laser incidida e seja espalhada com diferentes intensidades. A aquisição dessas flutuações de intensidade de luz,

resulta na velocidade do movimento browniano que está relacionado ao tamanho das partículas de acordo com a equação Stokes-Einstein (HARILALL *et al.*, 2013).

A determinação do diâmetro médio foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (DLS), empregando equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.2.2.1.3 Avaliação da eficiência de associação polímero: proteína (EA%)

Para avaliar a eficiência de associação polímero: proteína utilizou-se o Kit Pierce™ BCA Protein Assay –Thermo Scientific. O método de quantificação desenvolvido por SMITH *et al.* (1985) conhecido como método do ácido bicinconínico (BCA), baseia-se na reação de cobre (Cu II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (Cu I) e formando um complexo que absorve na região de 560 nm (ZAIA *et al.*, 1998). Trata-se de um método simples, rápido e preciso.

Para determinação da EA% foi construída uma curva analítica padrão de BVZ a partir de uma solução estoque (1 mg.mL⁻¹), de acordo com as especificações do Kit.

As partículas formadas pela união polímero: proteína foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 14000 rpm por 30 min, de acordo com metodologia adaptada de LEONARD *et al.* (2004) e a quantificação foi realizada utilizando espectrofotômetro UV-VIS em 562 nm de maneira indireta através da diferença entre a concentração total adicionada de proteína e a fração de proteína que permanece dispersa após o processo de centrifugação (Equação 3).

$$EA\% = \frac{[] BVZ adicionado - [] BVZ quantificado}{[] BVZ adicionado} \times 100$$

Equação 3

Em tubos de ensaio, foram adicionados a 100 µL de amostra uma mistura de reagentes contidos no kit. Para os padrões, adicionou-se a mesma quantidade dos reagentes A e B e 100 µL de água purificada. Após a incubação por uma hora a 37 °C, determinou-se a absorbância em 562 nm. Os valores foram calculados utilizando curva analítica de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2 Concentração x Eficiência de Associação (EA%)

Com os resultados obtidos no item avaliação da interação polímero: proteína, selecionou-se a razão 9:1 para avaliar a influência da concentração da massa total em relação à eficiência de

associação polímero: proteína. Para isso, mantendo-se as frações, foram analisadas as concentrações finais de 0,5, 5, 10, 20 e 30mg de massa total.

Para o preparo das amostras, realizou-se sequencialmente a adição do valor correspondente à massa do polímero, o volume de água MiliQ necessário para completar 1 mL e o volume de Avastin® correspondente à massa de proteína. Nesta etapa, a EA% foi analisada com o ajuste da solução estoque de polímero para diferentes valores de pH (7,4 e 5,8).

4.2.2.3 Caracterização estrutural do BVZ em diferentes valores de pH e na presença do alginato

4.2.2.3.1 Dicroísmo Circular (DC)

As medidas de DC foram adquiridas com a utilização de um espectropolarímetro (Jasco J-810) acoplado a um sistema de controle de temperatura. Os parâmetros utilizados na análise foram 0,5 segundo para o tempo de resposta, data pitch 0,5 nm, velocidade de aquisição de 100 nm/min e caminho óptico de 0,1 cm.

A avaliação do efeito da interação proteína-poliânion na estrutura secundária da proteína foi realizada variando-se a proporção entre as frações polímero e proteína (0,5 mg/mL). Amostra contendo a dispersão polimérica na mesma concentração foi utilizada como branco. Verificou-se ainda a estabilidade da proteína em diferentes valores de pH. Para a obtenção de um controle, foi determinada uma curva contendo BVZ 0,3 mg/mL. O tampão utilizado no preparo de todas as amostras e do branco foi o fosfato-acetato 50 mM (pH 5,8 e 7,4).

A contribuição do branco foi subtraída dos espectros resultantes por meio de tratamento no software Origin. Os valores obtidos foram normalizados para elipticidade residual molar ($\langle\theta\rangle$) descrita pela Equação 4.

$$\langle\theta\rangle = \frac{\theta \times 100 \times MM}{c \times 0,1 \times n} \quad \text{Equação 4}$$

Em que θ é a elipticidade em graus (Deg), MM é a massa molecular da proteína (g.mol^{-1}), c é a concentração da proteína (mg.mL^{-1}), 0,1 é o caminho óptico (cm), e n , o número de resíduos de aminoácidos. O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado pelo programa CDNN Deconvolution.

4.2.2.3.2 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em fluorímetro F4500 (Hitachi). Os espectros foram obtidos por meio de excitação em 280 nm e coleta da emissão de 300 a 420 nm. Os parâmetros utilizados para análise foram 240 nm/min para velocidade de aquisição, fenda de excitação de 5 nm, fenda de emissão de 20 nm, voltagem PMT 700 w.

A avaliação da interação proteína-poliânion foi feita fixando-se a concentração de massa (BVZ + Alginato) em 0,5 mg, variando-se as frações (1:9, 5:5 e 9:1). Amostras contendo a mesma concentração de polímero foram preparadas e utilizadas como controle.

A avaliação da estrutura terciária de BVZ em diferentes valores de pH foram realizadas utilizando tampão fosfato-acetato 50 mM nos pH 5,8 e 7,4. As medidas de fluorescência para todas as amostras, foram realizadas em triplicata, utilizando cubeta de quartzo 10 mm. Os resultados foram expressos por meio do comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e o centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$) descrita pela Equação 5.

$$\langle\lambda\rangle = \frac{\sum Fi \lambda i}{\sum Fi}$$

Equação 5

Em que Fi é a intensidade de fluorescência e λi é o comprimento de onda de emissão.

4.2.2.4 *Microcalorimetria Exploratória Diferencial (NanoDSC)*

As medidas microcalorimétricas foram conduzidas em equipamento Nano-DSC (TA Instruments) utilizando uma taxa de aquecimento igual a 1 °C min⁻¹ na faixa de varredura de 0-100 °C. Os resultados representam o perfil térmico de BVZ livre e incorporado em dispersões de alginato de sódio. As soluções utilizadas em todas as amostras foram os tampões fosfato (pH 7,5) e acetato (pH 5,8) 5mM. Os termogramas foram tratados utilizando-se software NanoAnalyze para obtenção dos parâmetros termodinâmicos relacionados ao processo de desenovelamento proteico.

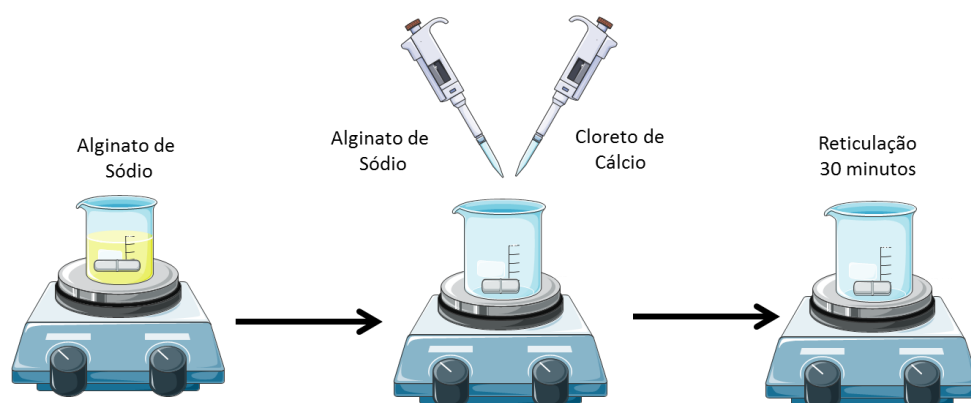
4.2.3 Preparo dos hidrogéis

Dispersões poliméricas de alginato de sódio em diferentes concentrações (1, 2 e 3%) foram preparadas utilizando água purificada em temperatura ambiente com agitação magnética “overnight”,

garantindo a completa dispersão do polímero. O pH das dispersões foi posteriormente ajustado para 7,4 com a utilização de NaOH 0,2 M ou HCl 0,1 M, se necessário.

Dispersões de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações 5, 10 e 15 mg/mL foram preparadas utilizando água ultrapura (MiliQ). Para a obtenção de hidrogéis de alginato de cálcio, utilizou-se um sistema de co-injeção das dispersões de alginato de sódio e cloreto de cálcio (Figura 6), de acordo com metodologia adaptada de ANSORENA *et al.* (2013).

Figura 6: Representação esquemática do preparo dos hidrogéis. Sistema de co-injeção de alginato de sódio e cloreto de cálcio.



Fonte: autoria própria

O hidrogel obtido permaneceu em agitação magnética por 30 minutos, garantindo a completa reticulação do sistema. Posteriormente, as amostras foram analisadas em relação ao seu aspecto macroscópico: homogeneidade, viscosidade, estabilidade física do sistema e transparência.

Para verificar a estabilidade acelerada dos hidrogéis, amostras foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL (Falcon, BD®) e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm. A estabilidade física do sistema foi considerada conforme quando a separação de fases do hidrogel não foi verificada.

4.2.4 Caracterização dos hidrogéis

4.2.4.1 Análise de Potencial Zeta para hidrogéis contendo BVZ em diferentes valores de pH

O ZP foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK. Os hidrogéis produzidos com 27 mg/mL alginato e 5

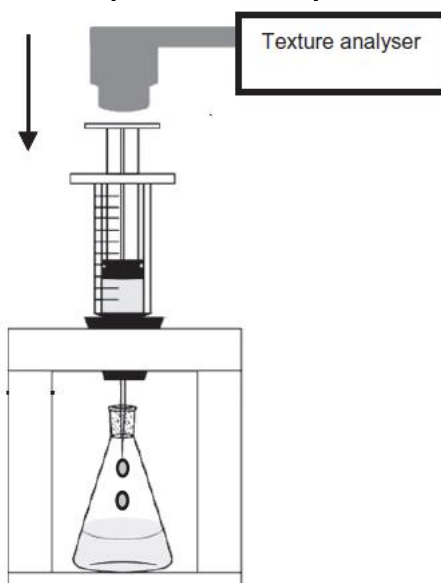
mg/mL CaCl_2 foram colocados na célula eletroforética e as análises foram realizadas em triplicata, calculando-se a média e o desvio padrão em dois diferentes valores de pH (5,8 e 7,4). Para a incorporação do fármaco, a concentração de BVZ (0,3 mg/mL) foi adicionada a dispersão de alginato de sódio antes do processo de reticulação.

4.2.4.2 Seringabilidade das formulações

Para determinar o trabalho necessário na extrusão das formulações produzidas, utilizou-se o analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®) no modo de compressão de acordo com metodologia de BRUSCHI e colaboradores (2007). O mesmo volume de cada uma das formulações foi adicionada, uma a uma, em seringas plásticas de 3 mL (BD Plastipak™) com agulha 0,70x30 mm (BD Precision Glide™) garantindo uma altura de 3 mm de formulação e evitando a formação de bolhas.

A seringa foi fixada verticalmente no equipamento e a prova foi colocada em contato com o êmbolo como esquematizado na Figura 7. A prova desceu em uma velocidade constante de 2 mm.s^{-1} através de uma distância de 30 mm (BERNEGOSSI, 2014). O trabalho necessário para que a formulação conseguisse transpor a agulha foi determinado através da área do gráfico de força *versus* distância registrada durante a compressão do êmbolo. Todas as amostras foram analisadas em temperatura ambiente (25 °C) e os resultados foram apresentados através dos valores médios de pelo menos cinco replicatas.

Figura 7: Representação esquemática do dispositivo utilizado para determinação do trabalho de seringabilidade.



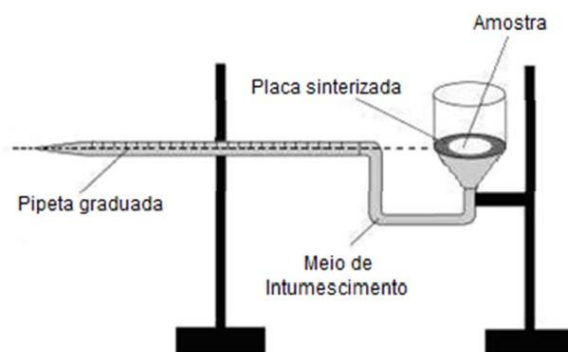
Fonte: BURCKBUCHLER *et al.* (2010).

4.2.4.3 Efeito do ambiente fisiológico na absorção de líquidos

As características de intumescimento de hidrogéis de alginato de cálcio foram investigadas de acordo com a metodologia adaptada por CURY e colaboradores (2009) empregando dispositivo de Enslin modificado. Foram utilizados tampão fosfato-acetato (50Mm) pH 5,8 e 7,4 preparados de acordo com metodologia descrita pela United State Pharmacopeia (USP, 2012).

Para analisar a capacidade de absorção, 3 mg±0,5 de hidrogéis liofilizadas (27 mg/mL alginato e 5mg/mL CaCl₂) com e sem BVZ (3 mg/mL) foram precisamente pesadas e colocadas em filtro de vidro sinterizado como ilustrado pela Figura 8 (PREZOTTI, 2013).

Figura 8: Dispositivo de Enslin para determinação da capacidade de absorção de líquidos.



Fonte: PREZOTTI (2013)

O volume de líquido absorvido foi avaliado em diferentes intervalos de tempo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em % de líquido absorvido em relação à massa inicial de amostra, de acordo com a Equação 6 (PREZOTTI *et al.*, 2012).

$$\% \text{ Absorção líquido} = \frac{\text{Volume médio absorvido}}{\text{Massa da amostra}} \times 100$$

Equação 6

4.2.4.4 Análises Reológicas

4.2.4.4.1 Análise reológica de fluxo

Para a caracterização reológica dos sistemas, utilizou-se o reômetro AR2000ex (TA Instruments®) no modo *fluxo* equipado com geometria de placas paralelas de 40 ou 60 mm, selecionadas de acordo com a viscosidade aparente da amostra, separadas por uma distância fixa de 1 mm, em temperatura de 25 °C.

Para avaliar as variações no comportamento reológico de hidrogéis frente a alterações em sua composição, diferentes sistemas foram produzidos e nomeados de acordo com seus constituintes. A tabela abaixo (Tabela 1) apresenta os sistemas estudados nesta etapa de caracterização com suas respectivas composições. Sabendo que a microrregião tumoral apresenta valores de pH inferiores ao pH fisiológico, utilizamos ácido láctico (pH 5,8) para simular o comportamento reológico desses sistemas frente a alterações de pH.

Tabela 1: Composição das formulações empregadas no estudo de comportamento reológico.

Amostra	BVZ	Polímero(mg/mL)	CaCl ₂ (mg/mL)	NaCl	pH
30_pH7,4_5R	-----	27mg/mL	5mg/mL	-----	7,4
30_pH7,4_5R_BVZ	3mg/mL	27mg/mL	5mg/mL	-----	7,4
30_pH7,4_3R	-----	27mg/mL	3mg/mL	-----	7,4
30_pH7,4_3R_BVZ	3mg/mL	27mg/mL	3mg/mL	-----	7,4
30_pH7,4_5R_NaCl	-----	27mg/mL	5mg/mL	0,1M	7,7
30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ	3mg/mL	27mg/mL	5mg/mL	0,1M	7,4
30_pH7,4_5R_ac. láctico	-----	27mg/mL	5mg/mL	-----	5,8
30_pH7,4_5R_ac. láctico_BVZ	3mg/mL	27mg/mL	5mg/mL	-----	5,8

Cerca de 1 mL das amostras foi cuidadosamente depositada na base inferior do reômetro, evitando o cisalhamento e permitindo um tempo de repouso de 5 minutos antes de cada determinação. As curvas ascendentes e descendentes de fluxo foram obtidas com gradiente de cisalhamento de 1 s^{-1} a 400 s^{-1} e 400 s^{-1} a 1 s^{-1} respectivamente, em um período de 3 minutos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

As curvas ascendentes de fluxo foram tratadas através da aplicação do modelo Lei das Potências (Equação 7) com utilização do Software Origin® 7, que descreve a propriedade de fluidos. De acordo com este modelo, os parâmetros K (relacionado à consistência da amostra) e n (índice de escoamento) são obtidos, de maneira que valores $n > 1$ representam um fluido dilatante, $n < 1$ representam um fluido pseudoplástico e $n = 1$ um fluido Newtoniano (BARNES *et al.*, 1989).

$$\sigma = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 7}$$

Na Equação 7, σ é a tensão de cisalhamento (Pa), γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), K é o coeficiente de consistência ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$) e n , o índice de comportamento do fluxo (adimensional).

4.2.4.4.2 Análise reológica oscilatória dinâmica

As análises oscilatórias foram realizadas a 37 °C, utilizando-se Reômetro AR2000ex (TA Instruments®) equipado com placas paralelas de 40 ou 60 mm de diâmetro separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, selecionadas de acordo com a viscosidade da amostra.

Primeiramente, determinou-se, para cada uma das formulações, a região de viscoelasticidade linear (RVL). Na RVL, a tensão aplicada não é capaz de deformar as estruturas do sistema preservando suas ligações intramoleculares (SCHRAMM, 2006).

Após a determinação da RVL para todas as amostras, o equipamento foi utilizado no modo frequency sweep para realização da varredura de frequência e determinação do modo elástico (G') e módulo viscoso (G''), aplicando-se uma tensão de 0,5 Pa e uma faixa de frequência de 0,01 a 100Hz, de acordo com metodologia adaptada de SCHWEIZER *et al.* (2013).

4.2.4.5 *Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV)*

Para analisar a influência da composição na morfologia dos hidrogéis, os sistemas (Tabela 1) foram congelados, utilizando nitrogênio líquido e liofilizados em equipamento Micromoduly (Thermo-Scientific). Para o preparo da amostra, utilizou-se fita dupla face de carbono. Após a deposição do material liofilizado, realizou-se o revestimento da amostra com ouro, por um período de 50 segundos, possibilitando o aumento da condutividade do feixe de elétrons para aquisição das imagens.

Para aquisição das imagens, utilizou-se equipamento JOEL-JSM-7500F acoplado ao software Joel Pc-100 ver 2.1.0.3. Com o objetivo de verificar os íons presentes na composição do material, utilizou-se espectroscopia de energia dispersiva (EDS) com detector Thermo Scientific acoplado ao sistema MEV e software NSS 2.3.

4.2.5 Estudo da atividade biológica dos hidrogéis

4.2.5.1 *Avaliação da atividade antiangiogênica dos hidrogéis utilizando modelo membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)*

Para avaliar a atividade antiangiogênica dos hidrogéis produzidos (27 mg/mL de alginato de sódio + 5 mg/mL cloreto de cálcio) em diferentes valores de pH (7,4 ou 5,8), ovos fertilizados (n=90-120) foram adquiridos da Pintobar (Portugal). Após assepsia com utilização de álcool 70%, os ovos foram incubados horizontalmente a 37 °C e 70% de umidade por três dias. No terceiro dia de

desenvolvimento embrionário, uma janela, com diâmetro médio de 2 cm, foi aberta no topo dos ovos através da remoção da casca. As janelas foram então cobertas com fita transparente para evitar a desidratação dos embriões e voltaram à incubadora nas condições inicialmente descritas (MARTINHO *et al.*, 2012; SILVA-CORREIA *et al.*, 2012).

Para o ensaio da CAM, o preparo dos hidrogéis foi realizado com a utilização de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco®) ajustado ao pH 7,4 ou 5,8 com utilização de solução de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Nos hidrogéis contendo proteína, bevacizumabe (3 mg/mL) foi adicionado à dispersão polimérica antes do processo de reticulação.

No 9º dia de desenvolvimento, ovos contendo embriões viáveis foram separados em diferentes grupos experimentais (Tabela 2). Antes de receber o tratamento, todos os ovos foram fotografados com a utilização de estereomicroscópio (Olympus S2x16) e software Cell B (Olympus). Os ovos foram fotografados *in ovo* periodicamente para documentar as mudanças vasculares ao longo do tempo (RIBATTI *et al.*, 1996b).

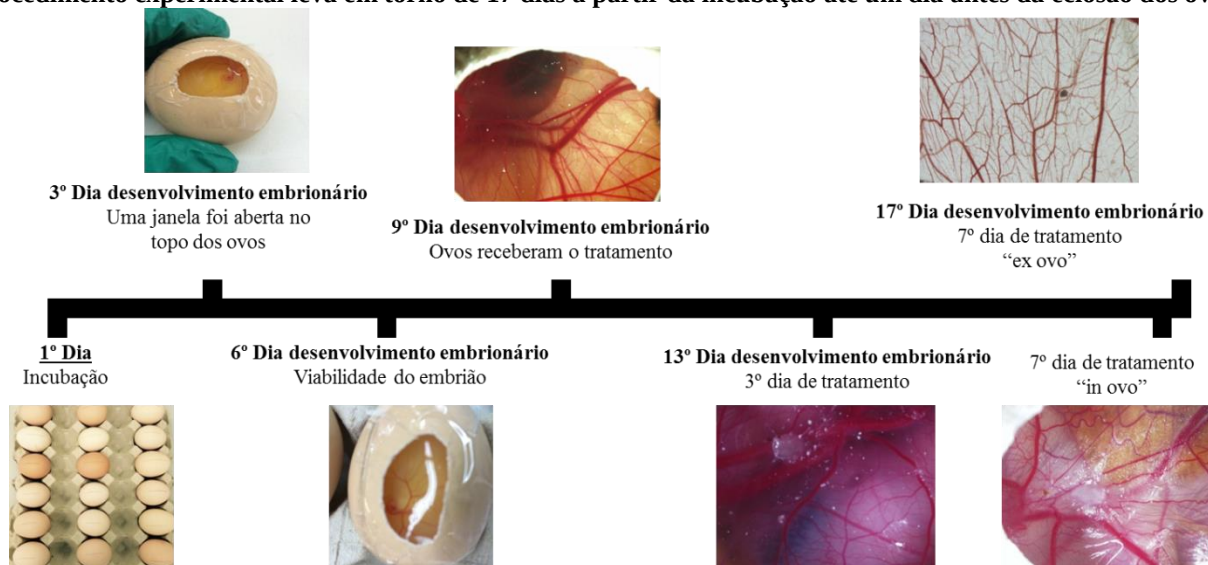
Tabela 2: Grupos experimentais utilizados no ensaio da CAM: avaliação da atividade antiangiogênica dos hidrogéis contendo BVZ em diferentes valores de pH.

Grupos experimentais	Especificação
DMEM_5,8 (Controle negativo)	Recebeu 25µL de DMEM pH 5,8
DMEM_7,4 (Controle negativo)	Recebeu 25µL de DMEM pH 7,4
Alginato	Recebeu 25µL de alginato disperso em água purificada
Hidrogel_5,8	Recebeu 25µL do hidrogel pH 5,8
Hidrogel_7,4	Recebeu 25µL do hidrogel pH 7,4
Hidrogel_BVZ_5,8	Recebeu 25µL do hidrogel contendo BVZ pH 5,8
Hidrogel_BVZ_7,4	Recebeu 25µL do hidrogel contendo BVZ pH 7,4
BVZ_5,8 (Controle positivo)	Recebeu 25µL do Avastin® disperso em DMEM pH 5,8
BVZ_7,4 (Controle positivo)	Recebeu 25µL do Avastin® disperso em DMEM pH 7,4

No 17º dia, imagens foram adquiridas *in ovo* e, posteriormente, os embriões foram fixados com a utilização de formaldeído 3,7% e colocados a -70 °C por um período de 10 min. Amostras da membrana carioalantóica foram cortadas e processadas para a quantificação de vasos sanguíneos (MARTINHO *et al.*, 2012; SILVA-CORREIA *et al.*, 2012; MARTINHO *et al.*, 2013).

Para efetuar a contagem, utilizou-se software ImageJ 1.48v determinando-se uma área de 300x300 pixels constante em torno dos hidrogéis. As contagens foram efetuadas por diferentes pesquisadores para minimizar erros e valores médios foram utilizados no processamento dos resultados. A Figura 9 representa esquematicamente o procedimento utilizado no ensaio de atividade antiangiogênica utilizando a CAM.

Figura 9: Representação esquemática do ensaio de atividade antiangiogênica dos sistemas utilizando CAM. O procedimento experimental leva em torno de 17 dias a partir da incubação até um dia antes da eclosão dos ovos.



Fonte: Autoria própria

4.2.5.2 *Análise do crescimento e progressão tumoral utilizando modelo membrana carioalantóica de embrião de galinha (CAM)*

4.2.5.2.1 Cultura Celular

Linhagem celular de glioma U251 foi utilizada como modelo de célula tumoral para a realização deste estudo. As células foram fornecidas pelo professor Joseph Costello, Universidade da Califórnia, Departamento de Neurocirurgia, San Francisco. A autenticação foi realizada no Laboratório IdentiCell (Departamento de Medicina Molecular na Universidade Hospital Aarhus Skejby, Århus, Dinamarca). A linhagem celular foi mantida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco, Invitrogen) e 1% de solução de penicilina / estreptomicina (Gibco, Invitrogen) a 35 °C e 5% CO₂ (MIRANDA-GONCALVES *et al.*, 2013).

4.2.5.2.2 Ensaio CAM

Para avaliar o crescimento e progressão do tumor, ovos foram inicialmente tratados como especificado no item 4.2.5.1. Entretanto, no 9º dia de desenvolvimento embrionário, as células U251 (2×10^6 células em 20 µL de DMEM) foram colocadas na CAM com a utilização de matrigel como suporte. Em seguida, as janelas foram cobertas e ovos voltaram para a incubadora. No 13º dia de desenvolvimento embrionário, já com microtumores formados na CAM, registrou-se a área e o

perímetro dos tumores e, posteriormente, o grupo teste recebeu 25 µl de hidrogel contendo BVZ (pH 5,8) e o grupo de controle não recebeu tratamento.

No 17º dia do desenvolvimento, a área e perímetro dos tumores foram registrados e, em seguida, os embriões de galinha foram sacrificados utilizando -70 °C por um período de 10 min. As membranas carioalantóica contendo tumores foram excisados, fixadas em formaldeído 3,7%, à temperatura ambiente, e incluídos em parafina para corte histológico. Fotos da CAM *ex ovo* foram utilizadas para a contagem de vasos sanguíneos.

4.2.5.2.3 Avaliação da proliferação celular e vasos sanguíneos de origem embrionária

Análises de imunohistoquímica em secções de CAM contendo microtumores foram realizadas para avaliar a proliferação celular (Ki67) e vasos sanguíneos de origem embrionária utilizando lectina *Sambucus nigra* (SNA-lectina).

Inicialmente, as lâminas de cortes histológicos foram hidratadas para recuperação antigênica utilizando 10 mM de tampão de citrato pH 6,0 (Merck) em microondas para Ki67 e banho-maria para SNA-lectina.

Para inativação de peroxidases endógenas, as lâminas foram incubadas em 3% (v/v) de solução de peróxido de hidrogênio durante 10 min, e, posteriormente, lavadas com tampão fosfato salino (PBS). As lâminas foram então incubadas com solução de bloqueio seguida pela adição de anticorpo primário Ki67 (1:100 *overnight*, Genova) e SNA-lectin (1:300, 2 horas- Vector Laboratories) em temperatura ambiente. Após esse período, foram sequencialmente lavadas com PBS.

Para o ensaio Ki67, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários por 10 min para formação do complexo estreptavidina-biotina peroxidase. Para finalizar, adicionou-se o cromogênio 3-diaminobenzidina (DAB) por um período de 10 min. Todas as lâminas foram, então, submetidas ao processo de contra coloração utilizando hematoxilina (Merck).

As imagens dos cortes histológicos foram adquiridas utilizando aumento de 400x em microscópio Olympus BX16 e software CellP (Olympus).

4.2.6 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando-se ao menos n=3 e comparados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA). Para comparações individuais, realizamos o teste post-hoc de Tukey's adotando *p<0,05 como critério de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Alginato de Sódio

5.1.1 Determinação da massa molecular do polímero utilizando Static Light Scattering (SLS)

Na técnica de espalhamento de luz estático, semelhante ao que ocorre no espalhamento de luz dinâmico, uma fonte de luz incide na amostra e as partículas que compõem esta amostra, dispersam a luz em todas as direções. Entretanto, ao invés de medir as flutuações tempo dependentes na intensidade dessa dispersão, a técnica de espalhamento de luz estático faz uso do tempo médio da intensidade da luz dispersa, sendo esta relacionada à concentração da amostra analisada (MURPHY, 1997).

A partir desta análise é possível determinar não somente a massa molecular média (M_w) da amostra, como também o segundo coeficiente virial (A_2), uma propriedade que descreve a força de interação entre partículas e o meio dispersante (MURPHY, 1997).

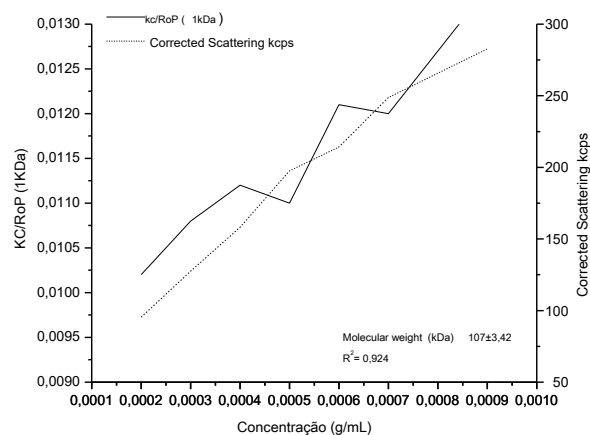
A massa molecular é determinada pela medida do polímero disperso em água, em diferentes concentrações. Esses resultados são, então, aplicados à equação de Rayleigh, que descreve a intensidade da luz dispersa a partir de uma partícula em solução. O padrão interno utilizado para as medidas deve ser um líquido de alta pureza com uma razão de Rayleigh conhecida. Geralmente, utiliza-se para esta finalidade tolueno grau HPLC, cuja razão é descrita em diversos livros de referência (MURPHY, 1997). A intensidade da luz dispersa produzida por uma partícula é proporcional à massa molecular média do polímero e sua concentração. Desta maneira, a massa molecular média (M_w) é obtida através do intercepto da reta.

O conhecimento da massa molecular do polissacarídeo é de fundamental importância para o entendimento da relação estrutura e propriedades. O alginato de sódio utilizado neste estudo apresenta um peso molecular médio (M_w) de $107 \pm 3,42$ kDa e um coeficiente virial $A_2 = 0,00214 \pm 2,74 \cdot 10^{-4}$ mL.mol/g² (Figura 10). Tendo em vista que a massa molecular interfere nas características dos hidrogéis, é extremamente importante o conhecimento desta propriedade quando se pretende delinear sistemas para a liberação de proteínas.

O ácido algínico é um polímero linear de alta massa molar constituído por dois monômeros de base β -D-manuronila e α -L-guluronila conectados entre si por ligações glicosídicas, que variam em quantidade e distribuição sequencial ao longo da cadeia de polímero, dependendo da fonte. Comercialmente, o alginato de sódio é obtido preferencialmente de algas marrons da família

Phaeophyceae, através do tratamento com soluções alcalinas, e possuem uma massa molecular que pode variar de 32 a 400 kDa (LEE e MOONEY, 2012).

Figura 10: Determinação da massa molecular média (Mw) utilizando Static Light Scattering



Na literatura existem pequenas diferenças entre alginatos denominados de baixo, médio e alto peso molecular. Para Bonino e colaboradores (2011), hidrogéis provenientes de alginato de sódio quimicamente reticulados podem possuir suas propriedades ajustadas alterando-se a composição e o M_w das cadeias poliméricas. Alginatos de baixa massa molecular ($M_w < 50\text{kDa}$) possuem a vantagem de se degradar de maneira mais rápida no organismo, fator que pode ser importante quando são utilizados em alguns sistemas terapêuticos, como a regeneração de tecidos em que a degradação do sistema é desejável (BONINO *et al.*, 2011).

Para BOONTHEEKUL e colaboradores (2005), os hidrogéis formados a partir de cadeias de baixo M_w são mais rapidamente degradados no organismo, entretanto, possuem propriedades mecânicas fracas. Assim, a utilização de alginatos com médio M_w pode permitir o controle das propriedades mecânicas do hidrogel, bem como o processo de degradação *in vivo*.

Aumentando o peso molecular do alginato é possível melhorar as propriedades mecânicas resultantes dos hidrogéis por eles produzidos; entretanto, o hidrogel formado a partir de um polímero de alto peso molecular apresenta-se extremamente viscoso, o que é muitas vezes indesejável para determinadas aplicações (LEE e MOONEY, 2012).

5.1.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Grande parte dos compostos com ligações covalentes sejam eles orgânicos ou inorgânicos, absorvem diversas frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do

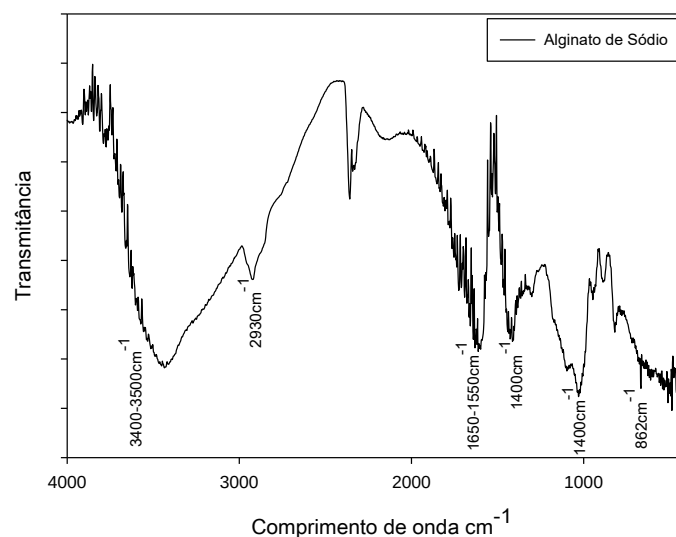
espectro eletromagnético (PAVIA *et al.*, 2010). Essa região corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e do micro-ondas (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

A região vibracional, também denominada infravermelho médio, situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , é a mais utilizada para fins de identificação de compostos (PAVIA *et al.*, 2010).

Cada tipo de ligação tem sua própria frequência de vibração. No entanto, como dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos encontram-se em ambientes levemente diferentes, os padrões de absorção no infravermelho, em duas moléculas de estruturas diferentes, nunca serão exatamente idênticos ainda que as frequências absorvidas nos dois casos sejam iguais. Desta maneira, o espectro de infravermelho pode servir para as moléculas, da mesma forma que as impressões digitais servem para os seres humanos (PAVIA *et al.*, 2010).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a espectrofotometria no infravermelho médio é um ensaio de identificação por excelência, proporcionando a possibilidade de distinguir substâncias com diferenças estruturais. O espectro de absorção na região do infravermelho do alginato de sódio com suas principais bandas de absorção marcadas, estão apresentados na Figura 11.

Figura 11: Espectro de absorção por infravermelho do alginato de sódio com as suas principais bandas de absorção marcadas.

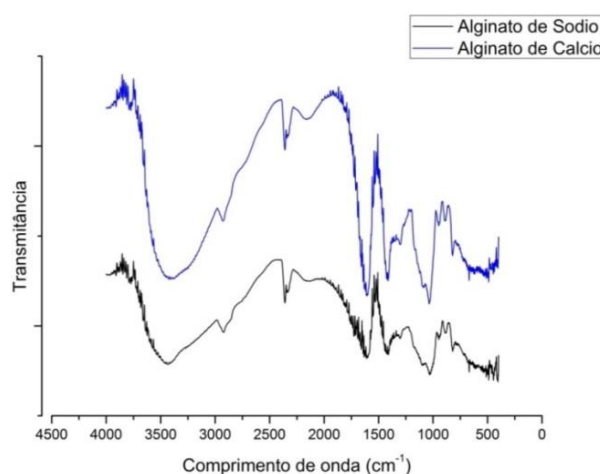


Comparando os dados da literatura com os dados apresentados na Figura 11, é possível observar uma banda larga de absorção na região compreendida entre $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ que corresponde ao estiramento da hidroxila O-H (SILVERSTEIN *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014). O estiramento carbono hidrogênio C-H de hibridização sp^3 é observado em frequências mais baixas que 3000 cm^{-1} , em torno de 2930 cm^{-1} (SARTORI *et al.*, 1997; PAVIA *et al.*, 2010). O

espectro ainda apresenta duas bandas características dos íons carboxilatos ($-\text{COO}$) presentes na cadeia polimérica do alginato de sódio, sendo uma mais intensa e que resulta da deformação axial assimétrica (em torno de $1650\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) e outra mais fraca (em torno de 1400 cm^{-1}), resultante da deformação axial simétrica (LUCINDA, 1999; SAMANTA e RAY, 2014; YANG *et al.*, 2014).

O espectro de IV do alginato de sódio ainda mostra picos correspondentes à vibração do estiramento C-O, característico de sua estrutura de polissacarídeo, que normalmente aparece como duas ou mais bandas, uma mais intensa e mais larga que a outra na faixa de $1300\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ (LAWRIE *et al.*, 2007; PAVIA *et al.*, 2010; SAMANTA e RAY, 2014). É possível ainda observar uma banda em torno de 862 cm^{-1} , correspondente à vibração da ligação Na-O (SAMANTA e RAY, 2014). Os espectros obtidos com alginato de sódio e alginato de cálcio para análise comparativa encontram-se apresentados na Figura 12.

Figura 12: Espectro de absorção por infravermelho do alginato de sódio e alginato de cálcio



Para análise comparativa, uma correlação entre os picos é uma excelente evidência para a identidade de substâncias (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Por conter em sua composição cadeias de ácido manurônico e gulurônico, no momento da adição do cálcio, o alginato apresenta mais de um tipo de coordenação metal-carboxilato, pois estas cadeias irão se comportar de maneira diferente durante o processo de reticulação (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010).

Utilizando o mesmo alginato, foi possível observar mudanças na intensidade das bandas com a adição de cálcio para a reticulação do sistema (Figura 12). SARTORI e colaboradores (1997) concluíram que a espectrofotometria de absorção na região do infravermelho pode fornecer informações referentes ao processo de reticulação que envolve a troca de íons sódio e cálcio. Além disso, verificou-se que com o aumento da concentração de cloreto de cálcio adicionada ao sistema,

a banda da região compreendida entre $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, que corresponde ao estiramento da hidroxila O-H, torna-se mais estreita e de maior intensidade, característico de um aumento nas ligações intramoleculares.

A afinidade de um determinado metal por uma rede polimérica pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles a sua estrutura cristalina, seu potencial de ionização, carga iônica, a massa e o raio do íon metálico, a participação de orbitais interiores na ligação e interações entre bandas adjacentes de grupos hidroxilas (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010).

Podemos observar que com a substituição de íons sódio por íons cálcio nos blocos de alginato, a densidade de carga é alterada de maneira que se cria um novo ambiente que circunda o grupo carbonila. Desta maneira, observa-se uma alteração na intensidade dos picos tanto para a deformação axial assimétrica como para a deformação axial simétrica.

É possível verificar ainda, uma pequena alteração no comprimento de onda correspondente à vibração do estiramento C-O. Para o alginato de sódio, os dois picos ocorrem em 1093 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} , enquanto que para o alginato de cálcio, esses valores apresentam um pequeno decréscimo para 1083 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} . CHEN e colaboradores (2002) observaram uma mudança desta mesma frequência de vibração de 1083 cm^{-1} para 1028 cm^{-1} quando sódio foi substituído por cálcio. Esta alteração ocorre como resultado do enfraquecimento da ligação C-O na presença do cálcio.

5.1.3 Determinação da fração M/G por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

O alginato é constituído por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) dispostos em padrões irregulares de blocos variáveis do tipo MM, MG e GG (MATSUMOTO *et al.*, 1992).

A composição, ou seja, a razão M/G, o comprimento dos blocos G e o peso molecular do polímero são fatores críticos que afetam as propriedades químicas do alginato e dos hidrogéis com ele produzidos (TONNESEN e KARLSEN, 2002).

A razão M/G e o padrão de distribuição dos blocos podem variar de acordo com a população, espécie, localização geográfica e idade da alga e estão relacionadas com suas propriedades funcionais como viscosidade, solubilidade, propriedades reológicas e interações com íons metálicos (SALOMONSEN *et al.*, 2009). A rigidez do polímero, em soluções aquosas, aumenta na proporção $\text{MG} < \text{M} < \text{G}$ (FU *et al.*, 2010).

A capacidade de formar géis na presença de cátions divalentes como o Ca^{+2} é fortemente influenciada pela composição do polímero; determinada pela razão M/G (PENMAN e

SANDERSON, 1972). De maneira geral, alginatos com alta concentração de ácido gulurônico formam géis quebradiços, enquanto aqueles contendo alta concentração de ácido manurônico originam géis mais elásticos e com boa estabilidade térmica (IZYDORCZYK *et al.*, 2005).

A espectroscopia de ^1H RMN é a principal técnica utilizada na investigação da composição e padrões estruturais organizacionais do alginato de sódio (GRASDALEN *et al.*, 1979; PANIKKAR e BRASCH, 1996).

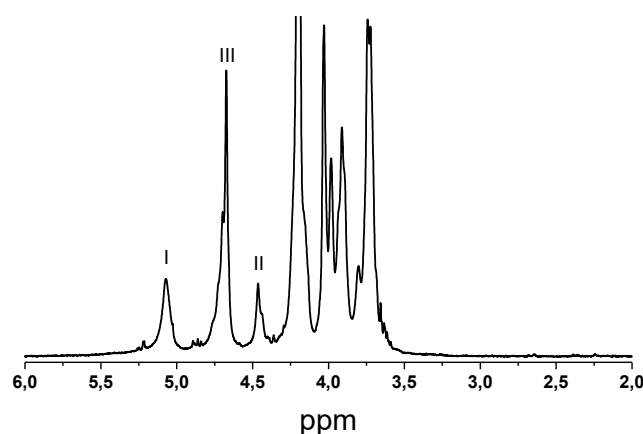
PENMAN e SANDERSON (1972) descreveram um método para a determinação da razão M/G em alginatos utilizando os picos obtidos a partir do espectro RMN ^1H . Posteriormente, Grasdalen e colaboradores (1979) determinaram não somente a razão M/G, como também a proporção de cada díade (GG, MG, GM, MM) na composição do polímero.

As atribuições dos sinais característicos da região anomérica estão bem estabelecidos na literatura (PENMAN e SANDERSON, 1972; GRASDALEN *et al.*, 1979; GRASDALEN, 1983; TORRES *et al.*, 2007; GEORG JENSEN *et al.*, 2012).

Três diferentes sinais são utilizados para realização dos cálculos: um sinal referente ao próton anomérico do ácido gulurônico em torno de 5,2ppm (Pico I); um próximo de 4,7 ppm onde encontram-se sobrepostos o próton anomérico do ácido manurônico e o H_5 dos blocos alternados (pico III); H_5 do ácido gulurônico em torno de 4,5ppm (Pico II) (BERTAGNOLLI *et al.*, 2014).

A Figura 13 mostra o espectro de RMN ^1H para o alginato de sódio submetido ao tratamento de pré hidrólise ácida. O processo é indicado para a obtenção de sinais separados e com uma resolução melhorada facilitando o cálculo da área. A temperatura utilizada (70 °C) possibilita o aumento da resolução espectral e a mudança de sinal do solvente para longe da região de interesse (GRASDALEN *et al.*, 1979).

Figura 13: Espectro RMN ^1H do alginato de sódio em D_2O



A fração dos blocos e a relação M/G foram calculadas de acordo com a metodologia proposta por GRASDALEN (1983) e GRASDALEN *et al.* (1979).

O ácido gulurônico individual (F_G) e os blocos contendo frações pareadas (F_{GG}) são calculados através da área sob os picos (I, II e III) utilizando a Equação 8 e a Equação 9 representadas abaixo (TORRES *et al.*, 2007).

$$F_G = \frac{A_I}{(A_{II} + A_{III})} \quad \text{Equação 8}$$

$$F_{GG} = \frac{A_{III}}{(A_{II} + A_{III})} \quad \text{Equação 9}$$

Desta maneira, a fração M pode ser determinada utilizando-se o valor de F_G de acordo com a Equação 10:

$$F_M = 1 - F_G \quad \text{Equação 10}$$

A fração M/G é determinada pelo quociente entre a fração M e a fração G através da Equação 11.

$$\frac{M}{G} = \frac{F_M}{F_G} = \frac{1 - F_G}{F_G} \quad \text{Equação 11}$$

De acordo com o conteúdo da fração de ácido gulurônico (F_G), o alginato é classificado como "High G-content" ou "Low G-content" (AGULHON *et al.*, 2014). Para o alginato utilizado neste estudo, determinou-se uma fração M/G de 1,93 sendo que valores de $M/G > 1,0$ m uma maior quantidade de blocos M na composição do alginato, caracterizando o material como "Low G-content". A Tabela 3 apresenta o resumo dos resultados obtidos para análise de ^1H RMN.

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos na análise de ^1H RMN de alginato de sódio

Alginato	Composição das frações			Frequência dubletos			Razão	η
	F_M	F_G	F_{MM}	F_{MG}	F_{GM}	F_{GG}	M/G	-----
N1	0,66	0,34	0,56	0,10	0,10	0,24	1,94	0,46
N2	0,68	0,32	0,59	0,09	0,09	0,22	2,15	0,43
N3	0,65	0,35	0,57	0,08	0,08	0,27	1,84	0,35
Média	0,658	0,342	0,556	0,102	0,102	0,241	1,927	0,413
Desvio Padrão	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,16	0,06

A razão M/G é um importante parâmetro que pode determinar a aplicação do polímero. Alginato contendo altas frações M/G são mais flexíveis e interessantes na obtenção de complexos polieletrólíticos como micro e nano partículas (BERTAGNOLLI *et al.*, 2014). Do ponto de vista biológico, a razão M/G para o alginato pode ainda representar um parâmetro relacionado com o processo ou controle da biodegradabilidade (BONINO *et al.*, 2011).

Jensen e colaboradores (2012) estudaram a influência da razão M/G de diferentes alginatos nas propriedades reológicas e na capacidade de absorção de água. Os resultados mostram que com razões M/G mais baixas, o alginato pode formar géis mais resistentes, capazes de absorver maiores quantidades de água.

O parâmetro η (Equação 12) pode ser adotado para elucidar a disposição de blocos na cadeia polimérica, ou seja, sua alternância. Para valores $0 < \eta < 1$, a estrutura de blocos é predominantemente homopolimérica; para $1 < \eta < 2$, adota-se uma estruturação alternada (GRASDALEN *et al.*, 1979; LARSEN *et al.*, 2003; AGULHON *et al.*, 2014).

$$\eta = \frac{F_{GM}}{F_M + F_G}$$

Equação 12

5.2 Estudos de pré-formulação

5.2.1 Avaliação da interação polímero (alginato): proteína (BVZ)

A mistura de polieletrólitos de cargas opostas em solução aquosa resulta na formação espontânea de complexos polieletrólíticos através de interações eletrostáticas que podem proporcionar o desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos com propriedades físico químicas moduláveis (MOUSTAFINE *et al.*, 2008; ČALIJA *et al.*, 2013).

Tendo em vista que em pH 7,4 o alginato possui uma carga residual negativa e o BVZ (Ponto isoelétrico= 8,3), uma carga residual positiva, utilizamos a mistura de polieletrólitos de cargas opostas no desenvolvimento dos hidrogéis. Para determinar qual a melhor fração polímero: proteína a ser utilizada para o desenvolvimento de sistemas estáveis e funcionais, analisou-se o tamanho de partículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, avaliou-se a polidispersidade dos complexos formados, o potencial zeta dos complexos e a eficiência de associação entre os polieletrólitos.

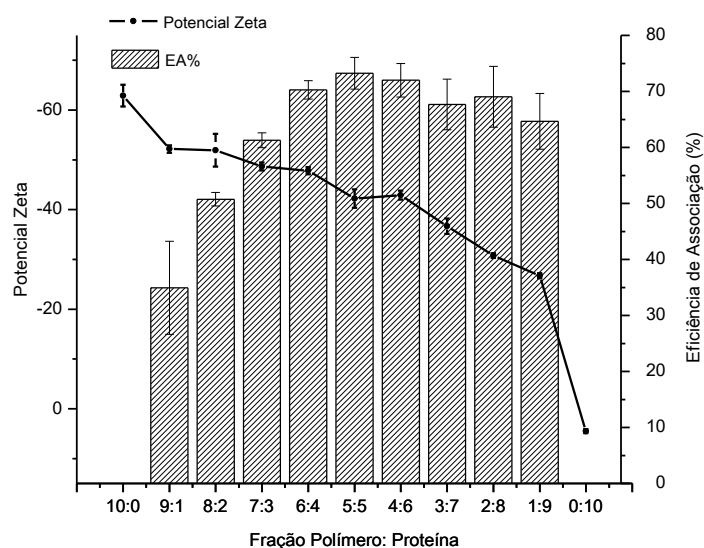
A medida do potencial zeta é consequência da existência de cargas de superfície que podem revelar informações relativas às interações supramoleculares entre polieletrólitos dispersos. A

medida é realizada através da mobilidade eletroforética que envolve a migração de uma partícula em virtude de um campo magnético externo (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005).

O conceito de potencial zeta vem sendo amplamente explorado na ciência dos coloides no sentido de compreender as interações entre partículas e a estabilidade de um sistema coloidal. A determinação da estabilidade de um sistema consiste na utilização da somatória das forças de repulsão que atuam na dupla camada elétrica da partícula para estimativa do potencial de interação entre essas partículas (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005).

Na Figura 14, estão ilustrados os resultados de potencial zeta e eficiência de associação para as diferentes proporções polímero: proteína estudadas.

Figura 14: Potencial zeta e eficiência de associação (EA%) em pH 7,4, para as diferentes proporções estudadas



Através dos resultados obtidos, é possível visualizar que o polímero disperso em água na concentração de 0,5 mg/mL possui um potencial zeta de aproximadamente -60 mV. Para a dispersão de alginato, a carga negativa está relacionada aos grupos carboxilatos presentes no polissacarídeo e para o pH estudado, esta carga negativa não possui uma alteração significativa (PEINADO *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2014). Por outro lado, uma dispersão contendo a proteína na mesma concentração apresentou um potencial zeta de aproximadamente 9 mV no pH estudado. A associação desses polieletrólitos em diferentes frações promoveu a alteração nos valores de potencial zeta. As diferentes cargas resultantes desta associação sugerem a ocorrência de interações eletrostáticas entre ambos: à medida que a concentração de proteína no meio foi aumentando, o valor de potencial zeta foi se tornando menos negativo.

Para a fração 5:5, em que temos 0,25 mg/mL de polímero e 0,25 mg/mL de proteína, o potencial zeta foi aproximadamente -40 mV. Para a fração 1:9 (0,05 mg/mL de polímero e 0,45 mg/mL de proteína), o valor de potencial zeta caiu para aproximadamente -25 mV. É importante observar que embora a proporção de polímero no sistema seja pequena, o fato de polímero disperso apresentar uma alta concentração de cargas negativa irá resultar em uma carga residual com valores negativos.

Os valores de potencial zeta podem indicar a estabilidade física do sistema. De maneira geral, quando partículas possuem um alto valor de potencial zeta, seja ele positivo ou negativo, na faixa de -30 ou +30, a repulsão entre elas deve ser suficiente para manter a estabilidade do sistema (BENITA e LEVY, 1993). Por outro lado, fora deste intervalo, verifica-se a minimização de forças repulsoras que irão prevenir a agregação de partículas (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005)

Quando o cloreto de cálcio foi adicionado ao polímero disperso em água, o valor de potencial zeta alterou de -60 mV para aproximadamente -30 mV. Entretanto, esse processo foi realizado com a adição de pequenas concentrações de cloreto de cálcio, pois o aumento da concentração resulta na formação de hidrogéis mais viscosos, o que impossibilita a avaliação deste parâmetro. Wongsagonsup e colaboradores (2005) utilizaram a medida do potencial zeta para monitorar o grau de substituição e o processo de reticulação em moléculas de amido. A introdução de grupamentos fosfato aumentou a carga negativa do amido, alterando os valores finais de potencial. Observou-se uma forte correlação entre as variáveis analisadas de maneira que os valores de potencial zeta possam ser utilizados para o monitoramento do processo de reticulação (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005).

Para monitorar a eficiência de associação entre o polímero e a proteína, foi elaborada uma curva analítica utilizando BVZ em diferentes concentrações, como especificado pelo Kit Pierce™ BCA Protein Assay –Thermo Scientific. Todas as amostras foram analisadas de maneira que os valores encontrados estivessem contemplados pela curva de calibração utilizada ($r^2=0,9952$); quando necessário, procedeu-se a concentração ou a diluição da amostra.

Para os valores de eficiência de associação entre o polímero e a proteína, observou-se que para a fração 9:1 (0,45 mg/mL de polímero e 0,05 mg/mL de BVZ) a percentagem de proteína associada é $34,9 \pm 8,3\%$. Já para a fração 9:2 (0,4 mg/mL de polímero e 0,1 mg/mL de BVZ), essa eficiência sobe para $52,16 \pm 0,7\%$. Para as demais frações, os valores de eficiência de associação ficam entre 60 e 75 %. A máxima eficiência de associação é alcançada na fração 5:5 (0,25 mg/mL de polímero e 0,25 mg/mL de BVZ). A alta eficiência de associação neste caso pode ser explicada pela maior disponibilidade de sítios de interação entre a proteína e o poliânion. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as frações 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9. Neste sentido, os resultados

sugerem que a associação entre polímero e proteína é favorecida pela presença de altas concentrações de BVZ. Além disso, podemos sugerir que o polímero pode apresentar maior capacidade de interação com a proteína do que a máxima concentração de proteína testada.

A adição da dispersão polimérica com o BVZ produziu sistemas particulados nucleados através de interações entre proteína e poliânion. A formação desses sistemas é resultado de interações supramoleculares, predominantemente eletrostáticas, entre grupos amino do BVZ com grupo carboxílico do alginato. A turvação do meio pode ser uma evidência da ocorrência dessas interações de maneira que muitos autores utilizam medidas de turbidez para monitorar a formação desses complexos polieletrólitos (PEINADO *et al.*, 2010).

Schweizer e colaboradores (2013) utilizaram medidas de turbidez para monitorar a formação de complexos polieletrólitos entre alginato e mAbs. Neste estudo, os resultados revelaram a existência de interações eletrostáticas entre os mAbs e a matriz aniônica independente dos valores de pH e força iônica, de maneira que esta interação seja mais evidente em valores de pH ácido. Como a proposta deste estudo consiste no desenvolvimento de um hidrogel para ser administrado localmente na terapia anti-tumoral, a interação entre polímero e proteína em pH ácido pode proporcionar a liberação modificada do BVZ diante das características encontradas na microrregião tumoral.

Interações eletrostáticas são a força motriz capaz de formar um complexo entre a proteína e o poliânion (complexos polieletrólitos), sendo a formação desses complexos, dependente de muitos fatores como peso molecular, concentração, razão entre os polieletrólitos que interagem, força iônica, pH e temperatura (CHOLLAKUP *et al.*, 2010).

Os resultados de diâmetro médio de partículas (nm) e polidispersidade (PDI) dos complexos polieletrólitos estudadas estão ilustrados nas Figura 15 e Figura 16, respectivamente.

Figura 15: Medidas de diâmetro médio (nm) dos complexos polieletrólíticos estudados

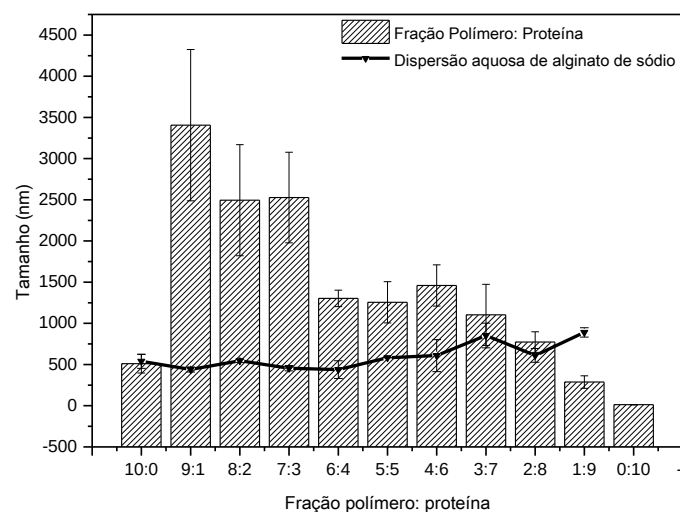
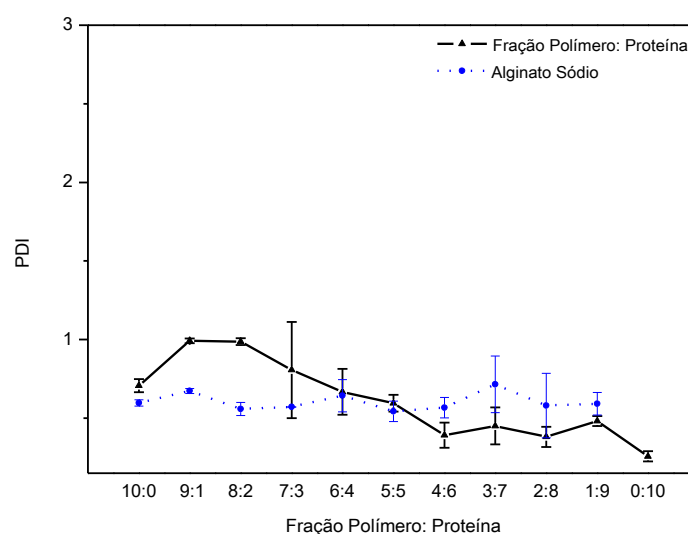


Figura 16: Polidispersidade (PDI) para os complexos polieletrólíticos estudados



De acordo com os resultados apresentados nas figuras 15 e 16, podemos verificar que, exceto para as frações 3:7; 2:8 e 1:9, a associação do polímero e BVZ ocasionou a formação de partículas maiores que os resultados encontrados quando alginato de sódio foi analisado na mesma concentração.

Quando analisado na concentração de 0,5 mg/mL, as partículas de alginato possuem um diâmetro médio de 539 ± 84 nm. Por outro lado, o BVZ disperso em água na mesma concentração, apresentou diâmetro médio de $12,45 \pm 0,8$ nm. A utilização de 0,45 mg/mL de polímero com 0,05 mg/mL de BVZ gerou a formação de micropartículas de $3,4 \pm 0,9$ μ m e alta polidispersidade. Entretanto, essas partículas tiveram seu tamanho diminuído à medida que se diminuiu a

concentração do polímero no meio e aumentou-se a concentração de BVZ. Uma mudança na distribuição de diâmetro de partículas é uma forte evidência da existência de interações específicas entre polieletrólitos de cargas opostas (FEFELOVA *et al.*, 2007).

Os valores de PDI foram variáveis nas frações estudadas. Com elevadas proporções de polímero, os complexos formados são altamente polidispersos (± 1). Esses valores vão reduzindo à medida que a concentração de polímero diminui. Desta maneira, o aumento da proporção de proteína leva a formação de sistemas mais homogêneos. O PDI é um valor adimensional e indica se amostra é monodispersa, ou seja, se ela possui uma distribuição de diâmetro das partículas homogênea (AZEVEDO *et al.*, 2014).

Em geral, um PDI acima de 0,2 indica que a amostra não apresenta elevada homogeneidade (SILVA MDOS *et al.*, 2011). Desta maneira, as amostras são consideradas polidispersas.

A associação de alginato e quitosana no desenvolvimento de nanopartículas para encapsulação de vitamina B₂ apresentou valores de PDI de aproximadamente 0,4 (AZEVEDO *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado que sistemas particulados formados por interações eletrostáticas tais como nanopartículas formadas pela associação entre policátions e poliânions, possuem elevado índice de polidispersidade muito provavelmente devido à natureza complexa dessas interações (RICHARDSON *et al.*, 2001; BAGRE *et al.*, 2013).

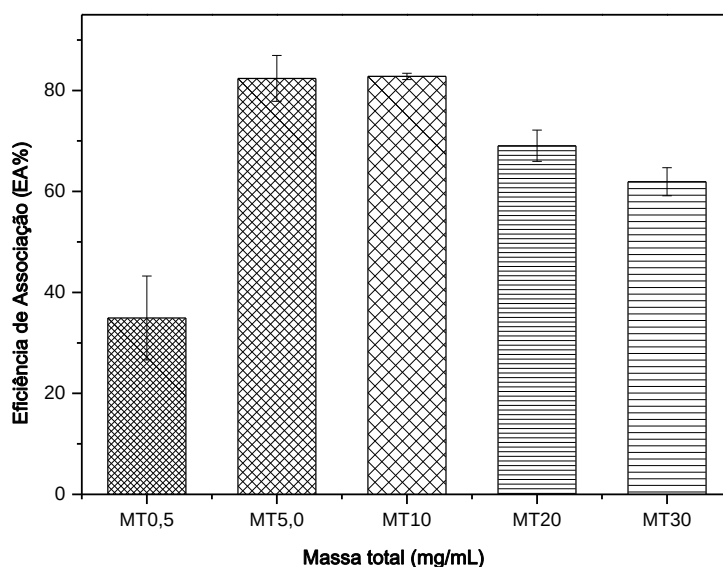
Com os resultados de diâmetro médio de partículas apresentados (Figura 15), verificou-se a ocorrência de interação supramoleculares, predominantemente eletrostáticas, entre o BVZ e o alginato e avaliou-se a magnitude desta interação através das medidas de potencial zeta, eficiência de associação, tamanho de partículas e PDI. De maneira geral, matrizes poliméricas carregadas negativamente como o alginato, possuem uma grande capacidade de interação com BVZ no pH estudado, formando complexos de tamanhos variados (dependente da fração dos constituintes), com valores variados de polidispersidade.

5.2.2 Concentração x Eficiência de Associação (EA%)

Com o objetivo de estudar a influência da massa total (polímero + proteína) em relação à eficiência de associação desses polieletrólitos, elevamos a concentração final dos constituintes para 10, 20 e 30mg/mL mantendo-se a proporção polímero proteína em 9:1 e o pH das dispersões em 7,4, valor em que os grupamentos de ácido carboxílico presentes no alginato encontram-se ligeiramente dissociados (YANG *et al.*, 2009). Na Figura 17, estão os resultados de eficiência de associação (%), em relação à massa total de polieletrólitos adicionada ao meio.

De acordo com os resultados, podemos verificar que o aumento de concentração de massa de 0,5 para 5 mg/mL resultou em mudanças significativas na capacidade de associação entre esses polieletrólitos: valor de EA% aumentou de $34,9 \pm 8,0\%$ para $82,4 \pm 4\%$. Para um nível de significância $p < 0,05$, amostras contendo 5 e 10 mg/mL de massa total mostraram a mesma eficiência de associação (aproximadamente 82%). Por outro lado, o aumento da massa de 10 mg/mL para 20 e 30 mg/mL resultou em uma pequena queda de EA%. Esses resultados podem sugerir uma alteração na conformação das cadeias poliméricas que pode, de certa maneira, prejudicar o processo de interação proteína – poliânion.

Figura 17: Eficiência de associação (%) em relação à massa total de polieletrólitos (polímero + proteína) adicionada ao meio.



Interações eletrostáticas entre proteína e polissacarídeo de cargas opostas são, na maioria dos casos, as interações primárias e prevalentes que governam a formação de partículas. No entanto, em alguns exemplos, essas interações primárias podem ser dirigidas por ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (DOUBLIER *et al.*, 2000).

Gu e colaboradores (2004) exploraram interações eletrostáticas entre alginato, matriz negativamente carregada, e VEGF, que em pH 7,4 apresenta uma carga positiva, para o desenvolvimento de sistemas de liberação com altos valores de eficiência de encapsulação. Recentemente alguns estudos relataram a capacidade de interação do BVZ com poliânions e superfícies carregadas negativamente para o desenvolvimento de sistemas de liberação desta proteína (ANDREW *et al.*, 2010; SCHWEIZER *et al.*, 2013).

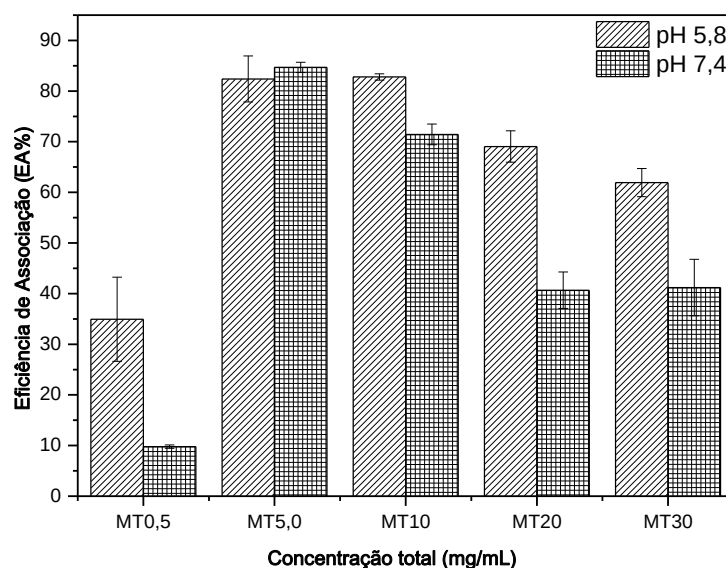
Assim, sabendo que as interações entre alginato e BVZ são dirigidas por interações supramoleculares, predominantemente eletrostáticas, é possível inferir que em maiores concentrações de polieletrólitos, as cadeias poliméricas estão organizadas em uma conformação que favorece sua interação com BVZ, através da maior disponibilidade de sítios de interação. Entretanto, o aumento excessivo desta concentração pode promover a compactação do polímero no meio, de maneira que essa forma disponibilize menos sítios ativos capazes de interagir com BVZ, consequentemente ocasionando a queda na EA%. Pode-se supor que a interação ideal entre proteínas e polissacarídeos ocorra em um equilíbrio crítico entre a densidade de carga dessas moléculas em determinado ambiente e a rigidez dessas moléculas ou partículas (DOUBLIER *et al.*, 2000).

Para poliácidos e polibases, nos quais o grau de dissociação é dependente do pH, a formação de complexos polieletrólíticos ocorre apenas em um intervalo limitado de pH. Devido à natureza lábil desta ligação, a densidade de carga responde a pequenas alterações nas condições locais, de maneira que as interações ocorram de forma diferenciada em função do pH (GUCHT *et al.*, 2011).

Para analisar a magnitude da interação entre polieletrólitos de cargas opostas frente a diferentes valores de pH, avaliou-se a eficiência de associação para os valores de pH 7,4 e 5,8.

Na Figura 18, encontram-se os valores de eficiência de associação (%) para diferentes concentrações de polieletrólitos em diferentes valores de pH.

Figura 18: Eficiência de associação entre polímero (alginato) e proteína (BVZ) em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de massa total.



De acordo com a Figura 18, podemos verificar que, exceto para a concentração de 5 mg/mL, o pH influenciou a eficiência de associação (%).

O alginato possui grupamentos COO^- e COOH ao longo da cadeia que conferem diferentes densidades de carga, dependendo do pH do meio (YANG, J. *et al.*, 2009). Desta maneira, a alteração da densidade de carga frente a alterações de pH, podem disponibilizar ou reduzir os sítios capazes de interagir com BVZ resultando em diferentes valores de eficiência de associação. Polieletrólitos de cadeias flexíveis e origem natural são tipicamente carboxilados ou sulfatados. A formação de complexos entre polímeros e proteínas envolve uma série de interações supramoleculares que sofrem grande efeito de pH, uma vez que a mudança de valores irá proporcionar a disponibilidade de grupos carboxílicos doadores. A mais forte evidência para a ocorrência destas interações resulta de variações estruturais sistemáticas desses complexos ou, ainda, de dados termodinâmicos que exibem entalpia e entropia típicas de interações hidrofóbicas ou eletrostáticas (COOPER *et al.*, 2005). Yang e colaboradores (2009) analisaram a interação entre alginato e um tensoativo catiônico em função de diferentes valores de pH. Para esta interação, a diminuição do pH afetou a associação entre alginato e tensoativo através de modificações nas interações eletrostáticas e hidrofóbicas. As interações entre polieletrólitos e proteínas têm sido extensivamente pesquisadas na literatura (DOUBLIER *et al.*, 2000; MATSUDO *et al.*, 2003; TURGEON *et al.*, 2003; LEONARD *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2005).

5.2.3 Caracterização estrutural do BVZ em diferentes valores de pH e na presença do alginato

5.2.3.1 Dicroísmo Circular (DC)

Dentre todos os problemas envolvidos no desenvolvimento de novos sistemas de liberação para a incorporação de biofármacos como peptídeos e proteínas, a estabilidade dessas moléculas certamente continua sendo o maior desafio a ser superado (BILATI *et al.*, 2005).

A estabilidade química de biofármacos envolve a integridade da sequência de aminoácidos que compõem sua estrutura (relacionados à estrutura primária), além da reatividade das cadeias laterais. Para peptídeos, a atividade está relacionada à estrutura primária e, possivelmente, à secundária. No caso das proteínas, existe a estrutura terciária e muitas vezes a quaternária que permitem o dobramento das moléculas que irão adquirir uma determinada conformação espacial tridimensional (WOLF *et al.*, 2003; BILATI *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional de uma proteína é essencial para que ela possa exercer sua atividade farmacológica. Pequenas mudanças estruturais podem resultar na ocorrência de toxicidade ou imunogenicidade, bem como a perda de sua atividade (PATEL *et al.*, 2014).

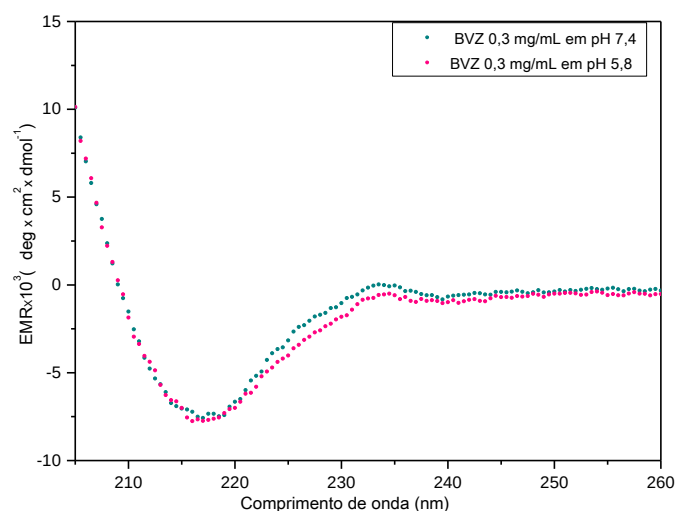
A espectroscopia de dicroísmo circular oferece diversas vantagens quando se pretende estudar a estabilidade da molécula relacionada à sua estrutura secundária. Trata-se de uma técnica de rotina que exige baixas concentrações para a obtenção de bons resultados. Além disso, a técnica possui alta robustez, o que impede que as medidas sejam afetadas pela presença da solução circundante (ABOEL DAHAB e EL-HAG, 2014).

A maior aplicação da técnica consiste na determinação de alterações estruturais que podem prejudicar sua conformação ou estabilidade, resultantes de mudanças ambientais como modificações de pH, concentração salina e temperatura. A técnica é ainda empregada para estudos de interações proteicas (ABOEL DAHAB e EL-HAG, 2014).

Os espectros resultantes da análise DC proporcionam informações conformacionais referentes à estrutura α -hélice e β -folha além de possibilitar a detecção de alterações mínimas na sua conformação (PATEL *et al.*, 2014)

Avaliando o espectro do BVZ em diferentes valores de pH (Figura 19) verificou-se que para ambos os valores os sinais são semelhantes. É possível notar uma pequena diferença na região 225 nm. Entretanto, observando a análise dos elementos de estrutura secundária (Tabela 4) não houve alterações significativas quando BVZ foi submetido a ambientes com diferentes valores de pH.

Figura 19: Espectro de Dicroísmo Circular: BVZ em diferentes valores de pH



Na região do UV distante, anticorpos monoclonais do tipo IgG apresentam um sinal negativo para o espectro de CD em torno de 217 nm, característico da conformação β -folha. Para esta classe, é evidente que esta é a estrutura secundária dominante (ABOEL DAHAB e EL-HAG, 2014). Para o bevacizumabe, uma banda negativa entre 210 e 220 nm reproduz informações referentes à folha β (TYAGI *et al.*, 2013).

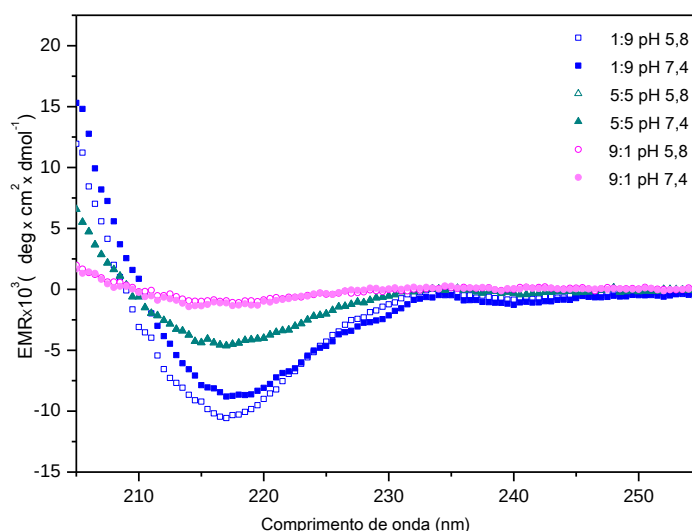
Tyagi e colaboradores desenvolveram blendas responsivas ativadas pela utilização de luz para a administração supracoroidal de bevacizumabe. Assim como nos hidrogéis, a obtenção do sistema no qual a proteína foi incorporada não envolvia etapas críticas como a utilização de solventes orgânicos ou altas temperaturas que pudessem provocar alterações estruturais em suas cadeias. A integridade conformacional do bevacizumabe foi constatada com o espectro de CD que confirmou a ausência de mudanças estruturais (TYAGI *et al.*, 2013).

Tabela 4: Parâmetros estruturais do BVZ em diferentes valores de pH e em diferentes proporções polímero: proteína

Parâmetros estruturais	pH	α -hélice (%)	β -antiparalela (%)	β -paralela (%)	Volta β (%)	Randômica
0,3 mg/mL BVZ	pH 5,8	5,1 $\pm$ 0,2	41,5 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,2	34,6 $\pm$ 0,2
	pH 7,4	5,3 $\pm$ 0,1	41,2 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,1
Fração	pH 5,8	4,9 $\pm$ 0,1	41,7 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 0,1	34,7 $\pm$ 0,1
	1:9 pH 7,4	4,7 $\pm$ 0,0	43,0 $\pm$ 0,0	5,4 $\pm$ 0,0	16,7 $\pm$ 0,0	34,6 $\pm$ 0,0
	pH 5,8	4,6 $\pm$ 0,0	42,7 $\pm$ 0,0	5,4 $\pm$ 0,0	17,3 $\pm$ 0,0	34,7 $\pm$ 0,0
	5:5 pH 7,4	4,6 $\pm$ 0,1	42,7 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,1	34,7 $\pm$ 0,1
	pH 5,8	3,6 $\pm$ 0,3	44,9 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3	18,5 $\pm$ 0,3	34,9 $\pm$ 0,3
	9:1 pH 7,4	3,9 $\pm$ 0,1	45,7 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,1	35,3 $\pm$ 0,1

Para analisar a influência do alginato na estrutura secundária do BVZ, as frações 1:9, 5:5 e 9:1 foram analisadas e os dados obtidos encontram-se na Figura 20 e Tabela 4.

Figura 20: Espectro dicroísmo circular: BVZ na presença do alginato em diferentes proporções e diferentes valores de pH



Grande parte dos métodos empregados para encapsular proteínas em sistemas poliméricos particulados resultam em consideráveis efeitos danosos sobre a integridade estrutural das proteínas, muitas vezes ocasionando perda ou diminuição de sua atividade (BILATI *et al.*, 2005; YANDRAPU *et al.*, 2013).

Para as frações estudadas, observamos que o sinal de DC torna-se menor, à medida que a concentração de proteína no meio é reduzida, ou seja, no sentido 1:9 para 9:1. Tendo em vista que a concentração é diretamente proporcional à intensidade do sinal, esses resultados estão coerentes com as concentrações estudadas. Para a fração em que se tinha a menor concentração de proteína 9:1 (0,05 mg/mL de BVZ), o sinal foi muito discreto, ainda que tenha sido detectado. Para que se tenha a melhora de sinal em DC, alguns parâmetros como caminho óptico, tempo de resposta ou velocidade de varredura devem ser modificados.

Ao avaliar os elementos da estrutura secundária do BVZ na presença do alginato (Tabela 4), observamos que, em relação às demais frações, a fração 9:1 apresentou uma ligeira diminuição no percentual de α -hélice e aumento de percentual de folha β . Essas pequenas alterações, entretanto, podem não estar associadas a qualquer prejuízo a sua estrutura, uma vez que podem ser resultantes da baixa concentração de BVZ no meio.

Ao avaliarmos as diferentes frações em relação aos valores de pH, podemos observar que, exceto para a fração 1:9, não foram encontradas diferenças significativas no espectro de DC. Na fração 1:9, que continha a maior concentração de BVZ (0,45 mg/mL), observamos que em pH 5,8 houve um aumento na intensidade do sinal de DC. O alargamento da banda, acompanhado do

aumento de intensidade de sinal negativo, pode indicar o início do desdobramento da proteína e o aparecimento de uma nova forma de folha β (ABOEL DAHAB e EL-HAG, 2014).

A intensidade dos espectros de DC pode ser influenciada pela rigidez da proteína, a natureza do ambiente em termos de ligações de hidrogênio, presença de grupos polares além da mobilidade das cadeias laterais. A magnitude de variações frente a mudanças de pH irão depender da estrutura da proteína e proporção relativa dos aminoácidos que a compõem (ABOEL DAHAB e EL-HAG, 2014).

Alguns autores relatam a utilização de agentes protetores como a trealose, capazes de evitar a ocorrência de modificações estruturais em BVZ quando incorporados à nanopartículas de PLGA produzidos com a utilização de solventes orgânicos (VARSHOCHIAN *et al.*, 2013). Outros agentes como albumina e pluronic foram capazes de preservar a estrutura da enzima L-asparaginase incorporada em nanopartículas pela técnica de dupla emulsão (WOLF *et al.*, 2003).

1.1.1.1 Espectroscopia de Fluorescência

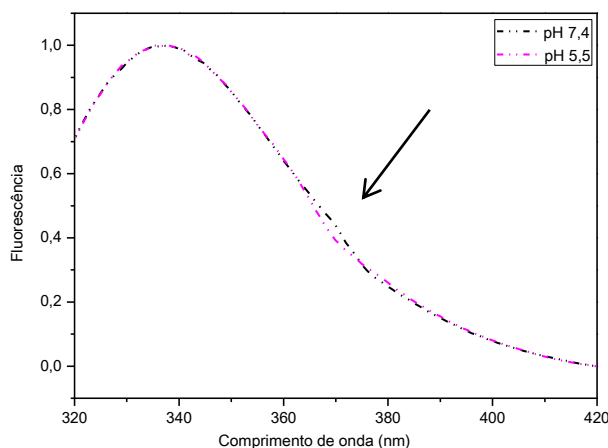
A fluorescência é um fenômeno que ocorre em compostos que apresentam alguns grupos particulares, denominados fluoróforos. Esses compostos, quando excitados em determinado comprimento de onda, são capazes de emitir luz. Essa luz está diretamente relacionada ao retorno de um elétron de estado excitado para um orbital de nível de energia mais baixo (estado fundamental) (CAMPANA, 1998).

Nas proteínas, os fluoróforos intrínsecos são formados por aminoácidos contendo anéis aromáticos como fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo o triptofano, o principal deles. O estudo desses fluoróforos pode fornecer informações importantes sobre a estrutura e interações de uma série de proteínas (STRYER, 1968).

As proteínas absorvem luz em comprimentos de onda próximos a 280nm decorrente do conteúdo de seus anéis aromáticos. Quando excitados, exibem um máximo de emissão no intervalo entre 320 e 350 nm (CAMPANA, 1998).

Para verificar a influência do pH na estrutura terciária do BVZ, realizamos a análise fluorimétrica do BVZ na concentração de 0,3 mg/mL em tampão fosfato acetato 50 Mm (pH 7,4 e 5,8). Os espectros relativos aos tampões foram subtraídos das medidas do BVZ. Na Figura 21, podemos visualizar os espectros de fluorescência do BVZ para diferentes valores de pH.

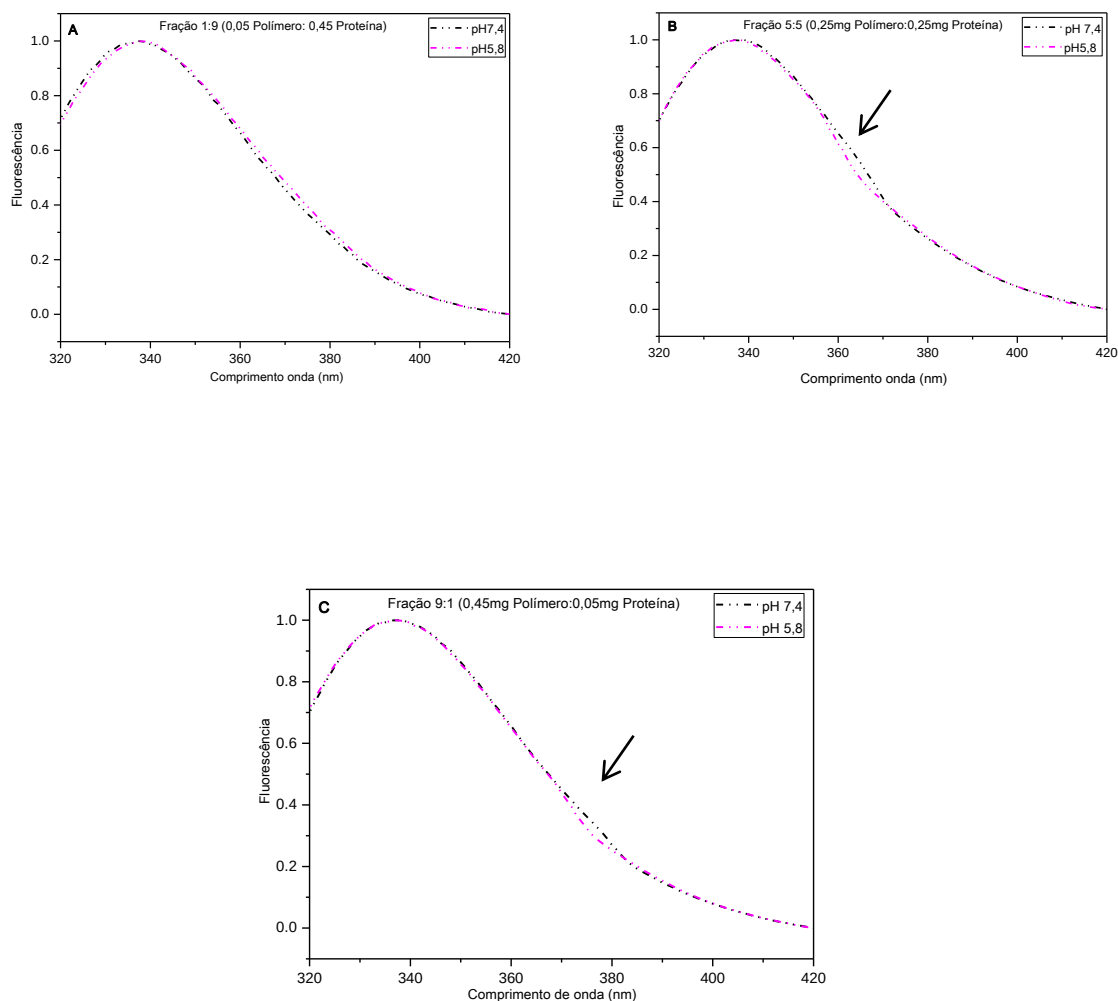
Figura 21: Espectros de fluorescência intrínseca ao triptofano: efeito do pH sobre a estrutura terciária do BVZ. Dados normalizados.



Os espectros mostraram uma pequena supressão de fluorescência para BVZ em pH 5,8 na região de 380 nm. Entretanto, a própria alteração de pH modifica o ambiente em que esses aminoácidos estão expostos de maneira que esses resultados são esperados. Tendo em vista que o λ máximo e o centro de massa espectral [λ] foram estatisticamente iguais (Tabela 5), podemos afirmar que não houve alterações na estrutura terciária do BVZ quando exposto a diferentes valores de pH. Pequenas diferenças ocasionadas pela alteração do pH do meio já foram relatadas por outros autores (SONG *et al.*, 2015).

Ainda utilizando a espectroscopia de fluorescência, avaliamos possíveis alterações na estrutura terciária de BVZ resultantes da presença do alginato no meio utilizando diferentes proporções, em diferentes valores de pH. Para isso, selecionamos as frações 1:9, 5:5 e 9:1 anteriormente estudadas (Figura 22).

Figura 22: Espectros de fluorescência intrínseca ao triptofano: BVZ na presença de alginato em diferentes proporções e diferentes valores de pH. Dados normalizados para (A) Fração 1:9 , (B) Fração 5:5 e (C) Fração 9:1



Assim como os espectros apresentados em diferentes valores de pH, avaliando a presença do alginato, verificou-se que para as frações 5:5 e 9:1 houve uma pequena supressão de fluorescência em pH 5,8. Entretanto, para todas as frações analisadas, independente dos valores de pH, o comprimento de onda máximo foi de aproximadamente 337 nm (Tabela 5), de maneira que não houve diferenças significativas em relação aos valores obtidos.

Tabela 5: Espectroscopia de fluorescência: parâmetros estruturais avaliados em diferentes valores de pH e na presença de diferentes proporções de alginato

Amostra	pH	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	$[\lambda]$ (nm)
BVZ 0,3mg/mL	5,8	338	342,5
	7,4	337	344
Fração 1:9	5,8	338	339,3
	7,4	337	342,6
Fração 5:5	5,8	338	333,7
	7,4	336	338,8
Fração 9:1	5,8	337	332,6
	7,4	338	334,2

5.2.4 Microcalorimetria Exploratória Diferencial (NanoDSC)

As proteínas apresentam uma elevada complexidade estrutural mantida por interações fracas não covalentes, de maneira que a entalpia dessas interações está na ordem de 5 a 20 Kcal.mol⁻¹ (equivalente as ligações de hidrogênio). A perturbação dessas interações pode ser causada por fatores como a temperatura, pH, concentração iônica, tensão de cisalhamento, interações de superfície ou secagem por congelamento. A análise térmica é uma ferramenta muito útil para detectar os efeitos de tais fatores sobre a estabilidade de fármacos proteicos (CHEN e OAKLEY, 1995).

A microcalorimetria exploratória diferencial mede a evolução de calor que ocorre durante mudanças controladas de temperatura e tem sido utilizada para estudar parâmetros termodinâmicos associados a essas mudanças, além da verificação da ocorrência de desnaturação térmica em sistemas contendo proteínas (COOPER *et al.*, 2005).

Assim como os demais anticorpos monoclonais, o BVZ apresenta uma elevada complexidade estrutural, com a presença de múltiplos domínios na sua estrutura proteica. A molécula apresenta duas cadeias pesadas idênticas que constituem a fração Fab e duas cadeias leves idênticas constituindo a fração Fc, contendo em ambos os domínios variáveis e constantes que originam o aparecimento de duas transições térmicas. De acordo com os resultados apresentados (Tabela 6), podemos verificar a ocorrência de duas transições térmicas.

Tabela 6: Parâmetros calorimétricos do BVZ em diferentes valores de pH, na presença e ausência do alginato.

		pH	Formulação	
			BVZ	BVZ+Alginato
1º Evento	T _{Máx} (°C)	7,4	69,58±0,00	72,69±0,00
	ΔH (Kcal mol ⁻¹)		334,985±0,00	547,8664±65,10
2º Evento	T _{Máx} (°C)		82,93±0,00	84,17±0,00
	ΔH (Kcal mol ⁻¹)		27,2044±0,00	25,90±5,71
1º Evento	T _{Máx} (°C)	5,8	65,52±0,00	72,73±0,07
	ΔH (Kcal mol ⁻¹)		399,981±0,00	547,8182±54,68
2º Evento	T _{Máx} (°C)		84,03±0,00	84,24±0,08
	ΔH (Kcal mol ⁻¹)		25,9596±0,00	38,76±2,26

Para o BVZ, a primeira transição, próxima a 70°C, está relacionada ao desdobramento do fragmento Fab enquanto a segunda transição, próxima a 80°C, é atribuída aos demais domínios do fragmento Fc. Desta maneira, os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com resultados reportados anteriormente na literatura para o BVZ (IONESCU *et al.*, 2008).

Observamos ainda que, de maneira geral, a presença do alginato, para ambos os valores de pH estudados, promoveu o aumento nos valores de T_{Máx} e ΔH que caracterizam os eventos ocorridos no BVZ. Estes resultados, em conjunto com os dados de espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência, podem sugerir que a presença do alginato aumentou a estabilidade térmica da proteína. A natureza estabilizante de poliânions frente a estruturas proteicas já foi anteriormente descrita na literatura (IVINOVA *et al.*, 2003; DERRICK *et al.*, 2007).

Podemos ainda verificar que a modificação do pH de 7,4 para 5,8 parece não promover modificações significativas nos eventos térmicos observados para o BVZ pois o ΔH e T_{max} não apresentaram variações significativas.

5.3 Preparo dos hidrogéis

Blocos adjacentes da fração G presentes no alginato são reticulados na presença de cátions divalentes, como o cálcio, através de interações com grupos carboxílicos dos açúcares, podendo resultar na formação de nanopartículas, micropartículas ou ainda, de uma rede polimérica tridimensional denominada hidrogel, em função das concentrações utilizadas. As características e rigidez do sistema formado serão fortemente influenciadas pela distribuição das suas frações M/G, sua massa molecular e a estequiometria do cátion que será utilizado como agente reticulante (KONG *et al.*, 2002).

Hidrogéis de alginato podem ser produzidos através dos métodos de reticulação químicos ou físicos (LEE e MOONEY, 2012). O método químico envolve a troca dos íons sódio presentes nas unidades G da cadeia polimérica por cátions divalentes e pode ser realizado com a utilização de sais solúveis como o cloreto de cálcio ou ainda, utilizando sais de cálcio com baixa solubilidade, com a formação do hidrogel *in situ*. O cátion utilizado no processo irá influenciar na permeabilidade, resistência e estabilidade do sistema produzido, sendo o cálcio um dos mais eficazes para a promoção do processo de reticulação por possuir o diâmetro adequado para coordenar grupamentos hidroxila e carboxila das cadeias do polissacarídeo (BIDARRA *et al.*, 2014; KAKLAMANI *et al.*, 2014).

De maneira geral, hidrogéis produzidos por reticulação iônica, são capazes de se degradar lentamente em pH neutro (LANSDOWN e PAYNE, 1994). Entretanto, o processo de degradação pode ser controlado através da manipulação da massa e composição do polímero (AUGST *et al.*, 2006).

Hidrogéis oferecem diversas vantagens como sistemas de liberação de fármacos. Entretanto, para ser utilizado como sistema injetável, deve combinar alguns requisitos como ser suficientemente fluido e homogêneo durante a administração, apresentar baixa viscosidade, ser biocompatível e biodegradável, além de cumprir exigências específicas à aplicação exata que se deseja (BIDARRA *et al.*, 2014).

As amostras foram nomeadas de acordo com sua constituição concentração do polímero em mg/mL (10, 20 e 30) e concentração de reticulante CaCl_2 (5, 10, 15 mg/mL). Todas as amostras foram preparadas em pH 7,4. Na Figura 23 é possível visualizar o aspecto macroscópico dos hidrogéis produzidos.

De acordo com a Figura 23, é possível visualizar que as amostras 10_5R, 20_5R e 30_5R, apresentam maior homogeneidade, estabilidade aparente e baixa viscosidade. Por outro lado, hidrogéis reticulados com 10 e 15 mg/mL de cloreto de cálcio dihidratado demonstram um aspecto diferenciado, formando sistemas de alta turbidez onde foram observadas a formação de precipitado.

A ligação de íons cálcio com as cadeias de alginato é estequiométrica e praticamente irreversível. Na ausência de outros íons, ou seja, com o controle da força iônica, ela ocorre muito mais rapidamente em comparação com a velocidade de difusão dos reagentes, originando sistemas com densidade de reticulação heterogênea (SKJÅK-BRÆK *et al.*, 1989)

A obtenção de micropartículas e filmes de alginato de cálcio compreende a utilização de concentrações de cálcio superiores às utilizadas neste estudo. A produção de micropartículas por ABD EL-GHAFFAR e colaboradores (2012) foi realizada com a utilização de reticulação iônica

de uma dispersão de alginato de sódio 2% gotejada em 500 mM de cloreto de cálcio (solução cerca de cinco vezes mais concentrada que as utilizadas para a obtenção dos hidrogéis). LÓPEZ CÓRDOBA *et al.* (2013) utilizaram uma solução de 3% de alginato de sódio e aproximadamente 10 mg/mL de cloreto de cálcio anidro para a obtenção de micropartículas. Esses resultados podem justificar a formação de material insolúvel observada quando hidrogéis foram preparados com concentrações de reticulante superiores a 5 mg/mL.

O processo de reticulação iônica (gelificação inotrópica) utilizado neste estudo apresenta algumas limitações. Ainda que a reticulação ocorra quase que instantaneamente no momento em que o cálcio entra em contato com a dispersão polimérica, esse processo resulta frequentemente em uma densidade de reticulação desequilibrada. Esse método é, na maioria das vezes, utilizado na obtenção de micropartículas através do gotejamento de uma dispersão de alginato em solução aquosa de cálcio (BIDARRA *et al.*, 2014). Hidrogéis de alginato formados com taxa de gelificação mais lenta tendem a exibir maior homogeneidade estrutural que hidrogéis rapidamente gelificados (KUO e MA, 2001).

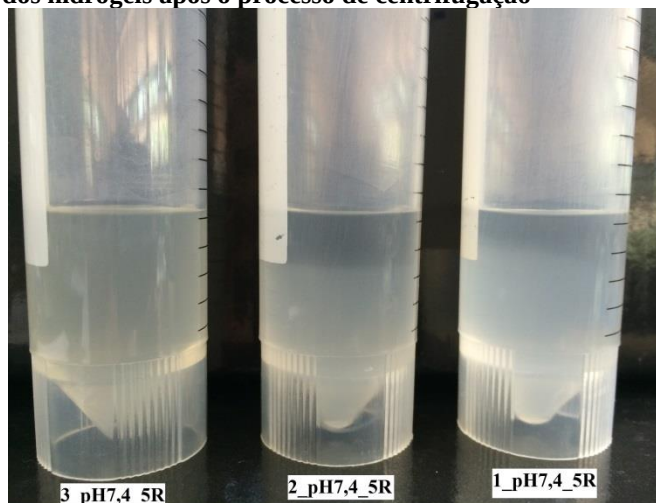
A utilização de gelificação iônica externa na produção de hidrogéis resulta na produção de sistemas heterogêneos. No entanto, a possibilidade de administrar via parenteral um hidrogel formado evita quaisquer problemas referentes ao processo de reticulação *in situ* (BARBUCCI *et al.*, 2005). O processo de reticulação *in situ* pode levar até 48 horas para ocorrer. Para este procedimento, existe a possibilidade de flutuações locais no organismo, como alterações locais de pH ou temperatura, que podem resultar na permanência de partículas sólidas não dissolvidas (KAKLAMANI *et al.*, 2014). Desta maneira, como este estudo visa a aplicação localizada desses hidrogéis, o processo de reticulação *in situ* deve ser evitado.

Dentre todas as metodologias testadas para a obtenção dos hidrogéis, o sistema de co-injeção entre a dispersão polimérica e a solução de cloreto de cálcio foi o que resultou na formação de géis com densidade de reticulação mais homogênea. Além disso, para a obtenção de hidrogéis estáveis e de baixa viscosidade, a concentração do agente reticulante não deve ultrapassar 5 mg/mL para as três concentrações de polímero testadas.

Para avaliar a estabilidade acelerada dos hidrogéis produzidos, as amostras 30_5R, 20_5R e 10_5R foram transferidas para tubos Falcon® de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. Após o período estabelecido, observou-se que tanto a amostra 20_5R quanto a amostra 10_5R apresentaram separação de fases após o processo de centrifugação (Figura 24).

Figura 23: Aspecto macroscópico dos hidrogéis produzidos em pH 7,4 com diferentes concentrações de polímero (10, 20 e 30mg/mL) e diferentes concentrações de reticulante (5, 10 e 15 mg/mL).

**10_5R****10_10R****10_15R****20_5R****20_10R****20_15R****30_5R****30_10R****30_15R**

Figura 24: Estabilidade dos hidrogéis após o processo de centrifugação

Diante dos resultados encontrados nos estudos de pré-formulação e preparação dos hidrogéis, verificou-se que para a obtenção de sistemas homogêneos e estáveis, os hidrogéis devem ser produzidos através do sistema de co-injeção entre alginato de sódio e cloreto de cálcio, utilizando uma concentração de 27 mg/mL do polímero disperso em água e 5mg/mL de agente reticulante.

5.4 Caracterização dos hidrogéis

Para a caracterização dos hidrogéis, selecionou-se a concentração total de 30mg/mL de massa, uma vez nesta condição, verificou-se uma boa estabilidade dos sistemas; respeitou-se a fração 1:9 com o objetivo de reduzir a concentração de proteína utilizada (27mg/mL de polímero e 3mg/mL de BVZ), e optou-se pela utilização de uma concentração de reticulante (CaCl_2) de 5mg/mL que proporcionou a obtenção de sistemas homogêneos.

5.4.1 Análise de Potencial Zeta para hidrogéis contendo BVZ em diferentes valores de pH

A análise do potencial zeta para hidrogéis contendo a proteína em pH 7,4 foi $-44,3 \pm 3,2$ mV, enquanto que em pH 5,8, esse valor se altera para $-33,2 \pm 1$ mV. Os resultados encontrados são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) e demonstram que, em valores menores de pH, as interações entre o alginato e o BVZ tornam-se mais evidentes reduzindo os valores de potencial zeta. Esses resultados, em conjunto com os resultados de eficiência de associação polímero: proteína em

diferentes valores de pH, sugerem que os hidrogéis desenvolvidos pode apresentar responsividade ao pH

Interações supramoleculares pH dependentes entre hidrogéis de alginato e mAbs foram recentemente reportadas na literatura para o desenvolvimento de sistemas de liberação. Neste estudo, a formação de complexos polieletrólíticos foi monitorada através da turbidez produzida de maneira que maiores valores de turbidez foram encontrados em pH ácido ($\pm 5,8$) (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

5.4.2 Avaliação da seringabilidade das formulações

Sistemas desenvolvidos para administração parenteral, ou seja, que serão administrados através de uma agulha, em vários locais e profundidades necessitam de algumas características peculiares, como serem suficientemente fluídos no momento da aplicação.

O trabalho de seringabilidade consiste na pressão ou força necessária para a injeção de um determinado sistema através de uma agulha de calibre e comprimento pré-determinado (BURCKBUCHLER *et al.*, 2010).

O teste de seringabilidade é extremamente importante, uma vez que irá medir a força necessária requerida para a extrusão deste sistema através de uma agulha, cumprindo as exigências de facilidade de aplicação (BRUSCHI *et al.*, 2007). A determinação desses valores visa prever as dificuldades ou facilidades decorrentes do sistema no momento da aplicação (BERNEGOSI, 2014). O desenvolvimento de hidrogéis capazes de transpor uma agulha sem que ocorram modificações em sua estrutura representam um grande desafio para a área farmacêutica e biomédica (LEE *et al.*, 2009).

Para fluídos Newtonianos, a força necessária para a extrusão pode ser estimada com a utilização da equação de Poiseuille, que envolve parâmetros como a viscosidade do líquido, o comprimento e calibre da agulha e a taxa de fluxo. No entanto, esta estimativa compreende erros tendo em vista a complexidade do sistema e a variabilidade dos parâmetros (RUNGSEEVIJITPRAPA e BODMEIER, 2009). Os hidrogéis desenvolvidos, entretanto, não apresentam um comportamento reológico de fluído newtoniano. Desta maneira, não foram realizados cálculos de estimativa do trabalho de seringabilidade dessas formulações.

Os valores de seringabilidade de diferentes formulações estão apresentados na Tabela 7. O trabalho necessário para a extrusão dos hidrogéis variou aproximadamente entre 15 e 25 N.mm. Observamos ainda que, com o aumento da concentração do polímero de 20 mg/mL para 30 mg/mL, a viscosidade e também a força requerida para a extrusão, aumentaram. Da mesma maneira, o

aumento da concentração do reticulante de 3 mg/mL para 5 mg/mL exige um trabalho maior para transpor a agulha. A necessidade de uma maior pressão com o aumento da concentração polimérica e do grau de reticulação iônica já foram relatadas por outros autores (JONES *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1997; KELLY *et al.*, 2004; AGUADO *et al.*, 2012).

Tabela 7: Trabalho de seringabilidade das formulações a 25°C

Amostra	Concentração polímero (mg/mL)	Concentração reticulante (CaCl ₂) mg/mL	Seringabilidade (N.mm)
3_pH 7,4_5R	27	5	24±2,1
3_pH 7,4_3R	27	3	21,3±0,8
2_pH 7,4_5R	18	5	15,5±2,60

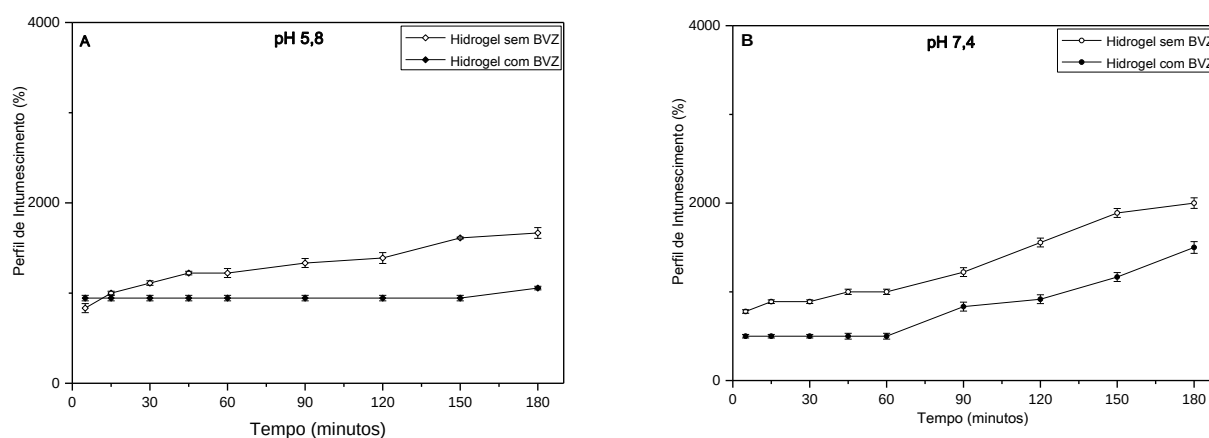
LE RENARD e colaboradores (2010) verificaram a seringabilidade de hidrogéis de alginato produzidos através de coinjeção com cloreto de cálcio. Seus resultados demonstraram que aumento da concentração de alginato está associado ao aumento da coesão e viscosidade que poderão limitar a seringabilidade dos sistemas.

5.4.3 Efeito do ambiente fisiológico na absorção de líquidos

A absorção de líquidos é uma propriedade muito importante para os sistemas de liberação, uma vez que ele terá grande influência sobre o perfil de liberação do fármaco no meio biológico, a sua degradabilidade e mucoadesão (WANG *et al.*, 2010).

Para analisar o perfil de absorção de líquido em diferentes valores de pH, utilizou-se hidrogéis liofilizados, produzidos com 27 mg/mL de alginato de sódio e 5 mg/mL de cloreto de cálcio e 3 mg/mL de BVZ. Na Figura 25 são apresentados os perfis de absorção dos hidrogéis, em diferentes valores de pH, após três horas.

Figura 25: Perfil de absorção de líquido de hidrogéis contendo ou não BVZ em diferentes valores de pH após 3 horas. (A) pH 5,8 e (B) pH 7,4



Com os resultados apresentados podemos observar que em pH 7,4 e em pH 5,8, o intumescimento foi menor para hidrogéis contendo BVZ. Para estes sistemas, as interações eletrostáticas entre o poliânion e polication resultam na formação de estruturas mais rígidas e compactas, minimizando o intumescimento.

Ao interagir eletrostaticamente com o alginato, o BVZ irá diminuir a densidade de cargas disponível no sistema. Esta neutralização minimiza a repulsão eletrostática de maneira que as cadeias ficam mais próximas, o que retarda o processo de absorção de líquido. O aumento da repulsão eletrostática em cadeias poliméricas já foi anteriormente relacionado ao aumento da capacidade de absorção de líquidos para estes sistemas (SAMANTA e RAY, 2014).

BAJPAI e TANKHIWALE (2006) estudaram o intumescimento de micropartículas de alginato reticulado com cálcio. Na presença da quitosana (polímero catiônico que interage com o alginato), o intumescimento dessas micropartículas era menor, tendo em vista a rigidez da estrutura resultante das interações supramoleculares.

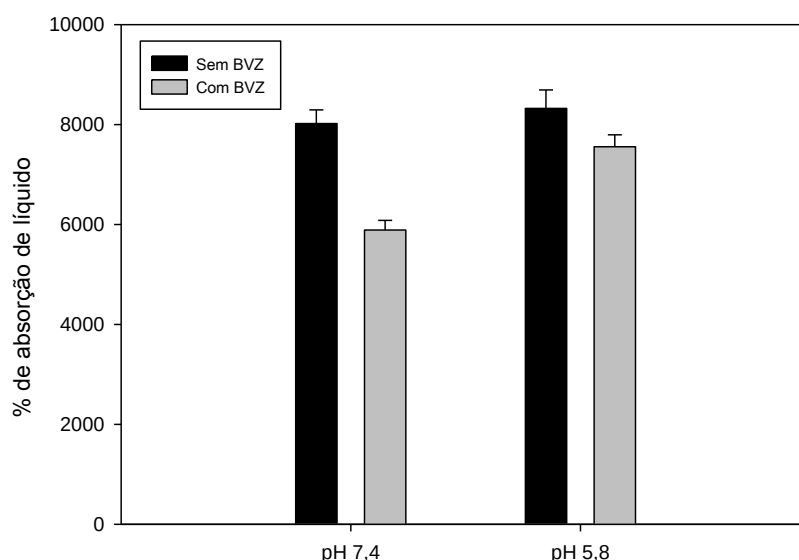
Analisando o comportamento de absorção de líquido dos hidrogéis nos valores de pH 5,8 e 7,4 é possível inferir que para hidrogéis contendo BVZ, o intumescimento é maior em pH 7,4. Esses resultados corroboram com os dados de eficiência de associação e potencial zeta. Em valores menores de pH, a interação entre BVZ e as cadeias de alginato são maiores, formando, portanto, estruturas mais rígidas que diminuem a capacidade de absorção de líquido desses sistemas. O pH do meio é um dos fatores mais importantes que afetam o processo de absorção de líquidos, pois irá influenciar não somente na carga de superfície do adsorvente, como no grau de ionização do líquido que será absorvido (LEE *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2012).

Para hidrogéis iônicamente reticulados, que contêm grupos carboxílicos, a capacidade de absorção de líquidos diminui sob condições ácidas devido à formação de ligações de hidrogênio entre grupos -COOH e -OH . (KIM *et al.*, 2012).

Quando alginato reticulado com cálcio é colocado em solução tampão fosfato pH 7,4, o processo de troca de íons Ca^{+2} presentes na estrutura “egg box” por íons sódio da solução tampão é o principal responsável pelo processo de absorção de líquidos (BAJPAI e TANKHIWALE, 2006).

Após 24 horas, hidrogéis contendo BVZ tiveram uma percentagem de absorção de líquidos menor que hidrogéis sem BVZ em pH 7,4 e 5,8 (Figura 26), mantendo o comportamento verificado anteriormente.

Figura 26: Perfil de absorção de líquido de hidrogéis contendo ou não BVZ em diferentes valores de pH após 24 horas.



5.4.4 Análises reológicas

5.4.4.1 Análise reológica de fluxo

A reologia é o ramo da ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria quando submetida a uma força. O comportamento de fluxo de um material está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema e é definido pela correlação entre taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento, representados graficamente em diagramas de curvas de fluxo, geralmente divididas em duas etapas: aumento da taxa de cisalhamento ilustrado através de uma curva ascendente e a

diminuição da taxa de cisalhamento, representada pela curva descendente (GENNARO, 2004; SCHRAMM, 2006; FORMARIZ, 2008; LEE, *et al.*, 2009; BERNEGOSSO, 2014).

Através desses diagramas, os materiais analisados podem ser classificados em fluídos Newtonianos e fluídos não Newtonianos. Para fluídos considerados Newtonianos, a viscosidade não varia quando ocorrem mudanças na taxa de cisalhamento, ou seja, ela é uma constante da relação entre tensão e taxa de cisalhamento. Entretanto, a maioria dos sistemas de liberação estudados na área farmacêutica, não exhibe esse comportamento e são considerados fluídos não Newtonianos (TONELI *et al.*, 2005; SCHRAMM, 2006).

Para os fluídos não Newtoniano, a viscosidade aparente é uma função da tensão e da taxa de cisalhamento de maneira que observando a curva ascendente dos diagramas de fluxo, podemos classificá-los em pseudoplástico, plástico ou dilatante (GENNARO, 2004; TONELI *et al.*, 2005).

Fluídos não-Newtonianos pseudoplásticos exibem uma diminuição da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento. Essa queda na viscosidade está relacionada à reorientação de partículas rígidas na direção do fluxo além da diminuição das interações intermoleculares que desfavorecem o fluxo, resultando em um fenômeno denominado *shear thinning* ou afinamento por cisalhamento. Para a maioria desses fluídos, entretanto, o efeito do cisalhamento é reversível, ou seja, o sistema é capaz de recuperar seu estado e sua viscosidade inicial quando o cisalhamento é retirado (SCHRAMM, 2006; CARVALHO, 2009).

Fluídos plásticos apresentam um limite de escoamento e, para esses sistemas, o diagrama de fluxo é ilustrado por uma curva ascendente que intercepta a ordenada não na origem, mas sim no ponto crítico (*yield point*) (SCHRAMM, 2006). Existem ainda materiais que sob determinadas condições de tensão ou taxa de cisalhamento, exibem um comportamento de fluxo dilatante, ou seja, aumentam a viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

Quando o sistema apresenta um perfil tempo dependente, através das curvas descendentes no diagrama de fluxo, em que ocorre a diminuição da taxa de cisalhamento, podemos obter informações referentes à tixotropia dos sistemas. Um sistema denominado tixotrópico é caracterizado pelo seu potencial de retornar às suas características iniciais, ou seja, pela reconstrução de sua estrutura inicial sempre que a tensão é retirada. Em fluidos reopético, assim como os fluidos tixotrópicos, após o repouso, o fluido tende a retornar ao seu comportamento reológico inicial. Entretanto, esse retorno resulta em um acréscimo na viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação (TONELI *et al.*, 2005; SCHRAMM, 2006; LEE *et al.*, 2009).

Para compostos de natureza polimérica, como os polissacarídeos, as propriedades reológicas estão diretamente relacionadas com a capacidade de formação de ligações de hidrogênio

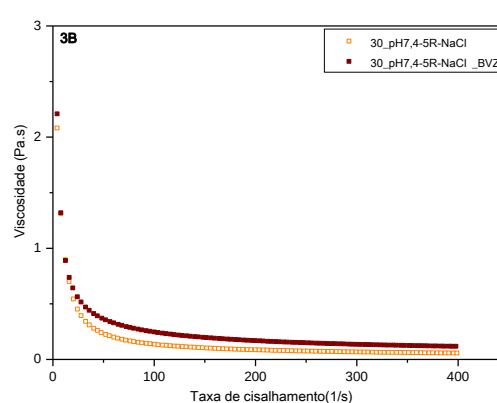
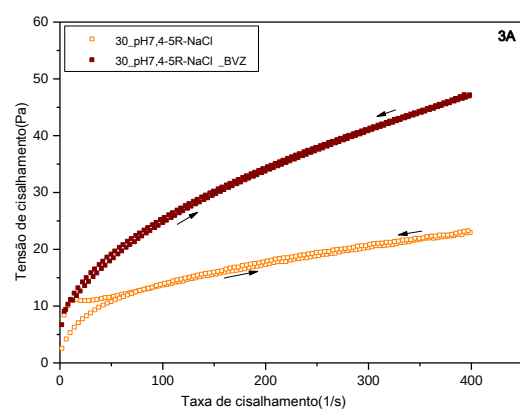
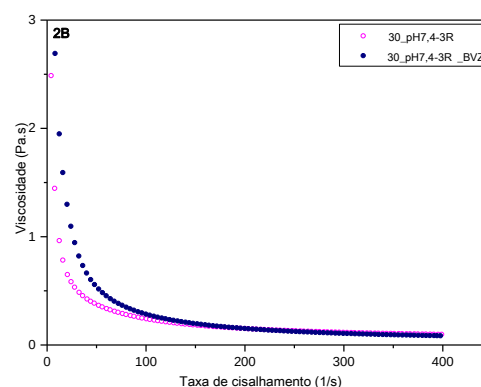
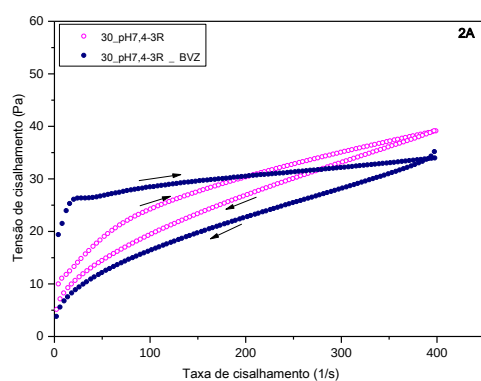
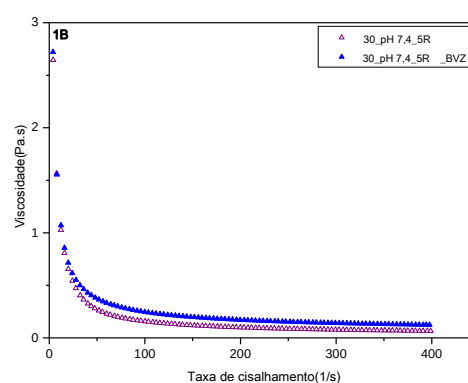
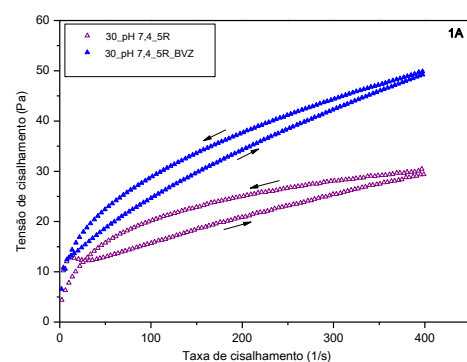
intermoleculares, concentração, massa molecular do polímero, além do pH, força iônica, grau de emaranhamento das cadeias e da temperatura (LIMA, 2006).

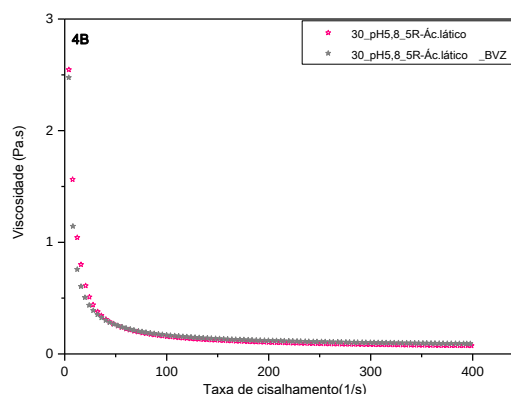
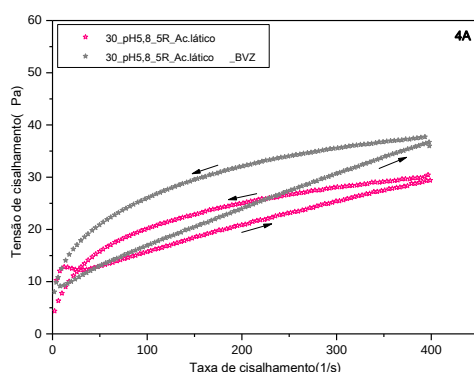
Alguns sistemas coloidais tornam-se mais fluídos quando são rapidamente agitados. Esse comportamento de adelgaçamento pelo cisalhamento é denominado de pseudoplasticidade, sendo que para esses sistemas, a viscosidade diminui com o cisalhamento crescente. Observa-se ainda que a taxa de cisalhamento aumenta mais rapidamente que o estresse de cisalhamento, tornando a curva de fluxo côncava no sentido do eixo da taxa de cisalhamento (GENNARO, 2004). Dispersões aquosas de alginato apresentam características de fluído não Newtoniano tipo pseudoplastico, ou seja, sua viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (BECKER e KIPKE, 2002).

A Figura 27 exibe a relação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento para os sistemas estudados. Os reogramas apresentados demonstram que os sistemas se comportam como fluídos não-Newtoniano, pois não apresentam uma linearidade entre tensão e velocidade de cisalhamento. Podemos ainda visualizar (Figura 27-B) que esses sistemas exibem uma viscosidade aparente que diminui em função do aumento da taxa de cisalhamento, indicando características de fluídos pseudoplástico.

O aumento da taxa de cisalhamento promove o alinhamento das cadeias poliméricas na direção do fluxo, além do rompimento das interações intermoleculares. Desta maneira, observa-se a redução da resistência interna e, conseqüentemente, a diminuição da viscosidade aparente dos sistemas (YANG *et al.*, 2009). É possível observar que, especialmente para as amostras 30_pH 7,4_5R e 30_pH 7,4_5R_NaCl (Figura 27-1B e 3B), a incorporação do BVZ resultou no aumento da viscosidade aparente das formulações através da formação de estruturas mais viscosas que os hidrogéis sem BVZ. Os resultados encontrados sugerem também a existência de interações supramoleculares entre o alginato e a proteína evidenciada nas análises de eficiência de associação, tamanho de partícula e potencial zeta. O aumento da viscosidade do sistema foi também utilizado por YANG e colaboradores (2009) para monitorar interações entre o polímero alginato e surfactante catiônico.

Figura 27: (A) Reograma: tensão de cisalhamento (Pa) x taxa de cisalhamento (1/s) para os diferentes sistemas estudados: curvas ascendentes e descendentes. (B) viscosidade aparente (Pa.s) x taxa de cisalhamento (1/s) para os diferentes sistemas estudados.





O grau de pseudoplasticidade pode ser medido através do comportamento de fluxo (n) sendo essas variáveis inversamente proporcionais: quanto maior o valor de n , menor o grau de pseudoplasticidade. Analisando o índice de consistência (K) é possível ainda avaliar a viscosidade dinâmica das formulações, indicando que quanto maior o seu valor, maior a viscosidade (FORMARIZ, 2008).

Através da aplicação do modelo de Lei das Potências, é possível efetuar a classificação dos sistemas em newtoniano, pseudoplástico e dilatante. Na Tabela 7, estão os valores de K referentes à consistência dos sistemas e os valores de n referentes ao comportamento de fluxo.

Tabela 7: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para os hidrogéis analisados.

Amostra	K	DP (k)	n	DP(n)
30_pH7,4_5R	4,39	0,20	0,29	0,008
30_pH7,4_5R_BVZ	2,99	0,09	0,46	0,005
30_pH7,4_3R	4,87	0,04	0,34	0,001
30_pH7,4_3R_BVZ	15,78	0,29	0,11	0,003
30_pH7,4_5R_NaCl	3,69	0,16	0,29	0,008
30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ	3,14	0,04	0,45	0,002
30_pH5,8_5R_ac. lático	3,11	0,18	0,36	0,011
30_pH5,8_5R_ac. lático_BVZ	1,67	0,09	0,50	0,009

Os valores de $n < 1$ observados confirmam o perfil exibido nos diagramas de fluxo característicos de fluidos não Newtonianos, tipo pseudoplástico. Além disso, é possível observar que exceto para a amostra 30_pH7,4_3R, a introdução do BVZ promoveu a diminuição da pseudoplasticidade do sistema. A formulação 30_pH7,4_3R apresenta um perfil diferenciado: a incorporação do BVZ no sistema resultou no aumento do grau de pseudoplasticidade, sendo esta formulação a que apresenta o menor valor de n . Em relação ao índice de consistência, novamente

observamos um perfil diferenciado na amostra 30_pH7,4_3R. Para este sistema, a incorporação do BVZ promoveu um aumento considerável no valor de K, enquanto que para as demais, essa incorporação resultou em valores semelhantes ou menores. Com esses resultados é possível inferir que esta amostra, em particular, pode ter se estrutura diferenciada em relação às demais.

Ainda observando as curvas ascendentes e descendentes das curvas de fluxo (Figura 27-A), é possível visualizar que exceto para as amostras 30_pH7,4_3R e 30_pH7,4_3R_BVZ, as curvas descendentes encontram-se acima das curvas ascendentes de maneira que elas não se sobrepõem, evidenciando um comportamento anti-tixotrópico ou reopético. Para esses sistemas, o extenso cisalhamento implica no aumento da viscosidade. Esse comportamento pode ser observado quando o sistema muda sua natureza física ou química (gelificação ou perda de solvente por evaporação) (SCHRAMM, 2006). Materiais reopéticos ou anti-tixotrópicos tornam-se mais viscosos conforme o aumento e duração da taxa de cisalhamento aplicada, um processo conhecido como endurecimento do trabalho, característica oposta a tixotropia (DEWAR e JOYCE, 2006).

A variação da viscosidade dependente do tempo é uma propriedade desejável para as formulações farmacêuticas tendo em vista a flexibilidade necessária aos sistemas de liberação de fármacos (SHETH, 1976).

O comportamento observado nesses hidrogéis pode ser desejável em formulações desenvolvidas para administração localizada comportando-se como sistemas depot. Durante a aplicação através da utilização de agulha e seringa (sob altas taxas de cisalhamento) verifica-se o desentrelaçamento das cadeias poliméricas e a organização dessas cadeias no sentido do fluxo, facilitando desta maneira a administração da formulação. Entretanto, com a retirada desta tensão, a formulação tem sua viscosidade aumentada, podendo esta ser superior à sua viscosidade inicial garantindo a permanência desses sistemas no local administrado.

Para os sistemas 30_pH7,4_5R_NaCl com e sem BVZ, a área de histerese formada entre as curvas é mínima em relação as demais formulações que apresentaram perfil semelhante, no entanto elas não se sobrepõem. Para os sistemas 30_pH7,4_3R com e sem BVZ, observamos que as curvas ascendentes e descendentes ocorrem no sentido horário evidenciando um comportamento tixotrópico tempo dependente. Estes sistemas podem possuir a capacidade de retornar à sua estrutura inicial sempre que forem mantidos em repouso por um longo período de tempo. Além disso, observamos que a incorporação de BVZ proporciona o aumento da área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes.

Hidrogéis produzidos com ácido hialurônico e alginato foram avaliados quanto ao seu comportamento mecânico e suas propriedades tixotrópicas antes e após sua passagem através de uma agulha. A capacidade desses sistemas em fluir como líquido (sob cisalhamento) e retornar a

sua estruturação inicial, permitiu a sua utilização como sistemas de liberação de fármacos para incorporação de proteínas e DNA. Além disso, constatou-se que a passagem dos hidrogéis de alginato através de uma agulha não provocou variações significativas na sua estrutura e propriedades reológicas (BARBUCCI *et al.*, 2005).

Não foram observadas mudanças significativas em relação ao comportamento de fluxo dos hidrogéis para os dois valores de pH avaliados. Yang e colaboradores verificaram que com a diminuição do pH de 6,6 para 5,0, as dispersões de alginato apresentam pequenas alterações de viscosidade, o que pode indicar que as interações intermoleculares não modificam. Entretanto, com a diminuição progressiva do pH para valores menores que 4,0 verificou-se um aumento considerável da viscosidade da dispersão, sugerindo a supressão da repulsão e a consolidação de ligações de hidrogênio intermoleculares (YANG, 2009).

5.4.4.2 *Análise reológica oscilatória*

A análise reológica oscilatória dinâmica consiste em uma técnica não destrutiva capaz de avaliar simultaneamente as propriedades viscosa e elástica de um determinado sistema, fornecendo informações sobre a natureza estrutural, o que poderá implicar no desempenho terapêutico dessas formulações (CALLENS *et al.*, 2003; SCHRAMM, 2006; CALIXTO *et al.*, 2014).

O termo viscoelasticidade surgiu com a existência simultânea de propriedades viscosas provenientes de líquidos e propriedades elásticas relativas a materiais sólidos, ambas podendo estar presentes em um único material (BARNES *et al.*, 1989; ANSETH *et al.*, 1996). A maior parte das análises reológicas que visam o estudo das propriedades viscoelásticas de um material é realizada em uma região denominada viscoelástica linear (RVL). Nessa região, quando o stress aplicado à amostra é aumentado, a relação entre stress e tensão é constante, ainda que a tensão seja variável em função do tempo, fator esse que permite a interpretação dos resultados (JONES, 1999).

A partir da caracterização do comportamento viscoelástico de um sistema é possível a determinação do parâmetro (G') referente ao módulo de armazenamento, que representa a energia armazenada por ciclo (resposta sólida) e o parâmetro (G'') denominado módulo de perda que representa a energia dissipada por ciclo dentro da amostra (referente a resposta líquida) (JONES, 1999; PELLETIER *et al.*, 2001; AGULHON *et al.*, 2014; CARDOSO, 2014).

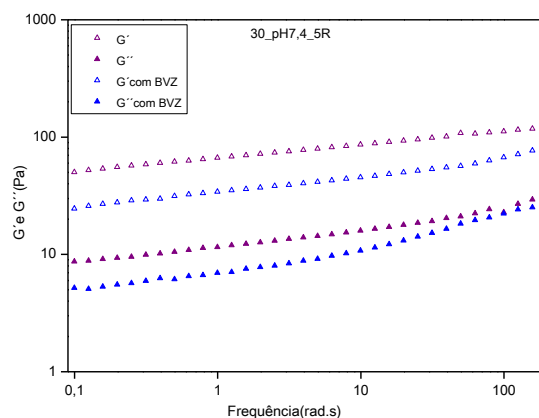
A magnitude desses módulos fornece uma indicação qualitativa da estrutura do sistema. Em dispersões poliméricas, quando $G' \gg G''$ é possível sugerir que o sistema esteja covalentemente interligado, enquanto que quando $G' > G''$ o sistema pode estar estruturado através de ligações

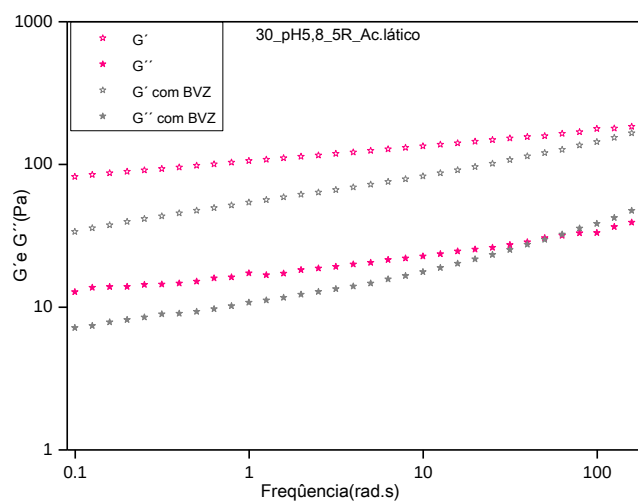
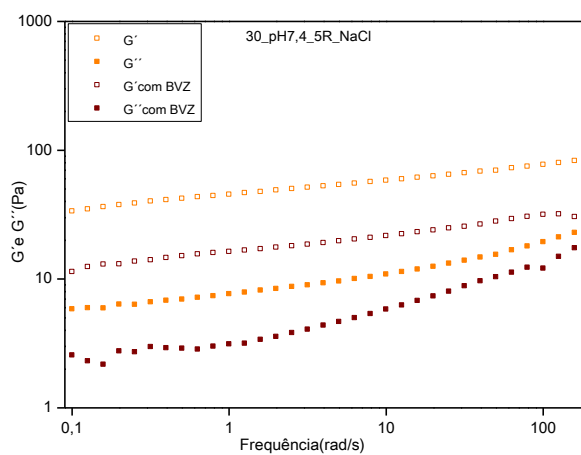
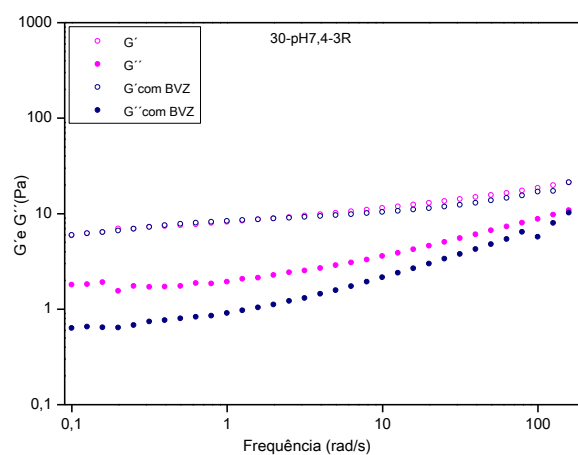
secundárias ou ainda quando $G' \leq G''$ as moléculas que compõem o sistema podem estar apenas ligadas por interações físicas (CEULEMANS *et al.*, 2002).

Análises reológicas são amplamente utilizadas na caracterização de hidrogéis ionicamente reticulados, fornecendo informações relevantes referentes à viscoelasticidade desses materiais que estão diretamente relacionadas à sua microestrutura, bem como parâmetros referentes à estrutura tridimensional das redes poliméricas (DINU *et al.*, 2012).

Para a caracterização das estruturas reticuladas contendo ou não BVZ, utilizamos uma varredura de tensão a uma frequência fixa para determinar valores que se encontram dentro da região viscoelástica linear (RVL). O valor escolhido foi 0,5 Pa que contemplava todos as amostras estudadas. Sistemas que apresentam uma linearidade em regiões mais baixas de tensão podem apresentar estruturas mais fracas, que pode ser rompida quando submetida a altas tensões (CARDOSO, 2014). A Figura 28 apresenta os espectros mecânicos para todas as formulações estudadas.

Figura 28: Variação dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência para os hidrogéis contendo ou não BVZ.





De maneira geral, podemos observar que todas as formulações apresentaram características de sistemas predominantemente elásticos tendo em vista que, para toda a faixa de frequência estudada, os valores do módulo de armazenamento (G') são superiores aos de fluidez (G'') (SAXENA *et al.*, 2011). O perfil apresentado pelas amostras analisadas é típico de hidrogéis poliméricos iônicamente reticulados (PELLETIER *et al.*, 2001; BARBUCCI *et al.*, 2005; AGULHON *et al.*, 2014; CARDOSO, 2014; LENCINA *et al.*, 2014). Para o alginato, esse perfil observado está diretamente relacionado com a distribuição de suas frações em sua composição, bem como a proporção de frações G em sua estrutura (STOKKE *et al.*, 2000).

Além disso, os módulos de G' e G'' apresentam dependência da frequência. Entretanto, os valores de G' são cerca de cinco vezes maiores que os valores de G'' (tangente δ), resultados esses que evidenciam a formação de géis mais fortes.

Agulhon e colaboradores (2014) estudaram a caracterização reológica de hidrogéis de alginato de sódio contendo alta e baixa concentração de F_G em sua composição, submetidos à reticulação química utilizando diferentes cátions. Hidrogéis com perfil reológico elástico, semelhante ao do presente estudo, foram encontrados quando alginato contendo alta concentração de G foram reticulados com manganês e cobalto. Por outro lado, a reticulação do alginato contendo alta ou baixa concentração de F_G utilizando cobre resultaram ambos em géis fortes, de alta coesão e elásticos. Tendo em vista o raio atômico e a valência desses elementos, o cátion que apresenta maior raio atômico, resultou na formação de géis mais estruturados. Dessa maneira, a utilização do cálcio, que possui um raio atômico superior, deve proporcionar a formação de hidrogéis mais resistentes e caráter elástico, ainda que o alginato utilizado neste estudo apresente baixa concentração de G em sua composição.

Ainda analisando a Figura 28, podemos observar uma redução evidente quando comparamos os valores de G' para hidrogéis reticulados com 5 mg/mL e 3 mg/mL de cloreto de cálcio. Para hidrogéis de alginato de cálcio, o componente G' , que representa a resposta sólida do sistema (módulo elástico), está associado à concentração de cálcio utilizada na reticulação, ou seja, quanto maior a concentração de cálcio adicionada ao sistema, mais evidente o comportamento elástico do sistema, que assume valores maiores para G' e géis mais resistentes (ANSETH *et al.*, 1996; STOKKE *et al.*, 2000; WEBBER e SHULL, 2004). Ainda que hidrogéis de alginato de cálcio apresentem um comportamento viscoelástico, o aumento da concentração de Ca^{+2} no sistema pode reduzir a dependência do módulo de armazenamento da frequência, resultando na formação de estruturas fortes e resistentes (WEBBER e SHULL, 2004).

Observamos ainda que a introdução do BVZ nos sistemas resultou na diminuição dos valores de G' e G'' exceto para o sistema 30_pH7,4_3R. Frente à conhecida relação entre valores

assumidos para o módulo elástico e a concentração de cátions utilizada para a reticulação, podemos inferir que a introdução de BVZ, diminui os sítios de interação disponíveis para a ocorrência da reticulação da cadeia com cálcio. Desta maneira, quando esses sistemas são reticulados, apresentam valores de G' inferiores aos apresentados quando a proteína não é incorporada ao sistema. Esses resultados podem ainda ser atribuídos a um efeito plastificante do fármaco que se interpõe na rede polimérica diminuindo as forças de interação intercadeias.

Considerando que o alginato e o BVZ possuem um alto peso molecular, com múltiplas cargas presentes na superfície e ainda o BVZ apresente uma estrutura tridimensional definida, fica evidente que as interações entre alginato e mAbs devem ocorrer de maneira distante, devido ao impedimento estérico e a flexibilidade restrita dessas cadeias, de maneira que a introdução do mAb, não provoca alterações significativas no comportamento dos sistemas. Por outro lado, a interação entre o cálcio e o alginato ocorre em uma distância pequena, portanto o aumento na concentração do reticulante resulta em alterações mais evidentes nos valores de G' (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

No hidrogel 30_pH7,4_3R, o valor de G' se manteve após a introdução da proteína e somente o valor de G'' reduziu. Ainda nesses sistemas, as diferenças observadas entre G' e G'' com a introdução do BVZ foi cerca de 8 vezes maior, de maneira que a presença do BVZ nestes sistemas resulta na formação de estruturas mais rígidas.

De maneira geral, hidrogéis se comportam como material viscoelástico. Assim, a dependência da força ou da tensão aplicada em função do tempo é extremamente importante para avaliar a magnitude da resposta mecânica do material (ANSETH *et al.*, 1996).

Para possibilitar uma análise mais detalhada, os valores de G' e G'' dos hidrogéis foram analisados em uma baixa frequência, onde o sistema apresenta uma estrutura mais preservada (CARDOSO, 2014). De acordo com a Tabela 8, podemos observar a predominância do comportamento elástico para todas as amostras. Observamos ainda que a diminuição na concentração do agente reticulante provocou uma queda de aproximadamente 8 vezes, nos valores de G' , diminuindo o comportamento elástico desses sistemas. A maior quantidade de reticulante adicionada possibilitou o maior número de ligações com os ânions da cadeia polimérica o que resultou na formação de uma rede tridimensional mais forte (CARDOSO, 2014).

A adição de NaCl anteriormente ao processo de reticulação dos hidrogéis resultou na queda dos valores de G' e G'' . A adição de sais provoca a formação de interações iônicas mais fracas pela blindagem dos grupos ionizados presentes na superfície das moléculas, resultando na formação de sistemas menos estruturados (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

Tabela 8: Valores de G' e G'' do teste oscilatório para os sistemas estudados (tensão 0,5 Pa e frequência 1 Hz)

Amostra	G'	G''
30_pH7,4_5R	66,58	11,53
30_pH7,4_5R_BVZ	34,17	6,95
30_pH7,4_3R	8,22	1,94
30_pH7,4_3R_BVZ	8,38	0,91
30_pH7,4_5R_NaCl	45,65	7,69
30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ	16,38	3,14
30_pH5,8_5R_ac. Láctico	106,01	17,30
30_pH5,8_5R_ac. láctico_BVZ	54,20	10,78

É possível observar que diminuição do pH pode contribuir para obtenção de sistemas com maior organização estrutural, uma vez que na presença de ácido láctico houve um aumento significativo para os módulos de armazenagem e perda. O aumento dos valores de G' e G'' , que determina um comportamento mais elástico em valores menores de pH, é resultado da maior interação intermolecular nesses sistemas (SCHWEIZER *et al.*, 2013).

Através da regressão linear (r) dos dados, podemos estabelecer uma análise quantitativa da variação de G' em função da frequência (HAMINIUK *et al.*, 2009). Valores de r mais próximos de 1 indicam menor dependência de G' em relação à frequência (ω), atribuídos a estruturas mais rígidas de comportamento predominantemente elástico (CARBINATTO *et al.*, 2012; CARDOSO, 2014).

Os valores de G' podem ainda ser avaliados através da aplicação da Lei da Potência (Equação 13), na qual G' é o módulo de armazenamento, S é uma constante que representa a resistência do gel, ω a frequência oscilatória e o n , o expoente viscoelástico, que pode fornecer informações referentes à força e estrutura do sistema (CARBINATTO *et al.*, 2012).

$$G' = S \cdot \omega^n \quad \text{Equação 13}$$

De acordo com SAXENA *et al.* (2011), os parâmetros S e n extraídos da Lei da Potência nos ensaios oscilatórios estão diretamente relacionados com a densidade de reticulação no interior dos hidrogéis. Quando o sistema possui uma alta densidade de reticulação, ele exibe altos valores de S e sua estrutura é considerada forte. De maneira inversa, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Assim, sistemas que apresentem um alto valor de n , possuem estruturas mais fracas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, podemos verificar que, de maneira geral, a adição de BVZ resulta em um aumento no valor de r , ou seja, a adição do fármaco torna

G' menos dependente da frequência, o que caracteriza a formação de estruturas mais estáveis e que suporta maiores variações de frequência. Esse comportamento não foi observado, entretanto, para a formulação 30_pH7,4_3R.

Observamos ainda que a diminuição da concentração do reticulante resultou em uma grande redução dos valores de S e aumento dos valores de n , resultados que corroboram as informações obtidas na análise qualitativa dos espectros mecânicos apresentados na Figura 28.

Tabela 10: Valores da regressão linear (r), expoente viscoelástico (n) e da resistência do gel (S) para os hidrogéis analisados.

Amostra	R	n	S
30_pH7,4_5R	0,66	0,12	66,20
30_pH7,4_5R_BVZ	0,75	0,13	34,01
30_pH7,4_3R	0,82	0,17	8,49
30_pH7,4_3R_BVZ	0,82	0,14	8,07
30_pH7,4_5R_NaCl	0,70	0,12	47,75
30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ	0,74	0,14	16,17
30_pH5,8_5R_ac. láctico	0,69	0,11	110,81
30_pH5,8_5R_ac. láctico_BVZ	0,79	0,21	53,00

Observando os valores de S , podemos reafirmar a ideia de que esses sistemas, em um pH ácido, apresentam uma estrutura mais forte e organizada. A presença de ácido láctico na formulação resultou em um grande aumento no valor de S , entretanto, houve uma redução em S quando BVZ foi incorporado às formulações.

O conjunto de dados reológicos obtidos está de acordo com os dados de ZP e eficiência de associação e absorção de líquidos sugerindo que, quando ocorrem alterações nos valores de pH do meio, os hidrogéis podem apresentar uma organização estrutural diferenciada que resulte em um perfil de liberação desejável para esta proteína, frente ao microambiente tumoral onde o sistema será aplicado.

5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV)

A microscopia eletrônica de alta resolução (MEV) é uma das técnicas mais versáteis que permite a observação e análise de características morfológicas dos mais variados objetos sólidos, sendo, portanto, amplamente utilizada na caracterização de sistemas de liberação de fármacos (DEDAVID *et al.*, 2007).

Para avaliar as variações na morfologia e na superfície de hidrogéis frente a alterações em sua composição, os sistemas utilizados no estudo do comportamento reológico foram submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.

As fotomicrografias (Figura 29) revelaram que os hidrogéis 30_pH7,4_5R com e sem a incorporação de BVZ exibem uma superfície irregular, rugosa, folheada, alongada (LM 100), onde encontra-se evidenciada (LM 600) a presença de poros de tamanhos e formatos variados, compondo a estrutura denominada “egg box”. Outros autores relataram a formação de hidrogéis de alginato de cálcio com as mesmas características aqui encontradas (DE MOURA *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2008; RUBIRA *et al.*, 2009).

O alginato de sódio é conhecido por sua capacidade de formar géis estáveis na presença de íons como o cálcio. Entretanto, géis homogêneos são preparados somente quando íons de cálcio são adicionados de maneira uniforme ou controlados na dispersão de alginato. A simples adição externa de agentes reticulante, como o cloreto de cálcio, dificilmente proporciona a obtenção de matrizes homogêneas (HAN *et al.*, 2013).

Fazendo uma análise comparativa, podemos observar que quando a concentração de reticulante é alterada de 5 mg/mL (Figura 29) para 3 mg/mL (Figura 30), ocorre a diminuição na densidade de reticulação (LM600), além da formação de poros maiores e espaçados. O maior conteúdo de íons cálcio incorporados nas cadeias de alginato resulta em uma rede de alginato mais densamente reticulada.

Para ambas as concentrações de reticulante utilizadas, entretanto, observamos a deposição de cristais de NaCl (Figura 29 e Figura 30- x5000) na superfície estrutural do hidrogel. A confirmação da composição desses cristais foi feita com a utilização de espectroscopia de energia dispersiva. Sabendo que no preparo dos hidrogéis foi utilizado alginato de sódio e cloreto de cálcio para a reticulação, a troca de sódio pelo cálcio resulta na formação de cristais de cloreto de sódio na superfície do hidrogel. Além disso, podemos afirmar que quanto maior a concentração de reticulante utilizada, maior é a deposição desses cristais.

Uma das variáveis estudadas no preparo dos hidrogéis foi a dispersão do polímero em solução de NaCl 0,1M para avaliar a influência desta adição no processo de reticulação e morfologia dos hidrogéis.

Observamos que a presença de NaCl (Figura 31) e, conseqüentemente, com o controle da força iônica, o processo de reticulação parece ser mais homogêneo, de maneira que os poros observados (LM 600) não sejam tão variáveis quanto os visualizados na Figura 29 e 30 (LM 600). A adição de cloreto de sódio pode tornar o gel de alginato mais homogêneo, ou seja, sua presença

proporciona uma distribuição do cálcio mais uniforme por toda a rede de alginato o que irá resultar na formação de poros homogêneos (GU *et al.*, 2004).

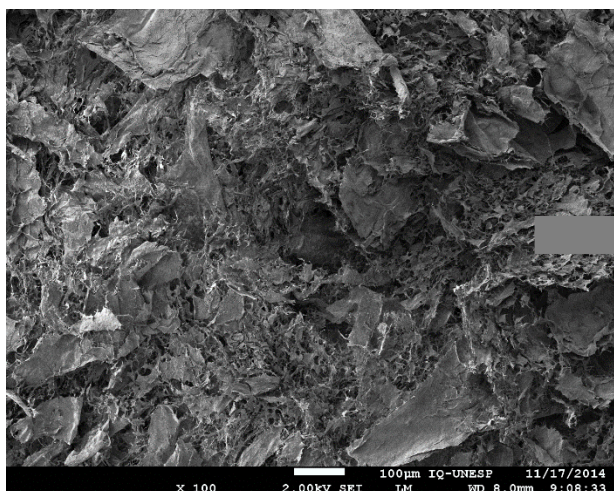
SKJÅK-BRÆK e colaboradores (1989) reportaram que não somente a presença de íons sódio em solução, como também íons magnésio no processo de reticulação, resultava na formação de hidrogéis mais homogêneos.

Além disso, é possível observar que o uso da dispersão de NaCl no preparo dos hidrogéis acentua ainda mais o acúmulo dos cristais de NaCl na superfície da estrutura dos hidrogéis, de maneira que para a Figura 31 (LM 600) eles sejam mais numerosos.

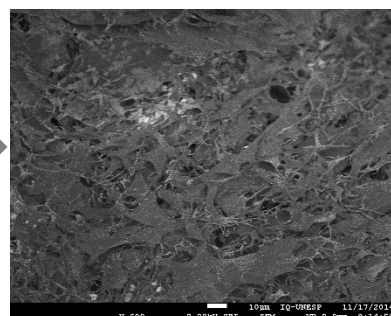
Avaliando a possibilidade da eliminação dos cristais de cloreto de sódio da superfície dos hidrogéis, após o preparo, os sistemas (30_pH7,4_5R) foram colocados em membrana de diálise com tamanho de poros de 1kDa para evitar a saída de qualquer estrutura de hidrogel, porém possibilitasse a passagem de íons como o cloreto de sódio. Essa membrana contendo o sistema foi imersa em um béquer com água MiliQ, sob ligeira agitação magnética realizando-se a troca do líquido por três vezes em um período de 24 horas. Os resultados deste processo estão ilustrados na Figura 32. As imagens evidenciam que o procedimento de diálise dos hidrogéis foi capaz de eliminar os cristais de cloreto de sódio depositados em sua superfície após o processo de reticulação.

Figura 29: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R) com e sem BVZ.

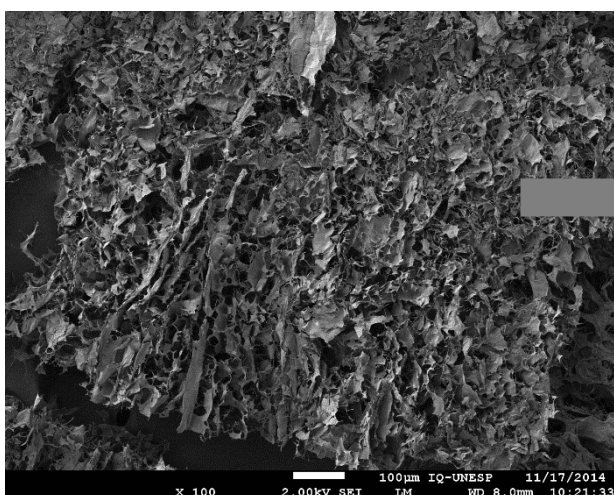
30_pH7,4_5R (LM 100)



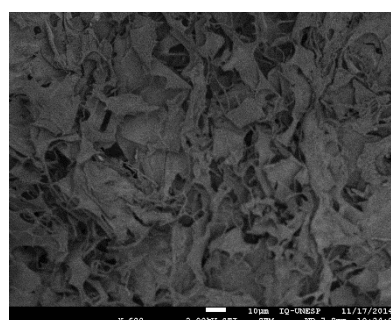
30_pH7,4_5R (LM 600)



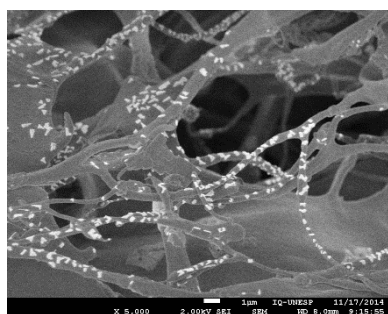
30_pH7,4_5R_BVZ (LM 100)



30_pH7,4_5R_BVZ (LM 600)



30_pH7,4_5R (x5000)



30_pH7,4_5R_BVZ (x5000)

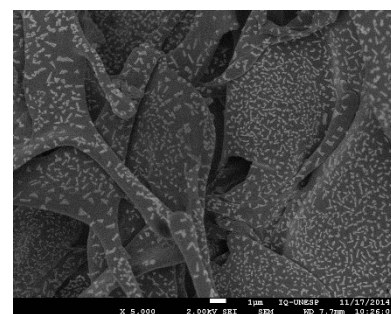
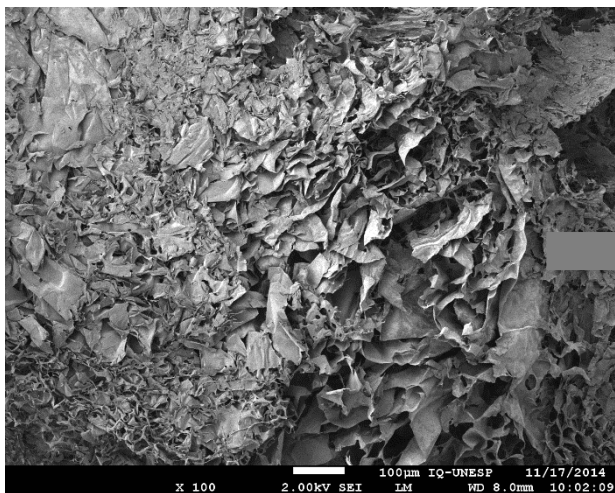
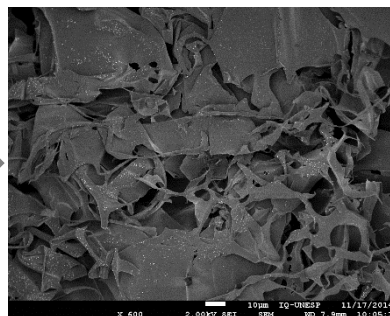


Figura 30: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_3R) com e sem BVZ.

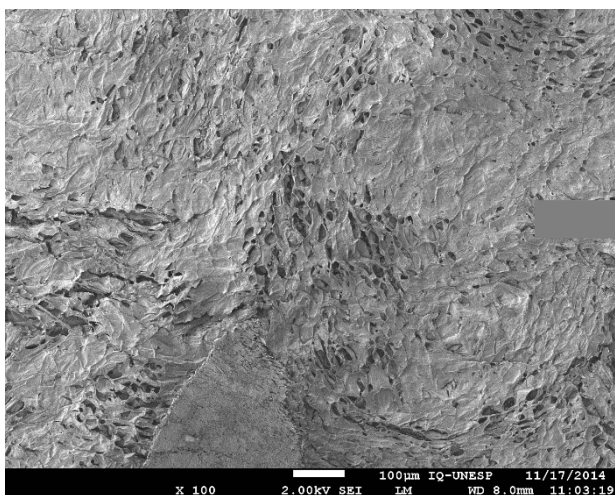
30_pH7,4_3R (LM 100)



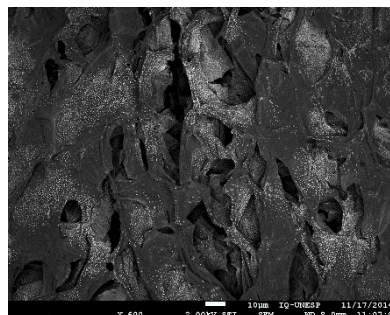
30_pH7,4_3R (LM 600)



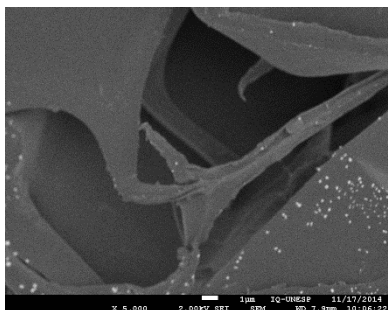
30_pH7,4_3R_BVZ (LM 100)



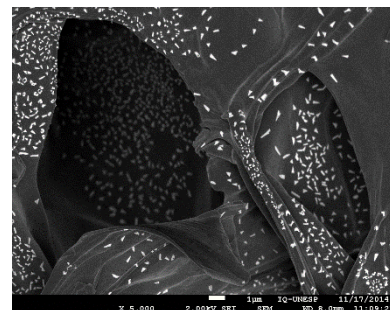
30_pH7,4_3R_BVZ (LM 600)



30_pH7,4_3R (x5000)



30_pH7,4_3R_BVZ (x5000)



Através da espectroscopia de energia dispersiva verificamos ainda a presença de cálcio na superfície dessas estruturas. Entretanto, utilizando uma tensão aceleração de 5 KV não foi detectado íons cálcio na composição da estrutura. Fazendo uma análise mais detalhada, com a utilização de tensão aceleração 10 KV, foi possível detectar a presença do cálcio na estrutura. Esses

resultados evidenciam que o cálcio foi capaz de promover a reticulação do sistema de maneira que ele faça parte da estrutura mais interna do hidrogel.

Para simular possíveis mudanças estruturais e morfológicas resultantes de alterações no pH, utilizou-se ácido láctico que foi colocado em contato com os hidrogéis por um período de aproximadamente uma hora, garantindo um valor médio de pH de $5,8 \pm 0,4$, antes do processo de liofilização.

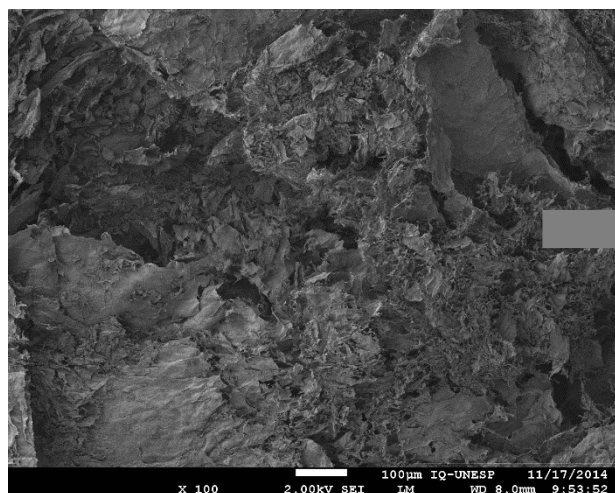
Com a presença do ácido láctico, é possível observar que não houve a precipitação de cristais de NaCl na superfície dos hidrogéis (Figura 33), uma vez que a redução do pH promoveu a solubilização desses cristais. Por outro lado, não foram observadas mudanças morfológicas frente à alteração de pH. Os hidrogéis continuaram com aspecto rugoso apresentando poros de tamanhos variados.

Em seus estudos, SKJÅK-BRÆK e colaboradores (1989) reportaram que as propriedades de formação de géis de alginato estão correlacionadas com o conteúdo e o arranjo sequencial do ácido L-gulurônico na cadeia polimérica sendo que a heterogeneidade dos hidrogéis formados é favorecida por fatores como baixas concentrações de íons cálcio, baixo peso molecular da cadeia do polissacarídeo, altas concentrações de alginato e elevado teor de ácido gulurônico.

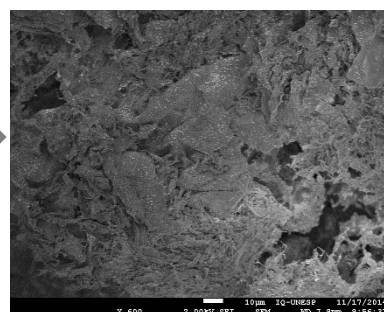
A morfologia dos poros de hidrogéis pode ainda ser relacionada com sua capacidade de absorção de água. A presença de grandes poros nos hidrogéis resulta em maior contato das redes com as moléculas de água. Desta maneira, a medida do tamanho médio dos poros pode fornecer uma ideia da capacidade de absorção desses hidrogéis (DE MOURA *et al.*, 2005).

Figura 31: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R_NaCl) com e sem BVZ.

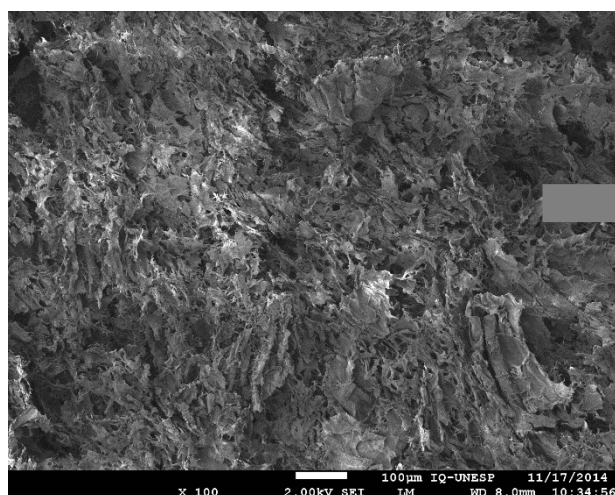
30_pH7,4_5R_NaCl (LM 100)



30_pH7,4_5R_NaCl (LM 600)



30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ (LM 100)



30_pH7,4_5R_NaCl_BVZ (LM 600)

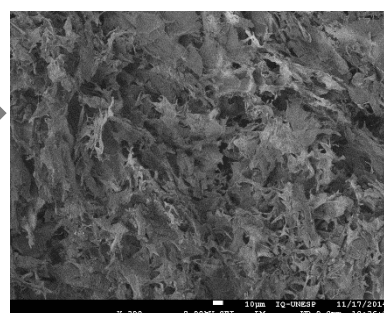
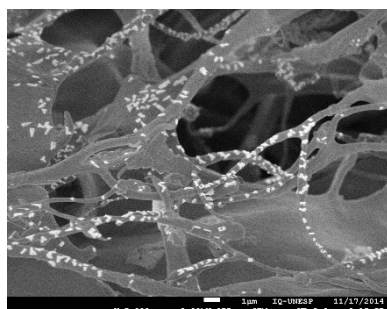


Figura 32: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 7,4_5R) antes e depois do processo de diálise

30_pH7,4_5R (x5000)



30_pH7,4_5R Após o procedimento (x5000)

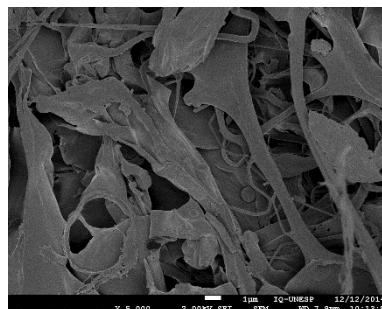
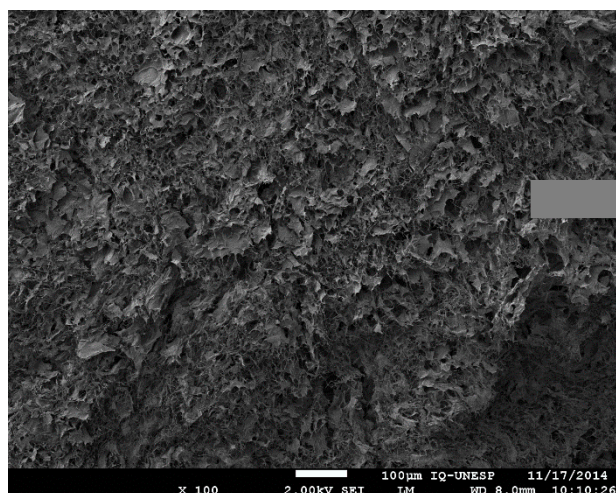
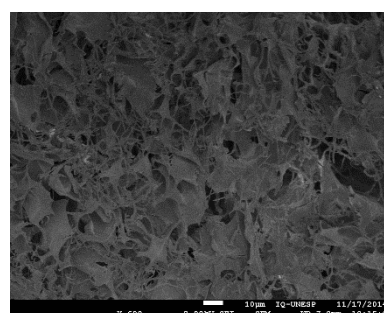


Figura 33: Fotomicrografia de hidrogéis de alginato (30_pH 5,8_5R_Ac. láctico) com e sem BVZ

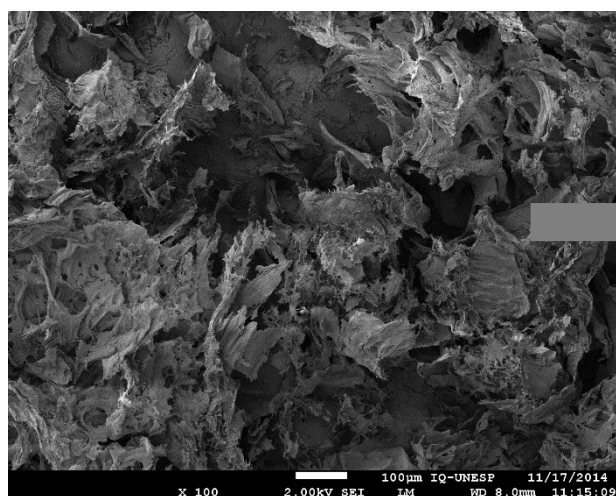
30_pH5,8_5R_ac. láctico (LM 100)



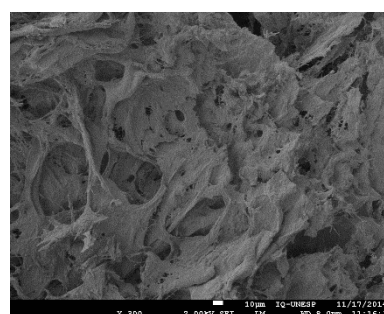
30_pH5,8_5R_ac. láctico (LM 600)



30_pH5,8_5R_ac. láctico_BVZ (LM 100)



30_pH5,8_5R_ac. láctico_BVZ



5.5 Estudo da atividade biológica dos hidrogéis

5.5.1 Avaliação da atividade antiangiogênica dos sistemas utilizando modelo membrana carioalantóica de embrião de galinha (CAM)

O sucesso da terapia anti-VEGF utilizando bevacizumabe apresenta algumas limitações especialmente em função de sua alta hidrofilia, baixa estabilidade em fluídos biológicos e peso molecular elevado, o que irá dificultar sua permeabilidade através de membranas biológicas, fatores estes que podem ser contornados com o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada que possibilitem a terapia localizada.

Uma das principais dificuldades envolvidas na pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos consiste na compreensão do seu comportamento frente aos sistemas biológicos. A proposta da utilização destes sistemas carreadores para a otimização do efeito terapêutico em processos patológicos como o câncer é promissora; no entanto, é necessário analisar sua interação com o microambiente tumoral, uma nova fronteira de pesquisa, denominada nano-bio interface, área de convergência entre nanotecnologia, farmácia, bioquímica, biofísica e biologia molecular (NEL *et al.*, 2009). Neste sentido, os experimentos *in vivo* tornam-se essenciais para a avaliação e o conhecimento dos mecanismos envolvidos em sua atividade.

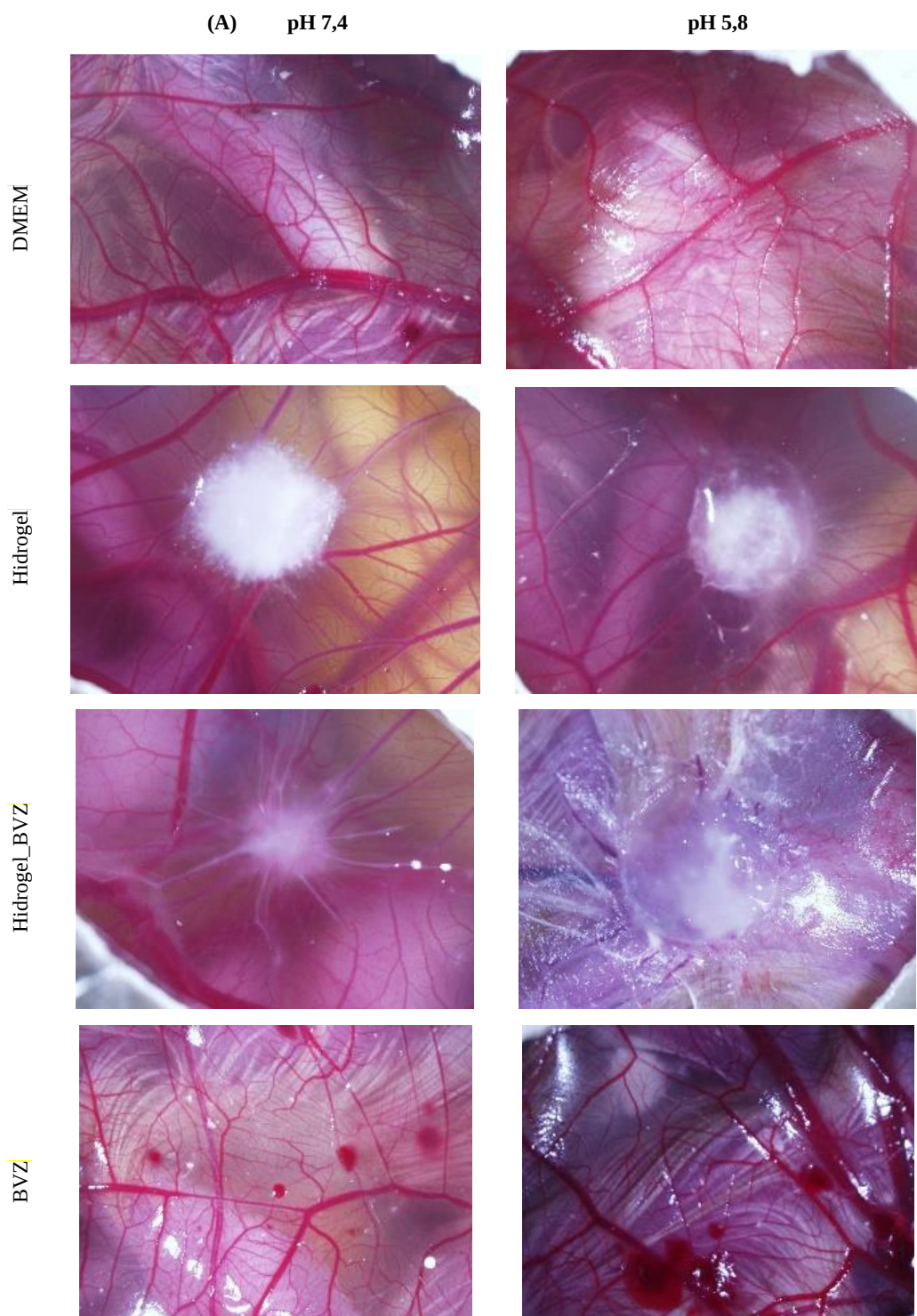
O uso de ensaio com CAM para estudar padrões antiangiogênicos, ao contrário dos outros modelos clássicos que envolvem a utilização de mamíferos, possui a vantagem de ser extremamente simples e viável a inúmeras amostras, além de ser um teste confiável de relativo baixo custo. Além disso, a membrana carioalantóica constitui uma fina rede vascular plana, facilmente visualizada com a utilização de um microscópio (ISHIWATA *et al.*, 1988; NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2010).

Neste estudo, avaliou-se a atividade antiangiogênica de hidrogéis de alginato de cálcio contendo bevacizumabe. Os hidrogéis foram implantados na CAM no 9º dia de desenvolvimento embrionário uma vez que, nesse período, a membrana carioalantóica atinge sua máxima vascularização (BORGES *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2014). As imagens adquiridas *in ovo* dos grupos DMEM (controle negativo), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ (controle positivo) para os dois valores de pH estudados, estão apresentadas na Figura 34.

Observando a Figura 34, é possível analisar que em ovos tratados com meio de cultura DMEM (grupo controle negativo), nota-se uma alta densidade de vasos sanguíneos para ambos os valores de pH estudados. Por outro lado, o grupo que recebeu hidrogel_BVZ, após três dias de tratamento, apresenta vasos sanguíneos colapsados na região em que o hidrogel foi implantado. Esse resultado

foi observado para hidrogéis_BVZ nos dois valores de pH estudados e também, embora menos evidente, quando BVZ comercial (Avastin®) foi utilizado.

Figura 34: Imagens adquiridas *in ovo* após três dias de tratamento (12º dia desenvolvimento embrionário). Os grupos experimentais DMEM (controle negativo), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ (controle positivo) foram analisados em (A) pH7,4 e (B) pH5,8.



É importante ressaltar que embora seja possível notar vasos sanguíneos colapsados em ovos que receberam BVZ comercial, a dimensão da atividade antiangiogênica é menos notável em comparação a atividade de hidrogel_BVZ. Enquanto quase não é possível visualizar vasos sanguíneos ao redor dos hidrogéis contendo BVZ, os grupos tratados com Avastin® possuem coágulos sanguíneos, entretanto, não deixam de exibir uma extensa rede de capilares.

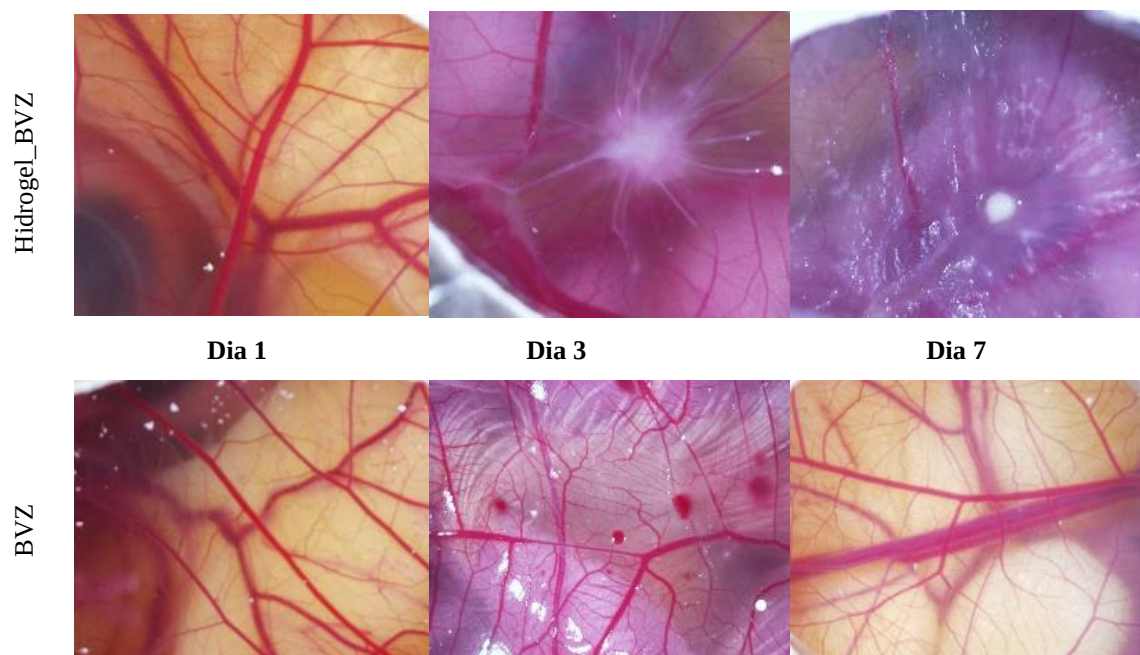
Estudos realizados anteriormente demonstram que quando polímeros são utilizados em combinação com fatores anti-angiogênicos, a resposta pode ser obtida entre 72 e 96 horas de tratamento quando se observa uma menor densidade de vasos em torno do sistema implantado na CAM. Desta maneira, os resultados aqui apresentados corroboram os dados da literatura (RIBATTI *et al.*, 1996b).

A observação macroscópica de todos os grupos experimentais ao longo dos 7 dias após o tratamento demonstra que o padrão de vascularização da CAM apresenta grandes modificações, em função do tempo, especialmente para os grupos tratados com hidrogel_BVZ. Com esta observação, é possível sugerir que o hidrogel é capaz de proteger e liberar o bevacizumabe por um período igual ou superior a 7 dias. No entanto, para avaliar esta hipótese, são necessários ensaios que possibilitem a análise da atividade do sistema em períodos superiores. Estes resultados não foram observados para os grupos experimentais que receberam BVZ comercial (controle positivo). Para estes grupos, pH 5,8 e 7,4, a atividade antiangiogênica foi observada 96 horas após o tratamento. Entretanto, não foi possível visualizar quaisquer alterações na densidade vascular entre o 4º e 7º dia após o tratamento.

A capacidade de promover a liberação controlada de fármacos proteicos utilizando matrizes poliméricas reticuladas já foi demonstrada anteriormente (DEVOLDER *et al.*, 2013). Alguns estudos tem demonstrado que BVZ pode ser liberado a partir de sistemas poliméricos por períodos extensos. Andrew e colaboradores desenvolveram filmes de sílica porosa, material aniônico semelhante ao alginato, capazes de interagir eletrostaticamente com o BVZ, proporcionando a liberação sustentada do fármaco por um período superior a 30 dias (ANDREW *et al.*, 2010).

Nanopartículas de poli-D,L-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA) proporcionaram a liberação sustentada de BVZ por um período de 90 dias. Segundo esses autores, a taxa de liberação do fármaco pôde ser ajustada em função da relação fármaco-polímero utilizada na produção dessas partículas (LI *et al.*, 2012). Além de reduzir custos, a extensão da meia vida através da liberação controlada de biofármacos como o BVZ pode proporcionar o aumento da eficácia do tratamento (WANG *et al.*, 2012).

Figura 35: Imagens adquiridas *in ovo* demonstram mudanças na densidade vascular em função do tempo. Grupos tratados com alginato_BVZ e BVZ (controle positivo) ambos em pH 7,4.



Correlacionando esses resultados dos estudos biológicos com dados de caracterização físico-química (dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria exploratória), é possível sugerir que os hidrogéis de alginato de cálcio são capazes de aumentar a estabilidade do bevacizumabe. Diversos estudos vêm destacando a natureza estabilizante de poliânions sobre estruturas proteicas (IVINOVA *et al.*, 2003; DERRICK *et al.*, 2007).

Após 7 dias de tratamento, os vasos sanguíneos foram avaliados *in ovo* e *ex ovo*. A avaliação da resposta antiangiogênica foi realizada de maneira semiquantitativa com a utilização de imagens adquiridas *ex ovo*. As imagens *ex ovo* permitem uma avaliação mais precisa do número de vasos sanguíneos através da utilização de software contendo uma ferramenta de contagem (SILVA-CORREIA *et al.*, 2012).

A figura 36 mostra a observação *ex ovo* dos diferentes grupos experimentais: DMEM (controle), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ. As membranas corioalantóica foram excisadas dos ovos e fotografadas para a contagem de vasos sanguíneos. Essas imagens, (Figura 36), destacam que os hidrogéis são biocompatíveis e estáveis durante o período de implantação. Os sistemas possuem boa integração com a CAM uma vez que vasos sanguíneos se formaram na presença dos hidrogéis. Além disso, não foram observados elementos que remetem a resposta inflamatória ao sistema adicionado.

A Figura 37 ilustra a quantificação de vasos sanguíneos *ex ovo* 7 dias após o tratamento. Os resultados representam a média de número de vasos contados por dois observadores independentes, de ao menos dez replicatas para os grupos tratados em pH 7,4.

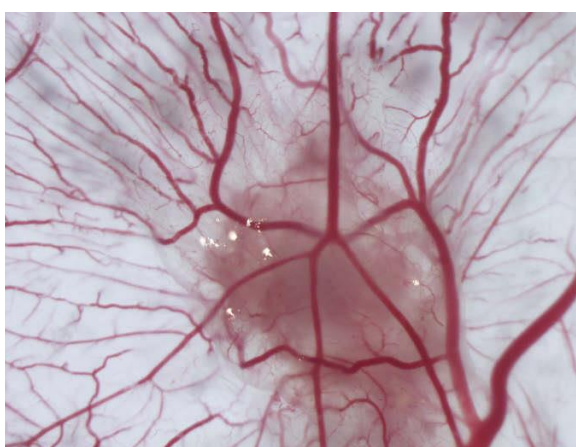
Sabendo que uma alta variabilidade é esperada e comumente observada nos ensaios *in vivo*, replicatas, ao menos $n=10$, são requeridas para que o ensaio apresente confiabilidade (RIBATTI *et al.*, 2006).

Figura 36: Avaliação da atividade antiangiogênica em diferentes grupos experimentais: DMEM (controle negativo), hidrogel, hidrogel_BVZ e BVZ (controle positivo). Imagens adquiridas *ex ovo*.

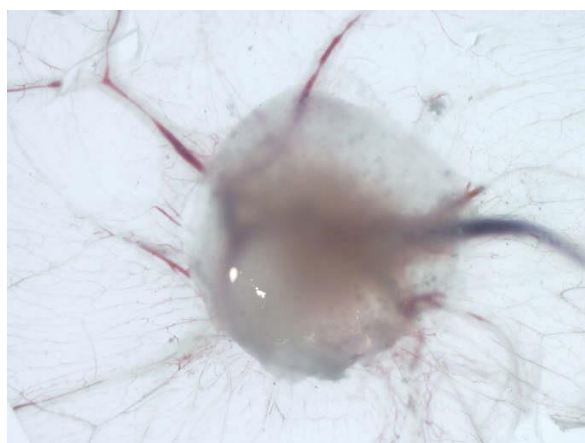
DMEM (controle negativo)



Hidrogel



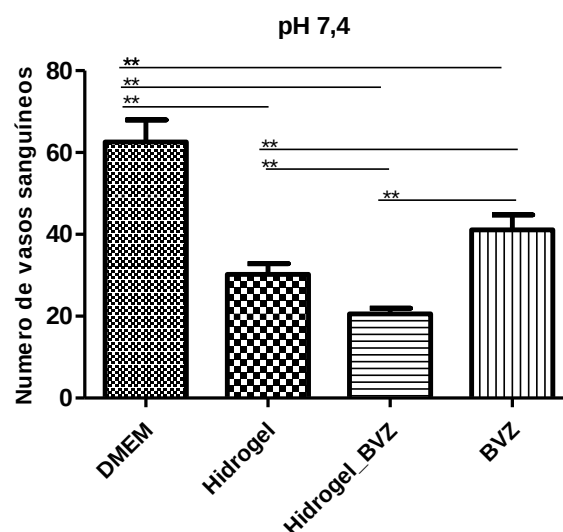
Hidrogel_BVZ



BVZ (controle positivo)



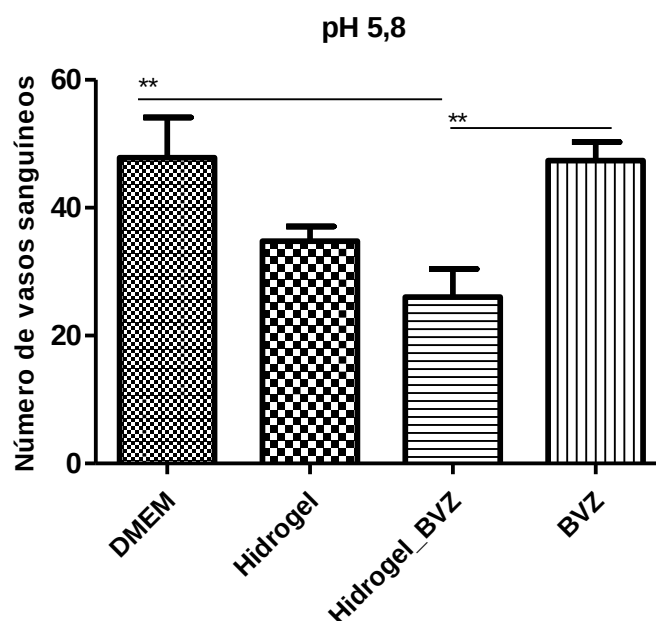
Figura 37: Quantificação de vasos sanguíneos *ex ovo* sete dias após o tratamento. Os resultados representam a média de ao menos 10 replicatas para os grupos tratados em pH 7,4. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes ().**



Foram observadas diferenças significativas nos números de vasos sanguíneos entre os grupos tratados em pH 7,4. O grupo controle (DMEM) mostra uma extensa rede de vasos sanguíneos e contagem de vasos superior aos demais grupos experimentais. É possível observar ainda que, embora os vasos sanguíneos tenham sido capazes de crescer na presença de hidrogéis (Figura 37), sua presença na CAM promove, por si só, a redução da sua formação. Esse fenômeno pode estar diretamente associado a alta capacidade de absorção de fluidos biológicos por esses sistemas. Entretanto, a grande expectativa destes resultados consiste no fato que o bevacizumabe incorporado nos hidrogéis foi capaz de promover uma grande redução na densidade vascular de maneira que este grupo apresente uma contagem de vasos inferior ao grupo tratado com BVZ comercial. Esses resultados reforçam a hipótese de que a incorporação no hidrogel pode proporcionar o aumento da estabilidade / atividade do BVZ.

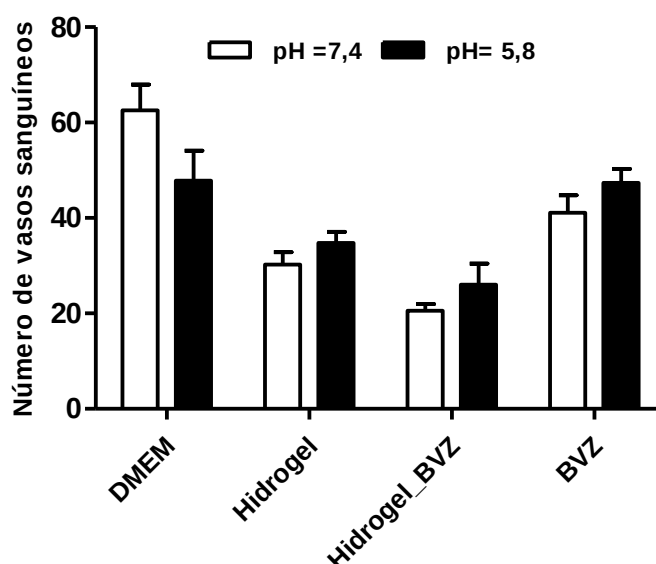
Comportamento semelhante foram obtidos para os grupos experimentais tratados em pH 5,8 (Figura 38). Para este valor de pH, os hidrogéis parecem promover a redução da formação de vasos sanguíneos, entretanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. No entanto, mais uma vez, é possível afirmar que o BVZ incorporado aos hidrogéis é capaz de promover a redução de vasos sanguíneos mostrando maior potencial anti-angiogênico que o BVZ comercial.

Figura 38: Quantificação de vasos sanguíneos *ex ovo* sete dias após o tratamento (Os resultados representam a média de ao menos 10 replicatas para os grupos tratados em pH 5,8. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes (**).



A quantificação de vasos sanguíneos foi também utilizada para avaliar a influência do pH sob a atividade antiangiogênica dos sistemas (Figura 39).

Figura 39: Quantificação de vasos sanguíneos *ex ovo* sete dias após o tratamento. Comparação entre grupos tratados em pH 7,4 e 5,8. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes (**).



Embora ambos os valores de pH apresentem a mesma tendência em relação a quantificação de vasos sanguíneos, não foi possível correlacionar, estatisticamente, atividade antiangiogênica e valores de pH utilizando modelo da membrana corioalantóica do embrião de galinha. Duas diferentes possibilidades podem explicar esses resultados: por um lado, a variação de pH de 7,4

para 5,8 pode realmente não influenciar a atividade antiangiogênica dos hidrogéis_BVZ. Por outro lado, o modelo CAM utilizado neste estudo apresenta valores de pH próximos ao fisiológico (7,4) e pode, desta maneira, ter tamponado o pH ácido dos sistemas adicionados. Para a segunda hipótese, o ensaio da CAM não foi capaz de reproduzir o microambiente ácido encontrado na região tumoral.

Rodrigues e colaboradores desenvolveram sistemas conjugados de doxorrubicina e polietilenoglicol (PEG) para liberação do fármaco nas das células tumorais através de clivagem ácida da ligação hidrazona após endocitose. Entretanto, a atividade antiangiogênica deste sistema foi avaliada com a utilização do modelo CAM e não foram observados efeitos antiangiogênicos para o conjugado (RODRIGUES *et al.*, 1999). Sabendo que a doxorrubicina exibe atividade antiangiogênica via redução do fator induzido por hipóxia 1 (HIF)-1 α , o modelo CAM parece ser incapaz de mimetizar a microrregião ácida do tumor, o que seria a condição necessária para a clivagem desse conjugado e consequentemente a liberação da doxorrubicina (VARGAS *et al.*, 2007; LEE. *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010).

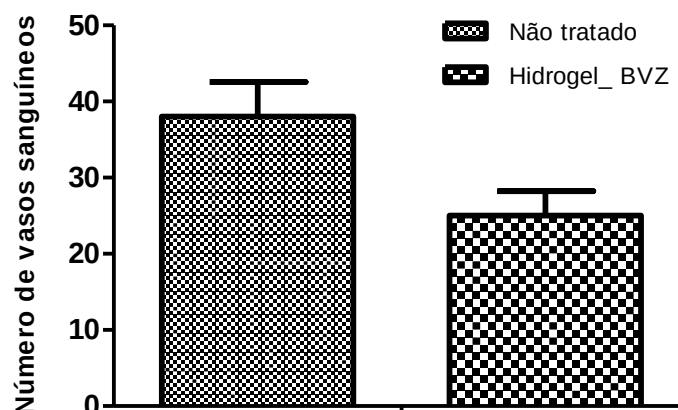
5.5.2 Análise do crescimento e progressão tumoral utilizando modelo membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)

Baseado nos resultados encontrados foram implantadas células tumorais de glioblastomas U251 na CAM criando microtumores que permitiriam a análise da atividade antiangiogênica dos hidrogéis e o monitoramento do crescimento e progressão do tumor, através das medidas de área e do perímetro do tumor durante o procedimento experimental. No 17º dia do desenvolvimento embrionário, CAM contendo tumores foram excisadas e fixadas para contagem de vasos sanguíneos e fixadas em parafina para análise imuno-histoquímica.

Uma das vantagens da utilização do modelo da CAM em substituição a utilização de mamíferos para o estudo do desenvolvimento tumoral, baseia-se no fato de que, diferentemente dos modelos mamíferos, após 2 a 5 dias de inoculação de células tumorais formam-se tumores 3D visíveis e suplementados pelos vasos sanguíneos presentes na CAM, processo que costuma demorar nos modelos utilizando mamíferos (VARGAS *et al.*, 2007).

Na Figura 40, estão os resultados de números de vasos sanguíneos contados de fotografias tiradas *ex ovo* após excisão da CAM. Embora seja possível verificar que existe uma tendência a redução de vasos sanguíneos para os grupos experimentais que receberam tratamento anti-VEGF (hidrogéis contendo BVZ), as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Figura 40: Quantificação macroscópica de vasos sanguíneos *ex ovo* após 4 dias de tratamento antiVEGF. Os resultados representam contagem do número médio de vasos sanguíneos realizada por observadores independentes (n=3). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes (**).



É importante destacar que para este estudo, o monitoramento da terapia anti-VEGF foi de 4 dias para que o experimento fosse finalizado antes da eclosão dos ovos. Desta maneira, é provável que os hidrogéis não tenham liberado todo o BVZ e, portanto, não exibiram todo o potencial anti-angiogênico do sistema. Os resultados apresentados no item 5.5.1. revelam que a atividade antiangiogênica dos sistemas é tempo dependente. Além disso, para o ensaio com células tumorais, utilizou-se uma baixa população experimental (n=3); sabendo que para experimentos *in vivo*, uma grande variabilidade é esperada, seria necessário ampliar a população de estudo.

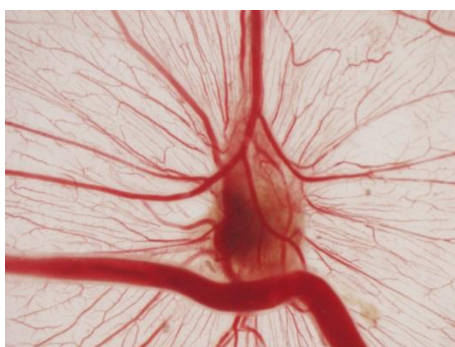
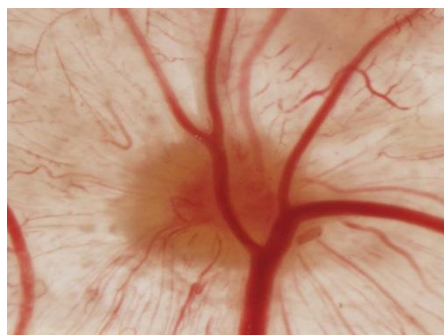
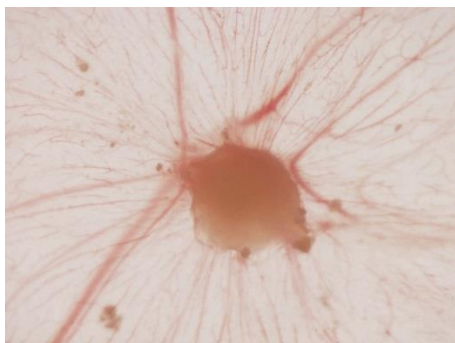
Na Figura 41, estão as fotografias *ex ovo* da CAM contendo tumores após excisão e fixação em formaldeído. Embora seja possível visualizar mudanças no suprimento vascular quando os ovos foram tratados com hidrogel_BVZ, a redução no número de vasos sanguíneos não é evidente para todos os ovos utilizados, reforçando desta maneira a necessidade de extensão do grupo experimental utilizado. Utilizando as imagens adquiridas *in ovo* durante todo o procedimento experimental, analisamos a área (cm²) e o perímetro do tumor (cm) como parâmetros de desenvolvimento e progressão tumoral. A Figura 42 mostra a área e o perímetro do tumor em dois momentos distintos: dia 1 representa medidas do tumor antes dos ovos receberem hidrogéis contendo BVZ e dia 5 representa as medidas do tumor 5 dias após o tratamento anti-VEGF.

Observando esses resultados (Figura 42), é possível avaliar que existe a tendência a diminuição da área e perímetro dos tumores após o tratamento com hidrogel_BVZ. Apesar do desvio padrão, os hidrogéis parecem ter ocasionado cerca de 50% de redução na área do tumor. Entretanto, para chegar a conclusões bem estabelecidas, são necessárias investigações que compreendam um período superior de análise e uma população maior.

Trabalhar com o modelo da CAM, especialmente quando envolve a introdução de uma linhagem celular, não é uma tarefa fácil. As infecções são um risco constante e contaminações das mais variáveis fontes podem ocorrer, reduzindo assim a população experimental e prejudicando o sucesso do ensaio (RIBATTI *et al.*, 1996a).

Figura 41: Inibição do crescimento tumoral e angiogênese: fotografias tiradas *ex ovo* após quatro dias de tratamento com hidrogéis contendo BVZ pH 5,8 (n=3).

Não tratado



Hidrogel_BVZ (Após 4 dias de tratamento)

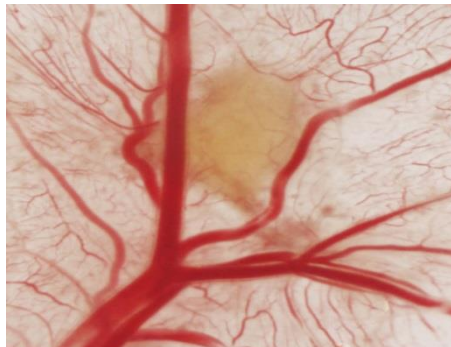
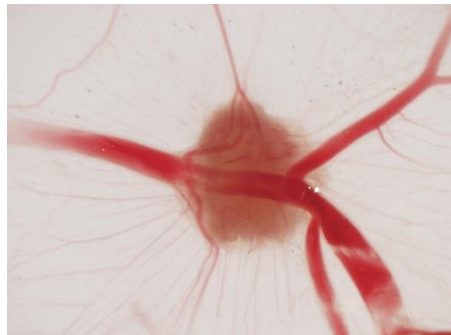
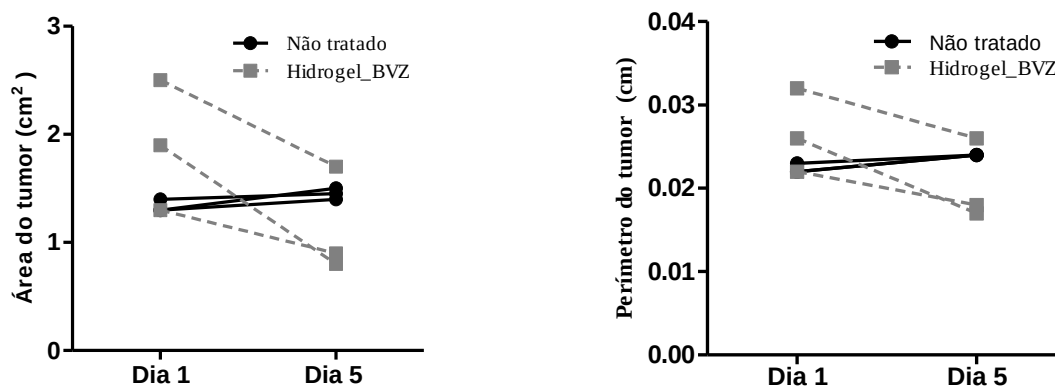


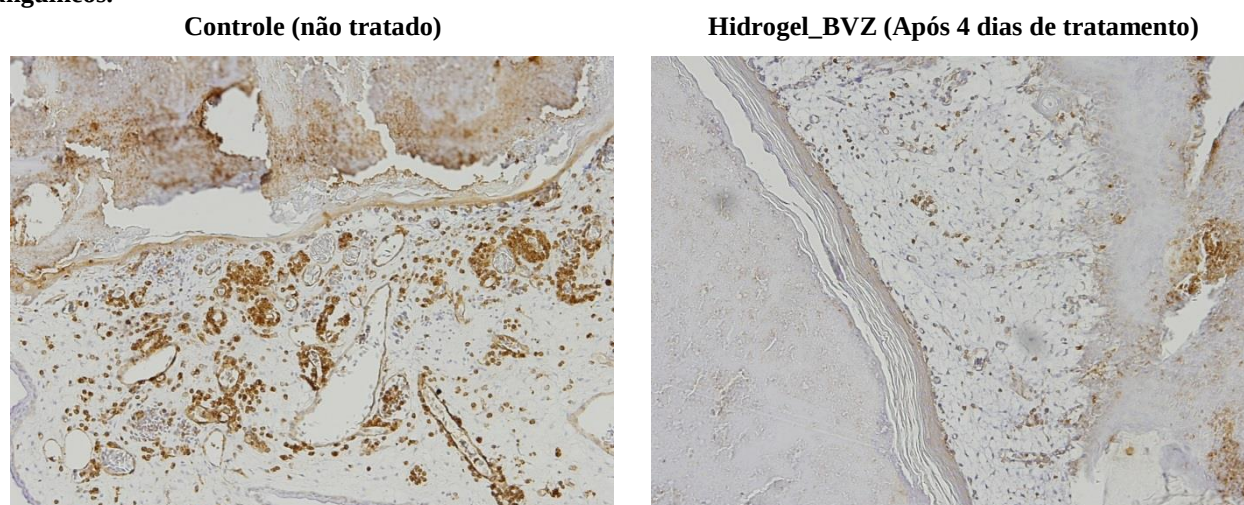
Figura 42: Área (cm²) e perímetro (cm) do tumor antes e após o tratamento com hidrogel_BVZ. Dia 1 refere-se às dimensões do tumor antes do tratamento e dia 5 refere-se às dimensões do tumor 3 dias após o tratamento. Os resultados estão expressos como médias (n=3). Diferenças com p<0,05 foram consideradas estatisticamente significantes (**).



5.5.2.1 Avaliação da proliferação celular e vasos sanguíneos de origem embrionária

A identificação microscópica de vasos sanguíneos fornece uma informação qualitativa valiosa quando se pretende estudar o processo de angiogênese (SILVA-CORREIA *et al.*, 2012). As análises histológicas foram realizadas em secções da CAM contendo microtumores. Vasos sanguíneos de origem embrionária foram destacados utilizando marcação com SNA-lectina. Fotografias obtidas em microscópio de luz polarizada podem ser visualizadas na Figura 43.

Figura 43: Fotografias adquiridas em microscópio de luz polarizada (400x): ensaio de imuno-histoquímica para cortes histológicos de CAM contendo microtumores. As amostras foram marcadas com SNA-lectina para vasos sanguíneos.



Diversos vasos sanguíneos macro e microscópicos podem ser visualizados na CAM. Embora macroscopicamente a quantificação de vasos sanguíneos não tenha apresentado diferenças significativas para os ovos tratados com hidrogel contendo BVZ, as fotomicrografias das secções

histológicas de CAM contendo microtumores marcadas com SNA-lectina mostram que o grupo controle possui um número elevado de vasos sanguíneos quando comparado ao grupo experimental que recebeu hidrogel_BVZ. Além disso, é possível observar que para o grupo que não recebeu tratamento anti-VEGF, os vasos sanguíneos exibem maior grau de organização.

Ki 67 é um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer um antígeno nuclear humano presente nas células em proliferação, entretanto, ausente quando as células estão em repouso. Desde a sua descoberta em 1983 por Gerdes e co-autores, o Ki-67 vem sendo amplamente utilizado especialmente para avaliar a proliferação celular em tumores malignos, uma vez que a determinação exata das taxas de proliferação possui grande valor para determinação do prognóstico e terapia adequada ao tratamento do câncer (GERDES *et al.*, 1983; GERDES *et al.*, 1984).

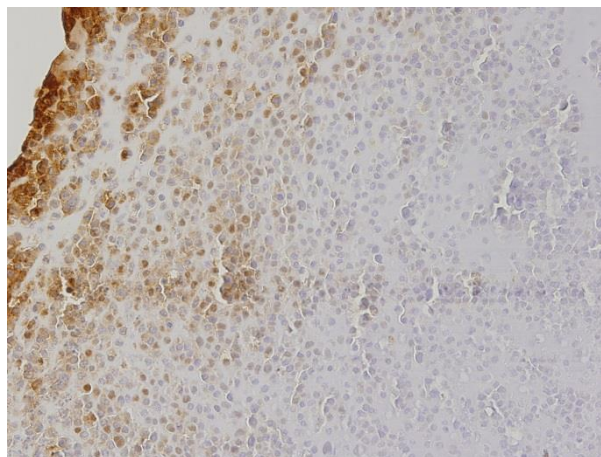
As secções de CAM contendo microtumores foram analisadas com imunomarcagem de Ki-67 para avaliação da proliferação celular (Figura 44). Entretanto, observando as fotografias adquiridas, ao contrário do esperado, não foram encontradas diferenças significativas em relação à taxa de proliferação celular entre o grupo controle e grupo que recebeu hidrogéis contendo BVZ.

Figura 44: Fotografias adquiridas em microscópio de luz polarizada (400x): ensaio de imuno-histoquímica para cortes histológicos de CAM contendo microtumores. As amostras foram marcadas com Ki-67 para avaliação da proliferação celular.

Controle (não tratado)



Hidrogel_BVZ (Após 4 dias de tratamento)



6 CONCLUSÕES

O uso de sistemas de liberação para a otimização do efeito terapêutico em processos patológicos como o câncer é sem dúvidas promissor, especialmente quando é projetado frente as características da patologia em questão. Este conceito introduz a abordagem da nanoarquitetônica, que providência ajustes entre efeitos e interações biológicas, englobando diversas áreas de pesquisa.

O alginato de sódio foi caracterizado com a utilização de static light scattering (SLS), determinando-se sua massa molecular média (± 107 kDa), espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) para determinação de sua fração M/G.

Nos ensaios de pré-formulação, as interações supramoleculares entre alginato e BVZ foram avaliadas e caracterizadas utilizando potencial zeta, tamanho de partícula e eficiência de associação. A análise de eficiência de associação e potencial zeta foi capaz de demonstrar além da ocorrência de interações predominantemente eletrostáticas entre polímero e proteína, que elas ocorrem de maneira diferenciada em pH ácido. As análises de espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria exploratória demonstraram a estabilidade proteica em diferentes valores de pH e na presença do alginato, que deve proporcionar uma estabilidade adicional à proteína.

Na produção de hidrogéis, uma concentração de 30 mg/mL de massa total (polímero + proteína) e 5 mg/mL de reticulante mostrou-se ideal para a produção de sistemas homogêneos, estáveis e com fluxo adequado através do orifício de uma agulha.

Através da utilização de microscopia eletrônica de varredura demonstrou-se que os hidrogéis exibem uma superfície rugosa, folheada, alongada, onde se encontram poros de tamanhos e formatos variados.

O conjunto de dados reológicos obtidos demonstra que ao sofrer cisalhamento, os hidrogéis produzidos possuem uma viscosidade reduzida. Além disso, os resultados do ensaio reológicos oscilatório apresentam boa correlação com os dados de potencial zeta e eficiência de associação e podem sugerir que quando ocorrem alterações nos valores de pH do meio, os hidrogéis apresentam uma organização estrutural diferenciada, o que pode ser vantajoso para a aplicação localizada que se pretende.

O estudo de avaliação da atividade antiangiogênica dos hidrogéis utilizando modelo da membrana carioalantóica do embrião da galinha demonstrou que a presença dos hidrogéis na CAM, parece reduzir, por si só, a formação de vasos sanguíneos. Além disso, esses sistemas contendo BVZ nos valores de pH 5,8 e 7,4 são capazes de reduzir a densidade de vasos sanguíneos de maneira mais significativa que a terapia antiVEGF disponível comercialmente. Verificou-se ainda que os sistemas

são capazes de aderir firmemente à superfície da CAM sem promover resposta inflamatória. Correlacionando os dados de caracterização do sistema e estudos da atividade biológica dos hidrogéis, é possível inferir que os sistemas desenvolvidos atuam promovendo a liberação do bevacizumabe, proporcionando o aumento da estabilidade do fármaco na microrregião tumoral, intensificando assim, sua atividade antiangiogênica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-GHAFFAR, M. A.; HASHEM, M. S.; EL-AWADY, M. K.; RABIE, A. M. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 667-675, 2012.
- ABOEL DAHAB, A.; EL-HAG, D. Effective protocol for the investigation of physicochemical and conformational stability and aggregation kinetics measurements of therapeutic IgG2 monoclonal antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 405, n. 0, p. 154-166, 2014.
- ABRISHAMI, M.; GANAVATI, S. Z.; SOROUSH, D.; ROUHBAKHSH, M.; JAAFARI, M. R.; MALAEKEH-NIKOUEI, B. Preparation, Characterization, and in Vivo Evaluation of Nanoliposomes-Encapsulated Bevacizumab (Avastin) for Intravitreal Administration. **RETINA**, v. 29, n. 5, p. 699-703 2009.
- AGUADO, B. A.; MULYASASMITA, W.; SU, J.; LAMPE, K. J.; HEILSHORN, S. C. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 7-8, p. 806-815, 2012.
- AGULHON, P.; ROBITZER, M.; HABAS, J.-P.; QUIGNARD, F. Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, n. 0, p. 525-531, 2014.
- AMORIM, R.; PINHEIRO, C.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; PEREIRA, H.; MOYER, M. P.; PRETO, A.; BALTAZAR, F. Monocarboxylate transport inhibition potentiates the cytotoxic effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v. 365, n. 1, p. 68-78, 2015.
- ANDRE, N. D.; SILVA, V. A.; WATANABE, M. A.; DE LUCCA, F. L. Intratumoral injection of PKR shRNA expressing plasmid inhibits B16-F10 melanoma growth. **Oncology reports**, v. 32, n. 5, p. 2267-2273, 2014.
- ANDREW, J. S.; ANGLIN, E. J.; WU, E. C.; CHEN, M. Y.; CHENG, L.; FREEMAN, W. R.; SAILOR, M. J. Sustained Release of a Monoclonal Antibody from Electrochemically Prepared Mesoporous Silicon Oxide. **Adv Funct Mater**, v. 20, n. 23, p. 4168-4174, 2010.
- ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N.; BRANNON-PEPPAS, L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. **Biomaterials**, v. 17, n. 17, p. 1647-1657, 1996.
- ANSORENA, E.; DE BERDT, P.; UCAKAR, B.; SIMÓN-YARZA, T.; JACOBS, D.; SCHAKMAN, O.; JANKOVSKI, A.; DEUMENS, R.; BLANCO-PRIETO, M. J.; PRÉAT, V.; RIEUX, A. D. Injectable alginate hydrogel loaded with GDNF promotes functional recovery in a hemisection model of spinal cord injury. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 148-158, 2013.
- AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 32-40, 2003.

- AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.
- AZEVEDO, M. A.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; CERQUEIRA, M. A. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 141-146, 2014.
- BAGRE, A. P.; JAIN, K.; JAIN, N. K. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 31-40, 2013.
- BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 6, p. 645-658, 2006.
- BAKHTIAR, R. Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibodies. **Journal of Chemical Education**, v. 89, n. 12, p. 1537-1542, 2012.
- BALTAZAR, F.; PINHEIRO, C.; MORAIS-SANTOS, F.; AZEVEDO-SILVA, J.; QUEIROS, O.; PRETO, A.; CASAL, M. Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response. **Histol Histopathol**, v. 29, n. 12, p. 1511-24, Dec 2014.
- BANTLE, S.; SCHMIDT, M.; BURCHARD, W. Simultaneous static and dynamic light scattering. **Macromolecules**, v. 15, n. 6, p. 1604-1609, 1982.
- BARBUCCI, R.; LEONE, G.; LAMPONI, S. Thixotrophy property of hydrogels to evaluate the cell growing on the inside of the material bulk (amber effect). **Journal of Biomedical Materials Research (Part B) Applied Biomaterials**, v. 76, n. 1, p. 33-40, 2005.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. ed. Elsevier, 1989.
- BECKER, T. A.; KIPKE, D. R. Flow properties of liquid calcium alginate polymer injected through medical microcatheters for endovascular embolization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 4, p. 533-540, 2002.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.
- BERNEGOSI, J. **Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o peptídeo KSL-W**. 2014. 104f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2014, 2014.
- BERTAGNOLLI, C.; ESPINDOLA, A. P.; KLEINUBING, S. J.; TASIC, L.; DA SILVA, M. G. Sargassum filipendula alginate from Brazil: seasonal influence and characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 619-623, 2014.

- BERTAGNOLLI, C.; ESPINDOLA, A. P. D. M.; KLEINÜBING, S. J.; TASIC, L.; SILVA, M. G. C. D. Sargassum filipendula alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, n. 0, p. 619-623, 2014.
- BIDARRA, S. J.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1646-1662, 2014.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 375-388, 2005.
- BOLA, B. M.; CHADWICK, A. L.; MICHPOULOS, F.; BLOUNT, K. G.; TELFER, B. A.; WILLIAMS, K. J.; SMITH, P. D.; CRITCHLOW, S. E.; STRATFORD, I. J. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 12, p. 2805-2816, 2014.
- BONINO, C. A.; KREBS, M. D.; SAQUING, C. D.; JEONG, S. I.; SHEARER, K. L.; ALSBERG, E.; KHAN, S. A. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 111-119, 2011.
- BOONTHEEKUL, T.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2455-2465, 2005.
- BORGES, J.; TEGTMEIER, F. T.; PADRON, N. T.; MUELLER, M. C.; LANG, E. M.; STARK, G. B. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. **Tissue Engineering Part A**, v. 9, n. 3, p. 441-450, 2003.
- BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.
- BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074-2089, 2007.
- BURCKBUCHLER, V.; MEKHLLOUFI, G.; GITEAU, A. P.; GROSSIORD, J. L.; HUILLE, S.; AGNELY, F. Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 351-6, 2010.
- BURISH, T. G.; TOPE, D. M. Psychological techniques for controlling the adverse side effects of cancer chemotherapy: findings from a decade of research. **Journal of pain and symptom management**, v. 7, n. 5, p. 287-301, 1992.
- ČALIJA, B.; CEKIĆ, N.; SAVIĆ, S.; DANIELS, R.; MARKOVIĆ, B.; MILIĆ, J. pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 “sandwich” polyelectrolyte complex. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, n. 0, p. 395-402, 2013.

CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA E SILVA, H.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; CHORILLI, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1-7 2014.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 323-328, 2003.

CAMPANA, P. T. **Desnaturação e reenovelamento da frutalina, uma lecitina ligante de D-galactose**. 1998. 107f. (Dissertação de Mestrado em Física Aplicada). Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 1998, 1998.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.

CARDOSO, V. M. D. O. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos**. 2014. 198f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2014, 2014.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. 2009. 143f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2009, 2009.

CASTRO, R. Câncer na Mídia: uma questão de saúde pública. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 1, p. 41-48, 2009.

CEBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJALLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 5, p. 601-615, 2006.

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: Rheological characterization of the interaction with mucin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1117-1127, 2002.

CHATENOUD, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. **Nature reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 123-132, 2003.

CHEN, H.; WANG, C. S.; LI, M.; SANCHEZ, E.; LI, J.; BERENSON, A.; WIRTSCHAFTER, E.; WANG, J.; SHEN, J.; LI, Z.; BONAVIDA, B.; BERENSON, J. R. A novel angiogenesis model for screening anti-angiogenic compounds: The chorioallantoic membrane/feather bud assay. **International journal of oncology**, v. 37, p. 71-79, 2010.

CHEN, J. P.; HONG, L.; WU, S.; WANG, L. Elucidation of Interactions between Metal Ions and Ca Alginate-Based Ion-Exchange Resin by Spectroscopic Analysis and Modeling Simulation. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9413-9421, 2002.

CHEN, T.; OAKLEY, D. M. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. **Thermochimica Acta**, v. 248, n. 0, p. 229-244, 1995.

CHOLLAKUP, R.; SMITTHIPONG, W.; EISENBACH, C. D.; TIRRELL, M. Phase Behavior and Coacervation of Aqueous Poly(acrylic acid)-Poly(allylamine) Solutions. **Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 2518-2528, 2010.

CHU, K. O.; LIU, D. T.; CHAN, K. P.; YANG, Y. P.; YAM, G. H.; ROGERS, M. S.; PANG, C. P. Quantification and structure elucidation of in vivo bevacizumab modification in rabbit vitreous humor after intravitreal injection. **Molecular pharmaceuticals**, v. 9, n. 12, p. 3422-3433, 2012.

CONGY-JOLIVET, N.; PROBST, A.; WATIER, H.; THIBAUT, G. Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. **Critical reviews in oncology hematology**, v. 64, n. 3, p. 226-233, 2007.

COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte-protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 1-2, p. 52-78, 2005.

CURTARELLO, M.; ZULATO, E.; NARDO, G.; VALTORTA, S.; GUZZO, G.; ROSSI, E.; ESPOSITO, G.; MSAKI, A.; PASTO, A.; RASOLA, A.; PERSANO, L.; CICCARESE, F.; BERTORELLE, R.; TODDE, S.; PLEBANI, M.; SCHROER, H.; VALENTA, S.; MUELLER-KLIESER, W.; AMADORI, A.; MORESCO, R. M.; INDRACCOLO, S. VEGF-targeted therapy stably modulates the glycolytic phenotype of tumor cells. **Cancer research**, v. 75, n. 1, p. 120-133, 2015.

CURY, B. S.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 8-15, 2009.

DAUGHERTY, A. L.; MRSNY, R. J. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 5-6, p. 686-706, 2006.

DAVIS, T.; RAMIREZ, M.; MUCCI, A.; LARSEN, B. Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from Sargassum spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 275-284, 2004.

DE MOURA, M. R.; GUILHERME, M. R.; CAMPESE, G. M.; RADOVANOVIC, E.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive stress and pore morphology. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 12, p. 2845-2852, 2005.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

- DERRICK, T.; GRILLO, A. O.; VITHARANA, S. N.; JONES, L.; REXROAD, J.; SHAH, A.; PERKINS, M.; SPITZNAGEL, T. M.; MIDDAUGH, C. R. Effect of polyanions on the structure and stability of repifermin (keratinocyte growth factor-2). **J Pharm Sci**, v. 96, n. 4, p. 761-76, 2007.
- DERWENT, J. J. K.; MIELER, W. F. Thermoresponsive hydrogels as a new ocular drug delivery platform to the posterior segment of the eye. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 106, p. 206-213, 2008.
- DEVOLDER, R.; ANTONIADOU, E.; KONG, H. Enzymatically cross-linked injectable alginate-g-pyrrole hydrogels for neovascularization. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 1, p. 30-37, 2013.
- DEWAR, R. J.; JOYCE, M. J. The thixotropic and rheopectic behaviour of maize starch and maltodextrin thickeners used in dysphagia therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 3, p. 296-305, 2006.
- DINU, M.; SCHWARZ, S.; DINU, I.; DRĂGAN, E. Comparative rheological study of ionic semi-IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and dextran sulphate and of polyacrylamide hydrogels. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 16, p. 1647-1657, 2012.
- DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, n. 3-4, p. 202-214, 2000.
- DREWES, C. C. **Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-x sobre a angiogênese in vivo induzida pelo VEGF**. 2011. (Dissertação de mestrado - Análises Clínicas e Toxicológicas). - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- DUFFY, M. J. The war on cancer: are we winning? **Tumour biology**, v. 34, n. 3, p. 1275-1284, Jun 2013.
- ESCOBAR, J. L.; GARCÍA, D. M.; ZALDIVAR, D.; KATIME, I. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. **Revista Iberoamericana Polímeros**, v. 3, n. 3, p. 1-25, 2002.
- FALK, A. T.; BARRIÈRE, J.; FRANÇOIS, E.; FOLLANA, P. Bevacizumab: A dose review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 94, n. 3, p. 311-322, 2015.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. Espectrofotometria no ultravioleta, visível e infravermelho. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 1 548 p. 2010.
- FEFELOVA, N. A.; NURKEEVA, Z. S.; MUN, G. A.; KHUTORYANSKIY, V. V. Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 339, n. 1-2, p. 25-32, 2007.
- FENG, X. Angiogenesis and Antiangiogenesis Therapies: Spear and Shield of Pharmacotherapy. **Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 3, p. 1-3, 2014.

FENG, X.; OFSTAD, W.; HAWKINS, D. Antiangiogenesis therapy: a new strategy for cancer treatment. **US Pharmacist**, v. 35, n. 7, p. 4-9, 2010.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 795-803, 2002.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for Anticancer Therapy. **The Oncologist**, v. 9, n. suppl 1, p. 2-10, 2004.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; GERBER, H.-P.; NOVOTNY, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 391-400, 2004.

FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; NOVOTNY, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 2, p. 328-335, 7/29/ 2005.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature Review Drug Discovery**, v. 6, n. 4, p. 273-286, 2007.

FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. 2008. 203p. (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2008, 2008.

FU, S.; THACKER, A.; SPERGER, D.; BONI, R.; VELANKAR, S.; MUNSON, E.; BLOCK, L. Rheological Evaluation of Inter-grade and Inter-batch Variability of Sodium Alginate. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1662-1674, 2010.

FUNARO, A.; HORENSTEIN, A. L.; SANTORO, P.; CINTI, C.; GREGORINI, A.; MALAVASI, F. Monoclonal antibodies and therapy of human cancers. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 385-401, 2000.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 3, p. 161-182, 1988.

GANTA, S.; DEVALAPALLY, H.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 187-204, 3/20/ 2008.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-899, 2004.

GENNARO, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GEORG JENSEN, M.; KNUDSEN, J. C.; VIERECK, N.; KRISTENSEN, M.; ASTRUP, A. Functionality of alginate based supplements for application in human appetite regulation. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 823-829, 2012.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International journal of cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

GERWECK, L. E.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. **Cancer research**, v. 56, n. 6, p. 1194-1198, 1996.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 1998.

GRAINGER, D. W. Controlled-release and local delivery of therapeutic antibodies. **Expert opinion on biological therapy**, v. 4, n. 7, p. 1029-1044, 2004.

GRASDALEN, H. High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, p. 255-260, 1983.

GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. **Carbohydrate Research**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 1979.

GU, F.; AMSDEN, B.; NEUFELD, R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 3, p. 463-472, 2004.

GUCHT, J. V. D.; SPRUIJT, E.; LEMMERS, M.; COHEN STUART, M. A. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 407-422, 2011.

GUNTHER, J. B.; ALTAWHEEL, M. M. Bevacizumab (Avastin) for the Treatment of Ocular Disease. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, n. 3, p. 372-400, 2009.

HALESTRAP, A. P.; PRICE, N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 2, p. 281-299, 1999.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 225-231, 2009.

HAN, Y.; ZENG, Q.; LI, H.; CHANG, J. The calcium silicate/alginate composite: Preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 11, p. 9107-9117, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O.; PAINTER, T. Development of Compositional Heterogeneity in Alginate Degraded in Homogeneous Solution. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, n. 9, p. 2955-2962, 1969.

HARDING, S. Analysis of Polysaccharides by Ultracentrifugation. Size, Conformation and Interactions in Solution. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I**: Springer Berlin Heidelberg, v.186, 2005. cap. 136821, p.211-254. (Advances in Polymer Science). ISBN 978-3-540-26112-4.

HARILALL, S. L.; CHOONARA, Y. E.; MODI, G.; TOMAR, L. K.; TYAGI, C.; KUMAR, P.; DU TOIT, L. C.; IYUKE, S. E.; DANCKWERTS, M. P.; PILLAY, V. Design and pharmaceutical evaluation of a nano-enabled crosslinked multipolymeric scaffold for prolonged intracranial release of Zidovudine. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 470-485, 2013.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of clinical oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007, 2008.

HOHENFORST-SCHMIDT, W.; ZAROGOULIDIS, P.; DARWICHE, K.; VOGL, T.; GOLDBERG, E. P.; HUANG, H.; SIMOFF, M.; LI, Q.; BROWNING, R.; TURNER, F. J.; LE PIVERT, P.; SPYRATOS, D.; ZAROGOULIDIS, K.; CELIKOGLU, S. I.; CELIKOGLU, F.; BRACHMANN, J. Intratumoral chemotherapy for lung cancer: re-challenge current targeted therapies. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 571-583, 2013.

HORI, Y.; WINANS, A. M.; IRVINE, D. J. Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 4, p. 969-982, 2009.

HUANG, D.; CHEN, Y.; ZENG, Q.; WU, R.; LI, Y. Image-guided percutaneous lipiodol-pingyangmycin suspension injection therapy for sacral chordoma. **Korean journal of radiology**, v. 14, n. 5, p. 823-828, 2013.

ISHIWATA, I.; ISHIWATA, C.; SOMA, M.; ONO, I.; NAKAGUCHI, T.; ISHIKAWA, H. Tumor angiogenic activity of gynecologic tumor cell lines on the chorioallantoic membrane. **Gynecologic oncology**, v. 29, n. 1, p. 87-93, 1988.

IVINOVA, O. N.; IZUMRUDOV, V. A.; MURONETZ, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Influence of Complexing Polyanions on the Thermostability of Basic Proteins. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 3-4, p. 210-215, 2003.

IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide Gums: structures, functional properties, and applications. In: CUI, S. W. (Ed.). **Food Carbohydrates: chemistry, physical properties, processing and applications**. Oxford CRC Press Taylor & Francis Group, 2005. p.293-295.

JONES, D.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; COULTER, W. A. Development and Mechanical Characterization of Bioadhesive Semi-Solid, Polymeric Systems Containing Tetracycline for the Treatment of Periodontal Diseases. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1734-1738, 1996.

JONES, D. S. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 167-178, 1999.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; O'NEILL, M. J. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 1, p. 71-79, 1997.

KAKLAMANI, G.; CHENELER, D.; GROVER, L. M.; ADAMS, M. J.; BOWEN, J. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 36, n. 0, p. 135-142, 8// 2014.

KELLY, H. M.; DEASY, P. B.; ZIAKA, E.; CLAFFEY, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 167-183, 2004.

KIM, M. S.; PARK, S. J.; GU, B. K.; KIM, C.-H. Ionically crosslinked alginate-carboxymethyl cellulose beads for the delivery of protein therapeutics. **Applied Surface Science**, v. 262, n. 0, p. 28-33, 2012.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KONG, H.-J.; LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. **Polymer**, v. 43, n. 23, p. 6239-6246, 2002.

KONG, H. J.; MOONEY, D. J. The effects of poly(ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. **Cell Transplant**, v. 12, n. 7, p. 779-785, 2003.

KRUSE, V.; DENYS, H.; VAN DEN BROECKE, R.; VAN BELLE, S.; COCQUYT, V. The addition of bevacizumab to standard chemotherapy in breast cancer: which patient benefits the most? **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 202, 2013.

KUO, C. K.; MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 6, p. 511-521, 2001.

LANSDOWN, A. B.; PAYNE, M. J. An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (Kaltostat) following subcutaneous implantation in the rat. **J R Coll Surg Edinb**, v. 39, n. 5, p. 284-288, 1994.

LARSEN, B.; SALEM, D. M.; SALLAM, M. A.; MISHRIKEY, M. M.; BELTAGY, A. I. Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 22, p. 2325-2336, 2003.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533-2541, 2007.

LE RENARD, P.-E.; JORDAN, O.; FAES, A.; PETRI-FINK, A.; HOFMANN, H.; RÜFENACHT, D.; BOSMAN, F.; BUCHEGGER, F.; DOELKER, E. The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 691-705, 2010.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88-98, 2009.

LEE, K.; QIAN, D. Z.; REY, S.; WEI, H.; LIU, J. O.; SEMENZA, G. L. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2353-2358, 2009.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 669-697, 2007.

LEE, O.-S.; HA, B.-J.; PARK, S.-N.; LEE, Y.-S. Studies on the pH-dependent swelling properties and morphologies of chitosan/calcium-alginate complexed beads. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 198, n. 9, p. 2971-2976, 1997.

LENCINA, S. M. M.; IATRIDI, Z.; VILLAR, M. A.; TSITSILIANIS, C. Thermoresponsive hydrogels from alginate-based graft copolymers. **European Polymer Journal**, v. 61, n. 0, p. 33-44, 2014.

LEONARD, M.; DE BOISSESON, M. R.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 3, p. 395-405, 2004.

LI, F.; HURLEY, B.; LIU, Y.; LEONARD, B.; GRIFFITH, M. Controlled release of bevacizumab through nanospheres for extended treatment of age-related macular degeneration. **The open ophthalmology journal**, v. 6, p. 54-58, 2012.

LI, Y.; SUI, K.; LIU, R.; ZHAO, X.; ZHANG, Y.; LIANG, H.; XIA, Y. Removal of Methyl Orange from Aqueous Solution by Calcium Alginate/Multi-walled Carbon Nanotubes Composite Fibers. **Energy Procedia**, v. 16, Part B, n. 0, p. 863-868, 2012.

LIMA, A. M. F. **Estudo de propriedades físico químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2006. 176f. (Tese de Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006, 2006.

LIN, Y. S.; NGUYEN, C.; MENDOZA, J. L.; ESCANDON, E.; FEI, D.; MENG, Y. G.; MODI, N. B. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 288, n. 1, p. 371-378, 1999.

LOPEZ-GOMEZ, M.; MALMIERCA, E.; DE GORGOLAS, M.; CASADO, E. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2013.

LÓPEZ CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 315-323, 2013.

LUCINDA, R. M. **Preparação e caracterização de micropartículas de quitosana-alginato**. 1999. 154f. (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 1999, 1999.

LYRA, M. A. M. D.; SOBRINHO, J. L. S.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F. D. L.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. D. S.; NETO, P. J. R. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MARIE, S. K. N.; SHINJO, S. M. O. Metabolism and Brain Cancer. **Clinics**, v. 66, p. 33-43, 2011.

MARTINHO, O.; GRANJA, S.; JARAQUEMADA, T.; CAEIRO, C.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; HONAVAR, M.; COSTA, P.; DAMASCENO, M.; ROSNER, M. R.; LOPES, J. M.; REIS, R. M. Downregulation of RKIP Is Associated with Poor Outcome and Malignant Progression in Gliomas. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30769, 2012.

MARTINHO, O.; SILVA-OLIVEIRA, R.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; CLARA, C.; ALMEIDA, J. R.; CARVALHO, A. L.; BARATA, J. T.; REIS, R. M. In Vitro and In Vivo Analysis of RTK Inhibitor Efficacy and Identification of Its Novel Targets in Glioblastomas. **Translational oncology**, v. 6, n. 2, p. 187-196, 2013.

MATSUDO, T.; OGAWA, K.; KOKUFUTA, E. Complex Formation of Protein with Different Water-Soluble Synthetic Polymers. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1794-1799, 2003.

MATSUMOTO, T.; KAWAI, M.; MASUDA, T. influence of concentration and mannuronate/guluronate [correction of gluronate] ratio on steady flow properties of alginate aqueous systems. **Biorheology**, v. 29, n. 4, p. 411-717, 1992.

MENDES, S. **Captação pelo carcinoma de mama e pelo linfonodo axilar de uma nanoemulsão lipídica administrada por injeção no tecido mamário locorregional**. 2008. 70p. (Tese de doutorado em Ciências Médicas). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008., 2008.

MESSORI, A. [Avastin-Lucentis: off-label and surroundings]. **Recenti Prog Med**, v. 105, n. 4, p. 137-140, 2014.

MIRANDA-GONCALVES, V.; HONAVAR, M.; PINHEIRO, C.; MARTINHO, O.; PIRES, M. M.; PINHEIRO, C.; CORDEIRO, M.; BEBIANO, G.; COSTA, P.; PALMEIRIM, I.; REIS, R. M.; BALTAZAR, F. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. **Neuro-oncology**, v. 15, n. 2, p. 172-188, 2013.

MITCHELL, R. N.; ABBAS, A. K.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran: Fundamentos de Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 728p.

MOE, S. T.; DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SIMDSRØD, O. Temperature dependence of the elastic modulus of alginate gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 4, p. 279-284, 1992.

MOURA, M. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Hidrogéis Semi-IPN Baseados em Rede de Alginato- Ca^{2+} com PNIPAAm Entrelaçado: Propriedades Hidrofílicas, Morfológicas e Mecânicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 132-137, 2008.

MOUSTAFINE, R. I.; MARGULIS, E. B.; SIBGATULLINA, L. F.; KEMENOVA, V. A.; MOOTER, G. V. D. Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 215-225, 2008.

MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 2// 1997.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-1504, 1997.

NEL, A. E.; MADLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; VAN BEIJNUM, J. R.; VAN BERKEL, M.; VAN DEN BERGH, H.; GRIFFIOEN, A. W. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. **Angiogenesis**, v. 13, n. 4, p. 281-292, 2010.

PAN, C. K.; DURAIRAJ, C.; KOMPPELLA, U. B.; AGWU, O.; OLIVER, S. C.; QUIROZ-MERCADO, H.; MANDAVA, N.; OLSON, J. L. Comparison of long-acting bevacizumab

formulations in the treatment of choroidal neovascularization in a rat model. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 27, n. 3, p. 219-24, 2011.

PANIKKAR, R.; BRASCH, D. J. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 293, n. 1, p. 119-132, 1996.

PAPAGEORGIOU, S. K.; KOUVELOU, E. P.; FAVVAS, E. P.; SAPALIDIS, A. A.; ROMANOS, G. E.; KATSAROS, F. K. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 4, p. 469-73, 2010.

PATEL, S. P.; VAISHYA, R.; PAL, D.; MITRA, A. K. Novel Pentablock Copolymer-Based Nanoparticulate Systems for Sustained Protein Delivery. **AAPS PharmSciTech**, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ªed. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PAVLIDIS, E. T.; PAVLIDIS, T. E. Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 31, p. 5051-5060, 2013.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279-3305, 2012.

PEINADO, I.; LESMES, U.; ANDRES, A.; MCCLEMENTS, J. D. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9827-34, 2010.

PELLETIER, S.; HUBERT, P.; PAYAN, E.; MARCHAL, P.; CHOPLIN, L.; DELLACHERIE, E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 54, n. 1, p. 102-108, 2001.

PENMAN, A.; SANDERSON, G. R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. **Carbohydrate Research**, v. 25, n. 2, p. 273-282, 1972.

PINHEIRO, C.; ALBERGARIA, A.; PAREDES, J.; SOUSA, B.; DUFLOTH, R.; VIEIRA, D.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. **Histopathology**, v. 56, n. 7, p. 860-867, 2010.

PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; AZEVEDO-SILVA, J.; CASAL, M.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, n. 1, p. 127-139, 2012.

PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; FERREIRA, L.; PEREIRA, S. M.; ETLINGER, D.; MOREIRA, M. A.; JUBE, L. F.; QUEIROZ, G. S.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. **International journal of gynecological pathology**, v. 27, n. 4, p. 568-574, Oct 2008.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para a liberação controlada de fármacos**. 2013. 111f

(Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2013, 2013.

PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, 2012.

PUSKÁS, I.; SZEMJONOV, A.; FENYVESI, É.; MALANGA, M.; SZENTE, L. Aspects of determining the molecular weight of cyclodextrin polymers and oligomers by static light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 124-128, 2013.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 0, p. 49-60, 2012.

RIBATTI, D.; NICO, B.; VACCA, A.; PRESTA, M. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 85-91, 2006.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 40, n. 6, p. 1189-97, Dec 1996a.

_____. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **The International journal of developmental biology**, v. 40, n. 6, p. 1189-1197, 1996b.

RICHARDSON, T. P.; MURPHY, W. L.; MOONEY, D. J. Polymeric delivery of proteins and plasmid DNA for tissue engineering and gene therapy. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 11, n. 1-3, p. 47-58, 2001.

RODRIGUES, P. C. A.; BEYER, U.; SCHUMACHER, P.; ROTH, T.; FIEBIG, H. H.; UNGER, C.; MESSORI, L.; ORIOLI, P.; PAPER, D. H.; MÜLHAUPT, R.; KRATZ, F. Acid-sensitive polyethylene glycol conjugates of doxorubicin: preparation, in vitro efficacy and intracellular distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2517-2524, 1999.

ROSS, J. S.; GRAY, K. E.; WEBB, I. J.; GRAY, G. S.; ROLFE, M.; SCHENKEIN, D. P.; NANUS, D. M.; MILLOWSKY, M. I.; BANDER, N. H. Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 4, p. 521-537, 2005.

RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; GUILHERME, M. R.; PAULINO, A. T.; TAMBOURGI, E. B. Morfologia de hidrogéis-IPN termo-sensíveis e pH-responsivos para aplicação como biomaterial na cultura de células. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 105-110, 2009.

RUNGSEEVIJITPRAPA, W.; BODMEIER, R. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4-5, p. 524-531, 2009.

- SALOMONSEN, T.; JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; STEUERNAGEL, S.; ENGELSEN, S. B. Alginate monomer composition studied by solution- and solid-state NMR – A comparative chemometric study. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1579-1586, 2009.
- SALTZMAN, W. M. Antibodies for treating and preventing disease: the potential role of polymeric controlled release. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 10, n. 2, p. 111-142, 1993.
- SAMANTA, H. S.; RAY, S. K. Synthesis, characterization, swelling and drug release behavior of semi-interpenetrating network hydrogels of sodium alginate and polyacrylamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 666-678, 2014.
- SAPRA, P.; SHOR, B. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 3, p. 452-469, 2013.
- SARTORI, C.; FINCH, D. S.; RALPH, B.; KEITH, G. Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy. **Polymer**, v. 38, n. 1, p. 43-51, 1997.
- SASICH, L. D.; SUKKARI, S. R. The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 4, p. 381-385, 2012.
- SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2ed. ed. São Paulo-SP: Artliber, 2006. 232p.
- SCHWEIZER, D.; SCHONHAMMER, K.; JAHN, M.; GOPFERICH, A. Protein-polyanion interactions for the controlled release of monoclonal antibodies. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 1, p. 75-83, 2013.
- SCHWEIZER, D.; SERNO, T.; GOEPFERICH, A. Controlled release of therapeutic antibody formats. **Eur J Pharm Biopharm** v. 88, n. 2, p. 291-309, 2014.
- SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278-287, 2012.
- SHAPIRO, L.; COHEN, S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. **Biomaterials**, v. 18, n. 8, p. 583-590, 1997.
- SHETH, B. B. Viscosity measurements and interpretation of viscosity data. **Journal of Texture Studies**, v. 7, n. 2, p. 157-178, 1976.
- SILVA-CORREIA, J.; MIRANDA-GONCALVES, V.; SALGADO, A. J.; SOUSA, N.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. M.; REIS, R. L. Angiogenic potential of gellan-gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: in vivo study. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 11-12, p. 1203-1212, 2012.

SILVA MDOS, S.; COCENZA, D. S.; GRILLO, R.; DE MELO, N. F.; TONELLO, P. S.; DE OLIVEIRA, L. C.; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1-3, p. 366-374, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2012. 490p.

SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, n. 1, p. 31-54, 1989.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SONG, J.; WU, F. Y.; WAN, Y. Q.; MA, L. H. Ultrasensitive turn-on fluorescent detection of trace thiocyanate based on fluorescence resonance energy transfer. **Talanta**, v. 132, p. 619-624, 2015.

SONVEAUX, P.; VÉGRAN, F.; SCHROEDER, T.; WERGIN, M. C.; VERRAX, J.; RABBANI, Z. N.; DE SAEDELEER, C. J.; KENNEDY, K. M.; DIEPART, C.; JORDAN, B. F.; KELLEY, M. J.; GALLEZ, B.; WAHL, M. L.; FERON, O.; DEWHIRST, M. W. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 12, p. 3930-3942, 2008.

STOKKE, B. T.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca-Alginate Gels. **Macromolecules**, v. 33, n. 5, p. 1853-1863, 2000.

STRYER, L. Fluorescence Spectroscopy of Proteins. **Science**, v. 162, n. 3853, p. 526-533, 1968.

TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer research**, v. 49, n. 16, p. 4373-4384, 1989.

TONELI, J. T. D. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 28, n. 6, p. 621-30, 2002.

TORRES, M. R.; SOUSA, A. P. A.; SILVA FILHO, E. A. T.; MELO, D. F.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; LIMA, M. G. S. Extraction and physicochemical characterization of Sargassum vulgare alginate from Brazil. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 14, p. 2067-2074, 2007.

TÓTOLI, E. G. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ampicilina sódica**. 2013. 155p. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2013, 2013.

TRÉDAN, O.; LACROIX-TRIKI, M.; GUIU, S.; MOURET-REYNIER, M.-A.; BARRIÈRE, J.; BIDARD, F.-C.; BRACCINI, A.-L.; MIR, O.; VILLANUEVA, C.; BARTHÉLÉMY, P. Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model. **Targeted Oncology**, p. 1-10, 2014.

TSIFTSOGLU, A. S.; RUIZ, S.; SCHNEIDER, C. K. Development and regulation of biosimilars: current status and future challenges. **BioDrugs**, v. 27, n. 3, p. 203-11, 2013.

TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 4-5, p. 401-414, 2003.

TYAGI, P.; BARROS, M.; STANSBURY, J. W.; KOMPELLA, U. B. Light-activated, in situ forming gel for sustained suprachoroidal delivery of bevacizumab. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 8, p. 2858-2867, 2013.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 35-NF30). **Buffer Solutions**, v. 1, p. 1067, 2012.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162-1176, 2007.

VARSHOCHIAN, R.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAHMOUDI, A. R.; KHOSHAYAND, M. R.; ATYABI, F.; SABZEVARI, A.; ESFAHANI, M. R.; DINARVAND, R. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3-4, p. 341-352, 2013.

WALSH, G. **BIOPHARMACEUTICALS BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**. ed. England: Wiley, 2003. 551p.

WANG, C. H.; HWANG, Y. S.; CHIANG, P. R.; SHEN, C. R.; HONG, W. H.; HSIUE, G. H. Extended release of bevacizumab by thermosensitive biodegradable and biocompatible hydrogel. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40-8, 2012.

WANG, Q.; XIE, X.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; WANG, A. Preparation and swelling properties of pH-sensitive composite hydrogel beads based on chitosan-g-poly (acrylic acid)/vermiculite and sodium alginate for diclofenac controlled release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 356-362, 2010.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WEBBER, R. E.; SHULL, K. R. Strain Dependence of the Viscoelastic Properties of Alginate Hydrogels. **Macromolecules**, v. 37, n. 16, p. 6153-6160, 2004.

WOLF, M.; WIRTH, M.; PITTNER, F.; GABOR, F. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1-2, p. 141-52, 2003.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINIT, S. Zeta Potential (ζ) and Pasting Properties of Phosphorylated or Crosslinked Rice Starches. **Starch - Stärke**, v. 57, n. 1, p. 32-37, 2005.

YANDRAPU, S. K.; UPADHYAY, A. K.; PETRASH, J. M.; KOMPELLA, U. B. Nanoparticles in Porous Microparticles Prepared by Supercritical Infusion and Pressure Quench Technology for Sustained Delivery of Bevacizumab. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 12, p. 4676-4686, 2013.

YANG, J.; CHEN, S.; FANG, Y. Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 333-337, 2009.

YANG, L.; MA, X.; GUO, N.; ZHANG, Y. Preparation and characteristics of sodium alginate/Na(+)-rectorite-g-itaconic acid/acrylamide hydrogel films. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 351-358, 2014.

YANG, Y.; WANG, J.; ZHANG, X.; LU, W.; ZHANG, Q. A novel mixed micelle gel with thermo-sensitive property for the local delivery of docetaxel. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 2, p. 175-182, 2009.

YOON, H.-J.; JANG, W.-D. Polymeric supramolecular systems for drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 211-222, 2010.

YUAN, Y.-J.; XU, K.; WU, W.; LUO, Q.; YU, J.-L. Application of the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in Neurosurgery Disease. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1275-1281, 2014.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZEITLIN, B. D.; DONG, Z.; NOR, J. E. RAIN-Droplet: a novel 3D in vitro angiogenesis model. **Lab Invest**, v. 92, n. 7, p. 988-998, 2012.