

THIAGO NUNES OTSUBO

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICO-QUÍMICA DE SUPRAMOLÉCULAS UTILIZADAS
PARA O MICROENCAPSULAMENTO/IMUNOISOLAMENTO DE ILHOTAS
PANCREÁTICAS HUMANAS: ELUCIDANDO OS MECANISMOS RESPONSÁVEIS
PELA INFLAMAÇÃO**

São Paulo
2019 · 2020

Thiago Nunes Otsubo

Caracterização biofísico-química de supramoléculas utilizadas para o microencapsulamento/imunoisolamento de ilhotas pancreáticas humanas: elucidando os mecanismos responsáveis pela inflamação

Trabalho de Formatura apresentado à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro de Materiais

Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP

Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP

Área de Concentração: Biofísico-química
Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (QBQ-IQUSP)

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Grillo Fernandes (PMT-EPUSP)

São Paulo

2019 - 2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-publicação

OTSUBO, Thiago

Caracterização biofísico-química de supramoléculas utilizadas para o microencapsulamento/imunoisolamento de ilhotas pancreáticas humanas: elucidando os mecanismos responsáveis pela inflamação / T. OTSUBO -- São Paulo, 2020.

76 p.

Trabalho de Formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1.Inflamação 2.Diabetes 3.Biofísico-química 4.Engenharia Supramolecular
5.Imunomateriais I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II.t.

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS

PMT 3596 – TRABALHO DE FORMATURA II
AVALIAÇÃO DO TRABALHO PELA BANCA EXAMINADORA

ALUNO: **Thiago Nunes Otsubo**

TÍTULO DO TRABALHO: “Caracterização biofísico-química de supramoléculas utilizadas para o microencapsulamento/imunoisolamento de ilhotas pancreáticas humanas: elucidando os mecanismos responsáveis pela inflamação”

DATA: **08.12.2020**

HORA: 14:00 Sala

AVALIAÇÃO:

NOTA

Mari Cleide Sogayar
(Orientadora)

10 (dez)

Elizabeth Grillo Fernandes
(Co-orientadora)

10 (dez)

Isaura Beatriz Borges Silva

10 (dez)

Média final 10 (dez)

Mari Cleide Sogayar
(Orientadora)

Elizabeth Grillo Fernandes
(Co-orientadora)

Isaura Beatriz Borges Silva

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, por ter me concedido saúde, determinação e força de vontade desde o momento em que escolhi fazer parte da POLI, mais de 10 anos atrás, até a conclusão deste trabalho, que marca o encerramento de um ciclo e a esperança do início de outro melhor em minha vida.

A minha família, pela demonstrada inteligência emocional ao lidar comigo em momentos de estresse e empatia ao entender e respeitar minha necessidade de introspecção ao longo do ano.

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, por ter acreditado que, mesmo sem nenhum background na área biomédica, eu poderia fazer a diferença, e partilhado da minha convicção de que o verdadeiro avanço da pesquisa nas Ciências da Natureza só pode ser alcançado quando profissionais das mais diversas áreas trabalham juntos para construir uma ponte que jaz justamente na interface/fronteira. Também, é claro, pela orientação ao longo da elaboração do Trabalho, principalmente nos momentos iniciais de definição do Tema.

À Profa. Dra. Elizabeth Grillo Fernandes, pelos valiosos conselhos e acompanhamentos pós-aula, que contribuíram para solidificar os meus conhecimentos em Materiais no geral e, especificamente, Polímeros, e também pelo apoio ao empreender este ousado desafio, ao menos do ponto de vista de nosso tradicional departamento.

À Me. e certamente futura Dra. Isaura B. Borges, pelo incessante apoio e disposição em me ajudar em todas as etapas deste projeto, e em especial pela tutoria para novatos em Laboratórios de Biologia durante a confecção das cápsulas.

À futura biomédica Camila Kimura, pela parceria nas atividades experimentais e no interesse pelo avanço da pesquisa concomitantemente por outra abordagem.

*Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, por ter servido como instrumento sem o qual não teria ciência da Pesquisa e ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP, por manter e possibilitar os recursos ao Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), laboratório em cujas instalações foram realizadas as **etapas preliminares** da Pesquisa.*

“不闻不若闻之，闻之不若见之，见之不若知之，知之不若行之”

(“*Conte-me e esquecerei. Ensine-me e talvez me lembre. Envolva-me e aprenderei.*”)

(KUANG, Xun)

Resumo

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune que provoca a morte das células-β produtoras de insulina. Além de ser incurável, o controle da glicemia é difícil e lábil, e o relapso pode levar a estados hiperglicêmicos prolongados que predispõem a diversos quadros sérios, como doenças cardiovasculares, infecções periféricas e coma cetoacidótico. Os pacientes que apresentam tal distúrbio precisam ater-se a um rígido estilo de vida que inclui minuciosa observação da dieta (quantidade e horário de refeições, composição nutricional e quantidade de alimentos ingeridos), prática de exercícios físicos regular e insulinoterapia frequente, invasiva e pouco eficaz. Essa ineficácia pode se tornar extrema em um grupo de pacientes com episódios hiperglicêmicos graves e muitas vezes fatais. Frente às claras limitações da insulinoterapia, uma série de tratamentos foram propostos ao longo dos quase 100 anos de pesquisa com variados graus de sucesso. O transplante de pâncreas órgão total, apesar do bom prognóstico, por ser uma cirurgia de grande porte apresenta diversos riscos associados ao procedimento e a necessidade de um regime de drogas imunossupressoras vitalício, que expõem o organismo a infecções oportunistas, e por si só apresentam uma série de efeitos colaterais. O transplante apenas de ilhotas pancreáticas apresentou resultados mais promissores; no entanto, não só a autoimunidade pode ser recorrente, mas a imunorrejeição não é eliminada, o que compromete a viabilidade e a funcionalidade do enxerto no longo prazo. Diante desse fato, propôs-se o imunoisolamento das ilhotas com cápsulas de biopolímeros (cujo principal é o alginato) de tamanho micrométrico, considerado o mais adequado. O microencapsulamento possibilitou significativo avanço na linha de pesquisa, com normoglicemia alcançada, nos melhores casos, por até 3 meses; após esse período, no entanto, uma série de reações inflamatórias comprometem o suprimento de oxigênio e nutrientes causando morte celular. A causa dessas reações inflamatórias é desconhecida, mas se sabe que a adsorção proteica é o primeiro evento que ocorre a partir da introdução de um biomaterial no microambiente *in vivo* e que desencadeia toda a cascata inflamatória subsequente. Essa deposição fibrótica pode ser condicionada a diversos fatores físico-químicos relacionados a características dos materiais e variáveis de processo próprias do microencapsulamento, de modo que uma investigação da inter-relação biocompatibilidade-interações físico-químicas foi realizada por uma série de pesquisadores empregando métodos de caracterização tais como XPS, FTIR, ToF-SIMS, Potencial ζ e Ângulo de Contato pelo Método da Gota Séssil. Os resultados de uma revisão bibliográfica desses estudos são aqui reportados, com especial ênfase dada às deduções quanto à biocompatibilidade que podem ser obtidas. As conclusões levantadas mostram que a razão $\frac{M}{G}$, o peso molecular e o teor de G do alginato, assim como a hidrofilicidade de eventuais policátions e a exposição de moléculas não ligadas na superfície da cápsula têm impacto direto na biocompatibilidade; que a adsorção proteica pode ser devida a interações de diferentes naturezas, como eletrostática, hidrofílica e intermolecular; e que a compreensão dessa inter-relação e o uso de técnicas de modificação química polimérica via enxertia podem levar à engenharia de superfícies imunorrepelentes em sua quase totalidade.

Palavras-chave: Inflamação; Diabetes; Biofísico-química; Engenharia Supramolecular; Imunomateriais

Listas de Figuras

Figura 1: Fórmula estrutural dos monômeros do ácido alginico; aparelhagem experimental de microencapsulamento; ligações cruzadas após gelificação (SILVA; SOGAYAR, 2018)	19
Figura 2: Estrutura molecular da quitosana (DE VOS et al., 2014)	20
Figura 3: Estruturas moleculares dos monômeros α-L-lisina e L-oritina (TAM et al., 2011).	21
Figura 4: Fórmula estrutural do poli(L-lactídeo) (SIGMA-ALDRICH, a) e scaffolds no formato de panquecas de copolímeros do monômero (SERRA; PLANELL; NAVARRO, 2013)	22
Figura 5: Fórmula estrutural do mPEG (SIGMA-ALDRICH, b) e representação esquemática de micelas fabricadas com o polímero para liberação controlada no tratamento da metástase do câncer de mama (XU et al., 2014)	23
Figura 6: Típico output espectral de XPS para o carbono (COVALENT METROLOGY) e aparelhagem experimental (KOLBE, 2017)	25
Figura 7: Exemplo de interferograma de FTIR.....	26
Figura 8: Típico espectro de FTIR (DOWNLING et al., 2010) e espectrofotômetro (JAPAN SPECTROSCOPIC COMPANY).....	27
Figura 9: Típico espectro de ToF-SIMS (FENG; CHAN; WENG, 2000)	28
Figura 10: Balanço de forças num equilíbrio trifásico de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida.....	30
Figura 11: Uma comparação dos picos para o elétron do orbital 1s do nitrogênio do espectro de XPS para microcápsulas desidratadas de APA e filmes de poli-L-lisina (TAM et al., 2005)	33
Figura 12: Uma comparação entre os espectros de razão massa-carga da microcápsula de APA desidratada, do filme de alginato de sódio e do de poli-L-lisina, como medido por ToF-SIMS estático. Picos marcados correspondem a íons característicos do PLL (a) positivos (b) negativos (TAM et al., 2005)	35
Figura 13: Espectros de absorção de FTIR para microcápsulas de alginato-PLL com núcleo gelificado de (a) cálcio ou (b) bário (TAM et al., 2011)	36
Figura 14: Razão entre as alturas dos picos correspondentes à amida II do policártion e ao carboxilato do alginato. Legenda: alginato (branco); +policártion (preto); +alginato (cinza) (TAM et al., 2011)	37
Figura 15: (a) Picos de FTIR em 1590 e 1550 cm ⁻¹ de cada grupo de cápsulas ao longo do período de estudo de 90 dias; (b) Índice de estabilidade por meio de FTIR semiquantitativo: medida da razão entre os picos correspondentes ao carboxilato do alginato e à amida II do PLO (\triangle) VPMG; (\diamond) VPLG; (—) pKel; (\square) pFlu; (\bullet) pMan (THANOS et al., 2006)	42
Figura 16: Potenciais ζ para microcápsulas feitas de diferentes alginatos (XIE et al., 2010a)	48
Figura 17: Adsorção proteica em microcápsulas feitas de diferentes alginatos. (a) fibrinogênio; (b) IgG (XIE et al., 2010a)	49
Figura 18: Isotermas de adsorção na superfície de microcápsulas de PLLA a várias forças iônicas: \circ 0,01; \bullet 0,075; \bullet 0,154. (a) albumina; (b) gamaglobulina; (c) fibrinogênio (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987).....	50
Figura 19: Potencial ζ de microcápsulas adsorvidas com fibrinogênio como função da concentração de fibrinogênio a 3 diferentes forças iônicas do meio de suspensão: \circ 0,01; \bullet 0,075; \bullet 0,154 (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987)	51
Figura 20: Típica curva de titulação potenciométrica para proteínas	52
Figura 21: Um modelo para a adsorção de fibrinogênio na superfície da microcápsula de PLLA. Áreas sombreadas indicam regiões hidrofóbicas. + e - representam cargas fixas, enquanto \oplus e \ominus indicam íons móveis do eletrólito (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987)	53
Figura 22: Ilustração esquemática do processo de graftização de mPEG nas microcápsulas hidrogélicas (fora de escala) (ZHENG et al., 2012)	55
Figura 23: Espectros de XPS para membranas de microcápsulas de ACAC _{PEG} com diferentes espessuras e suas curvas de ajuste. (A), (B) e (C) representam os picos para o elétron do orbital 1s do carbono para 10, 20 e 40 μ m, respectivamente, e (D), (E) e (F) os correspondentes picos para o elétron do orbital 1s do oxigênio (ZHENG et al., 2012)	56
Figura 24: Efeito da espessura da membrana na adsorção de (A) IgG (B) Fgn (ZHENG et al., 2012)	57
Figura 25: Comparação entre os picos C _{1s} dos espectros de XPS para as membranas das microcápsulas de (A) AC e (B) ACP _{situ} e curvas de ajuste (ZHENG et al., 2012)	57
Figura 26: Comparação entre os picos O _{1s} dos espectros de XPS para as membranas das microcápsulas de (A) AC e (B) ACP _{situ} e curvas de ajuste (ZHENG et al., 2012)	58

Lista de Tabelas

Tabela 1: Riscos e benefícios do transplante de ilhotas, transplante de pâncreas órgão total e insulinoterapia com bombas (RUTTER et al.)	16
Tabela 2: Composições elementares da superfície de microcápsulas de APA desidratadas, filmes de alginato de sódio e poli-L-lisina e beads desidratados de alginato gelificado com cálcio como medidos pelos espectros de XPS gravados em modo varredura. Valores expressos em porcentagem atômica média (TAM et al., 2005)	32
Tabela 3: Picos característicos do alginato de sódio e da poli-L-lisina que estavam presentes no espectro de razões massa-carga das microcápsulas de APA, como medido por ToF-SIMS estático (TAM et al., 2005).....	34
Tabela 4: Posições dos picos de absorbância de FTIR associados às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico dos grupos funcionais carboxilato do alginato (TAM et al., 2011).....	38
Tabela 5: Caracterização do alginato pré-encapsulamento (THANOS et al., 2006)	41
Tabela 6: Composição elementar da superfície de cápsulas alginato-PLL (DE VOS et al., 2012).....	44
Tabela 7: Ângulo de contato obtidos com água em diferentes membranas (XIE et al., 2010a)	46
Tabela 8: Composição química da superfície de membranas de ACA como medido de espectros de XPS gravados em alta resolução (XIE et al., 2010a).....	47

Sumário

1	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	1
2	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	2
2.1	DIABETES, DIABETES <i>MELLITUS</i> E DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1	2
2.2	TRATAMENTO PARA O T1D.....	9
2.2.1	HISTÓRICO	9
2.2.2	TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS (HPI).....	12
2.2.2.1	Vantagens	13
2.2.2.2	Limitações	14
2.3	ENCAPSULAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS	17
2.3.1	MICROENCAPSULAMENTO	18
2.3.1.1	Biopolímeros	19
2.3.1.1.1	Naturais.....	19
2.3.1.1.1.1	Alginato de sódio.....	19
2.3.1.1.1.2	Quitosana	20
2.3.1.1.2	Sintéticos.....	21
2.3.1.1.2.1	α -poli-L-lisina (α -PLL).....	21
2.3.1.1.2.2	Poli-L-ornitina (PLO)	21
2.3.1.1.2.3	Poli(L-lactídeo) (PLLA)	22
2.3.1.1.2.4	Poli(etileno glicol) metil éter (mPEG).....	23
2.4	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MICROCÁPSULAS	24
2.4.1	XPS	24
2.4.2	FTIR	26
2.4.3	ToF-SIMS	28
2.4.4	POTENCIAL Z	29
2.4.5	ÂNGULO DE CONTATO PELO MÉTODO DA GOTA SÉSSIL	30
2.5	QUÍMICA ANALÍTICA NA INVESTIGAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE.....	31
2.5.1	AS BASES DA INFLAMAÇÃO	43

2.5.1.1	Interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou intermoleculares: qual mecanismo regula a adsorção proteica?.....	48
2.5.1.1.1	Construindo um modelo simples para explicar a adsorção proteica	52
2.5.1.2	Em busca da cápsula 100% antivegetativa	54
3	<u>OBJETIVOS</u>	59
4	<u>CONCLUSÕES</u>	59
5	<u>REFERÊNCIAS</u>	60
6	<u>APÊNDICE A — ALGINATO: ORIGEM E PURIFICAÇÃO</u>	63
7	<u>APÊNDICE B — BIOCOMPATIBILIDADE E SUAS MUITAS DEFINIÇÕES</u>	64
8	<u>APÊNDICE C — OUTRAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS</u>	65

1 Introdução

A cada quatro casos de diabetes *mellitus* tipo 1 na América Latina, três provêm do Brasil – o País ocupa a 3^a posição no *ranking* mundial da doença. Isso significa que quase 100 mil crianças e adolescentes precisam manter, diariamente, um rígido controle da dieta em termos de qualidade e quantidade, sob pena de desenvolver complicações cuja severidade pode levar à cegueira e à necessidade de amputações. Nos últimos 10 anos, sua prevalência em tal faixa etária aumentou 14 vezes, sendo a doença crônica endocrinológica mais frequente e a segunda doença crônica pediátrica de maior incidência (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019).

Em 2022, as pesquisas visando a cura da doença irão completar 100 anos, e, embora importantes marcos tenham sido atingidos durante este primeiro século, ainda restam entraves críticos ao sucesso dos tratamentos. A linha de pesquisa mais promissora, o microencapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas com biopolímeros visando eliminar a rejeição imunológica, tem como principal desafio projetar uma cápsula 100% antivegetativa (que não permita proliferação celular) mas, para isso, os mecanismos biofísico-químicos que governam a interação do sistema imune com a supramolécula biomimética precisam ser profundamente compreendidos.

O presente trabalho tem a finalidade de servir como **revisão bibliográfica** de um longo histórico de técnicas de caracterização físico-químicas¹ que têm sido empregadas para entender essas interações, com especial ênfase dada às deduções que podem ser obtidas em termos de biocompatibilidade. Dessa forma, **todas as conclusões apresentadas no corpo do texto foram retiradas da literatura; nenhuma é de autoria própria**. A expectativa é de que o estudo em questão possa estabelecer as bases para outras futuras investigações na fronteira entre áreas de diferentes naturezas de modo a eliminar os empecilhos promovidos pela resposta inflamatória e levar, finalmente, à consolidação do tratamento como alternativa de cura ao diabetes *mellitus* tipo 1.

¹ Para técnicas de caracterização de outras naturezas, consulte o Apêndice C.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Diabetes, diabetes mellitus e diabetes mellitus tipo 1

Segundo o *Oxford English Dictionary* (2011, p.), o termo “diabetes” vem do grego antigo διαβήτης. Ele foi primeiramente usado em 230 a.C. pelo grego Apollonius de Memphis (PORETSKY, 2010) e, em tradução literal, significa “passagem através; sifão” (“dia” = através; “betes” = passagem) (BALDONI, 2017). A doença, no entanto, foi uma das primeiras a serem descritas (LEUTHOLTZ; RIPOLL, 2011), muito antes da cunhagem do termo: em 1500 a.C., um manuscrito egípcio fazia-lhe referência como “um esvaziamento excessivo de urina” (MULLA et al., 2017).

Hoje em dia, o resultado da busca da palavra no dicionário fornece o seguinte resultado: “cada um dos distúrbios caracterizados basicamente por excreção excessiva de urina (poliúria) e sede intensa (polidipsia)” (HOUAISS, 2009). E esses são os principais sintomas que unem uma série de doenças que, embora tenham origens completamente diferentes, são classificadas dentro de uma só descrição.

De acordo com o Relatório Nacional de Estatísticas em Diabetes para 2017 elaborado pelo CDC (Centro para o Controle e Prevenção de Doenças, da sigla em inglês), só nos Estados Unidos 30,3 milhões de pessoas apresentavam a doença. Desses, quase 7,2 milhões ainda não haviam sido diagnosticados.

A cada ano, são detectados mais de 1,5 milhão de novos casos entre adultos estadunidenses. Desses, 193000 casos referem-se apenas a indivíduos com menos de 20 anos de idade.

Isso, é claro, reflete-se em custos. Em 2012, o custo estimado total de casos de diabetes diagnosticados nos Estados Unidos foi de US\$245 bilhões (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 2017). Com esse dinheiro, é possível cobrir os gastos orçamentários com a saúde do Governo de SP por aproximadamente quatro anos (PINHONI, 2019).

Para se ter uma ideia, os gastos médicos médios de pessoas portadoras da doença nos Estados Unidos giram em torno de US\$13700 por ano, sendo que, desses, US\$7900 ($\approx 58\%$) são gastos apenas com questões relacionadas ao diabetes. Os gastos totais dessas pessoas com saúde correspondem a 230% do valor gasto por pessoas saudáveis (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 2017).

Mas o principal impacto da doença está nos efeitos que pode ter se não tratada a longo prazo. Alguns desses efeitos incluem, mas não se limitam a:

- Risco de derrame: 4x mais alto;
- Perda de consciência devido à cetoacidose;
- Risco aumentado de desenvolver catarata e glaucoma;
- Distúrbios visuais: vasos sanguíneos danificados nos olhos podem causar, por exemplo, moscas volantes. Se não tratados, podem levar à cegueira;
- Risco de doença cardiovascular: Pressão alta e vasos sanguíneos danificados colocam pressão no coração;
- Aumento do risco de infecções, sejam bacterianas, virais ou fúngicas, especialmente nos pés;
- Pressão alta;
- Vasos sanguíneos danificados (PIETRANGELO, 2017?).

Na realidade, o termo “diabetes” é usado para descrever duas condições totalmente desconexas: diabetes *mellitus* e diabetes *insipidus*.

A diabetes *insipidus* (DI) é uma condição caracterizada por grandes quantidades de urina **diluída** (por isso *insipidus*, que, em latim, significa insossa) e aumento da sede. Pode ser dividida em quatro tipos, de acordo com as causas subjacentes: DI central é devida à falta do hormônio vasopressina (hormônio antidiurético), seja por danos ao hipotálamo ou à glândula pituitária ou a fatores genéticos; DI nefrogênica ocorre quando os rins não respondem adequadamente à vasopressina; DI dipsogênica é resultado da ingestão excessiva de fluidos devido a danos no mecanismo de controle de sede do hipotálamo; DI gestacional ocorre apenas durante a gravidez (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2015).

A condição mais conhecida, no entanto, é a chamada diabetes *mellitus* (DM). DM é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por um alto nível de açúcar no sangue por um período prolongado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Esse teor de açúcar reflete-se no caráter adocicado da urina de pacientes de DM; daí o nome *mellitus*. Além dos sintomas próprios a qualquer variante de diabetes, os pacientes de DM costumam apresentar também aumento da fome. Se não tratada, a DM pode trazer muitas complicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013), agudas e crônicas. Além das citadas acima, pode ocorrer ainda doença renal crônica, estado hiperglicêmico hiperosmolar que pode levar ao coma, e até mesmo a morte (KITABCHI et al., 2009).

A prevenção e o tratamento envolvem a manutenção de uma dieta saudável, exercícios físicos regulares, um peso corporal normal e evitar o uso de tabaco. O controle da pressão arterial e a manutenção de cuidados adequados com os pés e os olhos são importantes para pessoas com a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Em 2017, o número de portadores de diabetes *mellitus* era estimado em 425 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019), o que correspondia a 8,8%

da população adulta, com taxas iguais em homens e mulheres (VOS et al., 2012). A tendência sugere que as taxas continuarão a subir (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019). Ser portador de DM no mínimo dobra o risco de uma pessoa ter morte prematura (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2013). Em 2017, a DM foi responsável por entre (3,2) e 5 milhões de mortes (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019), 3 vezes mais do que a cirrose em 2015 (VOS et al., 2016); (WANG et al., 2016). O custo econômico global de despesas com saúde relacionadas a DM em 2017 foi estimado em US\$727 bilhões (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019).

A insulina é o principal hormônio que regula a captação de glicose do sangue na maioria das células do corpo. Portanto, desempenha um papel central em todas as formas de diabetes *mellitus* (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*).

A insulina atua conforme o seguinte mecanismo: a ingestão e consequente digestão de alimentos eleva a glicemia, estimulando as células β a produzirem insulina e inibindo a produção de glucagon pelas células α . A insulina, por sua vez, estimula o fígado a absorver a glicose e metabolizá-la de modo a armazená-la na forma de glicogênio. Quando a glicemia cai, ocorre o inverso: as células β são inibidas e as células α são estimuladas a liberar glucagon, que vai atuar no fígado na lise da reserva energética de glicogênio, gerando glicose como insumo às células.

Quando, no entanto, a insulina não desempenha seu papel corretamente, esse mecanismo é comprometido, e o indivíduo pode apresentar glicemia repetidamente superior a $126 \frac{mg}{dL}$ após jejum ou acima de $200 \frac{mg}{dL}$ no teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Esses valores são suficientes para classificá-lo como portador de DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2006).

Existem duas razões para a insulina não desempenhar bem seu papel: ou não é produzida pelo pâncreas em quantidade suficiente ou as células do corpo não respondem adequadamente à insulina produzida (GARDNER; SHOBAC, 2011). Essas razões levam à existência de 2 tipos de diabetes *mellitus* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014):

- Diabetes tipo 1 (T1D) resulta da falha do pâncreas em produzir insulina suficiente devido à morte de células β. ‘Esta forma era anteriormente denominada “diabetes *mellitus* dependente de insulina” (IDDM, na sigla em inglês) ou “diabetes juvenil” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A morte de células β é causada por uma resposta autoimune (NORMAN; HENRY, 2014). A causa desta resposta autoimune é desconhecida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014);
- Diabetes tipo 2 (T2D) começa com resistência à insulina, condição na qual as células não respondem adequadamente à insulina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). À medida que a doença progride, o paciente pode desenvolver também insuficiência na produção do hormônio (RSSDI Textb. Diabetes Mellit., 2014). Esta forma era anteriormente denominada “diabetes *mellitus* independente de insulina” (NDDM, na sigla em inglês) ou “diabetes do adulto”. A causa mais comum é uma combinação de peso corporal excessivo e prática de exercícios insuficiente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Pacientes com T2D apresentam, além dos sintomas comuns a diabetes e a DM, cansaço (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2014). Muitas vezes, os sintomas aparecem lentamente. Fatores genéticos têm grande influência na possibilidade de desenvolver a doença (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2016).

T2D representa cerca de 90% dos casos de diabetes, com os outros 10% devidos principalmente ao T1D.

O tratamento envolve, além da prática de exercícios, a adoção de uma dieta saudável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Se os níveis de açúcar no

sangue não forem efetivamente reduzidos, o uso de metformina pode ser recomendado (MARUTHUR et al., 2016); (SAENZ et al., 2015). A cirurgia bariátrica pode amenizar a condição em pacientes obesos (CETINKUNAR et al., 2015); (GANGULY et al., 2015).

As taxas de T2D vêm aumentando acentuadamente desde 1960, paralelamente à obesidade. Em 2015, havia aproximadamente 392 milhões de pessoas diagnosticadas com a doença, em comparação a cerca de 30 milhões em 1985 (MOSCOU, 2013); (VOS et al., 2016). Normalmente, começa na meia-idade ou na idade avançada, embora as taxas de T2D estejam aumentando em jovens (TFAYLI; ARSLANIAN, 2009); (IMPERATORE et al., 2012).

Diferentemente do T2D, no T1D os sintomas geralmente aparecem em um curto espaço de tempo. Embora a causa da doença seja desconhecida, acredita-se que envolva uma combinação de fatores genéticos e ambientais (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2016). Fatores de risco incluem ter um membro da família com a doença. O T1D pode ser diferenciado do T2D pela presença de autoanticorpos (CHIANG et al., 2014).

Não há maneira conhecida de prevenir o T1D (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). “O número de pessoas afetadas globalmente é desconhecido, embora se estime que cerca de 80000 crianças desenvolvam a doença a cada ano”. Nos Estados Unidos, o número de pessoas afetadas é estimado em 1 a 3 milhões (CHIANG et al., 2014); (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020). As taxas de incidência geográfica variam amplamente, com aproximadamente 1 novo caso a cada 100000 pessoas por ano no Leste da Ásia e na América Latina e cerca de 30 novos casos a cada 100000 pessoas por ano na Escandinávia e no Kuwait (ATKINSON; SKYLER, 2012); (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Geralmente a doença tem início na infância ou na juventude (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2016).

Um número de abordagens tem sido explorado para entender as causas e fornecer tratamentos para o tipo 1.

Quanto à dieta, dados sugerem que a gliadina (uma proteína presente no glúten) pode desempenhar um papel no desenvolvimento do T1D, mas o mecanismo não é totalmente compreendido (SERENA et al., 2015). O aumento da permeabilidade intestinal causado pelo glúten, e a subsequente perda da barreira intestinal, que permite a passagem de substâncias pró-inflamatórias ao sangue, podem induzir resposta autoimune em indivíduos geneticamente predispostos ao T1D (ELFSTRÖM; SUNDSTRÖM; LUDVIGSSON, 2014); (VISSER et al., 2009). Existem evidências de experimentos realizados em modelos-animais de que a remoção do glúten da dieta pode impedir o T1D (SERENA et al., 2015); (ANTVORSKOV et al., 2014), mas os resultados das pesquisas em seres humanos são conflitantes.

Uma teoria propõe que o T1D é devido a uma resposta autoimune desencadeada por vírus, na qual o sistema imunológico ataca células infectadas por vírus junto às células β no pâncreas (REWERS; LUDVIGSSON, 2016); (FAIRWEATHER; IMMUNOLOGY; 2002, [s.d.]).

A terapia gênica foi proposta como uma possível cura para o T1D (BAGLEY et al., 2008).

Células-tronco podem ser usadas para gerar células β , mas no começo as células geradas não funcionavam tão bem quanto as células β normais (MINAMI; SEINO, 2013). Em 2014, foram produzidas células β mais maduras que liberaram insulina em resposta ao açúcar no sangue quando transplantadas em camundongos (PAGLIUCA et al., 2014); (REZANIA et al., 2014). Mais segurança e eficácia, no entanto, são requeridas para testes em humanos.

2.2 Tratamento para o T1D

2.2.1 Histórico

O primeiro tratamento de diabetes com sucesso foi feito por *Banting* e *Best* em 1922 utilizando insulina proveniente de cães (BANTING; BEST, 1922). A insulinoterapia continua sendo, até hoje, a principal forma de tratamento para o T1D (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2009). Ela é feita com base em 2 regimes: convencional e intensivo.

A insulinoterapia convencional é um regime mais antigo (em voga antes do desenvolvimento da monitorização de glicemia em casa), mas ainda é utilizado em certa quantidade de casos, sendo caracterizada por:

- Injeções de insulina de uma mistura de insulina de ação rápida (ou regular) e intermediária duas vezes ao dia, de manhã (para cobrir café da manhã e almoço) e à noite (para melhor controle da glicose durante a madrugada). Em alguns casos pode ser indicada administração 3x ao dia;
- Programação de refeições para corresponder aos picos previstos nos perfis de insulina;
- Um intervalo-alvo para os níveis de glicose no sangue maior do que o desejado para o regime intensivo;
- Inexistência de medições frequentes de níveis de glicose no sangue.

A vantagem do regime convencional é que, para diabéticos com estilo de vida regular, é menos invasivo. No entanto, se comparado ao regime intensivo, é difícil obter bons resultados de controle glicêmico com o regime convencional.

Já o regime intensivo recebe esse nome porque requer a administração de 4 ou mais doses por dia de insulina. Em contrapartida, oferece maior flexibilidade quanto a horários e ingestão de carboidratos em refeições, assim como na prática de atividades físicas.

No entanto, além de apresentar eficácia relativa por não mimetizar, com precisão, a cinética de secreção da insulina endógena, poder ter efeitos colaterais e ser desconfortável ao paciente (que deve administrar a injeção em intervalos de tempo de poucas horas e monitorar constantemente a glicemia ao longo do dia), em um grupo específico de pacientes de T1D com episódios glicêmicos graves e muitas vezes fatais, o controle da glicemia por insulinoterapia é difícil e lábil, mesmo por meio de injeção ou bomba. Por essas razões, tratamentos alternativos foram desenvolvidos para substituir os tecidos danificados (SILVA; SOGAYAR, 2018).

O primeiro transplante de pâncreas órgão total ocorreu em 1966 na Universidade de *Minnesota*, em *Minneapolis*, nos Estados Unidos. Apesar do falecimento da paciente 3 meses após a cirurgia, a substituição pancreática foi considerada um sucesso (KELLY et al., 1967). De lá pra cá, significativos avanços foram registrados no âmbito de drogas imunossupressoras, técnicas cirúrgicas e preservação de órgãos.

Apesar do prognóstico ser muito bom, com 95% dos pacientes ainda vivos 1 ano pós-cirurgia e 80-85% de todos os pâncreas ainda funcionais (FISHMAN; RUBIN, 1998), complicações podem surgir imediatamente ao término do procedimento, como trombose, inflamação, infecção, sangramento e rejeição do novo pâncreas (YADAV et al., 2017). A rejeição pode ocorrer imediatamente ou a

qualquer momento da vida do paciente. Para evitar a rejeição, os pacientes devem submeter-se a um regime de drogas imunossupressoras. Além de comprometer, consideravelmente, as defesas do corpo, deixando o indivíduo vulnerável a infecções oportunistas que podem levar à morte, essas drogas podem causar uma variedade de efeitos colaterais, que incluem:

- Osteoporose;
- Colesterol alto;
- Pressão alta;
- Náusea, diarreia ou vômitos;
- Fotofobia;
- Inchaço;
- Ganho de peso;
- Inflamação das gengivas (*MAYO CLINIC*, 2019).

Além disso, por exigir a realização de laparotomia, é considerada uma intervenção cirúrgica de grande porte, de modo que dá margem à lesão de órgãos vitais, perda de fluidos e sangue (COSTA); (MOHABIR, 2018). Possibilita, ainda, maior risco de contaminação microbial que pode desencadear infecção sistêmica e por em risco a vida do paciente (*EMORY UNIVERSITY DIVISION OF ANIMAL RESOURCES*).

Portanto, apesar do transplante de pâncreas estar associado a uma melhoria na qualidade de vida e até mesmo à reversão de algumas complicações tardias associadas ao T1D, traz consigo outros malefícios, sendo indicado apenas a poucos pacientes, geralmente aqueles que necessitam de transplante renal e dependem do bom funcionamento do pâncreas para o sucesso do procedimento (SILVA; SOGAYAR, 2018).

2.2.2 Transplante de ilhotas pancreáticas humanas (HPI)

O conceito do transplante de ilhotas não é novo (PIEMONTI; PILEGGI, 2013). “Investigadores tão antigos quanto o cirurgião inglês *Charles Pybus* (1882-1975) tentaram enxertar tecido pancreático para curar diabetes” (SOUZA et al., 2011). A maioria, no entanto, atribui a era recente da pesquisa de transplante de ilhotas aos estudos de *Paul Lacy*, que remontam a mais de 3 décadas. Em 1967, o grupo de *Lacy* desenvolveu um novo método baseado em colagenase (BALLINGER; LACY, 1972) (posteriormente modificado pelo Dr. Camilo Ricordi, então trabalhando com o Dr. *Lacy*) (RICORDI et al., 1990) para isolar ilhotas, abrindo caminho a futuras experiências com ilhotas *in vivo* e *in vitro*.

Desde então, melhorias nas técnicas de isolamento e em regimes imunossupressores culminaram, em 2000, com a publicação por *Shapiro* e colegas de um relatório descrevendo 7 casos consecutivos de pessoas que “alcançaram euglicemia após o transplante de ilhotas usando um protocolo livre de esteroides e um grande número de ilhotas, que ficou conhecido como Protocolo de *Edmonton*” (SHAPIRO et al., 2000). Este protocolo foi adaptado por centros de transplante de ilhotas em todo o mundo e aumentou muito o sucesso do procedimento.

Para isolar as ilhotas, os pesquisadores usam uma mistura de enzimas altamente purificadas (colagenases). Uma solução dessas enzimas é inserida no ducto pancreático que atravessa a cabeça, o corpo e a cauda do pâncreas. Administrada dessa maneira, a solução enzimática causa distensão do pâncreas, que é subsequentemente cortado em pequenos pedaços e transferido à chamada Câmara de Ricordi, onde ocorre a digestão do parênquima hepático e a liberação das ilhotas.

2.2.2.1 Vantagens

Entre as muitas vantagens potenciais do transplante de ilhotas em relação ao transplante de pâncreas órgão total estão:

- A baixa carga antigênica (1-2 g de volume celular de ilhotas *versus* um órgão multicelular de aproximadamente 100 g);
- Um procedimento de transplante menos invasivo, mais simples e de baixa morbidade, consistindo em cateterismo transepático percutâneo da veia porta *versus* vascularização cirúrgica delicada de um órgão inteiro e um procedimento complexo para drenagem do pâncreas exócrino na bexiga ou intestino;
- A facilidade com que ilhotas podem ser manipuladas favoravelmente *in vitro* para alterar a imunogenicidade ou produzir produtos gênicos que alteram favoravelmente o microambiente da ilhota pós-transplante ou protegem as ilhotas de elementos nocivos que podem resultar em necrose ou apoptose (LEROITH; TAYLOR; OLEFSKY, 2004).
- Eliminação de possíveis complicações associadas à presença de enzimas exócrinas (SILVA; SOGAYAR, 2018);
- Mais fácil manutenção e possibilidade de serem colhidas de enxertos de doadores que, de outro modo, não seriam adequados ao transplante de órgãos;
- Internações hospitalares mais curtas com a promessa de obter grandes reduções nos custos gerais com saúde (*THE CHAIKOF LAB – AT THE INTERFACE OF ENGINEERING AND MEDICINE*).
- Taxa de relaparotomia durante os 3 primeiros meses reduzida de 40 para 3%;

- Não apenas o procedimento de transplante, mas o regime imunossupressor necessário pós-intervenção está associado a menor morbidade e vulnerabilidade a infecções com risco de morte;
- Maior número de candidatos aptos ao transplante: p. ex., pacientes previamente avaliados para transplante de pâncreas órgão total e excluídos por doença cardiovascular podem ser considerados para transplante de ilhotas, já que não há contraindicações absolutas relacionadas a doenças cardiovasculares em cirurgias de pequeno porte (MAFFI et al., 2011);
- Menor incidência de complicações técnicas pós-operatórias responsáveis pela perda do enxerto, como trombose e vazamentos anastomóticos (MOASSESFAR et al., 2016).

2.2.2.2 Limitações

O protocolo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas recomenda o transplante de mais de 5000 $\frac{IEQ}{kg}$ de peso corporal do receptor. No entanto, apenas 1 pâncreas não fornece essa quantidade, sendo necessários ao menos 2. O pâncreas, como qualquer outro órgão, apresenta demanda ordens de magnitude superior à oferta. Há enorme pressão para que os poucos pâncreas disponíveis sejam destinados ao transplante, o que limita consideravelmente a sua aplicação em pesquisas. Para se ter uma ideia, no Brasil mais de 30 mil pessoas esperam na fila do transplante. A relação oferta *versus* demanda, no entanto, varia de região para região (BRASIL, 2018). No Reino Unido, por exemplo, a média de espera por um pâncreas é de apenas 13 meses (NATIONAL HEALTH SERVICE, 2019).

Outra limitação relacionada à aplicação da técnica é a necessidade, similarmente ao transplante de pâncreas órgão total, de submissão do paciente a um regime imunossupressor vitalício. Esse é um dos fatores que restringe a elegibilidade de pacientes de T1D ao transplante de ilhotas apenas a portadores da doença por mais de 5 anos e maiores de idade, cuja doença seja instável, apresentem episódios hipoglicêmicos graves e labilidade glicêmica que não possa ser estabilizada através de insulinoterapia.

Quanto à eficácia do tratamento, as restrições aparecem em menos de 5 meses. Apenas 50% dos pacientes permanecem insulinoindependentes após 5 anos do procedimento, e, 5 anos mais tarde, a maioria já retomou o uso de insulina em algum grau. Tanto a funcionalidade quanto a viabilidade das células são comprometidas ou pela rejeição do sistema imune do receptor; ou pela recorrência de autoimunidade; ou pela destruição provocada pelo regime imunossupressor (SILVA; SOGAYAR, 2018).

Outro aspecto importante que compromete a sobrevivência das células é a ocorrência do chamado estresse oxidativo, que está associado à liberação de radicais livres, em especial de espécies reativas de oxigênio (ROS, na sigla em inglês). Ao mesmo tempo que o tratamento com potentes antioxidantes pode mitigar esse processo, reduzindo a apoptose, dependendo do antioxidante a suplementação pode ter o efeito negativo inverso de interromper a síntese do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, na sigla em inglês), que desempenha papel central na neovascularização. As redes capilares são removidas no isolamento de ilhotas, de modo que a revascularização é imperativa à sobrevivência das células. Dessa forma, estudos que envolvem antioxidantes atóxicos estão em andamento (GAMBLE et al., 2018).

Tabela 1: Riscos e benefícios do transplante de ilhotas, transplante de pâncreas órgão total, e insulinoterapia com bombas

Riscos e benefícios	Transplante de ilhotas	Transplante de pâncreas	Bomba de insulina
Morte devido à operação ou ao procedimento	Menos do que 1 paciente em 100	3 pacientes em 100	Perto de 0
Operação para abrir a barriga	2 pacientes em 100	Todos os pacientes	0
Repetir a operação na barriga	Perto de 0	30 pacientes em 100	0
Sérias complicações cirúrgicas incluindo colostomia	Perto de 0	30 pacientes em 100	0
Quando o tratamento começa a funcionar	Depois de 3-12 semanas	Imediatamente	Imediatamente
Qualquer infecção ao longo de 6 anos	17 pacientes em 100	17 pacientes em 100	Não aplicável
Infecção com risco de morte e efeitos clínicos ao longo de 6 anos	2 pacientes em 100	2 pacientes em 100	0
Morte devido a infecção ao longo de 6 anos	1 paciente em 300	1 paciente em 300	Não aplicável
Câncer, potencialmente fatal, ao longo de 6 anos (exceto câncer de pele)	< 2 pacientes em 100	4 pacientes em 100	0
Câncer de pele incluindo melanoma (frequentemente tratável) ao longo de 6 anos	8 pacientes em 100	8 pacientes em 100	0
Redução grave da função renal devido a medicamentos antirrejeição	Às vezes	Às vezes	Não aplicável
Eliminação da necessidade de insulina exógena por 1 ano	30-70 pacientes em 100	80-90 pacientes em 100	Não aplicável
Eliminação da necessidade de insulina exógena por 5 anos	10-30 pacientes em 100	50-60 pacientes em 100	Não aplicável
Grande redução do número de crises hipoglicêmicas severas por 18 meses	75-95 pacientes de 100	75-85 pacientes de 100	
Risco reduzido de crises hipoglicêmicas severas por 5 anos	50-70 pacientes em 100	50-70 pacientes em 100	75 pacientes em 100
Melhora nas complicações do diabetes	Provavelmente	Provada	Provavelmente

Fonte: RUTTER et al.

2.3 Encapsulamento de ilhotas pancreáticas humanas

Dadas as deficiências mencionadas acima associadas aos métodos atuais de tratamento de T1D, 3 questões centrais precisaram ser enfrentadas pelos pesquisadores: a necessidade de um regime imunossupressor vitalício; a escassez de doadores falecidos; e o mimetismo fisiológico de um pâncreas funcional. Uma estratégia atraente para a geração de um pâncreas bioartificial que elimina a necessidade de imunossupressores é o encapsulamento de ilhotas produtoras de insulina em uma membrana semipermeável. Essa membrana deve possuir propriedades adequadas para proteger as ilhotas do sistema imunológico do hospedeiro e ao mesmo tempo permitir a troca de nutrientes e de pequenas moléculas (incluindo glicose e insulina) entre as ilhotas encapsuladas e seu ambiente externo.

Até o presente momento, as membranas semipermeáveis existentes podem ser categorizadas, com base nas diferenças na distância de difusão, em:

- Revestimentos ultrafinos – modificam diretamente a superfície das ilhotas para melhorar as propriedades mecânicas e de transporte. Visam cobrir cada ilhota com uma espessura uniforme, em vez de controlar o diâmetro total da cápsula, como os demais métodos;
- Macrocápsulas – cápsulas macrométricas que envolvem de 70 até 500000 ilhotas equivalentes. Podem ser extravasculares ou intravasculares baseado no seu mecanismo de transporte;
- Microcápsulas – tipicamente envolvem apenas um pequeno número de células, e, portanto, requerem cirurgia de pequeno porte. O diâmetro varia de 400 a 800 µm, sendo que o mecanismo de transporte de nutrientes é basicamente difusivo (SONG; ROY, 2016).

2.3.1 Microencapsulamento

A primeira tentativa de encapsular células em membranas poliméricas foi feita por *Vincenzo Bisceglie* em 1933. Na ocasião, ele envelopou células tumorais em uma estrutura polimérica e as transplantou na cavidade abdominal de um porco, quando percebeu que as células permaneceram viáveis por um longo período sem serem atacadas pelo sistema imunológico (BISCEGLIE, 1934). Mas foi *Thomas Chang*, em 1964, que propôs a ideia de **bioencapsulamento com membranas poliméricas ultrafinas** para promover imunoproteção. Ele sugeriu que essas “células artificiais” produzidas pelo método de gota não apenas protegiam as células encapsuladas da imunorrejeição, mas também proporcionavam uma alta razão superfície-volume, permitindo boa transferência de massa de O₂ e nutrientes (CHANG, 1964).

Vantagens em relação às demais técnicas incluem a manutenção de um gradiente de difusão adequado independentemente da quantidade de nutrientes; uma distância segura entre as ilhotas e o meio externo, desencorajando uma resposta imune; e a inserção individual de ilhotas nas cápsulas, para que, em caso de perda de integridade, apenas algumas ilhotas sejam destruídas.

Uma variedade de biomateriais tem sido usada na composição das cápsulas, desde polímeros artificiais, como poli(etileno glicol) (PEG), poli(álcool vinílico) (PVA), poliuretano (PU), poliéster (PES), polipropileno (PP) e poliacrilatos, até biopolímeros encontrados nas mais diversas formas na natureza, como agarose, quitosana, celulose, colágeno, xantana e alginato. No entanto, atualmente “considera-se que apenas o alginato de sódio foi suficientemente estudado de forma a qualificá-lo como seguro para aplicação em humanos” (SILVA; SOGAYAR, 2018, apud DE VOS et al., 2014).

2.3.1.1 Biopolímeros

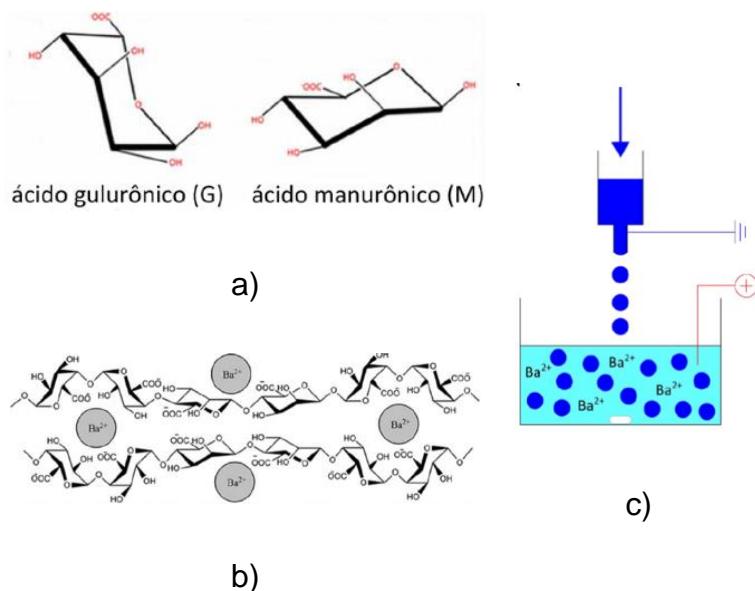
2.3.1.1.1 Naturais

2.3.1.1.1.1 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um sal obtido a partir da neutralização, com NaOH, do ácido algínico, um copolímero classificado dentro dos polieletrólitos. De ocorrência natural², apresenta boa biocompatibilidade, sendo formado por 2 monômeros – ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M) – cujo sequenciamento define suas propriedades distintas (SILVA; SOGAYAR, 2018).

Através de uma bomba de ejeção é possível obter cápsulas de alginato de sódio contendo células, porém somente através de um processo conhecido como gelificação é que se formam membranas resistentes. Esse processo assemelha-se fortemente à cura de um polímero termorrígido no que concerne à formação de uma estrutura reticulada; a diferença é que as ligações entre as cadeias não são de natureza covalente, mas sim iônica, desempenhando os íons de Ca^{2+} e Ba^{2+} o mesmo papel que o enxofre na vulcanização.

Figura 1: Fórmula estrutural dos monômeros do ácido algínico a); aparelhagem experimental de microencapsulamento b); ligações cruzadas após gelificação c)



Fonte: (SILVA; SOGAYAR, 2018)

² Para entender de onde o alginato advém, como é extraído e purificado, consulte o Apêndice A.

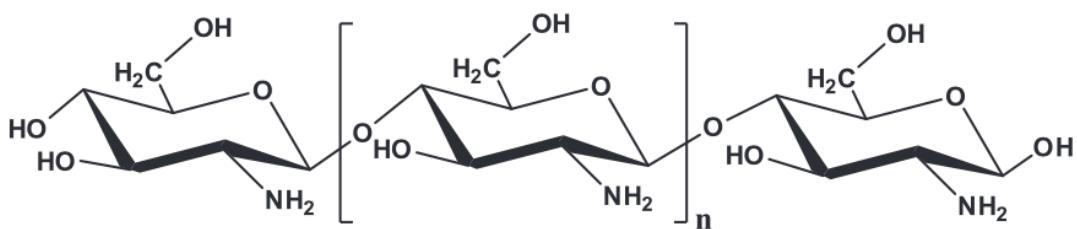
2.3.1.1.2 Quitosana

A quitosana é outro copolímero pertencente ao grupo dos polieletrólitos. Encontrado na carapaça de artrópodes, em fungos, anelídeos e moluscos, pode também ser produzida a partir da quitina através de uma reação conhecida como desacetilação, em que um grupo acetamida (NHCOH_3) é convertido em uma amina primária na presença de uma base de caráter fortemente alcalino (FOOK et al., 2016).

Sendo um polímero de origem natural e biodegradável, não é de se surpreender que tenha sido objeto de uma certa quantidade de estudos de encapsulamento (neurônios, fibroblastos, células estromais da medula óssea, cardiomiócitos) e até empregado em outros de natureza similar, como liberação controlada de fármacos, substituições dérmicas e aceleração da cicatrização de feridas (DE VOS et al., 2014).

Diante do alginato, figura como um material de promissora aplicação na constituição de microcápsulas, já que, sendo um polícation, a atração eletrostática entre os biomateriais tem sido responsabilizada por uma maior resistência mecânica e estabilidade frente a outras combinações (BARUCH; MACHLUF, 2006). Estudos mais detalhados, no entanto, são necessários para controlar melhor outras propriedades, como a permeabilidade.

Figura 2: Estrutura molecular da quitosana



Fonte: (DE VOS et al., 2014)

2.3.1.1.2 Sintéticos

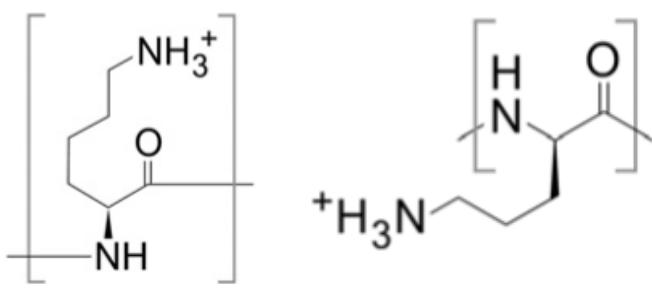
2.3.1.1.2.1 α -poli-L-lisina (α -PLL)

A α -poli-L-lisina é o enantiômero levógiro da α -polilisina, o polipeptídeo formado quando a policondensação (*ALAMANDA POLYMERS*) do aminoácido ocorre a partir do carbono- α . Outro policátion biodegradável, um estudo de 1993 já mostrava sua imunoproteção frente a IgG dentro de uma dada faixa de massa molar (HALLÉ et al., 1993). No entanto, estudos recentes apontam que apenas uma pequena exposição de sítios não ligados pode desencadear fibrose (LIU et al., 2010), de forma que adaptações têm de ser feitas para contornar esse fato.

2.3.1.1.2.2 Poli-L-ornitina (PLO)

A poli-L-ornitina é derivada da L-ornitina, um dos produtos do metabolismo enzimático envolvido no ciclo da ureia. Frente à evidente biocompatibilidade e dadas as limitações de resistência mecânica das microcápsulas fabricadas com PLL, foi proposta como alternativa com resultados promissores (CALAFIORE et al., 1999): é comprovadamente menos imunogênica e fornece melhor permeabilidade seletiva (DARRABIE; KENDALL; OPARA, 2005).

Figura 3³: Estruturas moleculares dos monômeros α -L-lisina e L-ornitina



Fonte: (TAM et al., 2011)

³ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951700736125. Concedida em 18 nov. 2020.

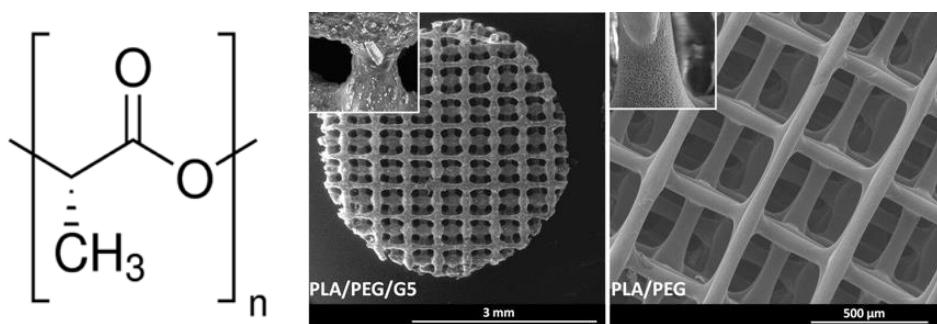
2.3.1.1.2.3 Poli(L-lactídeo) (PLLA)

Embora mais conhecido como poli(L-ácido láctico), de acordo com as regras da IUPAC não deve ser assim chamado, já que pertence ao grupo dos ésteres (MARTIN; AVÉROUS, 2001). É formado a partir da policondensação do ácido láctico que, portanto, pode ser vista também como uma esterificação. Tornou-se popular por ser um produto de origem renovável (i. e.: bioplástico), proveniente do milho, da mandioca, do açúcar da cana e da polpa da beterraba (MSUYA et al., 2017).

Assim como é formado também se degrada em seu monômero inócuo, por isso tem sido usado em implantes dos mais diversos: âncoras, parafusos, placas, pinos, hastes e malhas (AURAS et al., 2010). Sua biodegradação pode variar de 6 meses a 2 anos. Como é gradual, sua principal aplicação na área tem sido em próteses ortopédicas, já que é compatível com a lenta regeneração dos osteócitos e condrócitos, transferindo-lhes a carga de volta adequadamente.

Apesar de sua biocompatibilidade, pouquíssimos estudos foram feitos usando o PLLA na fabricação de microcápsulas. Uma patente americana clama a invenção de uma microcápsula de alginato e PLA que apresentou excelente permeabilidade (GOOSEN et al., 1987). Entretanto, os estudos se concentram no emprego do polímero na liberação controlada de fármacos, vacinas e na composição de arcabouços (scaffolds) (ALAGPULINSA et al., 2019).

Figura 4⁴: Fórmula estrutural do poli(L-lactídeo) (SIGMA-ALDRICH, a) e scaffolds no formato de panquecas de copolímeros do monômero



Fonte: (SERRA; PLANELL; NAVARRO, 2013)

⁴ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951701276321. Concedida em 18 nov. 2020.

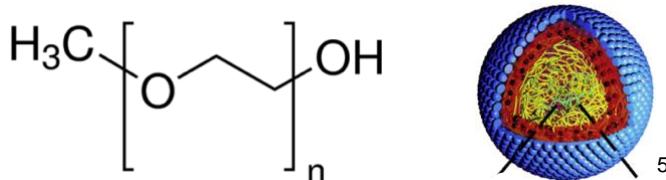
2.3.1.1.2.4 Poli(etileno glicol) metil éter (mPEG)

O poli(etileno glicol) é um poliéster de uso industrial e médico consolidados. Sendo uma molécula hidrofílica, já foi usada para evitar a adsorção inespecífica de proteínas no contexto da Bioquímica (GANJI et al., 2016).

Quando, em vez de reagir com a água, o óxido de etileno (C_2H_4O) reage com metanol (CH_3OH), forma-se o metoxi etileno glicol, cuja poliadição leva à formação do mPEG. Seu principal uso é na indústria farmacêutica e de cosméticos, devido a sua inércia fisiológica, suavidade e não irritabilidade (TSAL et al., 2015).

Pesquisadores chineses modificaram a hidroxila terminal do mPEG usando bromoacetaldeído dietilacetal (BADA) de acordo com a reação de substituição nucleofílica de *Williamson*, obtendo o produto que foi abreviado mPEG-BADA (ZHAO et al., 2009). Três anos mais tarde, alguns de seus conterrâneos submeteram o produto à hidrólise *in situ* por uma hora enquanto adicionavam uma solução aquosa de borocianohidreto de sódio ($NaCNBH_3$) gota a gota à temperatura ambiente sob proteção de nitrogênio obtendo uma solução de mPEG com aldeído terminal (mPEG-CHO) que foi usada para incubar microcápsulas de alginato-quitosana (AC) e fabricar microcápsulas de mPEG (ZHENG et al., 2012).

Figura 5: Fórmula estrutural do mPEG (SIGMA-ALDRICH, b) e representação esquemática de micelas fabricadas com o polímero para liberação controlada no tratamento da metástase do câncer de mama



Fonte: (XU et al., 2014)

⁵ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951711001949. Concedida em 18 nov. 2020.

2.4 Métodos de caracterização físico-química de microcápsulas

2.4.1 XPS

XPS (sigla em inglês para Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X) é uma técnica espectroscópica quantitativa para caracterização química da superfície de um material no que concerne à composição elementar, estado de oxidação, estrutura e densidade eletrônicas. Seu limite de detecção se encontra na faixa de partes por milhão (ppm).

Seu princípio de funcionamento é baseado no efeito fotoelétrico: ao incidirem sobre a amostra, os fótons de raios X interagem com os elétrons do material e transferem-lhes parte de sua energia cinética. Alguns elétrons receberão energia suficiente para ejetarem-se do material, sendo capturados pelo detector. Como o detector está situado a uma distância fixa da amostra, com a cronometragem do ensaio é possível calcular a velocidade desses elétrons e, portanto, sua energia cinética. Dessa forma, obtém-se um gráfico relacionando o número de elétrons à energia cinética, que constitui o *output* espectral.

A partir da energia cinética é possível calcular a energia de ligação desse elétron pela seguinte fórmula:

$$E_{ligação} = h\nu - E_{cinética} - \Phi \quad \text{Eq. 1}$$

onde Φ corresponde à função trabalho do detector, que pode ser compensada pelo sistema.

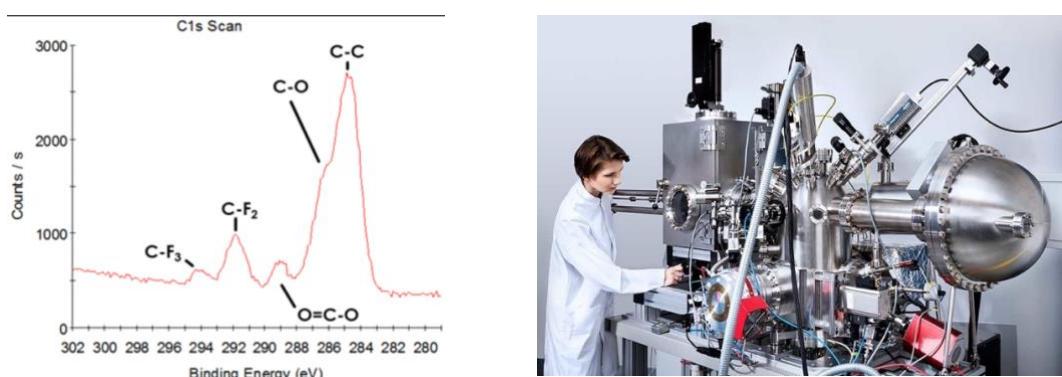
O elétron do orbital 1s é normalmente escolhido para análise por estar presente em absolutamente todos os elementos químicos.

Se considerarmos a energia de ligação igual à energia de ionização (o que é válido na maioria dos casos), fica evidente como o equipamento é capaz de distinguir elementos químicos e estados de oxidação. Além disso, como essa energia também é sensível aos estados de ligação do átomo do qual se analisa o elétron, o XPS é capaz de identificar inclusive os grupos funcionais presentes na superfície.

Por fim, diz-se que a técnica é quantitativa porque, quanto maior a concentração atômica do elemento na superfície da amostra, maior o número de fotoelétrrons emitidos. Assim, o tamanho do pico é uma medida da concentração atômica do elemento em questão (SANTOS, 2005).

XPS tem sido uma das técnicas mais empregadas para estudo da superfície de biopolímeros. Pesquisadores japoneses comprovaram, por exemplo, que a enxertia induzida por radiação de polietileno com acrilamida (um monômero solúvel em água) é capaz de alterar o caráter hidrofóbico da superfície de cateteres de modo a torná-los inertes às proteínas do plasma (“PHYSICOCHEMICAL ASPECTS OF POLYMER SURFACES.”, 1983).

Figura 6: Típico output espectral de XPS para o carbono (COVALENT METROLOGY) e aparelhagem experimental



Fonte: (KOLBE, 2017)

2.4.2 FTIR

FTIR, outro acrônimo para Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier*, é uma técnica qualitativa/semiquantitativa de espectroscopia por absorção em que uma luz policromática incide sobre a amostra e se mede o quanto dessa luz é absorvida por ela. Varia-se a faixa de frequências que constitui essa luz até se obter um espectro chamado de interferograma que é submetido a um tratamento matemático de cálculo da inversa para inferir-se a absorbância/transmitância por comprimento de onda.

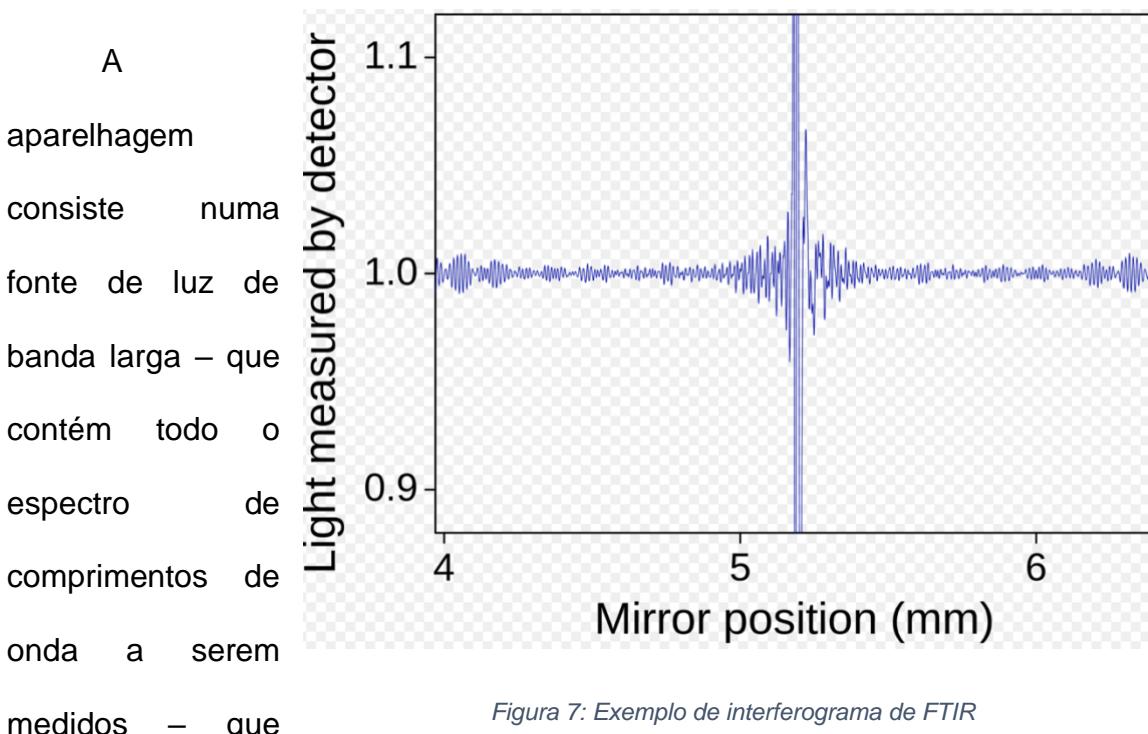


Figura 7: Exemplo de interferograma de FTIR

incide num interferômetro de *Michelson* – determinado arranjo de espelhos cuja posição do espelho do meio pode ser alterada. Conforme o espelho se move, cada comprimento de onda é alternadamente bloqueado e transmitido pelo interferômetro, devido ao fenômeno de interferência.

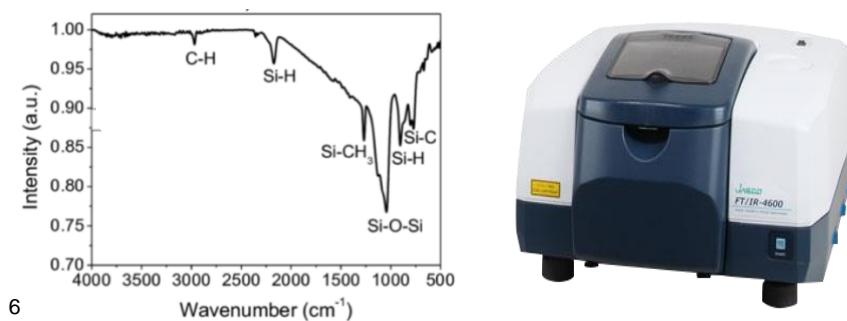
O interferograma é então processado através de um computador usando transformada de *Fourier* discreta (aplicando o algoritmo de Transformada Rápida),

que converte as absorbâncias no domínio da posição ao domínio inverso (número de onda) (GRIFFITHS, 1983).

A razão pela qual se estuda a interação da matéria com a radiação no infravermelho é que essa região possui frequências de ressonância com a vibração das ligações (ATKINS; PAULA, 2009). Cada ligação possui uma frequência de vibração única, que depende de uma série de variáveis, como a massa e a natureza dos átomos envolvidos, o modo de vibração (estiramento simétrico e assimétrico, dobramento angular, torção, balanço ou rotação) e a força da ligação (“Infrared and Raman Spectroscopy, Method and Applications”, 1996). Dessa forma, é possível construir tabelas de bandas de absorção características para os diversos grupos funcionais (SOCRATES, 2001).

O uso de FTIR para análise de materiais biológicos é extremamente disseminado na literatura por ser um método razoavelmente acessível (se comparado ao XPS e ao ToF-SIMS) e ainda assim extremamente poderoso: suas aplicações vão desde a determinação da polaridade ao longo da cadeia principal de uma proteína transmembranar (MANOR et al., 2012) até o monitoramento de tumores (ANDRUS, 2006).

Figura 8: Típico espectro de FTIR (DOWNLING et al., 2010) e espectrofotômetro



Fonte: (JAPAN SPECTROSCOPIC COMPANY)

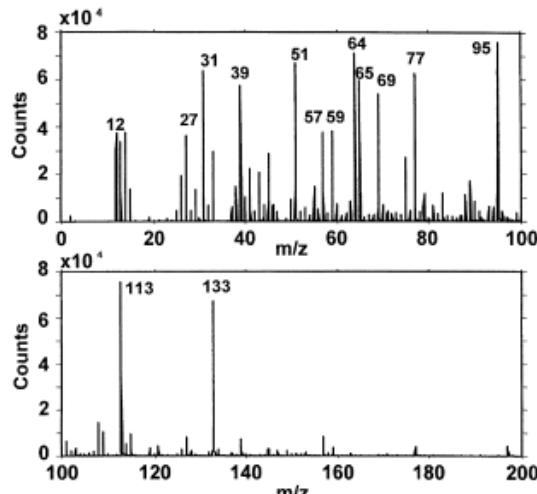
⁶ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952280215068. Concedida em 19 nov. 2020.

2.4.3 ToF-SIMS

ToF-SIMS (Figura 9⁷), abreviatura de Espectrometria de Massa por Íons Secundários por Tempo de Voo, é a técnica de análise química qualitativa e semiquantitativa de superfícies mais sensível que existe, com limites de detecção que alcançam a ordem de ppb. De maneira simplificada, a amostra é bombardeada com um feixe de íons primários que, analogamente aos fótons do XPS, transferem sua energia cinética às partículas da superfície, de modo que algumas delas adquiram energia suficiente para serem ejetadas do material. Muitas adquirem também carga, de onde advém o termo “íons secundários” (BENNINGHOVEN, 1994). Os íons de mesma polaridade são acelerados à mesma energia cinética, de modo que possuem um tempo único de “voo” até o detector. Cronometrando-se o “voo”, é possível então obter a razão massa-carga do íon, que o identifica, a princípio, inequivocamente.

Em 28 de julho desse ano, pesquisadores da Universidade de Sorbonne, na França, identificaram um potencial biomarcador de hipertensão arterial pulmonar, uma doença pouco compreendida e para a qual não existem ferramentas de diagnóstico nem cura, através de ToF-SIMS. A descoberta só reforça o papel vital que a reconstituição de imagens por espectroscopia de massa pode desempenhar na pesquisa biomédica moderna (VAN NUFFEL et al., 2020).

Figura 9: Típico espectro de ToF-SIMS



Fonte: (FENG; CHAN; WENG, 2000)

⁷ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951730034696. Concedida em 18 nov. 2020.

2.4.4 Potencial ζ

De acordo com o modelo de *Gouy-Chapman*, a superfície de uma partícula sólida eletricamente carregada num meio polar atrairá os contraíons da suspensão, depositando-se camadas cada vez menos densas devido à diminuição do módulo da força elétrica com a distância à superfície. As camadas fortemente adsorvidas e as primeiras que compõem a chamada camada difusa são arrastadas junto à partícula quando esta se move. O plano que separa as camadas arrastadas das demais é chamado plano de cisalhamento, e o potencial elétrico medido nesse plano é chamado potencial ζ .

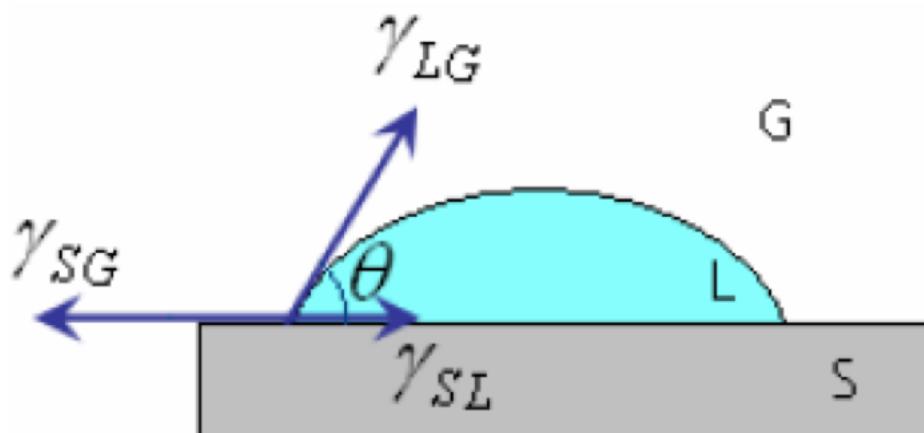
Como partículas podem chegar à escala nanométrica, é impossível colocar uma ponta de prova na superfície e outra na camada difusa de modo que um voltímetro ateste a d.d.p. Por isso, a medida da carga é feita indiretamente por meio de sua mobilidade eletroforética: ao serem colocadas entre duas placas carregadas de sinais opostos, são direcionadas pelo campo elétrico a uma das placas conforme a sua polaridade, sendo possível calcular a velocidade com que se dá esse movimento. Esta pode ser relacionada ao potencial da partícula junto ao que está adsorvido a sua superfície. Dito isso, fica fácil entender por que se calcula justamente esse potencial.

Pesquisadores chineses verificaram que a citotoxicidade de nanopartículas poliméricas se correlaciona diretamente ao potencial ζ : quanto mais positiva a carga da partícula, mais tóxica ela é à célula. Uma provável explicação é que as coroas proteicas que se formam reduzem as interações da partícula com as membranas celulares permitindo a digestão dela por lisossomos, danificando-os e afetando subsequentes processos biológicos (SHAO et al., 2015).

2.4.5 Ângulo de contato pelo método da gota séssil

O ângulo de contato entre uma gota de um líquido e uma superfície sólida sobre a qual foi depositada é uma medida da molhabilidade desse líquido — quanto menor o ângulo de contato maior a molhabilidade. Isso pode ser explicado pelo balanço de tensões interfaciais (γ) que se estabelece nessa situação:

Figura 10: Balanço de forças num equilíbrio trifásico de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida



Em repouso, o balanço de forças deve ser nulo. Portanto, se:

- $\Theta > 90^\circ$: superfície hidrofóbica ($\gamma_{sg} < \gamma_{sl}$);
- $\Theta < 90^\circ$: superfície hidrofílica ($\gamma_{sg} > \gamma_{sl}$).

Engenheiros químicos da Universidade de Porto relataram que a hidrofobicidade de materiais biomédicos, avaliada através do ângulo de contato pelo método da gota séssil, está associada a uma maior adesão de *Escherichia coli* e subsequente desenvolvimento de biofilme menos suscetível a antibióticos. Esses resultados preparam o terreno para o ajuste minucioso de propriedades de superfície de modo a aumentar a eficácia terapêutica antimicrobiana (GOMES et al., 2015).

2.5 Química Analítica na investigação da biocompatibilidade

Segundo *Paul de Vos*, o verdadeiro estado de biocompatibilidade⁸ de microcápsulas usadas para o imunoisolamento de ilhotas pancreáticas humanas com vistas à reversão de diabetes só pode ser determinado se técnicas de caracterização físico-químicas forem empregadas concomitantemente às biológicas de modo a elucidar quais parâmetros são responsáveis pelas respostas imunológicas apresentadas (ROKSTAD et al., 2014). Partindo dessa premissa, as técnicas descritas na seção anterior foram empregadas em uma série de estudos interdisciplinares para compreender, principalmente, os mecanismos envolvidos na limitada biocompatibilidade que compromete tanto a funcionalidade quanto a viabilidade celular do enxerto a longo prazo (3 meses+).

Já que, à época, as microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) eram as mais amplamente estudadas para o devido fim, pesquisadores canadenses liderados por *Tam* resolveram, em 2005, levantar um modelo físico-químico dessas microcápsulas à escala micrométrica/nanométrica. Para isso, duas das técnicas utilizadas foram XPS e ToF-SIMS. A análise de XPS é mostrada na Tabela 2.

A razão carbono-nitrogênio $\left(\frac{C}{N}\right)$ para a microcápsula foi 12,3, apenas levemente superior à mesma razão para o PLL (10,2). Isso é um indício de que o PLL está presente próximo à superfície em quantidades consideráveis. Segundo os autores, sabendo-se que o nitrogênio detectado se originou principalmente do PLL (figura 11), uma forma de quantificar essa suposição é dividir a razão $\frac{C}{N}$ do PLL pela da microcápsula: o resultado, 81%, estima quantos dos átomos de carbono presentes na superfície da cápsula advieram de moléculas de PLL.

⁸ A razão por trás da dificuldade em definir-se “biocompatibilidade” é fornecida no Apêndice B.

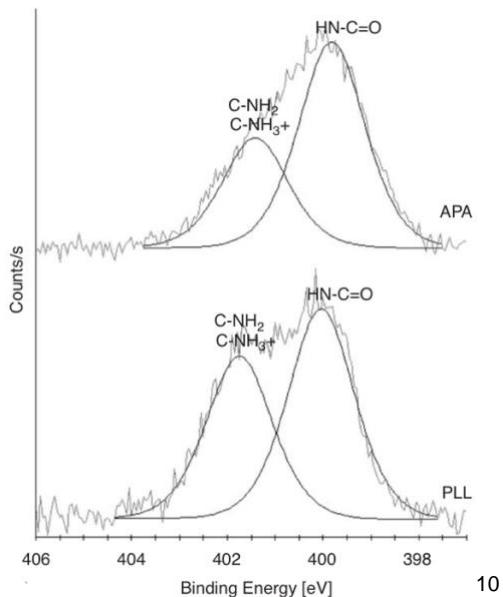
⁹ Tabela 2: Composições elementares da superfície de microcápsulas de APA desidratadas, filmes de alginato de sódio e poli-L-lisina e beads desidratados de alginato gelificado com cálcio como medidos pelos espectros de XPS gravados em modo varredura. Valores expressos em porcentagem atômica média

	Microcápsulas de APA	Alginato de sódio	Poli-L-lisina	Alginato gelificado com Ca
%C	55,9 ± 0,3	51,2 ± 0,1	60,1 ± 3,2	35,0 ± 0,9
%O	32,1 ± 0,7	38,3 ± 0,6	27,9 ± 2,5	34,7 ± 0,9
%Na	1,8 ± 0,3	10,1 ± 0,8	0	0
%N	4,54 ± 0,7	0	7,57 ± 3,41	0,17 ± 0,09
%S	0	0,37 ± 0,13	0	0
%P	0	0,03 ± 0,02	0	0
%Cl	0,05 ± 0,05	0	0	0
%Br	0	0	3,7 ± 1,5	0
%Ca	0	0	0	0,6 ± 0,1
%Si	5,7 ± 1,2	0	0,8 ± 0,8	29,5 ± 0,2
$\frac{C}{O}$	1,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
$\frac{C}{N}$	12,3 ± 0,3	—	10,2 ± 5,0	—
$\frac{C}{Na}$	32,9 ± 5,3	5,2 ± 0,4	—	—

Fonte: (TAM et al., 2005)

⁹ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951150730035. Concedida em 17 nov. 2020.

Figura 11: Uma comparação dos picos para o elétron do orbital 1s do nitrogênio do espectro de XPS para microcápsulas desidratadas de APA e filmes de poli-L-lisina



Fonte: (TAM et al., 2005)

A análise de ToF-SIMS apontou para essa mesma conclusão de outra forma. Muitos dos íons contendo nitrogênio característicos da molécula de PLL foram detectados na superfície da microcápsula: NH_4^+ , $CH_2 = NH_2^+$, $C_5H_{10}N^+$, CN^- , CNO^- e $-CH_2CONH_2$ (vide Tabela 3).

A figura 12 (a) mostra 3 dos picos correspondentes a esses íons nos espectros de íons positivos da microcápsula e do PLL ($\frac{m}{z} = 18, 30 \text{ e } 84$), enquanto a figura 12 (b) mostra outros 2 nos espectros de íons negativos ($\frac{m}{z} = 26 \text{ e } 42$). Esses 2 correspondentes aos íons negativos também apareceram no espectro do alginato, mas nesse caso representam íons com composições C_2H_2 e C_2H_2O , respectivamente, em vez de CN^- e CNO^- que são característicos de poliamidas.

¹⁰ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951150730035. Concedida em 17 nov. 2020.

11

Tabela 3: Picos característicos do alginato de sódio e da poli-L-lisina que estavam presentes no espectro de razões massa-carga das microcápsulas de APA, como medido por ToF-SIMS estático

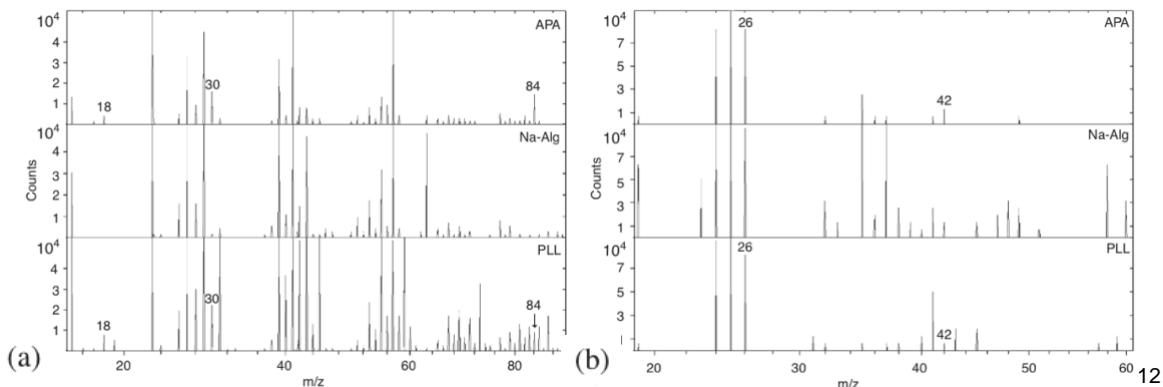
Molécula	$\frac{m}{z}$	Composição	Descrição	Intensidade		
				Caps. de APA	PLL	Alg de Na
Alginato de sódio $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$ $(M_w = 108,01)$ 	63+	HONa_2	$\text{Na}(\text{NaOH})^+$	1,9	—	40,8
	125+	$\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4\text{Na}$	Fragmento de alginato	1,9	—	11,6
	165+	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_3\text{Na}$	1 anel + $\text{COONa} + \text{H}$	1,6	—	1,2
	517+	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{16}\text{Na}_2$	2 unidades funcionais intactas + $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_4$	0,3	—	6,3
	399-	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_{12}\text{Na}_2$	2 unidades funcionais intactas + 2H	2,2	—	0,9
Polí-L-lisina $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ $(M_w = 129,10)$ 	18+	H_4N	NH_4^+	4,5	7,7	—
	30+	CH_4N	$\text{CH}_2 = \text{NH}_2^+$	16,3	18,6	0,5
	84+	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}^+$	12,2	6,7	0,3
	26-	CN	CN^-	86,4	81,1	—
	42-	CNO	CNO^-	13,3	11,8	—
	58-	$\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}$	$-\text{CH}_2\text{CONH}_2$	1,0	5,8	—
Complexo alginato-PLL	457+	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$	2 unidades funcionais de alginato + 1 unidade funcional de PLL	0,5	—	—

Fonte: (TAM et al., 2005)

¹¹ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951150730035. Concedida em 17 nov. 2020.

Essa similaridade de razões massa-carga ($\frac{m}{z}$) pode explicar por que esses 2 picos têm intensidades maiores para a microcápsula.

Figura 12: Uma comparação entre os espectros de razão massa-carga da microcápsula de APA desidratada, do filme de alginato de sódio e do de poli-L-lisina, como medido por ToF-SIMS estático. Picos marcados correspondem a íons característicos do PLL (a) positivos (b) negativos



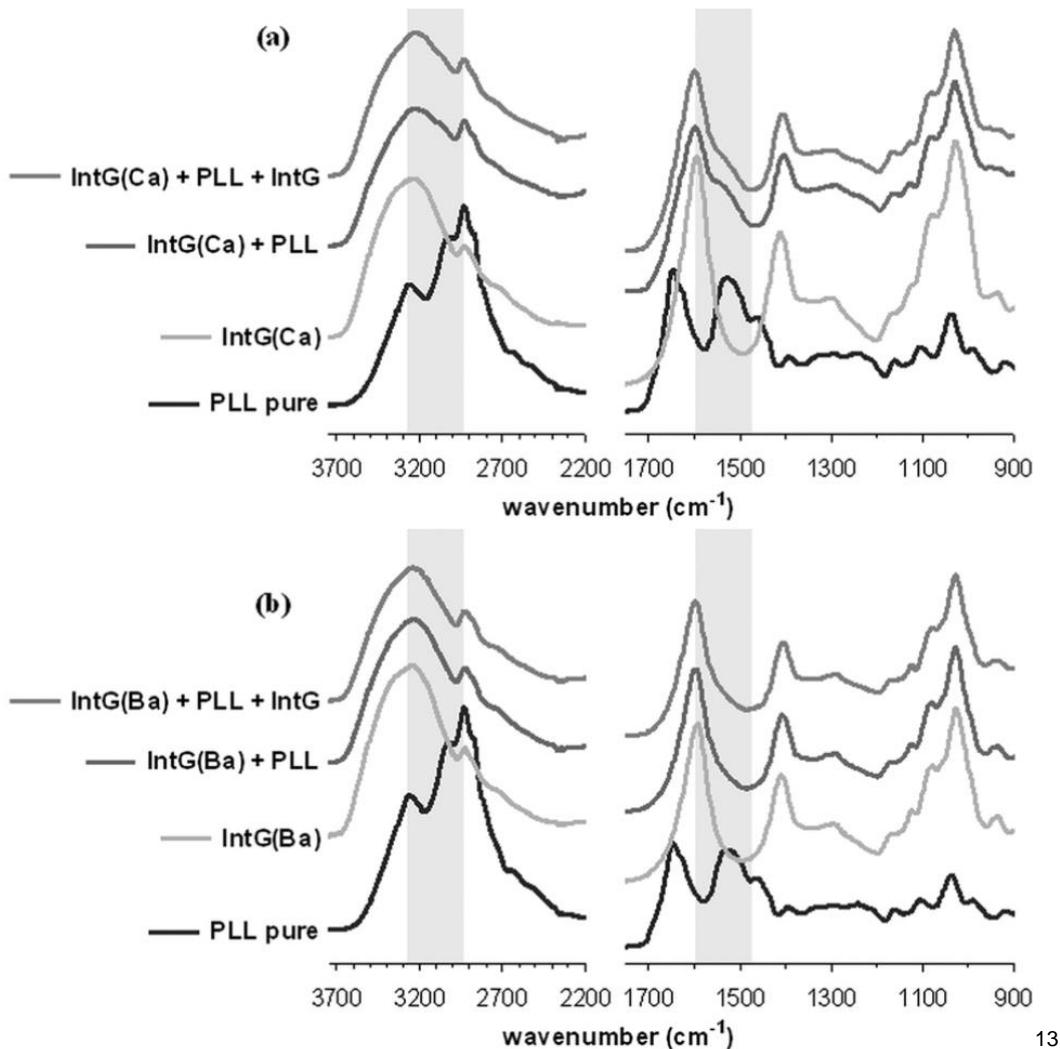
Fonte: (TAM et al., 2005)

Os íons associados com o PLL foram geralmente baixos em massa ($\frac{m}{z} = 18 \text{ a } 84$), o que indica que as moléculas na superfície da microcápsula eram pequenas e/ou fragmentadas. Isso levou os pesquisadores à conclusão de que **PLL exposto/não ligado não suficientemente neutralizado possa induzir a resposta imune** que foi observada com as microcápsulas de APA (TAM et al., 2005).

Como mencionado na seção 2.3.1.1, diante da limitada resistência mecânica associada ao PLL e do surgimento de um novo biomaterial de mesma evidente biocompatibilidade (poli-L-ornitina ou PLO), o mesmo grupo realizou, 5 anos mais tarde, um novo estudo em que produziram microcápsulas de alginato com teor intermediário (IntG-44%) e alto (HiG-71%) de ácido gulurônico gelificadas com cálcio (Ca) ou bário (Ba), revestiram-nas com poli-L-lisina (PLL) ou poli-L-ornitina (PLO) e adicionaram mais uma camada de alginato com teor intermediário de ácido gulurônico. Os espectros de FTIR são mostrados a seguir:

¹² Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951150730035. Concedida em 17 nov. 2020.

Figura 13: Espectros de absorção de FTIR para microcápsulas de alginato-PLL com núcleo gelificado de (a) cálcio ou (b) bário



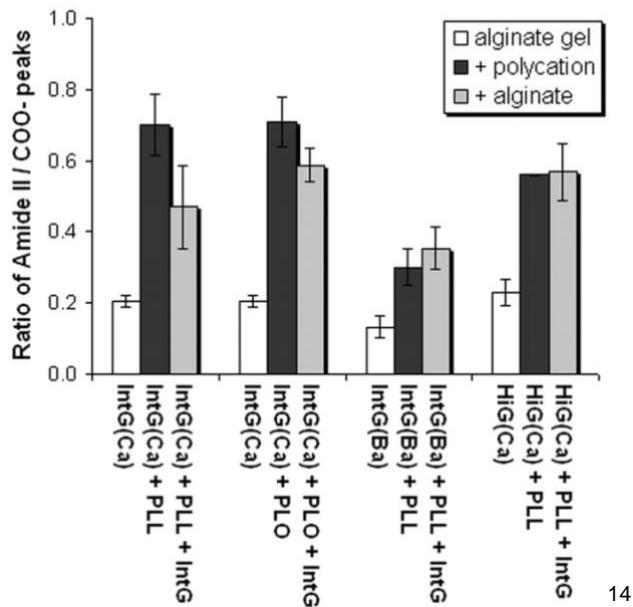
Fonte: (TAM et al., 2011)

Nos espectros correspondentes às cápsulas de cálcio, nota-se claramente a presença de “ombros” nos picos característicos da molécula de PLL [grupos amino protonados (NH_3^+) a $\approx 3050\text{ cm}^{-1}$ e amida II a $\approx 1530\text{ cm}^{-1}$] que são quase imperceptíveis no caso do bário. Segundo os pesquisadores, essa inexistência já é um bom indício de que menos PLL pode penetrar no e/ou ligar-se ao alginato. Essa suposição foi posteriormente confirmada pela análise semiquantitativa do espectro calculando-se a razão entre os picos correspondentes à amida II da

¹³ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951700736125. Concedida em 18 nov. 2020.

cadeia principal do policáton ($\cong 1526\text{ cm}^{-1}$, ombro) e ao carboxilato do alginato ($\cong 1593\text{ cm}^{-1}$), que é mostrada na figura 14:

Figura 14: Razão entre as alturas dos picos correspondentes à amida II do policáton e ao carboxilato do alginato. Legenda: alginato (branco); +policáton (preto); +alginato (cinza)



14

Fonte: (TAM et al., 2011)

Uma baixa penetração de PLL no alginato gelificado com bário pode ser explicada pela maior afinidade do íon pelo alginato se comparada ao cálcio, o que torna o deslocamento do bário pelo PLL menos energeticamente favorável.

Dessa forma, a baixa biocompatibilidade de cápsulas de bário pode ser explicada pela reduzida penetração de PLL no núcleo gelificado, já que uma membrana mais fina e/ou menos estável pode trazer maior risco de exposição de PLL não ligado.

Analizando agora apenas as cápsulas de cálcio quanto ao teor de ácido gularônico no alginato, um indício da força de interação iônica entre os polieletrólitos é o deslocamento dos picos associados às vibrações de estiramento assimétrico ($\cong 1593\text{ cm}^{-1}$) e simétrico ($\cong 1410\text{ cm}^{-1}$) dos grupos carboxilato do alginato à medida que se adicionam as demais camadas, mostrado na Tabela 4:

¹⁴ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951700736125. Concedida em 18 nov. 2020.

Tabela 4: Posições dos picos de absorbância de FTIR associados às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico dos grupos funcionais carboxilato do alginato

Material	Número de onda (cm ⁻¹)	Assimétrico		Simétrico	
		Mudança vs <i>beads</i> gelificados (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Mudança vs <i>beads</i> gelificados (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
IntG (Ca)	1593 ± 0	—	1410 ± 0	—	—
IntG (Ca) + PLL	1599 ± 2	+6	1404 ± 2	-6	—
IntG (Ca) + PLL + IntG	1602 ± 3	+9	1408 ± 2	-2	—
IntG (Ca) + PLO	1597 ± 2	+4	1402 ± 0	-8	—
IntG (Ca) + PLO + IntG	1598 ± 3	+5	1407 ± 1	-3	—
IntG (Ba)	1592 ± 1	—	1408 ± 0	—	—
IntG (Ba) + PLL	1596 ± 1	+4	1405 ± 1	-3	—
IntG (Ba) + PLL + IntG	1595 ± 2	+3	1404 ± 0	-4	—
HiG (Ca)	1593 ± 0	—	1409 ± 1	—	—
HiG (Ca) + PLL	1595 ± 0	+2	1405 ± 1	-4	—
HiG (Ca) + PLL + IntG	1596 ± 1	+3	1404 ± 2	-5	—

Fonte: (TAM et al., 2011)

15

Da tabela fica evidente que, em geral, o pico próximo a 1593 cm⁻¹ deslocou-se em direção a números de onda maiores, enquanto o outro foi no sentido contrário. Esses deslocamentos foram mais pronunciados para cápsulas com teor intermediário de

¹⁵ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951700736125. Concedida em 18 nov. 2020.

ácido gulurônico, o que suporta a ideia de que essa formulação mostrou maior eficiência de ligação com o policáton. Isso é consequência natural da maior afinidade dos blocos G pelos cátions divalentes.

A molhabilidade das microcápsulas também foi avaliada através do ângulo de contato pelo método da gota séssil. Foi afirmado que, por ser um hidrogel, o alginato é biocompatível devido a sua superior hidrofilicidade, que permite mínima adesão proteica e celular. De fato, os pesquisadores verificaram que a média do ângulo de contato para o poliânon foi menor do que 15°. Com a adição do policáton, esse valor aumentou significativamente para mais de 50°. Entretanto, quando analisados separadamente, ambos PLO e PLL apresentaram ângulos de contato iguais a $20,4 \pm 0,2^\circ$ e $24,6 \pm 0,6^\circ$, respectivamente. Portanto, não é o policáton que tem caráter hidrofóbico, mas sim o complexo alginato-policáton. A explicação dos autores para isso é que os grupos funcionais de cargas opostas dos polímeros estão ocupados interagindo entre si e, portanto, indisponíveis à água.

Entre os policátions, PLO apresentou um caráter levemente mais hidrofílico do que o PLL, sendo, portanto, mais molhável. No teste de adesão celular, mostrou-se, também, o mais biocompatível, o que reforça a hipótese de que **hidrofilicidade é de fato importante para minimizar a imunogenicidade do biomaterial.**

Os resultados mostram que **não é, como se achava, a habilidade da camada externa de alginato de isolar as cargas positivas** a responsável por governar as propriedades físico-químicas e, consequentemente, a biocompatibilidade de microcápsulas de alginato-policáton, **mas sim a etapa de difusão e ligação do policáton** na formação da membrana (TAM et al., 2011).

Frente à evidente superior biocompatibilidade do PLO em detrimento do PLL, pesquisadores estadunidenses realizaram uma investigação da estabilidade intraperitoneal de microcápsulas de alginato-poliornitina em ratos usando, entre outros, FTIR. Foram testados 5 tipos de alginatos, mostrados na tabela 5. Os espectros de FTIR são mostrados na figura 15 (a).

Exceto para o grupo VPMG, o pequeno “ombro” devido à amida II do PLO tornou-se um distinto segundo pico e o pico de PLO em 1640 cm^{-1} emergiu, indicando erosão superficial do alginato e proeminência do PLO na superfície. No caso do pMan e do pFlu, essa emergência ficou evidente a partir do 30º dia e atingiu seu valor máximo no 60º. Já o grupo VPMG manteve a composição química da superfície, como mostra o “ombro” da amida II no 90º dia.

Para agora caracterizar semiquantitativamente as mudanças nessas absorções químicas, as razões entre a área abaixo dos picos correspondentes ao carboxilato do alginato e à amida do PLO foram calculadas e são mostradas na figura 15 (b). Da figura, fica claro que a formulação VPMG apresentou o melhor desempenho, indicando que **um alginato cuja razão $\frac{M}{G}$ é próxima a 1 e com suficiente peso molecular permite até 3 meses de estabilidade das microcápsulas no peritônio** (THANOS et al., 2006).

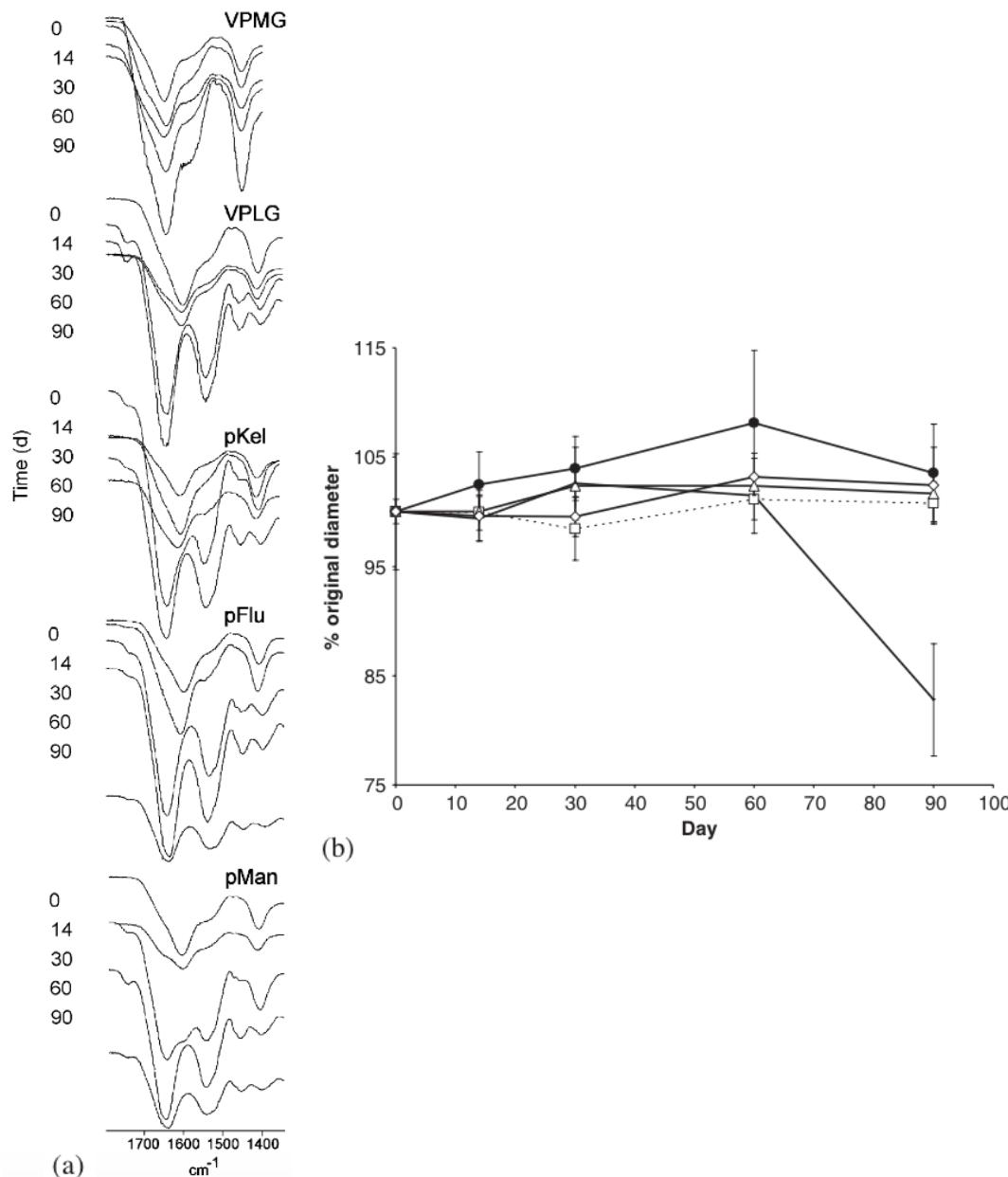
Tabela 5¹⁶. Caracterização do alginato pré-encapsulamento

Tipo do alginato	Fonte	Especificações	Razão $\frac{M}{G}$	Conteúdo total proteico ($\frac{\mu g}{mL}$)	Nível de endotoxina ($\frac{EU}{mL}$)	Viscosidade (cP)	Peso molecular (kDa)		
							M_w	$\frac{M_w}{M_n}$	M_z
VPMG	N/A	Baixa viscosidade	$\frac{56}{44}$	31	<1	25	317	3,9	840
VPLG	N/A	Baixa viscosidade	$\frac{72}{28}$	40	<1	22	383	3,5	979
pKel	Keltone LVCR	Médio G, baixa viscosidade	$\frac{73}{27}$	41	7,9	37	398	4,1	1163
pFlu	Fluka	Alto G	$\frac{13}{87}$	34	39,5	45	534	6,3	1510
pMan	Manucol LKX	Médio G, média viscosidade	$\frac{49}{51}$	86	40,5	88	609	14,5	n.a.

Fonte: (THANOS et al., 2006)

¹⁶ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951740096722. Concedida em 18 nov. 2020.

Figura 15¹⁷: (a) Picos de FTIR em 1590 e 1550 cm⁻¹ de cada grupo de cápsulas ao longo do período de estudo de 90 dias; (b) Índice de estabilidade por meio de FTIR semiquantitativo: medida da razão entre os picos correspondentes ao carboxilato do alginato e à amida II do PLO (\triangle) VPMG; (\diamond) VPLG; (—) pKel; (\square) pFlu; (\bullet) pMan



Fonte: (THANOS et al., 2006)

¹⁷ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951740096722. Concedida em 18 nov. 2020.

2.5.1 As bases da inflamação

Conforme mencionado na seção 2.2.2.2, 2 dos principais motivos que restringem o estabelecimento da terapia como uma alternativa consolidada para reestabelecer a normoglicemia indefinidamente têm apenas uma causa raiz: a ativação bioquímica do sistema imune e o subsequente processo inflamatório desencadeado.

É bastante disseminada a crença de que, dentre as etapas que compõem a fisiopatologia da inflamação, a adsorção inespecífica de proteínas é o primeiro evento que acontece na superfície de qualquer sistema implantado num tecido vivo e que determina as consecutivas interações celulares, tais como sobrecrescimento fibrótico, coagulação do sangue, entre outras.

Apesar de ser um processo um tanto quanto complexo, a deposição fibrótica pode ser intimamente correlacionada a uma série de fatores físico-químicos envolvidos nas interações proteína-biomaterial (tais como interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças *de van der Waals*) (XIE et al., 2010a) e a características intrínsecas ao material (e. g.: conformações) (ZHENG et al., 2012) e às cápsulas (ex.: rugosidade superficial).

Com o objetivo de ganhar maior *insight* quanto à engenharia de superfícies de modo a controlar o comportamento de adsorção proteica e, no futuro, poder direcionar a resposta biológica (XIE et al., 2010b), as técnicas de caracterização apresentadas na seção 2.4 foram empregadas em outra sequência de estudos de fronteira envolvendo profissionais das mais diversas áreas do conhecimento, de biólogos a químicos, engenheiros e até farmacêuticos-bioquímicos.

O grupo do Prof. *Paul de Vos*, a maior referência na linha de pesquisa pela abordagem médica, implantou cápsulas de alginato-PLL na cavidade peritoneal de ratos na tentativa de associar as mudanças físico-químicas às respostas inflamatórias usando, entre outros, XPS e Potencial ζ . **Apesar de ter sido citado na seção 2.3.1.1.2.2 que o PLO é menos imunogênico frente ao PLL (TAM et al., 2011), essa hipótese não é um consenso na literatura: o próprio estudo em questão, de 2012, afirma que encontrou, num estudo prévio (PONCE et al., 2006), o resultado oposto.**

O *output* do XPS das cápsulas recuperadas por lavagem nos dias 1, 5 e 7 pós-implantação é apresentado na Tabela 6¹⁸:

Tabela 6: Composição elementar da superfície de cápsulas alginato-PLL

Dia pós-implantação	Teor de G	C (%)	N (%)	O (%)	Outros (Na, K, Si) (%)
0	Médio	57,2 ± 0,8	5,8 ± 0,6	34,3 ± 2,1	2,7 ± 0,8
	Alto	55,3 ± 0,7	6,0 ± 0,5	33,9 ± 0,8	4,8 ± 0,6
1	Médio	57,8 ± 3,6	5,8 ± 1,0	30,0 ± 3,9	6,4 ± 1,0
	Alto	56,1 ± 1,0	5,5 ± 0,3	34,2 ± 1,6	4,2 ± 0,6
5	Médio	58,9 ± 1,7	7,2 ± 0,9	30,1 ± 1,2	3,8 ± 0,4
	Alto	64,5 ± 4,1	7,4 ± 0,8	23,2 ± 2,3	4,9 ± 0,8
7	Médio	61,6 ± 2,6	8,6 ± 0,8	26,3 ± 2,7	3,5 ± 0,5
	Alto	62,3 ± 2,4	7,5 ± 0,6	27,1 ± 2,9	3,1 ± 0,3

Fonte: (DE VOS et al., 2012)

¹⁸ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4951740646494. Concedida em 18 nov. 2020.

A proporção de nitrogênio nas cápsulas com teor intermediário de ácido gularônico saltou de 5,8% para 8,6% durante a semana de observação. **Esse aumento na quantidade justamente de nitrogênio é uma forte evidência da adsorção de proteínas** provenientes do microambiente peritoneal. Mais interessante, no entanto, é analisar o perfil de mudança da composição das cápsulas de alto teor de G: uma diminuição estatisticamente significativa no começo ($6,0 \pm 0,5\%$ no dia 0 para $5,5 \pm 0,3\%$ no dia 1) seguida por um posterior aumento como esperado. Essa diminuição no sinal de N reflete uma perda de PLL na superfície e, portanto, uma exposição de cargas positivas. Para confirmar essa teoria, os potenciais ζ das duas composições foram calculados e, embora tenham sido iguais no dia da implantação, apenas o das cápsulas com alto teor de ácido gularônico apresentou um aumento.

Como visto na seção 2.4.4, as células em geral apresentam carga líquida negativa, e assim também o fazem muitas das demais moléculas biológicas, como as proteínas. A hipótese dos pesquisadores é que houve alguma alteração estrutural na superfície das cápsulas devido ao influxo de células e a mudanças no pH que afetou apenas as cápsulas com alto teor de ácido gularônico. Dessa forma, **por um mecanismo de atração eletrostática, a adsorção proteica foi facilitada, e as cápsulas com alto G se mostraram bioincompatíveis.**

Esses resultados ilustram que a adequada documentação dos materiais e padronização dos procedimentos de teste não podem mais ser negligenciados, já que apenas uma diferença de não mais de 10% no teor de ácido gularônico do alginato tem um profundo efeito na resposta às cápsulas. Além disso, as propriedades físico-químicas *in vitro* não são necessariamente as propriedades após exposição ao microambiente *in vivo*.

As mudanças *in vivo* devem ganhar mais atenção nos esforços de engenharia futuros (DE VOS et al., 2012).

Um dos grupos mais proeminentes no âmbito da investigação da biocompatibilidade de microcápsulas pela abordagem da engenharia química e de materiais, liderado pelo Prof. Xie, analisou outra variável de processo importante na preparação das cápsulas: o peso molecular do alginato. Eles descobriram que, para microcápsulas de alginato-quitosana-alginato (ACA), **o peso molecular do alginato é diretamente proporcional ao potencial ζ e, portanto, também à adsorção proteica**. A razão para isso é que, quanto maior o peso molecular, maiores as forças intermoleculares entre as cadeias do poliânon, de forma que, na gelificação, o número de pontos de ligação cruzada é maior. Isso se traduz, por sua vez, numa rede menos aberta e porosa, o que leva a uma ligação menos eficiente entre a quitosana e o alginato. Portanto, mais grupos amino protonados ficam descobertos, resultando em fibrose (XIE et al., 2010b).

Num outro estudo publicado pelo grupo no mesmo ano, cápsulas de ACA foram preparadas com alginatos de diferentes teores de ácido gulurônico e avaliadas por ângulo de contato, XPS e Potencial ζ . Os valores são apresentados, respectivamente, nas tabelas 7 e 8 e na figura 16:

Tabela 7: Ângulo de contato obtidos com água em diferentes membranas

	Membranas de ACA com diferentes alginatos	
	Baixo teor de G	Alto teor de G
Ângulo de contato da água (°)	$68,5 \pm 2,4$	$77,7 \pm 3,3$

Fonte: (XIE et al., 2010a)

19

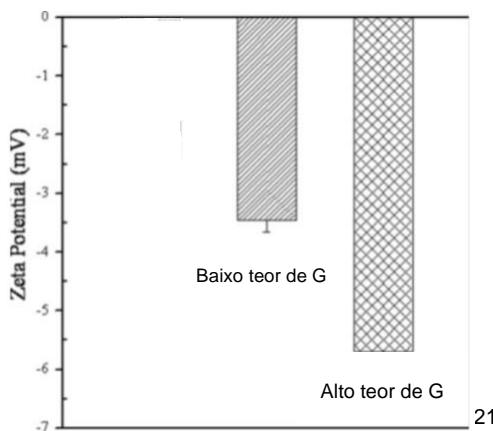
¹⁹ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952010349199. Concedida em 18 nov. 2020.

Tabela 8²⁰: Composição química da superfície de membranas de ACA conforme medido de espectros de XPS gravados em alta resolução

Membranas de ACA feitas de diferentes alginatos		
Porcentagem atômica no XPS (%)	Baixo teor de ácido gulurônico	Alto teor de ácido gulurônico
C	65,3	61,8
O	26,2	27,6
N	1,7	2,4
Na	1,0	1,7
$\frac{C}{O}$	2,5	2,2
$\frac{C}{N}$	37,7	26,1
$\frac{C}{Na}$	66,0	35,5

Fonte: (XIE et al., 2010a)

²⁰ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952010349199. Concedida em 18 nov. 2020.

Figura 16: Potenciais ζ para microcápsulas feitas de diferentes alginatos

Fonte: (XIE et al., 2010a)

Apesar do Potencial ζ das microcápsulas com baixo teor de G ter sido maior (o que aponta para uma maior quantidade de grupos amino protonados descobertos na superfície dessas cápsulas), os resultados de XPS para o nitrogênio e de ângulo de contato mostram que houve menos quitosana nessas membranas. Segundo os pesquisadores, essa aparente inconsistência pode ser entendida como uma menor eficiência de ligação entre a quitosana e o alginato de baixo teor de G frente ao de alto, já que os géis feitos com alginato com baixo teor de G comportam-se da mesma forma que aqueles com alta viscosidade. Como resultado, houve menos quitosana, mas mais grupos amino protonados na superfície dessas membranas. **Essa descoberta opõe-se ao comportamento relatado por Tam et al. em 2011, porém há de se ter em mente que os canadenses usaram PLL e PLO como policártions, e não quitosana.**

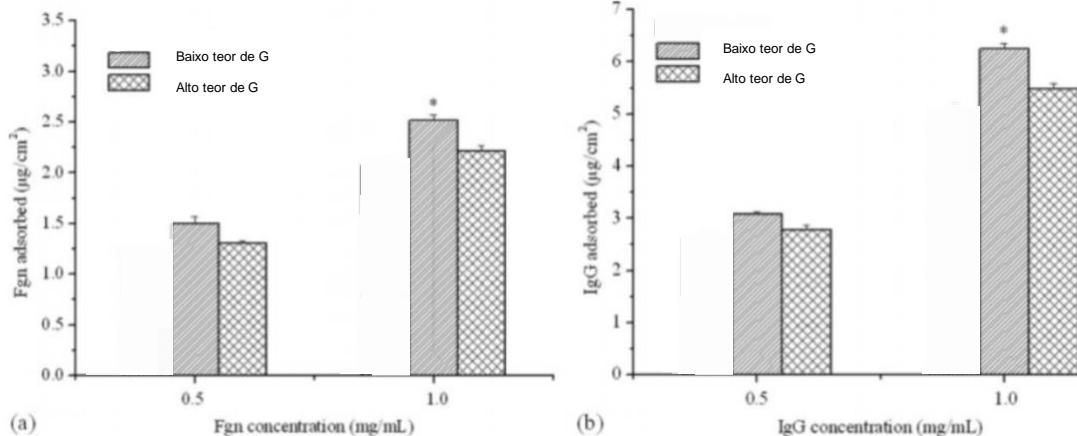
2.5.1.1 Interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou intermoleculares: qual mecanismo regula a adsorção proteica?

Ainda nesse estudo, os autores realizaram ensaios de adsorção proteica, que são mostrados na figura 17:

²¹ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952010349199. Concedida em 18 nov. 2020.

Figura 17: Adsorção proteica em microcápsulas feitas de diferentes alginatos. (a) fibrinogênio; (b) IgG

22



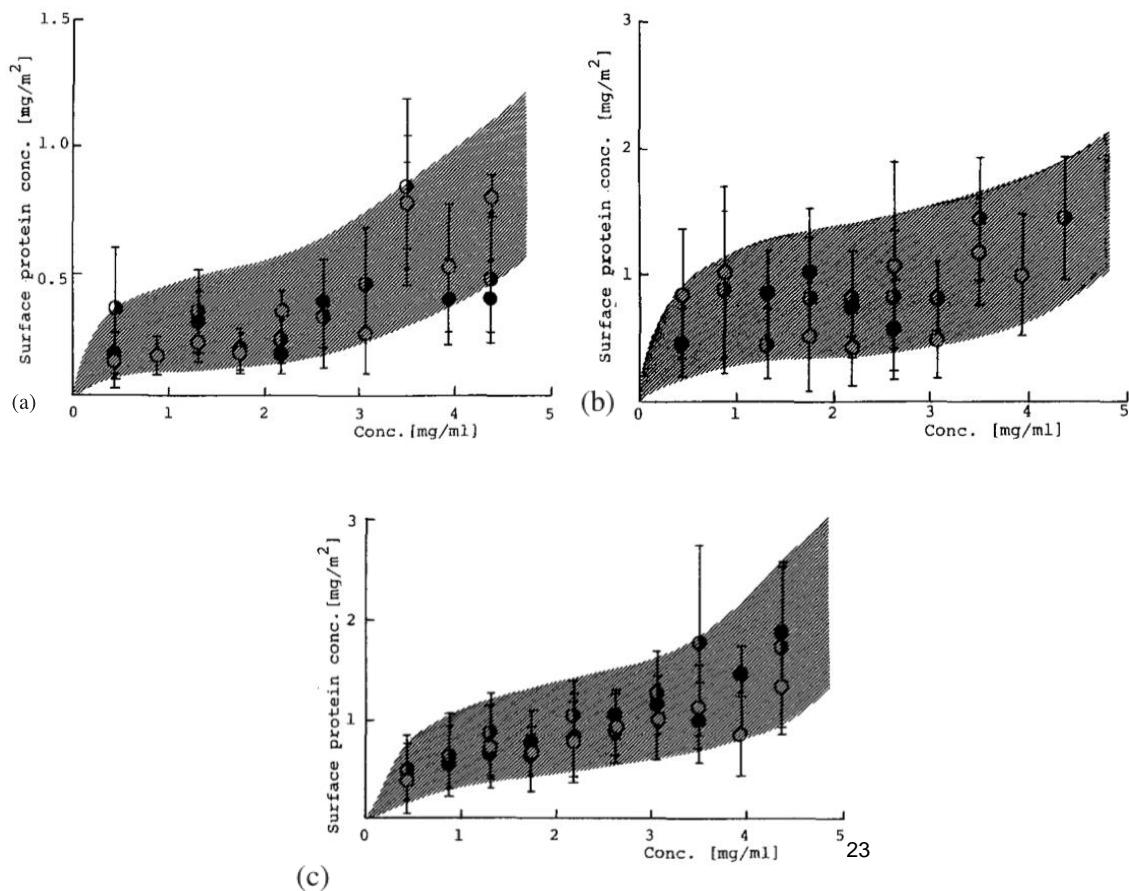
Fonte: (XIE et al., 2010a)

O fibrinogênio bovino (Fgn, 340 kDa) e a gamaglobulina (IgG, 156 kDa) foram selecionados devido a sua importante participação no sobrecrescimento fibrótico em biomateriais implantados. O fibrinogênio é relevante à coagulação sanguínea e pode também induzir adesão bacteriana, e a gamaglobulina é considerada uma opsonina, tendendo a mediar a inflamação quando adsorvida a superfícies estranhas.

Apesar das membranas das microcápsulas de ACA feitas com alginato de alto teor de ácido gularônico terem apresentado um caráter mais hidrofóbico no ensaio de ângulo de contato pelo método da gota séssil, também apresentaram menor quantidade de proteína adsorvida. Os resultados de Potencial ζ , por outro lado, estão coerentes com a adsorção, apontando para uma menor quantidade de sítios positivamente carregados. **Portanto, pode-se depreender que, nesse caso, a interação eletrostática dominou a hidrofóbica. A explicação dos autores para isso é que a interação hidrofóbica entre materiais e proteínas não seria suportada quando o ângulo de contato é inferior a 75°** (XIE et al., 2010a).

Farmacêuticos-bioquímicos da Universidade de Tóquio realizaram estudos de adsorção de proteínas do plasma (albumina, gamaglobulinas e fibrinogênio) a microcápsulas de PLLA. As isotermas de equilíbrio de adsorção para cada uma das proteínas a diferentes forças iônicas são mostradas na figura 18:

Figura 18: Isotermas de adsorção na superfície de microcápsulas de PLLA a várias forças iônicas: ○ 0,01; ● 0,075; • 0,154. (a) albumina; (b) gamaglobulina; (c) fibrinogênio



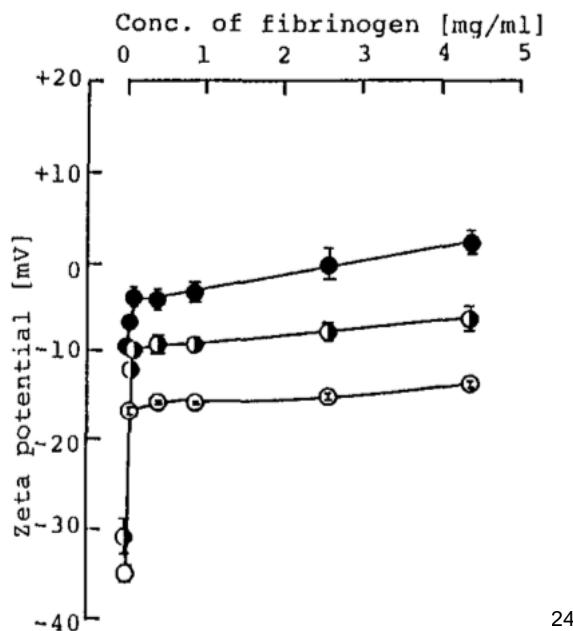
Fonte: (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987)

Da figura, pode-se notar que a quantidade adsorvida variou pouco com a força iônica da solução. Sugere-se, portanto, que a principal força motriz para a adsorção dessas proteínas à superfície das microcápsulas de PLLA não é de natureza eletrostática, mas pode envolver ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas.

²³ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952021069471. Concedida em 18 nov. 2020.

A figura 19 mostra o potencial ζ dessas microcápsulas em função da concentração de fibrinogênio a 3 diferentes forças iônicas:

Figura 19: Potencial ζ de microcápsulas adsorvidas com fibrinogênio como função da concentração de fibrinogênio a 3 diferentes forças iônicas do meio de suspensão: ○ 0,01; ● 0,075; • 0,154



24

Fonte: (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987)

O potencial ζ apresenta um comportamento de proporcionalidade direta à concentração independente da força iônica. Particularmente, à **força iônica de 0,154, o potencial ζ muda de sinal quando a concentração de fibrinogênio vale 4,4 $\frac{mg}{ml}$.**

Esses fenômenos não podem ser explicados pelo modelo convencional de distribuição de potencial ao redor de uma partícula carregada, que assume que cargas estão localizadas apenas na superfície particular de espessura zero, predizendo, portanto, que o potencial ζ e a carga líquida da partícula têm sempre o mesmo sinal. Em outras palavras, já que as proteínas adsorvidas carregam uma carga líquida negativa, a adsorção proteica sempre deve aumentar a carga líquida negativa das microcápsulas. Portanto,

²⁴ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952021069471. Concedida em 18 nov. 2020.

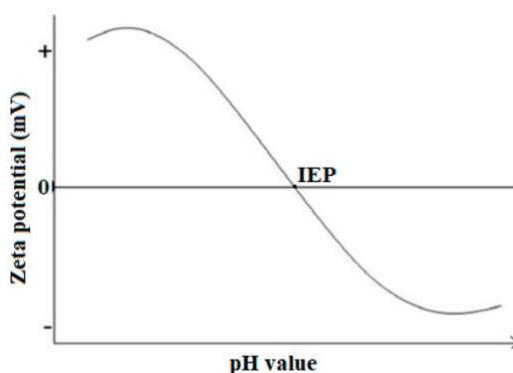
segundo o modelo convencional, o potencial ζ tornar-se-á mais negativo à medida que a adsorção proteica progride, o que, como visto no parágrafo anterior, não é o que acontece.

2.5.1.1.1 Construindo um modelo simples para explicar a adsorção proteica

Num artigo anterior, o mesmo grupo de pesquisadores japoneses propôs uma teoria para a distribuição de potencial ao longo de uma superfície tendo uma camada carregada de espessura finita não nula sendo composta de duas subcamadas: uma interna e outra externa (OHSHIMA; OHKI, 1985). Essa teoria prediz, por exemplo, que quando a camada interna estiver negativamente carregada e a externa positivamente carregada, o potencial ζ pode, em alguns casos, tornar-se positivo mesmo que a carga líquida na camada superficial como um todo seja negativa.

Como as microcápsulas têm claramente carga negativa, o caráter positivo deve provir do fibrinogênio. Uma típica curva de titulação potenciométrica para proteínas é mostrada na figura 20:

Figura 20: Típica curva de titulação potenciométrica para proteínas

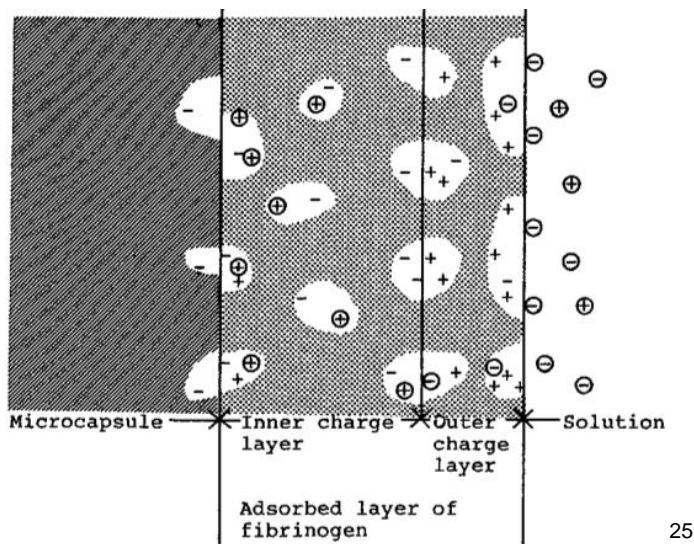


O intercepto x é chamado ponto isoelétrico (IEP, na sigla em inglês), que corresponde ao valor de pH em que a carga líquida da proteína é neutra. Esse valor é 5,5 para o fibrinogênio, ou seja, no pH em que o estudo foi realizado (7,4,

tampão fosfato-salino) a carga líquida da proteína é negativa. Entretanto, uma porção da molécula deve ter cargas positivas, já que alguns de seus grupos laterais, como a lisina e a arginina, possuem valores de pK_a iguais a 10,5 e 12,5, respectivamente.

Dessa forma, **se o fibrinogênio estiver arranjado de tal modo que a porção positiva esteja disposta na camada externa enquanto a negativa na camada interna (que contém também a membrana da microcápsula), é possível explicar o comportamento a princípio anômalo do potencial ζ na adsorção proteica:**

Figura 21: Um modelo para a adsorção de fibrinogênio na superfície da microcápsula de PLLA. Áreas sombreadas indicam regiões hidrofóbicas. + e - representam cargas fixas, enquanto \oplus e \ominus indicam íons móveis do eletrólito



25

Fonte: (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987)

O caráter hidrofóbico das regiões diminui à medida que se afasta da microcápsula. Já que não é possível esperar uma polarização de carga apreciável numa molécula livre/não ligada, a redistribuição de grupos carregados em moléculas de fibrinogênio adsorvidas pode ocorrer no processo de adsorção (MAKINO; OHSHIMA; KONDO, 1987).

²⁵ Licença obtida via Copyright Clearance Center nº4952021069471. Concedida em 18 nov. 2020.

2.5.1.2 Em busca da cápsula 100% antivegetativa

Após anos de pesquisa nas propriedades físico-químicas de microcápsulas de alginato-quitosana-alginato (ACA) e em sua interação com proteínas, o grupo de pesquisadores chineses liderado pelo Prof. Xie decidiu empreender um esforço de modificação química polimérica das cápsulas através de enxerto com molécula reconhecidamente imunorrepelente, MPEG.

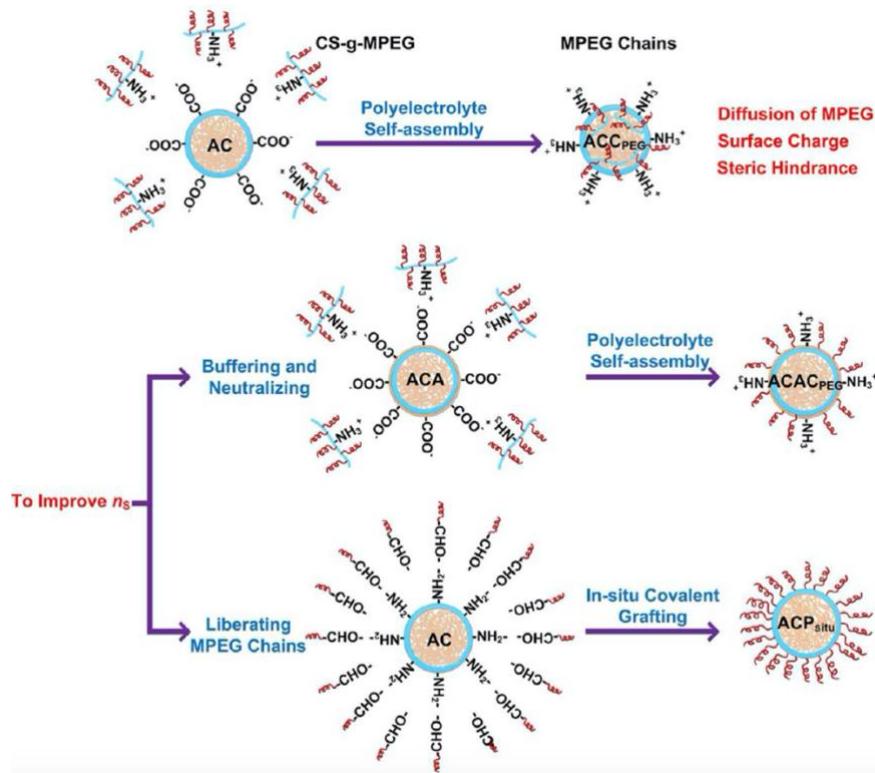
O PEG, como já mencionado na seção 2.3.1.1.2.4, distingue-se por sua extraordinária imunotolerância, que é atribuída a um número de propriedades únicas tais como energias livres mínimas na interface com a água, extensa hidratação, boa flexibilidade conformacional, considerável mobilidade de cadeia e grande volume excluído. Além disso, sua baixa toxicidade e imunogenicidade na lista de substâncias seguras do FDA tornam-no um material adequado a aplicações no campo de materiais para transplante.

A deposição direta de um copolímero de quitosana enxertada com mPEG (CS-g-mPEG) na superfície de microcápsulas de AC, embora possível, leva a uma série de problemas que podem limitar a repulsão proteica: a difusão do mPEG e seu aprisionamento no interior do hidrogel poroso; o acúmulo de cargas positivas na superfície das microcápsulas; e o impedimento estérico dos grupos laterais do copolímero, que limita significativamente a densidade superficial de enxerto (n_s).

Para resolver todos os 3 problemas, as estratégias de modificação química polimérica deveriam objetivar o aumento da densidade de cadeias de mPEG na superfície, a neutralização dos sítios positivos e a liberação dos grupos laterais de mPEG da cadeia principal de quitosana.

Em linha com esses objetivos, duas estratégias foram adotadas: a introdução de uma camada tampão de alginato (não só para neutralizar as cargas, mas também para fornecer sítios negativos para ligação com o copolímero e prevenir a difusão das cadeias de mPEG em direção ao interior) e a graftização covalente *in situ* dos grupos laterais de mPEG já liberados do esqueleto de quitosana diretamente nos grupos amino das microcápsulas de AC (que também previne a protonação destes grupos). Os esforços são resumidos na figura 22:

Figura 22: Ilustração esquemática do processo de enxertia de mPEG nas microcápsulas hidrogélicas (fora de escala)

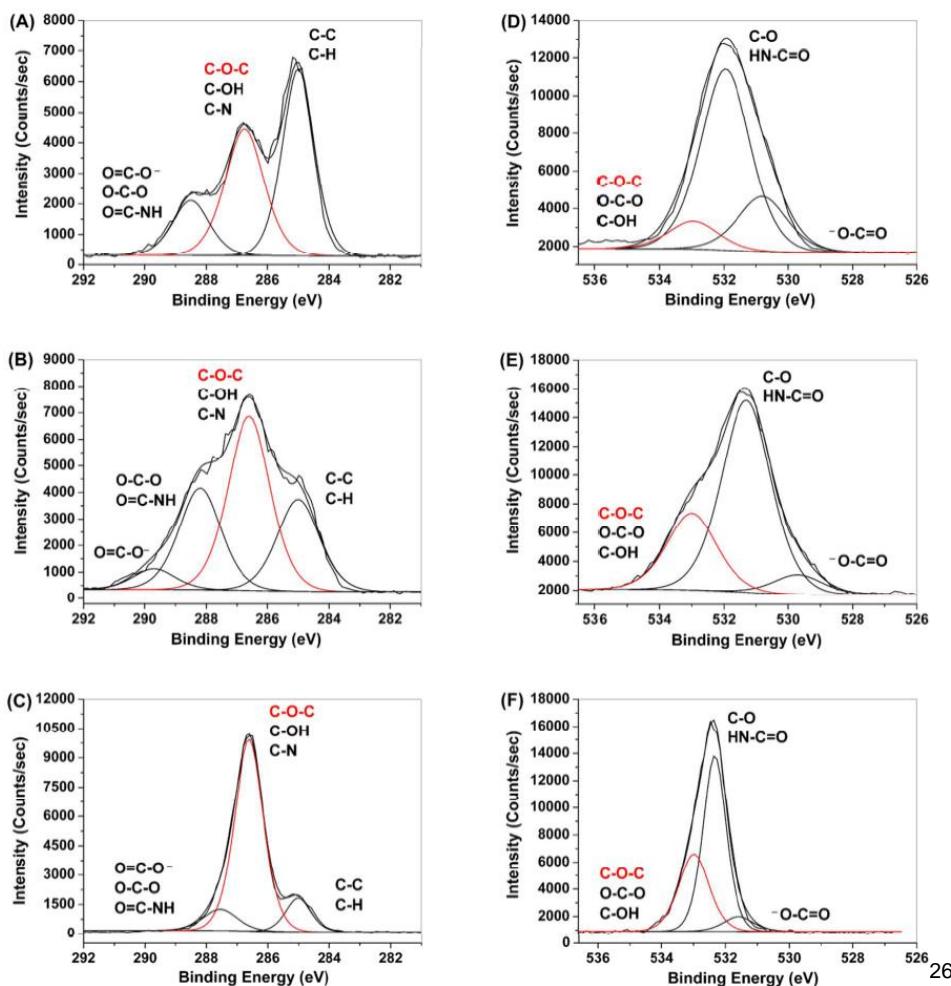


Fonte: (ZHENG et al., 2012)

Os pesquisadores investigaram então o efeito da variação da espessura da camada tamponante na biocompatibilidade das **microcápsulas de ACAC_{PEG}**. Essa espessura foi controlada pelo tempo de revestimento do alginato gelificado com quitosana; quanto maior o tempo, mais quitosana pode difundir através do gel, o que implicou mais alginato externo para neutralizá-la e, subsequentemente,

mais sítios para enxerto do copolímero. Essa intuição foi confirmada pelos resultados de XPS, que são mostrados na figura 23:

Figura 23: Espectros de XPS para membranas de microcápsulas de ACAC_{PEG} com diferentes espessuras e suas curvas de ajuste. (A), (B) e (C) representam os picos para o elétron do orbital 1s do carbono para 10, 20 e 40 µm, respectivamente, e (D), (E) e (F) os correspondentes picos para o elétron do orbital 1s do oxigênio



Fonte: (ZHENG et al., 2012)

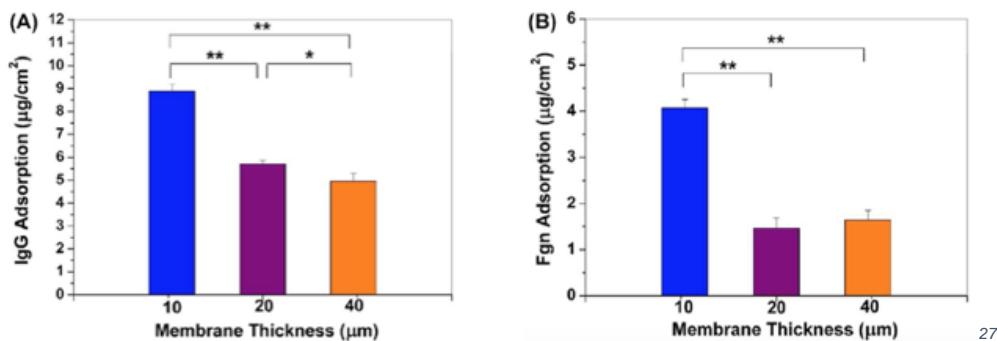
É possível notar um aumento, em geral, no pico correspondente ao grupo funcional éter-carbono (C-O-C), característico do mPEG, tanto no pico C_{1s} quanto no pico O_{1s} de cima para baixo, ou seja, com o aumento da espessura da membrana. Consequentemente, houve um aumento também da porcentagem da área total abaixo dos picos atribuída ao C-O-C: conforme a espessura foi de 10 a 40

²⁶ Reimpresso com permissão de (ZHENG et al., 2012). Copyright (2020) American Chemical Society.

μm , a porcentagem da área sob o pico do C_{1s} correspondente ao $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ foi de 38,6% a 78,0%, e a porcentagem sob o pico do O_{1s} de 10,5% a 34,0%, demonstrando, claramente, o aumento de n_s .

Esse aumento refletiu diretamente na adsorção proteica. Os resultados do ensaio com Fgn e IgG são mostrados na figura 24:

Figura 24: Efeito da espessura da membrana na adsorção de (A) IgG (B) Fgn



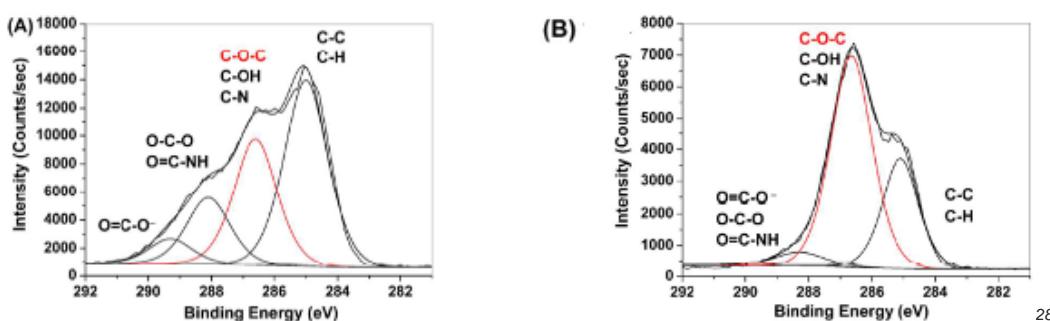
27

Fonte: (ZHENG et al., 2012)

A **adsorção de IgG** diminuiu de $9,1 \pm 0,3$ para $4,5 \pm 0,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$, uma **redução maior do que 50%**, conforme a membrana passou de 10 a 40 μm . A **adsorção de Fgn** também diminuiu de $4,1 \pm 0,2$ para $1,6 \pm 0,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$, uma **redução em torno de 61%**. A principal razão para melhor repulsão proteica foi a decuplicação de n_s .

As microcápsulas de $\text{ACP}_{\text{sitú}}$ também foram estudadas por XPS. A comparação de seus resultados com os das microcápsulas de AC (controle) é mostrada nas figuras 25 e 26:

Figura 25: Comparação entre os picos C_{1s} dos espectros de XPS para as membranas das microcápsulas de (A) AC e (B) $\text{ACP}_{\text{sitú}}$ e curvas de ajuste

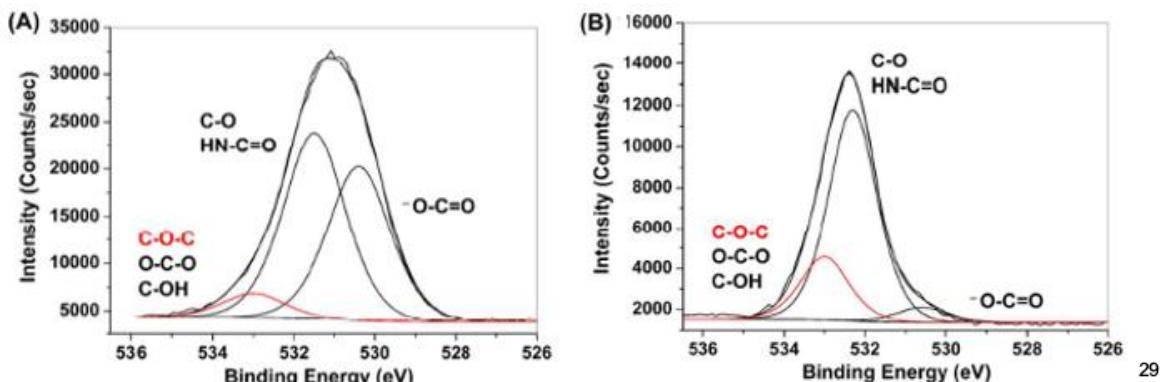


28

Fonte: (ZHENG et al., 2012)

^{27,28} Reimpresso com permissão de (ZHENG et al., 2012). Copyright (2020) American Chemical Society.

Figura 26: Comparação entre os picos O_{1s} dos espectros de XPS para as membranas das microcápsulas de (A) AC e (B) ACP_{situ} e curvas de ajuste



Fonte: (ZHENG et al., 2012)

A análise das figuras revela que a intensidade relativa do pico correspondente ao éter-carbono aumentou notavelmente com a **enxertia *in situ***, o que indica a introdução bem-sucedida de cadeias de mPEG. A partir do aumento na porcentagem da área sob o pico C_{1s} atribuída ao C-O-C de 31,2% a 69,5%, n_s foi calculado, atingindo o valor de **1,00 ± 0,03 $\frac{\text{cadeia}}{\text{nm}^2}$** . Segundo os autores, o aumento de n_s foi acompanhado de uma transição a que foram submetidas as cadeias de mPEG da conformação “cogumelo” à conformação “escova”: a repulsão estérica entre as cadeias levou a sua protrusão, minimizando a atração eletrostática da cápsula e, consequentemente, maximizando a eficiência da modificação.

Nessa densidade superficial de enxerto de mPEG, a adsorção proteica de IgG e Fgn decresceu proeminentemente a $0,3 \pm 0,4$ e $0,2 \pm 0,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$, respectivamente. Isso equivale a uma redução, para ambos, de quase 100% se comparada a do controle de ACAC_{PEG}. Essa superfície modificada com mPEG através do método de graftização covalente *in situ* mostrou-se quase completamente imune à adsorção proteica. Resta saber se, em estudos futuros, o comportamento *in vivo* seguirá esta tendência (ZHENG et al., 2012).

²⁹ Reimpresso com permissão de (ZHENG et al., 2012). Copyright (2020) American Chemical Society.

3 Objetivos

- i. Evidenciar o peso e a suma importância das contribuições que a Físico-química pode trazer a uma linha de pesquisa, essencialmente, biológica;
- ii. Instigar a aplicação das técnicas aqui apresentadas, dentre outras, inclusive, no futuro dos projetos acadêmicos do Núcleo, seja na linha em questão ou mesmo em qualquer outra;
- iii. Estimular futuras parcerias e recrutamentos de profissionais de outras áreas relevantes ao enfoque do Laboratório de modo a fortalecer esta iniciativa e potencializar as descobertas do Grupo, aumentando sua exposição, a longo prazo, no cenário mundial.

4 Conclusões

A Química Bioanalítica é comprovadamente um importante instrumento na investigação dos mecanismos que subjazem a demonstrada bioincompatibilidade de ilhotas microencapsuladas *in vivo*, podendo direcionar a engenharia de superfícies imunotolerantes.

A análise realizada pelos pesquisadores mostrou que variáveis de produto, como razão $\frac{M}{G}$, peso molecular e teor de G do alginato e hidrofilicidade do policártion, e variáveis de processo, como exposição de moléculas carregadas não ligadas na superfície da cápsula, têm consequências na funcionalidade e viabilidade das células pós-transplante. A adsorção proteica, etapa determinante ao prosseguimento da cascata inflamatória subsequente, é diretamente ativada pela falta de controle desses parâmetros através de interações de natureza eletrostática, hidrofílica e intermolecular.

A partir da compreensão dessa inter-relação e utilizando técnicas de modificação química polimérica de enxertia, os cientistas foram capazes de alcançar a imunorrepelência em sua quase totalidade, demonstrando as ilimitadas possibilidades que o conhecimento e o controle das propriedades físico-químicas podem trazer no caminho rumo ao sucesso do tratamento.

5 Referências

1. ALAGPULNSA, D. A. et al. Alginate-microencapsulation of human stem cell-derived β cells with CXCL12 prolongs their survival and function in immunocompetent mice without systemic immunosuppression. *American Journal of Transplantation*, 2019.
2. ALAMANDA POLYMERS. *Poly-L-lysine and Poly-d-lysine*. Disponível em: <<https://www.alamanda-polymers.com/content/poly-l-lysine-and-poly-d-lysine>>. Acesso em: 2019.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. *Fast Facts Data and Statistics about Diabetes*. [S.I.] 2020. Disponível em: <<https://professional.diabetes.org/content/fast-facts-data-and-statistics-about-diabetes>>. Acesso em: 2019.
4. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. *Insulin Basics*. [S.I.][S.I.] Disponível em: <<https://www.diabetes.org/diabetes/medication-management/insulin-other-injectables/insulin-basics>>. Acesso em: 2019.
5. ANDRUS, P. G. *Cancer monitoring by FTIR spectroscopyTechnology in Cancer Research and Treatment*, 2006.
6. ANTVORSKOV, J. C. et al. *Dietary gluten and the development of type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2014.
7. ATKINS, P.; PAULA, J. DE. *Atkins' Physical chemistry 8th edition*. Chemistry, 2009.
8. ATKINSON, M. A.; SKYLER, J. *Atlas of Diabetes*: Fourth Edition. Type 1 Diabetes. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2012.
9. AURAS, R. et al. *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. [s.l.: s.n.].
10. BAGLEY, J. et al. *Gene therapy in type 1 diabetes*. *Critical Reviews in Immunology*, 2008.
11. BALDONI, N. R. *Perfil nutricional de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em seguimento nas unidades de saúde da família*. Universidade de São Paulo, , 2017.
12. BALLINGER, W. F.; LACY, P. E. *Transplantation of intact pancreatic islets in rats*. *Surgery*, 1972.
13. BANTING, F. G.; BEST, C. H. *The internal secretion of the pancreas*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 7, n. 5, p. 251–266, 1 fev. 1922.
14. BARUCH, L.; MACHLUF, M. *Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: Effect on mechanical properties and on long-term viability*. *Biopolymers*, 2006.
15. BENNINGHOVEN, A. *Chemical Analysis of Inorganic and Organic Surfaces and Thin Films by Static Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS)*Angewandte Chemie International Edition in English, 1994.
16. BISCEGLIE, V. Über die antineoplastische Immunität. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 1934.
17. BRASIL tem mais de 30 mil pacientes em lista de espera para transplante. **G1**, 23 ago. 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2018/08/23/brasil-tem-mais-de-30-mil-pacientes-em-lista-de-espera-para-transplante.ghtml>>. Acesso em: 2019.
18. CALAFIORE, R. et al. *Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals*. *Annals of the New York Academy of Sciences. Anais...* 1999
19. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *National Diabetes Statistics Report*. Atlanta, GA: 2017.
20. CETINKUNAR, S. et al. *Effect of bariatric surgery on humoral control of metabolic derangements in obese patients with type 2 diabetes mellitus: How it works*. *World Journal of Clinical Cases*, 2015.
21. CHANG, T. M. S. *Semipermeable microcapsules*. *Science*, 1964.
22. CHIANG, J. L. et al. *Type 1 diabetes through the life span: A position statement of the American Diabetes Association*. *Diabetes Care*, 2014.
23. COSTA, D. G. *Noções de enfermagem sobre instrumentação cirúrgica*. Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, Uberaba, Disponível em: <<http://www2.ebsersp.gov.br/documents/147715/0/Aula+Noções+de+Enfermagem+sobre+Instrumentação+o+Cirúrgica.pdf/2d8872c8-0731-4755-a200-a6a92a109d94>>. Acesso em: 2019.
24. COVALENT METROLOGY. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS/ESCA) Services*. Disponível em: <<https://covalentmetrology.com/xps/>>. Acesso em: 2019.
25. DARRABIE, M. D.; KENDALL, W. F.; OPARA, E. C. *Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules*. *Biomaterials*, 2005.
26. DE VOS, P. et al. *Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets*. *Diabetologia*, 1997.
27. DE VOS, P. et al. *Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology*. *Biomaterials*, 2009.
28. DE VOS, P. et al. *Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014.
29. DE VOS, P. et al. *The association between in vivo physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules*. *Biomaterials*, 2012.
30. DOWLING, D. P. et al. *Evaluation of the anti-fouling properties of nm thick atmospheric plasma deposited coatings*. *Surface and Coatings Technology*, 2010.
31. ELFSTRÖM, P.; SUNDSTRÖM, J.; LUDVIGSSON, J. F. *Systematic review with meta-analysis: Associations between coeliac disease and type 1 diabetes*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2014.
32. EMORY UNIVERSITY DIVISION OF ANIMAL RESOURCES. *Surgical Resources: Definitions: Major and Minor Surgical Procedures*. [S.I.]. Disponível em: <http://www.dar.emory.edu/vetcare/surg_definitions.php>. Acesso em: 2019.
33. FAIRWEATHER, D.; IMMUNOLOGY, N. R.-N.; 2002, UNDEFINED. *Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease?* *nature.com*, [s.d.].
34. FENG, J.; CHAN, C. M.; WENG, L. T. *Influence of chain sequence structure of polymers on ToF-SIMS spectra*. *Polymer*, 2000.
35. FISHMAN, J. A.; RUBIN, R. H. *Infection in Organ-Transplant Recipients*. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 24, p. 1741–1751, 11 jun. 1998.
36. FOOK, B. R. et al. *Estudo Da Desacetilação Da Quinina Para Produção De Quitosana*. Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016.
37. GAMBLE, A. et al. *The journey of islet cell transplantation and future developments*. *Islets*, 2018.
38. GANGULY, S. et al. *Metabolic bariatric surgery and type 2 diabetes mellitus: An endocrinologist's perspective*. *Journal of Biomedical Research*, 2015.
39. GANJI, M. et al. *DNA binding proteins explore multiple local configurations during docking via rapid rebinding*. *Nucleic Acids Research*, 2016.
40. GARDNER, D. G.; SHOBAC, D. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*. [s.l.: s.n.].
41. GOMES, L. C. et al. *Escherichia coli adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2015.
42. GOOSEN, M. F. A.; O'SHEA, G. M.; SUN, A. M. F.; SANOFI PASTEUR LTD. *Microencapsulation of living tissue and cells* US4689293A. Depósito: 4 dez. 1984. Concessão: 25 ago. 1987. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4689293A/en>>. Acesso em: 2019.
43. GRIFFITHS, P. R. *Fourier transform infrared spectrometry*. *Science*, 1983.
44. HALLÉ, J. P. et al. *Protection of islets of langerhans from antibodies by*

- microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes. *Transplantation*, 1993.
45. HOUAIS, Antonio; VILLAR, Mauro de Salles. *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*. Elaborado pelo Instituto Antônio Houaiss de Lexicografia e Banco de Dados da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2009. CD-ROM.
46. IMPERATORE, G. et al. Projections of type 1 and type 2 diabetes burden in the U.S. population aged <20 years through 2050: Dynamic modeling of incidence, mortality, and population growth. *Diabetes Care*, 2012.
47. Infrared and Raman Spectroscopy, Method and Applications. *Vibrational Spectroscopy*, 1996.
48. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 9. ed. Bruxelas, Bélgica: 2019. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 2019.
49. JAPAN SPECTROSCOPIC COMPANY. FT/IR-4000 Series of FTIR Spectrometers. Disponível em: <<https://jascoinc.com/products/spectroscopy/ftir-spectrometers/models/ftir-4000-series/>>. Acesso em: 2020.
50. KAMMULA, R. G.; MORRIS, J. M. Considerations for the biocompatibility evaluation of medical devices. *Medical Device and Diagnostic Industry*, 2001.
51. KELLY, W. D. et al. Allogtransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, 1967.
52. KITABCHI, A. E. et al. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care*. Anais...2009
53. KLEINOVÁ, A. et al. FTIR spectroscopy of silicon carbide thin films prepared by PECVD technology for solar cell application. Reliability of Photovoltaic Cells, Modules, Components, and Systems VIII. Anais...2015
54. KOLBE, Michael. New instrumentation to analyze the surface of silicon spheres. *Physikalisch-Technische Bundesanstalt*, 2017. Disponível em: <https://www.ptb.de/cms/en/gateways/ptb-for-the-public/news/singlenews.html?tx_news_pi1%5Bnews%5D=7793&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Baction%5D=_detail&tx_news_pi1%5Bday%5D=20&tx_news_pi1%5Bmonth%5D=1&tx_news_pi1%5Byear%5D=2017&tx_news_pi1%5Bhash=6a8a974ae163bba19f061246c3564616>. Acesso em: 2020.
55. LEROITH, D.; TAYLOR, S.; OLEFSKY, J. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. [s.l.: s.n.].
56. LEUTHOLTZ, B.; RIPOLL, I. *Exercise and disease management*. [s.l.: s.n.].
57. LIU, X. Y. et al. Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-L-lysine for islet encapsulation. *ASAIO Journal*, 2010.
58. MAFFI, P. et al. Risks and benefits of transplantation in the cure of type 1 diabetes: Whole pancreas versus islet transplantation. A single center studyReview of Diabetic Studies, 2011.
59. MAKINO, K.; OHSHIMA, H.; KONDO, T. Interaction of poly(L-lactide) microcapsule surface with plasma proteins: Reversal of zeta potential caused by fibrinogen. *Journal of Colloid And Interface Science*, 1987.
60. MANOR, J. et al. Environment polarity in proteins mapped noninvasively by FTIR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012.
61. MARTIN, O.; AVÉROUS, L. Poly(lactic acid): Plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*, 2001.
62. MARUTHUR, N. M. et al. Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysisAnnals of Internal Medicine, 2016.
63. MAYO CLINIC. *Pancreas Transplant*. [S.I.] 20 aug. 2019. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/pancreas-transplant/about/pac-20384783>>. Acesso em: 2019.
64. MINAMI, K.; SEINO, S. Current status of regeneration of pancreatic β -cellsJournal of Diabetes Investigation, 2013.
65. MOASSESFAR, S. et al. A Comparative Analysis of the Safety, Efficacy, and Cost of Islet Versus Pancreas Transplantation in Nonuremic Patients with Type 1 Diabetes. *American Journal of Transplantation*, 2016.
66. MOHABIR, P. K. Cirurgia. Manual MSD Versão Saúde para a Família. [S.I.] abr. 2018. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/assuntos-especiais/cirurgia/cirurgia>>. Acesso em: 2019.
67. MOSCOU, Susan. Getting the word out: advocacy, social marketing, and policy development and enforcement. In: TRUGLIO-LONDRIGAN, Marie; LEWENSON, Sandra (org.). *Public health nursing: practicing population-based care*. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2013. pp. 315-334.
68. MSUYA, N. et al. Poly (lactic acid) Production from Monomer to Polymer: A Review. *SciFed Journal of Polymer Science*, 2017.
69. MULLA, I. et al. The history of diabetes: From olden days to discovering insulin. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*, 2017.
70. NATIONAL HEALTH SERVICE. *Pancreas transplant waiting list*. 11 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/pancreas-transplant/preparation/>>. Acesso em: 2019.
71. NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *Alternative Devices for Taking Insulin*. [S.I.] mai. 2009. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj4retw-DtAhV6DrkGHThZBxQFjABegQIBhAC&url=https%3A%2F%2Fwww.niddk.nih.gov%2Fmedia%2FFFiles%2FDiabetes%2FAlternative_Devices_Insulin_508.pdf&usg=AQavw16JQM0ug_lkHPvqkcfYfWT9>. Acesso em: 12 set. 2019.
72. NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *Diabetes Insipidus*. [S.I.] out. 2015. Disponível em: <<https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/diabetes-insipidus>>. Acesso em: 2019.
73. NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *Diagnosis of Diabetes and Prediabetes*. [S.I.] jun. 2014. Disponível em: <<http://www.lb7.uscourts.gov/documents/14-34261.pdf>>. Acesso em: 2019.
74. NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *Symptoms & Causes of Diabetes*. [S.I.] dez. 2016. Disponível em: <<https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/symptoms-causes?dkrd=hispt0015>>. Acesso em: 2019.
75. NORMAN, A. W.; HENRY, H. L. *Hormones: Third Edition*. [s.l.: s.n.].
76. OHSHIMA, H.; OHKI, S. Donnan potential and surface potential of a charged membrane. *Biophysical Journal*, 1985.
77. Oxford English Dictionary. Ed. Oxford, Oxfordshire: Oxford University Press, 2011.
78. PAGLIUCA, F. W. et al. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*, 2014.
79. PHYSICOCHEMICAL ASPECTS OF POLYMER SURFACES. , 1983.
80. PIEMONTI, L.; PILEGGI, A. 25 YEARS OF THE RICORDI AUTOMATED METHOD FOR ISLET ISOLATION. *CellR4-- repair, replacement, regeneration, & reprogramming*, 2013.
81. PIETRANGELO, Ann. The Effects of Diabetes in Your Body. *Healthline*, [2017?]. Disponível em: <<https://www.healthline.com/health/diabetes/effects-on-body>>. Acesso em: 2019.
82. PINHONI, Marina. Governo de SP sanciona orçamento de R\$231 bilhões para o estado em 2019. **G1 SP**, São Paulo, 8 de jan. de 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2019/01/08/governo-de-sp-sanciona-orcamento-de-r-231-bilhoes-para-o-estado-em-2019.ghtml>>. Acesso em: 2019.
83. PONCE, S. et al. Chemistry and the biological response against immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials*, 2006.
84. PORETSKY, L. *Principles of diabetes mellitus*. [s.l.: s.n.].
85. REWERS, M.; LUDVIGSSON, J. *Environmental risk factors for type 1 diabetesThe Lancet*, 2016.

86. REZANIA, A. et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 2014.
87. RICORDI, C. et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetologica Latina*, 1990.
88. RODRIGUEZ, S. et al. Current Perspective and Advancements of Alginate-Based Transplantation Technologies. In: *Algimates - Recent Uses of This Natural Polymer*. [s.l.: s.n.].
89. ROKSTAD, A. M. A. et al. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulationAdvanced Drug Delivery Reviews, 2014.
90. RSSDI Textbook of Diabetes Mellitus. [s.l.: s.n.].
91. RUTTER, et al. *Islet cell transplantation: What do I need to know?* Lothian: UK ISLET TRANSPLANT CONSORTIUM; NHS LOTHIAN. 36 pp.
92. SAENZ, A. et al. Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitusCochrane Database of Systematic Reviews, 2015.
93. SERENA, G. et al. The role of gluten in celiac disease and type 1 diabetesNutrients, 2015.
94. SERRA, T.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia*, 2013.
95. SHAO, X. R. et al. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, 2015.
96. SHAPIRO, A. M. J. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine*, 2000.
97. SIGMA-ALDRICH. Methoxypolyethylene glycol 350. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6768?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 2019.
98. SIGMA-ALDRICH. Poly(L-lactide). Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyllactide1234598765?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 2019.
99. SILVA, C.; SOGAYAR, M. Terapias alternativas para o diabetes mellitus tipo 1: caracterização funcional do gene Txnip na diferenciação β-pancreática e desenvolvimento de biomaterial. 2018.
100. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Perguntas Frequentes sobre Diabetes (II). [S.I.] 26 mar. 2006. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/perguntas-frequentes-sobre-diabetes-ii/>>. Acesso em:
- 2019.
101. SOCRATES, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts*. [s.l.: s.n.].
102. SONDERMEIJER, H. P. et al. Optimization of alginate purification using polyvinylidene difluoride membrane filtration: Effects on immunogenicity and biocompatibility of three-dimensional alginate scaffolds. *Journal of Biomaterials Applications*, 2016.
103. SONG, S.; ROY, S. Progress and challenges in macroencapsulation approaches for type 1 diabetes (T1D) treatment: Cells, biomaterials, and devices. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016.
104. SOUZA, Y. E. D. M. DE et al. Islet transplantation in rodents: do encapsulated islets really work? *Arquivos de Gastroenterologia*, 2011.
105. TAM, S. K. et al. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate-polyacrylation microcapsules. *Acta Biomaterialia*, 2011.
106. TAM, S. K. et al. Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. *Biomaterials*, 2005.
107. TFAYLI, H.; ARSLANIAN, S. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in youth: the evolving chameleon. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2009.
108. THANOS, C. G. et al. Intraperitoneal stability of alginate-polyornithine microcapsules in rats: An FTIR and SEM analysis. *Biomaterials*, 2006.
109. THE CHAIKOF LAB – AT THE INTERFACE OF ENGINEERING AND MEDICINE. *Cell Transplantation*. Disponível em: <<https://www.chaikoflab.org/cell-transplantation/>>. Acesso em: 2019.
110. TSAI, I-Min; LI, Kun; HUANG, Yanzhen; WANG, Xiaobin; LI, Kechang; WU, Weiming; XIAMEN JU SHENG MECHANICAL ENGINEERING CO LTD (China). *Method for producing methoxypolyethylene glycols* US8952205B2. Depósito: 27 jan. 2014. Concessão: 10 fev. 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US8952205>>. Acesso em: 14 nov. 2020.
111. VAN NUFFEL, S. et al. Multimodal Imaging Mass Spectrometry to Identify Markers of Pulmonary Arterial Hypertension in Human Lung Tissue Using MALDI-ToF, ToF-SIMS, and Hybrid SIMS. *Analytical Chemistry*, 2020.
112. VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 2012.
113. VISSER, J. et al. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: Celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009.
114. VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 2016.
115. VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 2012.
116. WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 2016.
117. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *About diabetes*. [S.I.] 2014. Disponível em: <https://web.archive.org/web/20140331094533/http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/>. Acesso em: 2019.
118. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Diabetes Fact Sheet*. [S.I.] nº 312. mar. 2013. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20130826174444/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em: 2019.
119. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Report on Diabetes*. França: 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;sequence=1>. Acesso em: 2019.
120. XIE, H. G. et al. Effect of surface morphology and charge on the amount and conformation of fibrinogen adsorbed onto alginate/chitosan microcapsules. *Langmuir*, 2010b.
121. XIE, H. G. et al. Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2010a.
122. XU, P. et al. Hydrogen-bonded and reduction-responsive micelles loading atorvastatin for therapy of breast cancer metastasis. *Biomaterials*, 2014.
123. YADAV, K. et al. Significant arterial complications after pancreas transplantation—A single-center experience and review of literature. *Clinical Transplantation*, 2017.
124. ZHAO, Y. J. et al. Kinetic analysis and improvement of the williamson reaction for the synthesis of polyethylene glycol propionaldehyde. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009.
125. ZHENG, J. et al. Enhancement of surface graft density of MPEG on alginate/chitosan hydrogel microcapsules for protein repellency. *Langmuir*, 2012.

6 APÊNDICE A — Alginato: Origem e Purificação

O alginato existe *in vivo* como uma mistura de sais com diferentes cátions (Sr, Mg e Ca) encontrada na matriz intracelular dos tecidos de algas marrons. Sua extração primária é realizada via troca iônica com uma base forte obtida da solubilização da barrilha (RODRIGUEZ et al., 2020).

Em sua forma bruta, é encontrado junto a uma série de impurezas como proteínas, lipopolissacarídeos, DNA e RNA, de modo que a viabilidade das ilhotas transplantadas pode ser diretamente correlacionada à pureza do alginato usado (SONDERMEIJER et al., 2016).

Existem várias técnicas para a purificação do alginato. A rota industrial tradicional é feita via adição de soluções de CaCl_2 , HCl e $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. A purificação industrial, no entanto, frequentemente não permite a obtenção do grau de pureza requerido às aplicações biomédicas. Nesse sentido, muitos pesquisadores têm desenvolvido métodos originais em seus próprios laboratórios. O grupo do Prof. De Vos, por exemplo, inovou em 1997 ao adicionar uma etapa de extração proteica usando CHCl_3 e $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ — 1 ano após introdução no peritônio, apenas 10% das cápsulas apresentaram sobrecrescimento fibrótico, frente a 100% das produzidas com alginato em sua forma bruta. Essa constatação apenas reforça a importância da etapa de purificação num contexto estéril como o cirúrgico (DE VOS et al., 1997).

A Química Analítica pode também ser usada para avaliar a qualidade dessa extração e a pureza do produto final. Técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia no infravermelho (IR) foram previamente empregadas com sucesso para esse fim, e até a modelagem matemática dos estágios de precipitação já permitiu otimização global do processo (RODRIGUEZ et al., 2020).

7 APÊNDICE B — Biocompatibilidade e suas muitas definições

Segundo as recomendações da Divisão de Polímeros da IUPAC, biocompatibilidade é a “habilidade de um material desenvolver uma resposta imune apropriada a uma aplicação específica/entrar em contato com um sistema vivo sem produzir um efeito adverso” (VERT et al., 2012). Essa definição, ainda que coerente, não é clara, e isso advém do limitado conhecimento da interação dos biomateriais com o corpo — restringi-la, portanto, à performance frente a um único tipo celular/tecido, como frequentemente é feito, é no mínimo inconsequente (KAMMULA; MORRIS, 2001).

A norma ISO 10993 é outra exaustivamente referenciada quando se buscam parâmetros para avaliar a biocompatibilidade de um material. Constitui-se de uma série de testes *in vitro* (sensitização, genotoxicidade, hemocompatibilidade, carcinogênese, etc.) que, embora não prevejam seu comportamento após introdução no microambiente *in vivo*, configuram-se pré-requisitos importantes ao prosseguimento da pesquisa rumo à experimentação em modelos-animais e posteriormente ensaios clínicos.

A alternativa adotada pela maioria dos pesquisadores diante desse impasse é não constatar indiscutivelmente a adequação do material para aplicação em seres vivos, mas sim adotar um aspecto relevante da resposta imune/biomimetização para o contexto do biomaterial/microambiente em questão e estudar o desempenho aferido a partir dele. Tendo em mente a tradicional cascata de reações inflamatórias que ocorrem após a detecção de抗ígenos, podem ser avaliados a adsorção e a deposição proteica na superfície dos endotélios dos tecidos vasculares, a produção de citocinas e quimiocinas durante a fase aguda da inflamação e até mesmo a mimetização da matriz extracelular, comprovadamente responsável pela modulação e atenuação das respostas inflamatórias (SILVA; SOGAYAR, 2018).

8 APÊNDICE C — Outras técnicas de caracterização de microcápsulas

Neste trabalho foram descritas apenas técnicas de caracterização físico-química de microcápsulas. Embora XPS, ToF-SIMS, Potencial ζ , Ângulo de contato pelo método da gota séssil e FTIR estejam entre as mais usadas e forneçam preciosas informações da superfície do biomaterial, não são nem de longe as únicas capazes de mapear as propriedades físico-químicas dos biopolímeros, quem dirá as propriedades de outras naturezas.

Ainda no âmbito da Físico-Química, outros aspectos importantes para materiais poliméricos correlacionados ao processo de formação das cápsulas podem ser estudados [p. ex.: determinação da massa molar média (SLS, viscosidade intrínseca, SEC) e polidispersão (SEC)], e a composição química pode ser averiguada sob outras óticas/em outras escalas [estrutura sequencial (RMN); análise micrométrica (ATR)].

Inestimáveis deduções sobre a performance de um biomaterial podem ainda ser obtidas com o emprego de técnicas fora dessa esfera: a resistência mecânica (por investigação por sonda via pinças ópticas, micropipeta e micromanipulação) até mesmo adaptada ao contexto das injeções intraperitoneais (ensaios de compressão uniaxial e elasticidade via analisador de textura superficial equipado com transdutor de força); o vazamento de componentes intracapsulares (ICP/AES, RMN ^1H); a topografia e a elasticidade/Módulo de Young (AFM modo contato); a permeabilidade (fluorescência, UV/VIS, radioatividade, SEC com detector sensível à concentração, kits de ensaios proteicos, ISEC); e a integridade (microscopia óptica, MEV, ESR, micro-FTIR, marcadores radioativos e supressão da fluorescência) (DE VOS et al., 2009).