



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2019

**Bárbara Andreia  
Rodrigues Pereira**

**Desenvolvimento de microagulhas intumescíveis  
biopoliméricas para extração de fluido intersticial**



**Bárbara Andreia  
Rodrigues Pereira**

**Desenvolvimento de microagulhas intumescíveis  
biopoliméricas para extração de fluido intersticial**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo Bioquímica Clínica, realizado sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Carla Andreia Cunha Vilela, Investigadora do CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha avó.

## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Helena Cristina Correia de Oliveira**

Investigadora auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

**Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros**

Investigadora principal do CICECO – Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Pela conclusão deste mestrado agradeço às minhas orientadoras, a Doutora Carmen Freire e à Doutora Carla Vilela, pela orientação exemplar, disponibilidade e visão crítica e oportuna, bem como ao professor Armando Silvestre pelo seu contributo.

À Daniela Fonseca reconheço e agradeço todo o apoio fundamental, pois, sempre esteve disponível para me guiar no laboratório, responder a todas as minhas perguntas e transmitir os seus conhecimentos. À Doutora Helena Oliveira e aos seus alunos pelo acompanhamento nos ensaios biológicos. A todos com quem partilhei o laboratório pelo bom ambiente de trabalho que sempre proporcionaram.

Aos meus pais, todo o amor, generosidade, apoio e paciência. Reconheço e agradeço todo o esforço e sacrifícios para que pudesse estudar. Sem eles, não seria possível.

À minha avó Maria, todo o apoio e altruísmo. Agradeço principalmente todo o amor, pois esse nunca vou perder!

Por fim, um profundo e sentido agradecimento a todos, professores, colegas e funcionários com quem partilhei e aprendi durante todo o meu percurso académico. Muito obrigada.

## palavras-chave

Microagulhas, fluido intersticial, hidrogéis, carboximetilcelulose, ácido cítrico, celulose microcristalina.

## resumo

O desenvolvimento de ferramentas de amostragem minimamente invasivas para diagnóstico e outros cuidados de saúde, que sejam mais aceitas pelo paciente e permitam a monitorização fisiológica rápida e frequente, têm recebido muita atenção nos últimos anos. A extração e análise minimamente invasiva do fluido intersticial da pele surge como uma alternativa à recolha de sangue, pois este reflete com precisão as concentrações de fármacos e substâncias endógenas encontradas no plasma. As microagulhas (MAs) são sistemas que permitem a extração de fluido intersticial de forma minimamente invasiva, com a vantagem adicional da autoaplicação. Por outro lado, o uso de biopolímeros tem sido amplamente descrito para aplicações biomédicas, pois são biocompatíveis, não tóxicos e possuem propriedades únicas.

Neste contexto, este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de MAs biopoliméricas intumescíveis para extração de fluido intersticial da pele, compostas por carboximetilcelulose, ácido cítrico (como agente reticulante) e celulose microcristalina (como reforço mecânico), e preparadas por micromoldagem. Os sistemas de microagulhas preparados foram caracterizados relativamente à sua morfologia e propriedades mecânicas. Os resultados mostram que as MAs que exibem melhores características morfológicas e mecânicas são aquelas com 7,5% (% m/v) de carboximetilcelulose e 10% (% m/v) de ácido cítrico. A adição de celulose microcristalina aumentou a resistência mecânica das MAs, mas os resultados obtidos não apresentam evidências que justifiquem a adição de mais de 5% de celulose microcristalina às MAs. Desta forma, 7,5% (% m/v) de carboximetilcelulose, 10% (% m/v) de ácido cítrico e 5% (% m/v) de celulose microcristalina, produzem as melhores MAs em termos morfológicos e mecânicos. Posteriormente, avaliaram-se as MAs compostas por 7,5% (% m/v) de carboximetilcelulose e 10% (% m/v) de ácido cítrico, com e sem adição de 5% (% m/v) de celulose microcristalina no que respeita ao seu intumescimento e citotoxicidade. As MAs com 5% (% m/v) de celulose microcristalina apresentaram maior grau de intumescimento e menor perda de massa. Ambas as amostras mostraram ser não citotóxicas para uma linha celular de queratinócitos humanos (células HaCaT).

Globalmente, todos os parâmetros indicam que as MAs com 7,5% (% m/v) de carboximetilcelulose, 10% (% m/v) de ácido cítrico e 5% (% m/v) de celulose microcristalina são aquelas que apresentam as melhores características morfológicas, mecânicas e de intumescimento. E uma vez que são não citotóxicas, apresentam enormes potencialidades para aplicações biomédicas, nomeadamente na extração não invasiva de fluido intersticial.

**keywords**

Microneedles, interstitial fluid, hydrogels, carboxymethylcellulose, citric acid, microcrystalline cellulose.

**abstract**

The need to develop minimally invasive sampling tools for healthcare and diagnostic that might be more accepted by the patient and allow a quick and frequent physiological monitoring has received a lot of attention. The minimally invasive extraction and analysis of interstitial fluid is presented as an alternative to blood sampling, given that it reflects with precision the concentrations of free drugs and endogenous substances found in plasma. Microneedles (MNs) arise as a vehicle that enables the extraction of skin interstitial fluid in a minimally invasive way with the added advantage of self-application. Additionally, the use of biopolymers has been well described for biomedical applications, given they are biocompatible, nontoxic and have unique properties.

Within this framework, this study aims the development of biopolymeric hydrogel-forming MN arrays for skin interstitial fluid extraction, composed of carboxymethylcellulose, citric acid (as cross-linker) and microcrystalline cellulose (as mechanical reinforcement), and prepared by micromolding. The obtained microneedle systems have been characterized morphologically and mechanically. The results show that MNs with 7.5% (% w/v) of carboxymethylcellulose and 10% (% w/v) of citric acid exhibit the best morphological and mechanical characteristics. The addition of microcrystalline cellulose increased the MNs mechanical strength, but the results obtained do not present enough evidence to justify the addition of more than 5% (% w/v) of microcrystalline cellulose. In this way, 7.5% (% w/v) of carboxymethylcellulose and 10% (% w/v) of citric acid and 5% (%w/v) of microcrystalline cellulose, produce the best MNs in terms of morphology and mechanical performance. Subsequently, MNs with 7.5% (% w/v) of carboxymethylcellulose, 10% (% w/v) of citric acid, with and without 5% (% w/v) of microcrystalline cellulose, were evaluated in terms of swelling behavior and cytotoxicity. Those with 5% (% w/v) of microcrystalline cellulose showed a higher swelling degree and a lower weight loss. Both MN samples showed no cytotoxicity to human keratinocytes cell line (HaCaT cells).

Overall, all parameters indicate that MNs with 7.5% (% w/v) of carboxymethylcellulose, 10% (% w/v) of citric acid and 5% (% w/v) of microcrystalline cellulose are those with the best morphological, mechanical and swelling characteristics. Since they are non-cytotoxic, these MNs can be used in biomedical applications, namely on the non-invasive extraction of interstitial fluid.

## Índice

Índice .....	i
Lista de abreviaturas .....	iii
Lista de figuras .....	iv
1. Enquadramento .....	1
2. Introdução .....	4
2.1. Pele e a via transdérmica.....	4
2.1.1. Organização estrutural da pele.....	4
2.1.2. Via transdérmica para monitorização e administração .....	6
2.2. Microagulhas.....	7
2.2.1. Classificação e aplicações biomédicas.....	10
Microagulhas sólidas.....	10
Microagulhas revestidas.....	11
Microagulhas solúveis.....	12
Microagulhas perfuradas .....	13
Microagulhas intumescíveis.....	14
2.2.2. Propriedades mecânicas das microagulhas .....	15
2.3. Extração de fluido intersticial .....	19
3. Materiais e métodos .....	22
3.1. Materiais.....	22
3.2. Preparação dos sistemas de microagulhas com carboximetilcelulose e ácido cítrico	22
3.2.1. Otimização da concentração de carboximetilcelulose .....	22
3.2.2. Otimização da concentração de ácido cítrico.....	23
3.3. Incorporação de celulose microcristalina na formulação das microagulhas .....	23
3.4. Caracterização das amostras .....	23
3.4.1. Análise morfológica.....	23
3.4.2. Análise mecânica .....	24
3.4.3. Análise de FTIR.....	24
3.4.4. Avaliação do intumescimento das microagulhas.....	24
3.4.5. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	25
3.4.6. Análise estatística .....	26



4.	Resultados e discussão .....	27
4.1.	Preparação dos sistemas de microagulhas com carboximetilcelulose e ácido cítrico	28
4.1.1.	Otimização da concentração de carboximetilcelulose .....	28
4.1.2.	Otimização da concentração de ácido cítrico.....	33
4.2.	Incorporação de celulose microcristalina na formulação das microagulhas.....	42
4.3.	Determinação do intumescimento, citotoxicidade e capacidade de extração de analitos das microagulhas <i>in vitro</i> .....	48
4.3.1.	Avaliação do intumescimento das microagulhas .....	49
4.3.2.	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	51
5.	Conclusões .....	53
6.	Bibliografia .....	55

## Lista de abreviaturas

AC	Ácido Cítrico
CM	Celulose Microcristalina
CMC	Carboximetilcelulose
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
FI	Fluido intersticial
MA (s)	Microagulha (s)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PDMS	Poli(dimetil siloxano)
SC	<i>Stratum corneum</i>

## Lista de figuras

Figura 1: Representação das diferentes camadas e subcamadas que constituem a pele humana. Adaptado de (18).....	5
Figura 2: Ilustração esquemática do processo de fabrico de MAs poliméricas por micromoldagem com PDMS. (1) Modelo mestre. (2) Despejo do PDMS. (3) Molde fêmea. (4) Preencher com a solução do polímero. (5) Solidificação. (6) Microagulhas poliméricas. Adaptado de (16). .....	8
Figura 3: Esquema representativo da aplicação de microagulhas sólidas. Adaptado de (24). .....	10
Figura 4: Esquema representativo da aplicação de microagulhas revestidas. Adaptado de (24). .....	11
Figura 5: Esquema representativo da aplicação de microagulhas solúveis. Adaptado de (24). .....	12
Figura 6: Esquema representativo da aplicação de microagulhas perfuradas. Adaptado de (24). .....	13
Figura 7: Esquema representativo da aplicação de microagulhas intumescíveis. Adaptado de (24).....	14
Figura 8: Esquema representativo do procedimento utilizado por Larrañeta et al. (1) para avaliar a força manual de inserção de um sistema de MAs em parafilme. Adaptado de (1). .....	16
Figura 9: Gráficos de força/agulha (N) em função do deslocamento (mm). (A) Comportamento típico das MAs perante um teste de força axial. (B) Comportamento típico das MAs perante um teste de força transversal. Adaptado de (85). .....	17
Figura 10: Representação da montagem utilizada para determinar a força de fratura da base do sistema de MAs. Adaptado de (83). .....	18
Figura 11: Molde de PDMS utilizado para preparar as MAs. ....	22
Figura 12: Estrutura química da (A) carboximetilcelulose, (B) ácido cítrico e (C) celulose microcristalina. ....	27
Figura 13: Representação esquemática do processo de desenvolvimento de MAs intumescíveis para a extração de fluido intersticial.....	28

Figura 14: Fotografias das microagulhas obtidas na lupa dos sistemas de MAs para as diferentes concentrações de CMC. (A) CMC 5%; (B) CMC 7,5%.....	29
Figura 15: Altura média (mm) das MAs obtidas para as diferentes concentrações de CMC (5% e 7,5% (% m/v)) com os valores de p obtidos pelo teste t (ns – não significativo). ....	30
Figura 16: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de carboximetilcelulose (5% e 7,5% (% m/v)). .....	30
Figura 17: Fotografias das MAs obtidas na lupa para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de CMC 5%; (B) Amostra de CMC 7,5%.....	31
Figura 18: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de carboximetilcelulose (5% e 7,5% (% m/v)) com os valores de p não significativos obtidos pelo teste de t não emparelhado (ns – não significativo).....	32
Figura 19: Fotografias das microagulhas produzidas por adição durante a secagem, obtidas no microscópio ótico, e dos sistemas de MAs para as diferentes concentrações de CMC. (A) CMC 5%; (B) CMC 7,5%.....	33
Figura 20: Fotografias dos sistemas de MAs obtidas na lupa. (A) AC 5%; (B) AC 7,5%; (C) AC 10%.....	34
Figura 21: Diagrama de barras da altura média (mm) das MAs obtidas para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%, 7,5% e 10% (% m/v)) com os valores de p obtidos pelo teste de Tukey (* – $p < 0,05$ ).....	35
Figura 22: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%, 7,5% e 10% (% m/v)). .....	35
Figura 23: Fotografias das MAs obtidas na lupa para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de AC 5%; (B) Amostra de AC 7,5%; (C) Amostra de AC 10%. .....	37
Figura 24: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%, 7,5% e 10% (% m/v)) com os valores de p não significativos obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo).....	39
Figura 25: Espectro de FTIR das amostras reticuladas e dos compostos puros constituintes. (A) AC; (B) CMC; (C) CMC 7,5% + AC 5%; (D) CMC 7,5% + AC 7,5%; (E) CMC 7,5% + AC 10%.....	40

Figura 26: Representação esquemática da carboximetilcelulose reticulada com ácido cítrico.....	41
Figura 27: Representação esquemática da reação de reticulação entre a CMC e o AC.....	42
Figura 28: Fotografias dos sistemas de MAs obtidas na lupa. (A) CM 5%; (B) CM 10%; (C) CM 15%.....	43
Figura 29: Diagrama de barras da altura média (mm) das MAs para as diferentes concentrações de CM (5%, 10% e 15% (% m/v)) com os valores de p obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo, * – $p < 0,05$ ).....	44
Figura 30: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de celulose microcristalina (5%, 10% e 15% (% m/v)).....	44
Figura 31: Fotografias obtidas pela lupa das MAs para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de CM 5%; (B) Amostra de CM 10%; (C) Amostra de CM 15%.....	46
Figura 32: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de celulose microcristalina (0%, 5%, 10% e 15% (% m/v)) com os valores de p não significativos obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo).....	47
Figura 33: Espectro de FTIR das amostras reticuladas e dos compostos puros constituintes. (A) AC; (B) CMC; (C) CM; (D) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%; (E) CMC 7,5% + AC 10% + CM 10%; (F) CMC 7,5% + AC 10% + CM 15%.....	48
Figura 34: Diagrama de barras que apresenta o grau de intumescimento e a perda de massa. No eixo das abcissas: (1) CMC 7,5% + AC 10%; (2) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%...	49
Figura 35: Fotografias das MAs obtidas na lupa antes ((A), (C)) e depois do intumescimento ((B) e (D)). (A) e (B): CMC 7,5% + AC 10%; (C) e (D): CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.....	50
Figura 36: Diagrama de barras da (A) altura média antes e depois do intumescimento e da (B) largura média antes e depois do intumescimento. No eixo das abcissas: (1) CMC 7,5% + AC 10%; (2) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.....	51
Figura 37: Diagrama de barras da viabilidade celular (%) das células HaCaT quando expostas às amostras de CMC 7,5% + AC 10% e CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.....	52

## 1. Enquadramento

Atualmente existe a necessidade de melhorar o acesso aos cuidados de saúde melhorando a sua qualidade, disponibilidade e utilização. Estes cuidados de saúde incluem a extração e monitorização de analitos, bem como a administração de ingredientes ativos. Assim, é importante desenvolver alternativas que ofereçam mais conforto, sendo minimamente invasivas e indolores, e fáceis de utilizar. A pele é um órgão acessível através do qual são administradas várias formulações – via de administração transdérmica (1). Esta via de administração caracteriza-se pela aplicação de ingredientes ativos na pele, para que estes sejam absorvidos e entrem na circulação sistémica. É apresentada como uma alternativa aos métodos convencionais, nomeadamente à administração oral e à injeção com agulhas hipodérmicas, resolvendo algumas das maiores desvantagens destes métodos, especificamente, evita o metabolismo de primeira passagem, é indolor e não invasiva, entre outros (2). Para além da administração de ingredientes ativos a via transdérmica pode também ser utilizada para extração de fluido intersticial (FI) para monitorização e extração de analitos (3,4). Contudo, a via transdérmica é limitada pelo efeito de barreira da pele, mais precisamente pela camada mais exterior, designada por *Stratum corneum* (SC). A natureza da SC limita a extração de FI pois os procedimentos existentes têm riscos para os pacientes, são demorados e necessitam da assistência de profissionais médicos e de equipamentos especializados (5). Limita também a administração de ingredientes ativos, pois dependendo da natureza deste pode impedir que se difunda a uma taxa adequada para atingir doses terapêuticas no plasma, ou até impedir totalmente a sua permeação (3). Neste sentido, foram desenvolvidas alternativas para tentar superar as limitações da via transdérmica (2,6). Todavia, devido às dificuldades encontradas para conseguir contornar efetivamente a SC, foi necessário considerá-la como uma barreira que não pode ser vencida, mas contornada. Surgem então as microagulhas (MAs), que são dispositivos capazes de perfurar a SC para que a epiderme viável se torne acessível quer para a extração de FI, quer para a administração de ingredientes ativos (1,7).

As MAs são, portanto, dispositivos com dimensões micrométricas, fabricadas com diversos materiais, métodos e designs, capazes de extrair analitos, ou administrar ingredientes ativos através da barreira da pele (8–11). Permitem usufruir das vantagens da via transdérmica enquanto permitem alargar a sua aplicabilidade (12). Até ao momento, as MAs foram produzidas com diversos materiais, nomeadamente metais, vidro, cerâmica e

diversos polímeros (7). Existem vários tipos de MAs, mas as MAs intumescíveis têm recebido bastante atenção nos últimos anos, tanto para administração de ingredientes ativos, como para a extração de analitos. Estas MAs são geralmente produzidas a partir de polímeros reticulados (13). E apesar da estabilidade destes polímeros, a sua aplicação pode apresentar alguns inconvenientes, particularmente a citotoxicidade de alguns reticulantes ou a permanência de algum reagente que seja nocivo para o organismo (14). Mais recentemente a preparação de MAs constituídas por materiais biodegradáveis, biocompatíveis e renováveis tem ganho enorme atenção.

Os biopolímeros são designados como polímeros sintetizados por organismos vivos, bem como os seus derivados. São então biomoléculas poliméricas constituídas por monómeros como monossacarídeos, ácidos nucleicos, ou aminoácidos (15). Sendo os polissacarídeos e as proteínas as famílias de biopolímeros mais utilizadas para o fabrico de MAs (16). As características dos biopolímeros mais desejadas são a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, natureza não tóxica e poderem ser hidrolisados em produtos removíveis e não tóxicos (15). Os biopolímeros são importantes para o bom funcionamento do corpo humano sendo responsáveis por manter as células agregadas para formar tecidos, enviam sinais químicos às células de forma a guiar o seu comportamento, contribuem para a hidratação e elasticidade da pele, lubrificam as articulações e o trato gastrointestinal e ainda protegem contra patógenos constituindo o muco que cobre os olhos e o trato respiratório. O seu uso para aplicações biomédicas abrange a administração transdérmica, que inclui a extração de analitos e a administração de ingredientes ativos através da pele, a regeneração de tecidos, revestimentos biomiméticos, entre outros (17). Os biopolímeros têm sido utilizados para fabricar MAs de forma a oferecer maior área para armazenar o ingrediente ativo a administrar, eliminar o perigo associado à quebra das MAs na pele e ainda os procedimentos complexos e dispendiosos que são necessários para o fabrico das MAs com outros materiais. Os biopolímeros existem num largo espectro apresentando diferentes características, detalhadamente perfis de degradação, propriedades de intumescimento e resposta a estímulos biológicos e físicos (13). É importante que as MAs poliméricas possuam as seguintes características: biocompatibilidade sem desencadear resposta imune, força suficiente para penetrar a SC, fabricadas por métodos que não danifiquem cargas sensíveis (EX. proteínas, peptídeos e vacinas) e ainda permitir a administração rápida, controlada ou sustentada de ingredientes ativos (18).

O objetivo principal desta dissertação consiste no desenvolvimento de MAs intumescíveis biopoliméricas para extração de FI para análise minimamente invasiva de metabolitos. Englobado nos objetivos específicos do trabalho estão a preparação das MAs intumescíveis biopoliméricas, caracterização de acordo com as características físicas (morfologia e estrutura) e mecânicas e a avaliação do seu intumescimento e citotoxicidade.



## 2. Introdução

Neste capítulo serão apresentados alguns aspectos relevantes sobre a pele e a via transdérmica, nomeadamente a estrutura da pele e a via transdérmica para monitorização de analitos e administração de ingredientes ativos. Seguidamente, será desenvolvido o tópico das Microagulhas, referindo a sua classificação e aplicações biomédicas, e as propriedades mecânicas desejáveis e como são determinadas. Finalmente, irá apresentar-se a extração de FI, o seu potencial para o diagnóstico e monitorização de analitos, bem como as aplicações já reportadas de MAs para a extração de FI.

### 2.1. Pele e a via transdérmica

A pele é composta por um conjunto de tecidos e desempenha diversas funções, nomeadamente como superfície sensorial, barreira contra agressões físicas, químicas e biológicas, na termorregulação, processos endócrinos, entre outros (12,13,14). É um órgão complexo, constituído por cerca de cinco tipos diferentes de células estruturais e ainda outras células provenientes da circulação sistémica e do sistema imune (19).

#### 2.1.1. Organização estrutural da pele

A pele é estruturalmente dividida em duas camadas principais, a epiderme e a derme (Figura 1). Existindo ainda uma terceira camada, a hipoderme (Figura 1). A epiderme é a camada mais exterior da pele constituída por uma camada de epitélio estratificado escamoso responsável por proteger o organismo contra agressões externas, lubrificar a pele com lípidos, e ajudar na termorregulação através da sudorese e dos pelos (19,20). A maior população de células da epiderme são queratinócitos, contudo existem ainda outras populações de células, especificamente os melanócitos, células de Langerhans, células Merkel e células estaminais (19). Tendo em conta o estado de diferenciação e maturação dos queratinócitos, a epiderme pode ser dividida em cinco camadas. Estas são denominadas, da mais profunda à mais superficial, de *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* e *stratum corneum* (19,22). A renovação celular da epiderme ocorre na camada mais profunda, a *stratum basale*, o único local capaz de promover a divisão celular, e a eliminação das células ocorre por descamação constante na camada mais superficial, a SC. Desta forma, a divisão e diferenciação dos queratinócitos ocorre na camada basal, estes posteriormente movem-se

através das restantes camadas até atingir a camada mais superficial (22). No processo de deslocamento das células pelas diferentes camadas há a perda dos desmossomas, acumulação de grânulos de querato-hialina e finalmente a perda dos núcleos e transformação dos queratinócitos em queratinócitos terminais, ou corneócitos, na última camada.

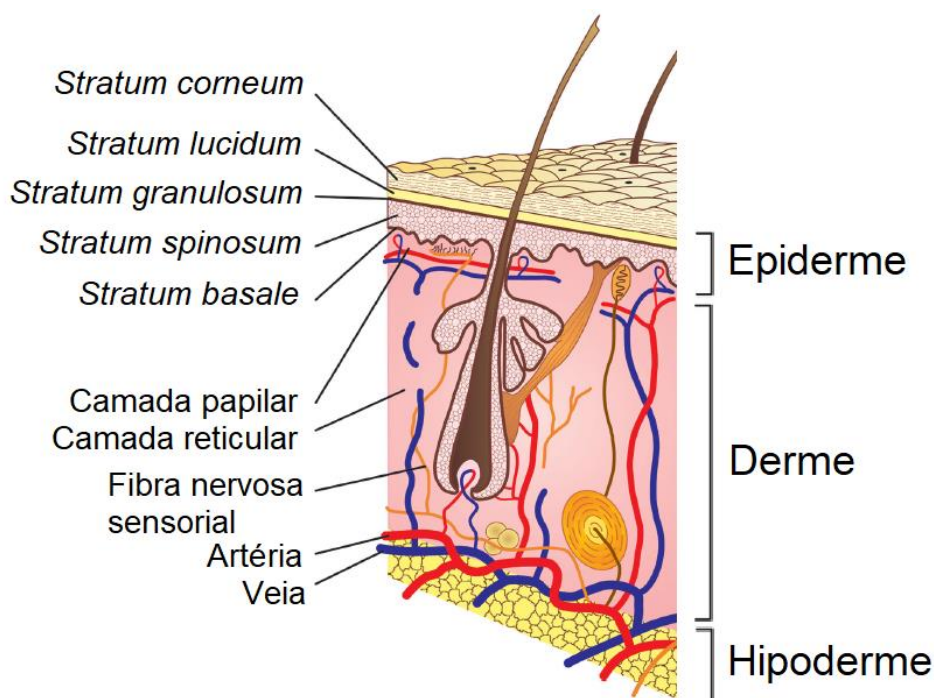


Figura 1: Representação das diferentes camadas e subcamadas que constituem a pele humana. Adaptado de (18).

A derme está entre a epiderme e a hipoderme e é responsável por fornecer nutrientes e suporte físico à epiderme (22). Adicionalmente protege o corpo de danos e infecções e atua como um órgão de armazenamento de água (21). É constituída maioritariamente por fibroblastos, e ainda colagénio e fibras elásticas (19). Adicionalmente, existem na derme vasos sanguíneos, rede de capilares linfáticos, folículos de pelo, terminações dos nervos sensoriais, glândulas sebáceas e glândulas sudoríferas (23). A sua estrutura é dividida em duas camadas: a camada papilar, que está em contacto com a epiderme e é rica em terminações de nervos sensoriais e vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, e uma camada reticular profunda e espessa, constituída por tecido conetivo forte com colagénio e fibras elásticas (19,22). Como a epiderme é avascular, a

vasculatura presente na derme é fundamental para fornecer oxigênio, nutrientes e remover subprodutos do metabolismo provenientes da epiderme (22).

A hipoderme é uma camada de tecido adiposo subcutâneo que se encontra abaixo da epiderme e da derme (21). Esta camada é composta por estruturas de tecido conectivo reticular que conectam a derme aos músculos ou ossos (23). É responsável por oferecer suporte às camadas de pele superiores bem como por conectá-las a tecidos mais profundos. Contém vasos sanguíneos que alimentam a pele, atua como reservatório de gordura e ainda como isolador térmico (21).

### **2.1.2. Via transdérmica para monitorização e administração**

A via transdérmica refere-se à administração de ingredientes ativos através da pele, para que atinjam a circulação sistêmica e surge da necessidade de recurso a terapias menos invasivas para o paciente (2). Apesar da administração de ingredientes ativos ser a aplicação mais frequentemente referida, a via transdérmica pode também ser utilizada para extração de FI e conseqüente monitorização de analitos (4).

Para a monitorização dos pacientes são determinadas concentrações plasmáticas de fármacos ou substâncias endógenas quer para o diagnóstico, quer para tratamento. Assim, a monitorização é fundamental para o clínico diagnosticar patologias, bem como para otimizar a terapia adequada a cada paciente. A monitorização tem várias aplicações como o diagnóstico de doença aguda ou crónica, controlo de fármacos com janelas terapêuticas estreitas, entre outros (4). Atualmente, a monitorização terapêutica é maioritariamente dependente da quantificação do analito de interesse em amostras de sangue. A análise de sangue, apesar de possuir elevada precisão e fornecer informações vitais, apresenta alguns problemas, nomeadamente a necessidade de profissionais médicos treinados, processo de análise demorado com extração e preparação das amostras por vezes complexas, uso de agulhas havendo uma porção significativa da população com fobia a agulhas, risco de infeção, e o risco com os bebés prematuros pois cada intervenção médica irá amplificar o risco de infeção (3). Existe então a necessidade de desenvolver novas técnicas não invasivas ou minimamente invasivas que sejam mais aceites pelo paciente bem como permitam a monitorização rápida e frequente, possibilitando um melhor controlo de doenças, rápida deteção de níveis tóxicos de fármacos e ainda a deteção de substâncias ilícitas em toxicodependentes e condutores (4). Uma das alternativas ao sangue é o FI, pois

este geralmente reflete com precisão as concentrações de fármacos livres e de substâncias endógenas existentes no plasma (24). Como a SC é uma barreira e impede a migração de fluidos corporais para o exterior é necessário utilizar técnicas que permitam a extração de quantidade suficiente de FI para análise (3,4). Assim são apresentadas as microagulhas (MAs), uma alternativa que aproveita as vantagens da via transdérmica, supera desvantagens permitindo a extração e monitorização de analitos e a administração de um maior espectro de ingredientes ativos.

## **2.2. Microagulhas**

As estruturas de MAs consistem em várias projeções micrométricas tipicamente colocadas numa base de suporte ou num adesivo, capazes de penetrar a barreira da SC e administrar ingredientes ativos, bem como permitir a extração de FI para posterior análise (7). As MAs são minimamente invasivas pois a sua aplicação na pele ocorre sem estimular os nervos da derme e sem danificar os vasos sanguíneos (6,13).

O primeiro conceito de MA foi descrito em 1976 numa patente da ALZA corporation por Gerstel e Place (25). Mas, só nos anos 90, com os avanços na área da microfabricação, foi possível o seu fabrico (14). O primeiro estudo publicado sobre MAs descreve o uso de MAs de silicone para facilitar a administração de calceína (26). A calceína é um ingrediente ativo difícil de administrar pela via transdérmica porque permeia mal a pele em circunstâncias normais. O estudo realizado (26) mostrou que a permeabilidade da pele à calceína aumentou significativamente, mais de 4 ordens de magnitude, com o uso das MAs. Desde então foram utilizados muitos outros materiais para o seu fabrico incluindo metais, como o aço inoxidável (8), paládio (9), níquel (9) e titânio, vidro (10), cerâmicas (11) e vários polímeros (27). Os métodos de fabrico são baseados nas técnicas de microfabricação de adicionar, remover e copiar microestruturas recorrendo a processos fotolitográficos, gravura com silício, corte a laser, galvanoplastia de metal, eletropolimento de metais, micromoldagem (28–36), impressão 3D, litografia de extração (37), entre outros (38). A micromoldagem será o único método abordado com mais detalhe pois será utilizado no presente trabalho.

A micromoldagem é um dos métodos mais utilizado uma vez que é eficiente, de baixo custo, tem boa reprodutibilidade e é fácil de aplicar em produções de grande escala. É um processo que envolve 6 passos principais: 1) produção do modelo mestre das MAs;

2) preparação do molde fêmea das MAs; 3) moldagem do polímero, ou outro material, no molde fêmea; 4) remoção de bolhas por centrifugação ou vácuo; 5) solidificação por secagem ou foto-polimerização; e 6) remoção das MAs do molde fêmea (13,29,30,34). O molde fêmea preparado na segunda etapa do processo descrito deve transcrever completamente as microestruturas do modelo mestre. E pode ser feito de vários materiais sendo o poli(dimetil siloxano) (PDMS) o material mais utilizado (13,28,29). O PDMS é o melhor substrato para a micromoldagem dado que tem boa capacidade de transcrição, boa termoestabilidade e adesão reduzida, o que facilita a separação das MAs do molde (13). Apesar da micromoldagem ser um método vantajoso existem algumas limitações, nomeadamente é um método complexo com vários passos demorados, o que pode causar a perda de atividade de ingredientes ativos encapsulados nas MAs, e necessita de calor ou luz UV (32), limitando a possibilidade de utilizar ingredientes ativos sensíveis, como peptídeos, proteínas e vacinas (13). Na figura 2 encontra-se representado um processo típico de micromoldagem usando PDMS para fabricar MAs poliméricas.

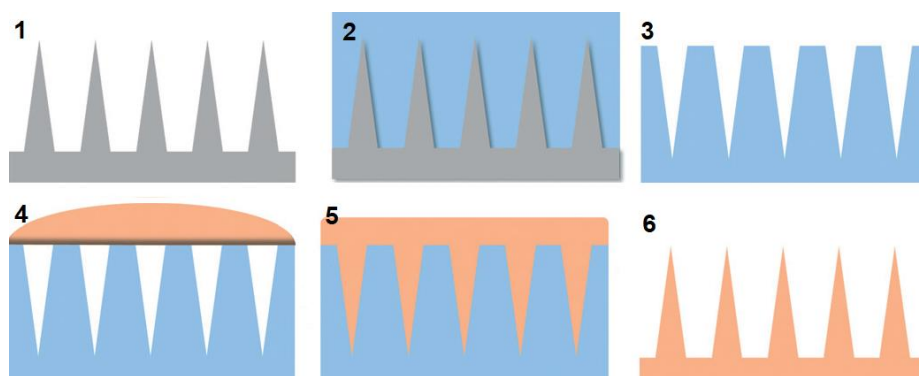


Figura 2: Ilustração esquemática do processo de fabrico de MAs poliméricas por micromoldagem com PDMS. (1) Modelo mestre. (2) Despejo do PDMS. (3) Molde fêmea. (4) Preencher com a solução do polímero. (5) Solidificação. (6) Microagulhas poliméricas. Adaptado de (16).

As MAs são produzidas em várias geometrias, semelhantes a agulhas, em forma de pirâmide ou cone e em forma de ponta de flecha (7,39). Podem ser fabricadas no plano, no qual as MAs se encontram paralelas à superfície de fabrico, ou fora do plano, em que as MAs se encontram perpendiculares à superfície de fabrico (40).

A aplicação indolor das MAs é muito importante para a aceitação do paciente (40). E por isso a avaliação das consequências da inserção e remoção das microagulhas da pele é importante para garantir conforto e segurança para o paciente. A avaliação inclui a sensação de dor quando as MAs são aplicadas e também o fecho dos poros e a presença de eritema persistente após a sua remoção (41). Os pacientes geralmente descrevem a aplicação como indolor, sendo a aplicação acompanhada de uma sensação de pressão, enquanto que na aplicação de agulhas hipodérmicas é descrita uma dor aguda (40). Relativamente à segurança do método, importa referir que com as MAs há o rompimento da *SC* e a penetração até à epiderme viável ou até à derme. Como estas camadas são normalmente estéreis, é indispensável considerar a necessidade das MAs e dos produtos utilizados para o seu fabrico estarem livres de cargas microbiológicas, que possam causar irritação ou infeção sistémica (41). Por outro lado, é também possível a entrada de microrganismos através dos microcanais criados pelas MAs, todavia, é reportado que o risco de infeção pela administração com uma agulha hipodérmica é mais elevado do que com MAs (40,42). Para aumentar e garantir a segurança dos pacientes é necessário que a esterilização das MAs seja uma exigência regulamentar. Esta exigência irá acarretar vários desafios nomeadamente tornar o processo mais dispendioso e mais complicado para produção de larga escala, necessitando de um processo que não comprometa cargas farmacológicas (41). Sobre a preocupação da irritação da pele, sob a forma de eritema ou edema, na maior parte dos casos reportados a irritação desaparece totalmente após 48h (41). No entanto, é fundamental avaliar previamente qual o potencial do material das MAs para irritar a pele, o que pode ser feito recorrendo a vários métodos disponíveis, nomeadamente através da avaliação da citotoxicidade em linhas celulares, ultrassom de alta frequência, observação de mudança da cor da pele, entre outros (43,44).

Concluindo, é atribuída às MAs mínima invasividade, aplicação fácil (2) e sem dor (40), elevada aceitação do paciente (40), menor penetração microbiana (42) e boa tolerância sem edema ou eritema durante longos períodos de tempo (43). E são consideradas como desvantagens, condições externas, como a hidratação da pele poder afetar a aplicação das MAs (19) e a ponta das MAs poder quebrar e permanecer na pele após remoção do sistema de MAs. Esta última pode ser um problema no uso de materiais sem capacidade de dissolução ou biodegradação, permanecendo indeterminadamente no organismo até que sejam retirados (14).

### 2.2.1. Classificação e aplicações biomédicas

As MAs são usualmente divididas em MAs sólidas, perfuradas, revestidas, solúveis ou biodegradáveis e intumescíveis (12). Desde a sua conceptualização, há quatro décadas, têm sido exploradas intensamente para a administração transdérmica de fármacos e vacinas, e também para a extração de FI. As MAs oferecem a possibilidade de administrar um maior número de ingredientes ativos através da pele, extrair FI e várias outras aplicações (38).

#### Microagulhas sólidas

As MAs sólidas são utilizadas para criar microcanais transientes na SC através dos quais pode ser extraído FI, pela aplicação de vácuo, ou administrados ingredientes ativos por aplicação de uma formulação convencional (14,45) (Figura 3). A maior limitação do uso de MAs sólidas é a necessidade de um processo de dois passos, o que pode dificultar a aceitação por parte do paciente (14). Tipicamente são utilizados metais e diversos polímeros para o seu fabrico (38), e são fabricadas recorrendo a vários processos, como micromaquinação a laser (46), litografia e gravura (47), micromoldagem (48), entre outros métodos (23).

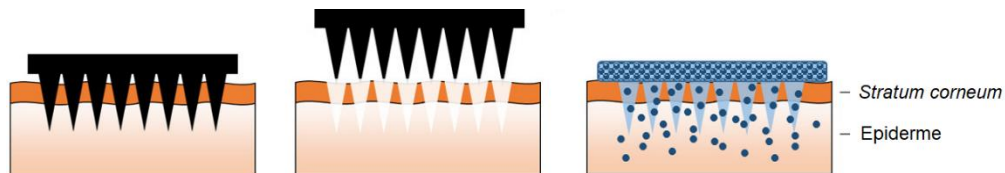


Figura 3: Esquema representativo da aplicação de microagulhas sólidas. Adaptado de (24).

É reportada a utilização de MAs sólidas de vidro de borossilicato para extrair FI com sucesso e posteriormente determinar a concentração de glucose com precisão a partir do mesmo (45). A aplicação destas MAs para a administração de ingredientes ativos é mais estudada do que a sua aplicabilidade para a extração de FI. Esta abrange a administração de diversos ingredientes ativos, bem como as aplicações na indústria cosmética. Já se administraram com MAs sólidas vários ingredientes ativos, como calceína recorrendo a MAs de silicone (26), naltrexona com MAs de metal (49), insulina com MAs de aço inoxidável (50) e o toxoide difteria com adjuvante da toxina da cólera (51). A indústria

cosmética tem também vindo a mostrar interesse em MAs, tanto para estimular a reparação de marcas na pele, como para administrar ingredientes ativos na pele com propósitos cosméticos (41). Já existem em comercialização alguns produtos com MAs sólidas e um deles é o Dermaroller®, comercializado desde 1999 na Alemanha, sendo desde então comercializado mundialmente. Este tem como objetivo melhorar a textura da pele e a aparência de cicatrizes e consiste em MAs sólidas metálicas com comprimento de 0,2-2,5 mm num rolo cilíndrico (7).

### **Microagulhas revestidas**

As MAs revestidas são MAs sólidas revestidas com uma formulação do ingrediente ativo, que após a inserção das MAs dissolve e difunde através das camadas da pele (Figura 4) (6). Tendo em conta que o método de atuação destas MAs se baseia na administração do que esteja presente no revestimento, estas não são utilizadas para a extração de FI. Existem vários métodos para as revestir e incluem, mergulhar as MAs numa formulação do ingrediente ativo (52), impressão com jato de tinta (53) ou por pulverização (54). Comparadas com as MAs sólidas trazem a vantagem da sua aplicação ser de apenas um passo (14).

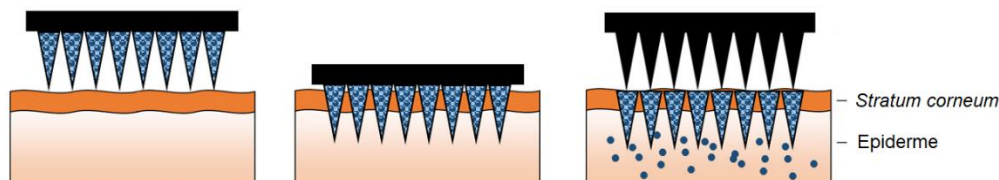


Figura 4: Esquema representativo da aplicação de microagulhas revestidas. Adaptado de (24).

As MAs revestidas já foram utilizadas para administrar lidocaína com MAs de silício (55), desmopressina com MAs de titânio (56), hormona paratiroideia com MAs de titânio (57) e vacinas de estirpes sazonais de H1N1 e H3N2 utilizando MAs poliméricas e de aço inoxidável (58,59).



### Microagulhas solúveis

As MAs solúveis foram primeiramente referidas em 2005 por Miyano *et al.* (60). São MAs que se dissolvem quando são inseridas na pele e entram em contacto com o FI, libertando o ingrediente ativo que se encontra incorporado na matriz das MAs (Figura 5) (14). Visto que estas MAs se dissolvem quando em contacto com o FI também não são comumente utilizadas para extrair FI, sendo a grande parte dos estudos realizados com este tipo de MAs direcionados para a administração de ingredientes ativos.

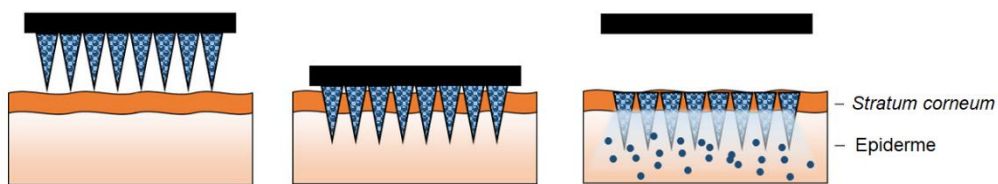


Figura 5: Esquema representativo da aplicação de microagulhas solúveis. Adaptado de (24).

Têm sido fabricadas, maioritariamente, com polímeros. E estes para serem utilizados em MAs solúveis, precisam de ser solúveis em água sendo a sua solubilidade em água determinada por características específicas da estrutura química da macromolécula. Particularmente, pela quantidade de grupos funcionais hidrofílicos presentes na sua estrutura (61). Tendo em conta que o ingrediente ativo se encontra incorporado na matriz das MAs e é libertado à medida que estas dissolvem, é possível manipular a cinética de libertação do ingrediente ativo através da natureza do polímero e da sua taxa de dissolução (14). A escolha do polímero é então um passo chave para se obter as características de dissolução desejadas (7).

As MAs biodegradáveis são incluídas nesta classe, e são MAs que ao invés de dissolverem quando inseridas na pele degradam ao longo do tempo libertando o ingrediente ativo (14). O polímero irá decompor-se, idealmente, em subprodutos naturais endógenos como gases, água e sais inorgânicos, que posteriormente são excretados ou absorvidos. A biodegradação ocorre pela clivagem hidrolítica ou enzimática de ligações sensíveis, resultando na perda do material polimérico (62). Desta forma a libertação do ingrediente ativo pode ser sustentada por meses com a escolha do polímero indicado (63). As vantagens da utilização de MAs solúveis ou biodegradáveis incluem a eliminação da

agulha ser fácil pois são “self-disabling”, ou seja, são eliminadas quando inseridas na pele pela sua dissolução/biodegradação não sendo necessário outro processo para as descartar. E como são fabricadas com materiais solúveis ou biodegradáveis, elimina-se o risco de deixar resíduos na pele (14).

As MAs solúveis já foram utilizadas para administrar ingredientes ativos como heparinas de baixo peso molecular com MAs de poli(metil vinil eter/anidrido maleico) (64), insulina com MAs de sulfato de condroitina (65), hormona de crescimento humana com MAs de carboximetilcelulose (72) e a vacina influenza com MAs de polivinilpirrolidona (73). Também as MAs solúveis são utilizadas na indústria cosmética, um exemplo é o MicroHyal®<sup>®</sup>, um produto aprovado com MAs solúveis carregadas com ácido hialurônico e este é utilizado para reduzir a aparência de rugas (38).

### **Microagulhas perfuradas**

As MAs perfuradas possuem uma conduta na sua estrutura através da qual pode ser extraído FI, ou administrada uma formulação fluida ou líquida de um ingrediente ativo (Figura 6). Estas MAs são geralmente fabricadas com metais ou silicone através de técnicas de moldagem, microfabricação e métodos de fotolitografia com raio-X (23).

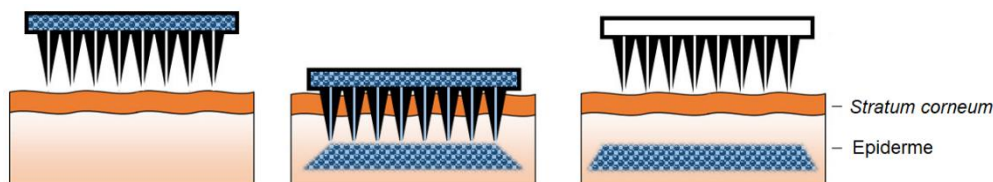


Figura 6: Esquema representativo da aplicação de microagulhas perfuradas. Adaptado de (24).

É reportada a utilização de MAs perfuradas de silício para a extração de FI, com sucesso na extração e análise de glucose (68,69). Relativamente à administração de ingredientes ativos, foram utilizadas para administrar lidocaína com MAs de vidro de borossilicato (70), insulina com MAs de níquel e aço inoxidável (71,72) e a vacina influenza (73–77). Existe um produto com MAs perfuradas já aprovado para uso médico, o Soluvia® um produto com uma MA perfurada anexada a uma seringa. Mais

especificamente já comercializado mundialmente como IDflu®, Intanza® e Fluzone Intradermal® para administração de vacinas influenza (38).

### Microagulhas intumescíveis

Finalmente, existem as MAs intumescíveis, ou de hidrogéis, descritas pela primeira vez por Donnelly *et al.* (44). Os hidrogéis são polímeros altamente hidrofílicos ou solúveis em água reticulados através de ligações covalentes. Assim, é um material polimérico que tem a capacidade de intumescer e reter uma fração significativa de água, ou outro fluido, na sua estrutura sem dissolver. Quando as MAs são introduzidas na pele absorvem o FI, e desta forma podem ser utilizadas para extrair FI e monitorizar analitos, ou para administrar ingredientes ativos. Neste último caso, a absorção de FI permite a difusão do ingrediente ativo que pode estar num reservatório anexado às MAs, como representado na Figura 7, ou incorporado na matriz do hidrogel. (7,44).

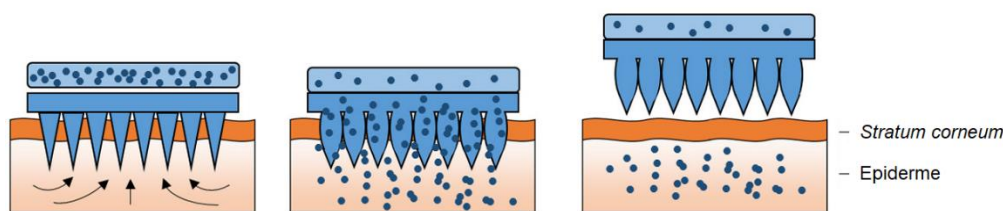


Figura 7: Esquema representativo da aplicação de microagulhas intumescíveis. Adaptado de (24).

Estas MAs apresentam várias vantagens relativamente aos outros tipos de MAs, quer para a administração de fármacos, quer para a extração de FI. Estudos mostram que não ficam bloqueadas ou comprimidas pelo tecido circundante, ao contrário do que pode acontecer com as MAs perfuradas (44). Apresentam uma aplicação simples, de apenas 1 passo, uma desvantagem das MAs sólidas (7). São removidas da pele intactas, ao contrário das MAs solúveis, não havendo resíduos de polímeros deixados para trás, pois o polímero absorve o FI sem dissolução. Como não podem voltar a ser inseridas na pele reduz-se ainda o risco de transmissão de infeções (78).

É reportado o uso das MAs de poli(metil vinil eter/anidrido maleico) e poli(etileno glicol) (79,80) e de ácido hialurónico metacrilatado (32) para extração de FI com êxito na

extração e análise de teofilina, cafeína e glicose (79), sulforrodamina (80) e colesterol e glicose (32). Para a administração de ingredientes ativos Donnelly *et al.* (44), utilizou MAs de poli(metil vinil éter/anidrido maleico) e poli(etileno glicol) para administrar, com sucesso, metronidazol, teofilina, insulina e albumina do soro de bovino.

### **2.2.2. Propriedades mecânicas das microagulhas**

Para permitir movimentos, a pele tem de ser flexível o suficiente, mantendo a capacidade de retomar ao seu estado original. Pode ser descrita como anisotrópica, viscoelástica, não linear e não homogênea (19). É fundamental a inserção efetiva das MAs na pele, para que estas sejam eficientes a extrair FI. Para tal, é importante caracterizar as MAs quanto às suas características mecânicas (14).

Começando pelo seu design, tendo em conta que o objetivo das MAs é penetrar a pele ou outro tecido biológico sem fratura ou flexão, o design ideal deve contribuir para que as MAs possuam uma força de inserção baixa e uma força de fratura alta (14). Existem diversos fatores que podem afetar a força de fratura e a inserção na pele das MAs, sendo os principais: os materiais utilizados, a altura da agulha, o raio da ponta, o diâmetro da base, a geometria da agulha, a sua espessura e ainda a sua densidade (81). Davidson *et al.* procurou avaliar qual a geometria mais eficiente para a inserção de MAs, considerando vários parâmetros como a espessura das MAs, o seu diâmetro, profundidade de inserção, espaçamento entre as MAs, entre outros (82). Determinaram que os fatores que mais significativamente afetam a inserção são a altura e o espaçamento entre os centros das MAs. No geral, observaram que as MAs devem apresentar baixa força de inserção e alta força de quebra, devem ser desenhadas para aplicação numa parte específica do corpo, devem ser suficientemente flexíveis aos contornos da pele e devem evitar a deformação da pele para que haja a sua inserção completa (82). Por fim, outro fator importante a considerar é o método de aplicação, manual ou com aplicador, pois as forças de aplicação são diferentes (14). Fornecendo instruções específicas a 20 indivíduos (Figura 8), Larrañeta *et al.* (83) determinou que as forças de inserção manuais de um sistema de MAs variava entre 10 e 50 N, reportando que a força de aplicação manual média é de 30 N (83). A força que cada MA terá de suportar irá variar com o tamanho do sistema pois, esses 30 N serão divididos pelo número total de MAs no sistema.

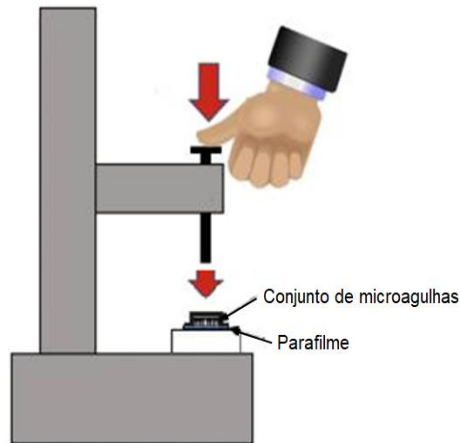


Figura 8: Esquema representativo do procedimento utilizado por Larrañeta et al. (1) para avaliar a força manual de inserção de um sistema de MAs em parafilme. Adaptado de (1).

As MAs encontram-se sujeitas a várias fontes de stress quer na sua inserção, quer na sua remoção, devido à não uniformidade da superfície da pele. Estas fontes de stress podem causar falhas como flexões e a quebra da base. Não existe um teste único que consiga considerar todos estes aspetos e caracterizar completamente o seu desempenho, assim a sua caracterização envolve normalmente um conjunto de testes (84). Um dos testes comumente utilizados para avaliar a força mecânica das MAs é o teste de força axial. Este teste envolve a aplicação de uma força perpendicular à base das MAs (84), sendo medido o deslocamento e a força aplicada às MAs até que estas fraturem ou deformem (85). Analisando as curvas de força-deslocamento observa-se uma descida brusca, sendo a força máxima antes dessa descida tomada como a força de falha das MAs (Figura 9A) (86). Alguns testes de força axial são aplicados em apenas uma MA e por isso devem ser analisados com cuidado, já que a força de falha de uma estrutura de MAs não pode ser assumida como diretamente correlacionada com a de uma única MA.

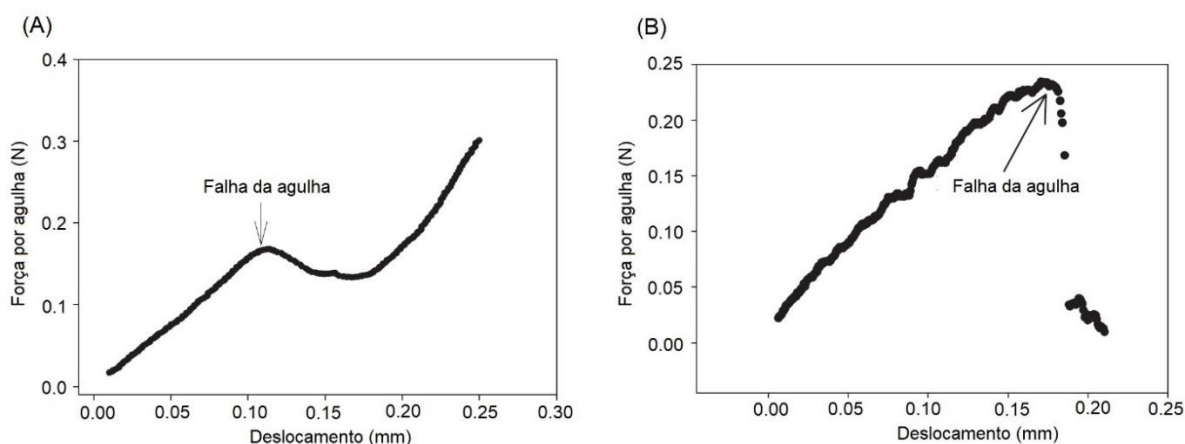


Figura 9: Gráficos de força/agulha (N) em função do deslocamento (mm). (A) Comportamento típico das MAs perante um teste de força axial. (B) Comportamento típico das MAs perante um teste de força transversal. Adaptado de (85).

Outro teste é o teste da força transversal, já que as irregularidades da pele frequentemente causam inserção incompleta da estrutura das MAs que pode causar a flexão transversal das mesmas (84). Deste modo, é necessário avaliar a força de fratura transversal e para isso uma força transversal (força aplicada paralelamente à base da MA e normal ao eixo das ordenadas da MA) é aplicada num ponto definido no eixo da MA até que esta frature (86). Tal como no teste anterior, observa-se uma descida súbita na curva força-deslocamento e essa indica a força de falha da MA (Figura 9B). O teste de força transversal pode ser realizado apenas numa MA ou num grupo de MAs (84,85). Uma grande limitação deste teste é requerer que o operador alinhe manualmente a sonda metálica para um comprimento definido na MA, o que é especialmente difícil com a dimensão micrométrica das mesmas (84).

Por último pode ser feito um teste para determinar a força e flexibilidade da base. A estabilidade da base é também um fator importante já que esta deve ser flexível o suficiente para se adaptar à topografia da pele. Para avaliar este parâmetro foi desenvolvido um teste de flexão de 3 pontos (85). Para tal coloca-se o sistema de MAs em cima de dois blocos de alumínio afastados e utilizando um texturómetro, com uma sonda de metal, é aplicada uma força (Figura 10). O pico máximo da curva força-deslocamento representa a força necessária para quebrar a placa base. É avaliada ainda a flexão da placa antes da sua fratura de forma a aferir a sua flexibilidade (85).

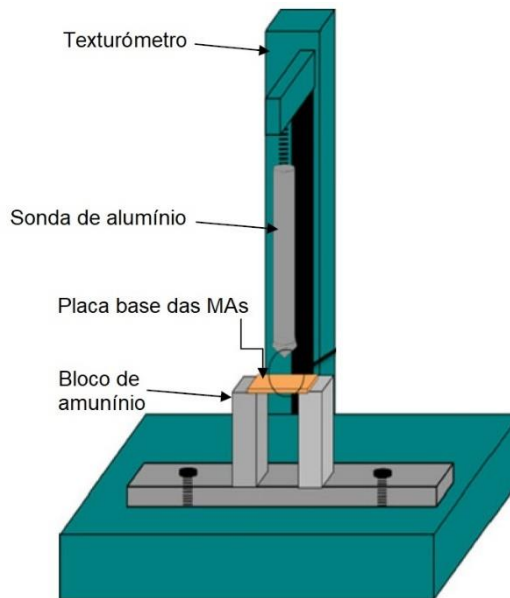


Figura 10: Representação da montagem utilizada para determinar a força de fratura da base do sistema de MAs. Adaptado de (83).

Posteriormente, tendo em conta as características mecânicas e a inserção na pele das MAs, é necessário verificar se a inserção é conseguida. Para isso, é necessário avaliar a profundidade de penetração das MAs e as dimensões dos microcanais formados, bem como o perfil de recuperação da pele (7). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a penetração das MAs é a aplicação de corantes na superfície da pele, como o azul de metileno. Estes corantes irão apenas corar as células da epiderme viável tornando visíveis os microcanais criados pelas MAs (14,87). Outras técnicas alternativas incluem a perda transepidérmica de água (88), esta baseia-se no princípio de que uma rutura na barreira da pele vai aumentar a perda de água à superfície. Ou a medição de impedância elétrica, como a *SC* proporciona isolamento elétrico, este método avalia se as MAs conseguiram com sucesso comprometer a sua função de barreira (84,89). Não obstante, os métodos apresentados apenas avaliam se a função de barreira da *SC* foi reduzida, não oferecendo informação quantitativa sobre a profundidade de inserção das MAs (84). Para obter dados sobre a inserção pode recorrer-se a microscopia confocal (90) onde, após inserção das MAs, a área é tratada com uma solução que contém micropartículas fluorescentes específicas que podem seguidamente ser detetadas por microscopia e indicam a profundidade dos poros. Outra técnica utilizada é a tomografia de coerência ótica (91), uma técnica de imagem que utiliza luz de baixa coerência para capturar imagens de

resolução micrométrica. Permite uma avaliação não invasiva da profundidade de penetração, da cinética de dissolução das MAs e do fecho dos microcanais, em tempo real e *in vivo* (7).

### **2.3. Extração de fluido intersticial**

O diagnóstico e a monitorização de patologias são cada vez mais facilitados pela análise de biomarcadores em sangue, urina, saliva e outros fluidos corporais. Mas, o sangue é o fluido regularmente mais utilizado para análises clínicas, sendo uma fonte rica de informação biológica (5). Contudo, a análise de sangue pode causar dano tecidual e desconforto ao paciente, gera resíduos de risco biológicos afiados, acarreta risco de infeção e requer profissionais médicos para a sua extração. Assim, recentemente, o FI da pele apareceu como uma alternativa promissora à amostragem de sangue. O FI faz parte do espaço intersticial, ou interstício, que é um termo geral para todos os tecidos conjuntivos e de suporte que estão fora do sangue, vasos linfáticos e células do parênquima. Consiste em água intersticial e os seus solutos, e é responsável por transportar nutrientes e produtos residuais resultantes do metabolismo entre as células e os capilares sanguíneos, moléculas de sinalização entre as células, e antigénios e citocinas para nódulos linfáticos de drenagem local para regulação imunitária (24). Tendo em conta que é formado por filtração transcápilar do sangue, a sua composição é semelhante à do plasma e varia consoante as mudanças fisiológicas (24).

As MAs apresentam grande potencial e algum sucesso na extração de FI (19,32,45,68,69,79,80,92). As MAs sólidas e perfuradas permitem gerar poros ou canais na pele através dos quais o FI pode ser extraído por capilaridade ou utilizando vácuo. Wang *et al.* (45) reporta a aplicação de MAs sólidas como pré-tratamento e seguida a aplicação de vácuo para extração de FI. Foi possível extrair 1-10 µL de FI por este método para a determinação de glucose. Encontrou-se uma correlação entre os níveis de glucose determinados no FI e no sangue, o que mostra a obtenção dos níveis de glucose com precisão a partir da amostra de FI. Além disso, foi também possível detetar no FI a mudança repentina nos níveis de glucose após a administração de insulina (45). É também reportada a utilização de MAs perfuradas para a extração de fluido intersticial, com sucesso na extração e análise de analitos presentes no FI (68,69). Strambini *et al.* (69) reporta a aplicação de MAs perfuradas, colocadas numa placa com um reservatório no



verso. Por capilaridade conseguiram um “uptake” de FI de 1  $\mu\text{L/s}$ . Determinaram a concentração de glucose através de um biossensor enzimático inserido no verso da placa, sendo necessário preencher o reservatório de 5  $\mu\text{L}$  com FI (69). Ito *et al.* (92) reporta ainda a utilização de MAs solúveis, de uma forma semelhante à reportada para MAs sólidas. As MAs são inseridas na pele e dos microcanais formados foi extraído o FI recorrendo a uma pipeta (92).

As MAs intumescíveis são uma alternativa às mencionadas anteriormente pois permitem a extração de FI recorrendo apenas a um passo, extraindo o FI pela sua capacidade de intumescer sem a necessidade de dispositivos extra. É reportado o uso das MAs de poli(metil vinil eter/anidrido maleico) e poli(etileno glicol) e de ácido hialurónico metacrilatado para extração de FI com êxito na análise de diversos analitos (32,79,80). Caffarel-Salvador *et al.* (79) reporta o uso de MAs de poli(metil vinil eter/anidrido maleico) e poli(etileno glicol) aplicadas na pele de ratos durante 1h em que as concentrações de glucose no FI extraído refletiam a tendência das concentrações de glucose no sangue. Chang *et al.* (32) utilizou MAs de ácido hialurónico metacrilatado para extrair FI aplicadas em pele de ratos. Estas em 10 minutos conseguiram extrair FI suficiente para analisar os níveis de glucose e colesterol. Os níveis de glucose detetados no FI estavam de acordo com aqueles detetados no sangue dos ratos. Contudo, os níveis de colesterol detetados no FI apresentaram uma tendência semelhante àqueles do sangue, mas em concentração mais baixa. Isto pode indicar a necessidade de uma calibração especial. Ainda assim, mostrou a extração de FI com êxito utilizando apenas MAs intumescíveis sem necessidade de outros equipamentos e de um processo mais complexo (32).

Neste contexto, neste trabalho iremos então produzir microagulhas intumescíveis biopoliméricas para extração de fluido intersticial utilizando carboximetilcelulose, ácido cítrico e celulose microcristalina. A produção destas MAs vem colmatar a procura por dispositivos menos invasivos, produzidos com materiais de origem natural, ou derivados de produtos naturais, não tóxicos e biocompatíveis que permitam alargar a utilização do FI para aplicações de diagnóstico e monitorização. A carboximetilcelulose (CMC) é um composto aniónico, solúvel em água obtido pela esterificação do grupo hidroxilo primário da celulose (93). Apesar da diversidade de polímeros naturais, a celulose e os seus derivados têm sido amplamente utilizados em várias aplicações biomédicas (93,94). Como a CMC é um polímero solúvel, iremos reticulá-la com o ácido cítrico de forma a produzir

um polímero intumescível, ou um hidrogel. O ácido cítrico (AC) é um agente de reticulação utilizado em sistemas com celulose (95–97). Existe em vários tecidos animais e vegetais, e possui funções biológicas fundamentais, como o seu envolvimento no ciclo de Krebs como intermediário para obtenção de energia útil (98). A sua utilização pretende ultrapassar a questão da maior toxicidade e custos associados a outros agentes reticulantes, sendo um composto amplamente utilizado na indústria alimentar como um aditivo natural seguro (96,97). De forma a tornar as MAs estrutural e mecanicamente mais estáveis irá testar-se a integração de celulose microcristalina na formulação das MAs. A celulose microcristalina (CM), comercializada como Avicel®, é uma substância obtida através de celulose purificada e parcialmente despolimerizada, caracterizada por um elevado grau de cristalinidade. Na sua forma em pó, é utilizada como aglutinante e como preenchimento na indústria alimentar e farmacêutica, e como agente de reforço no desenvolvimento de compósitos poliméricos. De entre várias vantagens incluem-se, a cristalinidade, biodegradabilidade, renovabilidade e não toxicidade (99). Assim pretende-se que estas MAs ofereçam uma alternativa de amostragem mais natural, menos invasiva que permita a extração de FI para aplicações mais alargadas.

### 3. Materiais e métodos

Neste capítulo apresentam-se todos os materiais e métodos utilizados na preparação de sistemas de MAs intumescíveis com CMC, AC e CM e na caracterização de todas as amostras preparadas.

#### 3.1. Materiais

Carboximetilcelulose (CMC) sal de sódio (grau de substituição:1,2, peso molecular médio: ~250 000), celulose microcristalina (CM) (Nome comercial: Avicel® PH-101, tamanho de partículas ~ 50 µm) e ácido cítrico (AC) anidro (99,6%, para análise ACS), foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A linha celular de queratinócitos humanos imortalizados e não cancerígenos HaCaT foi obtida da Cell Lines Services (Eppelheim, Alemanha). A solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal de bovino, L-glutamina, penicilina/estreptomicina e fungizone foram obtidos da Gibco® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 98%) foi adquirido à Sigma-Aldrich.

#### 3.2. Preparação dos sistemas de microagulhas com carboximetilcelulose e ácido cítrico

##### 3.2.1. Otimização da concentração de carboximetilcelulose

Os sistemas de MAs foram preparados por micromoldagem utilizando moldes de PDMS com 11×11 MAs de dimensão, apresentado na figura 11.

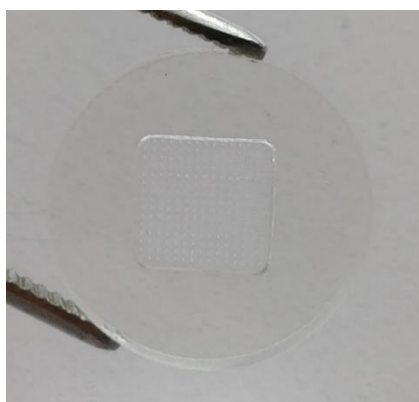


Figura 11: Molde de PDMS utilizado para preparar as MAs.

Prepararam-se MAs com soluções de CMC com diferentes concentrações, 5%, 7,5% e 10% (% m/v). Foi utilizada uma concentração de 10% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução) de ácido cítrico. Os moldes foram preenchidos progressivamente por adições de 40  $\mu$ L de solução, com centrifugações de 6000 rpm durante 5 minutos entre cada adição, até o molde estar totalmente preenchido. Posteriormente, durante a evaporação do solvente seguiram-se duas metodologias diferentes. Num método os moldes foram colocados numa estufa a 30 °C durante a noite, para evaporação do solvente e seguidamente a 80 °C durante 24 h, para ocorrer a reação de reticulação. No outro método, durante a evaporação do solvente a 30 °C adicionou-se 3 vezes solução até ao topo do molde, após as 3 adições manteve-se a solução a 30 °C durante a noite e posteriormente a 80 °C durante 24 h.

### **3.2.2. Otimização da concentração de ácido cítrico**

Depois da otimização da concentração de CMC, produziram-se MAs com a concentração fixa de 7,5% (% m/v) de CMC, e com concentrações variáveis de AC, 5%, 7,5% e 10% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução). As MAs foram obtidas seguindo um procedimento igual ao descrito anteriormente (ponto 3.2.1).

### **3.3. Incorporação de celulose microcristalina na formulação das microagulhas**

Para a otimização da concentração de CM utilizaram-se concentrações fixas de CMC e AC, 7,5% e 10% (% m/v), respetivamente, e quantidades variáveis de CM, 5%, 10% e 15% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução). As MAs foram obtidas seguindo um procedimento igual ao descrito anteriormente (ponto 3.2.1).

## **3.4. Caracterização das amostras**

### **3.4.1. Análise morfológica**

A caracterização morfológica foi realizada recorrendo a uma lupa Nikon SMZ18. Foi medida a altura de 15 MAs de forma aleatória em 3 sistemas de MAs de cada amostra. As alturas foram medidas recorrendo ao programa NIS-Elements, versão 4.50.00, Copyright 1991-2015 Laboratory imaging.

### 3.4.2. Análise mecânica

Para a caracterização mecânica foi realizado um teste de compressão axial recorrendo a um equipamento TA.XT. Plus C equipado com uma sonda de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro. Os dados do teste foram obtidos pelo programa Exponent connect, versão 7.0.3.0, copyright 2019, registado à Universidade de Aveiro. As definições do aparelho foram as seguintes, modo de teste: compressão, velocidade pré teste: 0,1 mm/s, velocidade de teste: 0,01 mm/s e velocidade pós teste: 10,0 mm/s.

### 3.4.3. Análise de FTIR

A análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada num espectrofotómetro Perkin Elmer. As amostras foram analisadas em modo de absorção (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , 32 scans, e uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.4.4. Avaliação do intumescimento das microagulhas

Para avaliar o intumescimento, 3 sistemas de MAs de cada amostra foram aplicados num hidrogel de agarose com 1,4% (% m/m), através de parafilme colocado na superfície do hidrogel de forma a mimetizar de melhor forma a inserção das MAs na pele. As MAs foram pesadas antes do ensaio ( $m_0$ ), de seguida inseridas no hidrogel de agarose através do parafilme, onde permaneceram durante 30 min. Após o intumescimento as MAs foram pesadas ( $m_i$ ), e a percentagem de intumescimento foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{m_i - m_0}{m_0} \times 100$$

Seguidamente as MAs foram colocadas numa estufa a 40°C para secarem até estabilização da massa e posteriormente foram pesadas ( $m_s$ ), e foi calculado o grau de perda de massa através da seguinte fórmula:

$$\text{Grau de perda de massa (\%)} = \frac{m_0 - m_s}{m_0} \times 100$$

As MAs foram também observadas na lupa antes e depois do intumescimento. Também na lupa foram medidas as suas dimensões, nomeadamente a altura e largura da base, antes e depois do intumescimento.

### 3.4.5. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O potencial citotóxico das amostras foi avaliado numa linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT) usando o ensaio do MTT. O ensaio envolve a conversão do MTT, solúvel em água, no formazan, insolúvel em água, cuja concentração após solubilização é determinada pela absorbância a 570 nm. As células cresceram em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino, 2 mM L-glutamina, 10 000 U/mL penicilina/estreptomicina e 250 µg/mL fungizone a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera humidificada. As células foram observadas diariamente num microscópio eclipse T100 (Nikon, Tóquio, Japão). O teste foi realizado com os sistemas de microagulhas de CMC 7,5% + AC 10% e CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%. Como controlo negativo as células foram expostas apenas ao meio e a viabilidade das células foi calculada relativamente às células controlo, segundo a fórmula que se segue. Não foi testado um controlo positivo.

$$\text{Viabilidade das células (\%)} = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{DMSO}}{Abs_{amostra} - Abs_{DMSO}} \times 100$$

As amostras foram lavadas em água ultrapura e depois esterilizadas com etanol a 70%. Seguidamente, foram lavadas em PBS várias vezes de forma a remover completamente o etanol. Posteriormente, foram incubadas com 1,5 mL de meio DMEM completo a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h para preparação do extrato. Foram preparadas placas com 6000 células/poço e estas foram incubadas no meio de cultura durante 24 h para adesão. Após as 24 h, o meio foi retirado dos poços e substituído por 100 µL do extrato, e as células incubadas durante mais 24 h. O extrato foi previamente diluído 1:2 com meio DMEM. No final da incubação, adicionou-se 50 µL de MTT (1 g/L) a cada poço e incubaram-se as placas durante 4 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> com atmosfera humidificada. Posteriormente, o meio de cultura com MTT foi removido e substituído por 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa colocada num agitador por 2 h no escuro de forma a dissolver completamente os cristais de formazano. A absorbância das amostras foi medida com um BioTek Synergy HT plate reader (Synergy HT Multi-Mode, BioTeK, Winooski, VT) a 570 nm com correções de branco.

### **3.4.6. Análise estatística**

Os dados foram testados para o seu ajuste à distribuição normal e os requisitos de homogeneidade de variâncias também foram determinados. As análises de variância foram realizadas através de ANOVA unidirecional, perante a análise de 3 ou mais grupos, seguidas de procedimentos de comparação múltipla em pares (teste de Tukey). Para o teste mecânico, devido à elevada densidade de dados retirados à medida que a sonda se desloca, definiram-se pontos com 0,05 mm de distância entre eles e apenas esses foram analisados estatisticamente. Para a análise de apenas dois grupos de amostras utilizou-se o teste de t não emparelhado.

#### 4. Resultados e discussão

Antes de iniciar a preparação de MAs e a otimização do processo de produção preparámos e caracterizámos filmes de CMC reticulada com AC de acordo com método reportado por Capanema *et al* (95), para adquirir sensibilidade com o sistema e escolher quais as melhores condições para preparar as MAs. Com base no conhecimento adquirido pelo comportamento dos filmes foram determinadas que seriam testadas concentrações de 5%, 7,5% e 10% (% m/v) de CMC e 5%, 7,5%, 10% (% m/v, relativamente à concentração total de CMC) de AC para a produção de MAs intumescíveis. Produziram-se então MAs com CMC, AC (agente reticulante) e CM (reforço mecânico), cujas estruturas químicas se apresentam na figura 12.

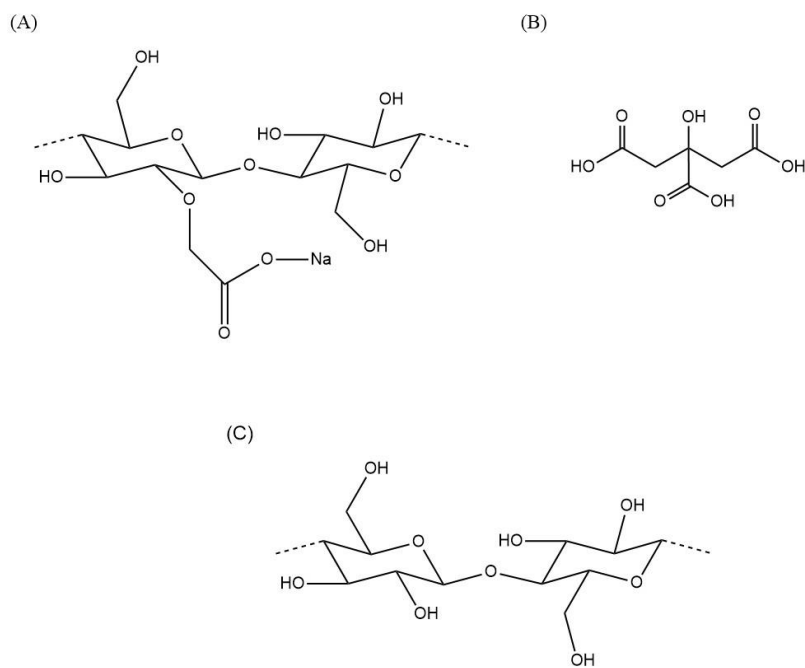


Figura 12: Estrutura química da (A) carboximetilcelulose, (B) ácido cítrico e (C) celulose microcristalina.

O primeiro passo relativo à produção das MAs foi a otimização da concentração de CMC, seguido da otimização da concentração de AC e posteriormente da incorporação de CM na formulação como reforço mecânico. De forma a determinar quais as melhores formulações as amostras foram caracterizadas morfológica e mecanicamente, e quanto à



sua composição/estrutura. As melhores formulações resultantes do processo de otimização, que apresentaram melhores características mecânicas e morfológicas, avançaram para a fase seguinte na qual se avaliou o intumescimento e a citotoxicidade. Na figura 13 apresenta-se um esquema que sumariza todo o trabalho desenvolvido.

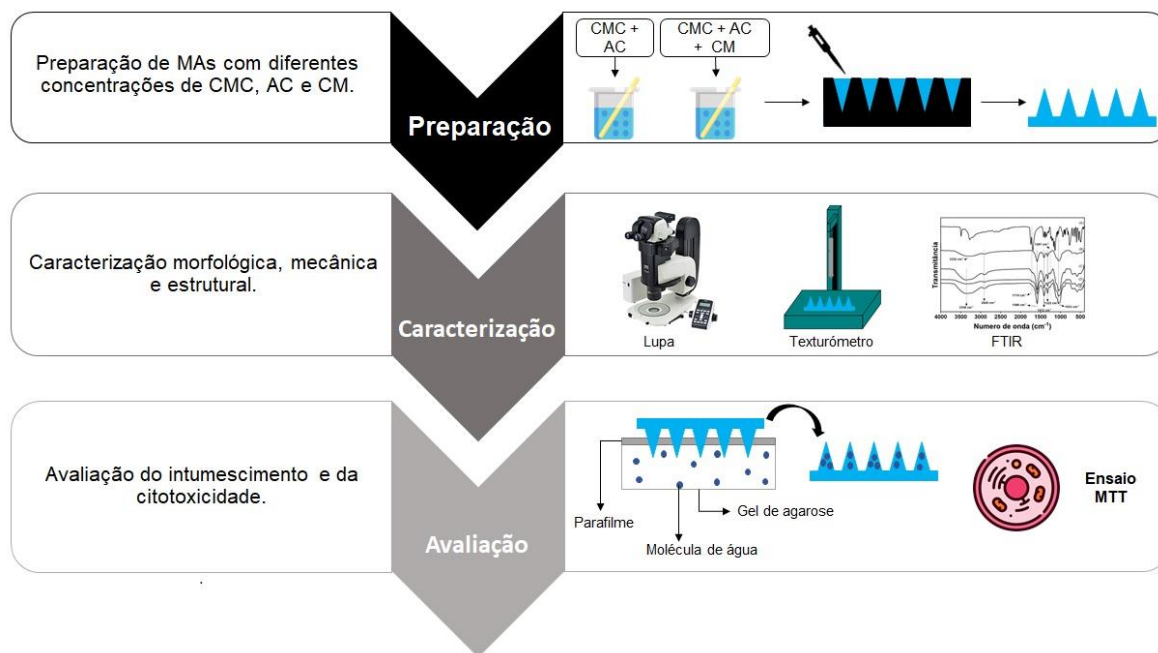


Figura 13: Representação esquemática do processo de desenvolvimento de MAs intumescíveis para a extração de fluido intersticial.

#### 4.1. Preparação dos sistemas de microagulhas com carboximetilcelulose e ácido cítrico

##### 4.1.1. Otimização da concentração de carboximetilcelulose

Para a otimização da concentração de CMC produziram-se sistemas de MAs com apenas CMC e AC, utilizando diferentes concentrações de CMC, 5%, 7,5% e 10% (% m/v), e uma concentração fixa de AC de 10% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução). A observação das MAs na lupa mostrou que os sistemas com 5% de CMC apresentavam MAs ocas com apenas as pontas preenchidas. As MAs com 7,5% de CMC estavam completamente preenchidas com pontas bem definidas. Já a solução com 10% de CMC, por ser demasiado viscosa impediu o preenchimento total do molde não

sendo possível produzir sistemas de MAs completos. Na figura 14 apresentam-se as fotografias obtidas na lupa das MAs para as concentrações de 5% e 7,5% de CMC.

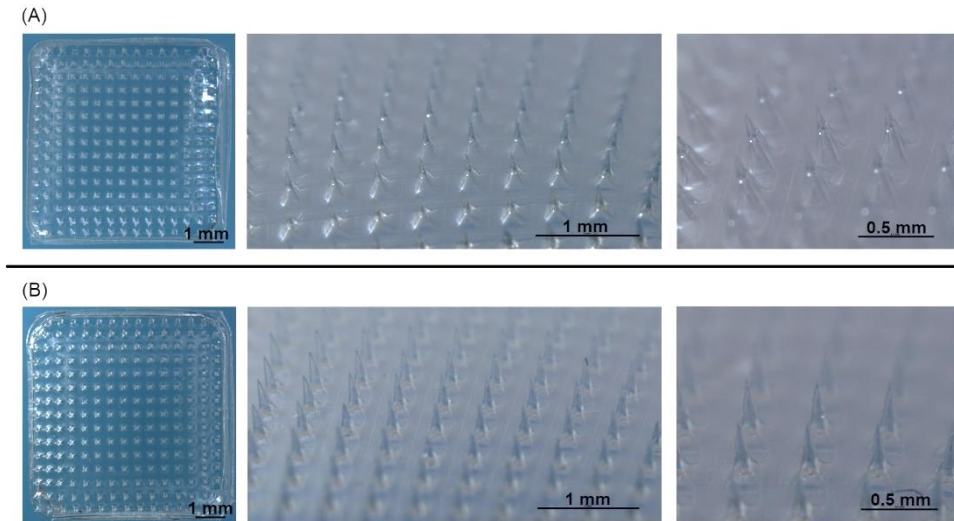


Figura 14: Fotografias das microagulhas obtidas na lupa dos sistemas de MAs para as diferentes concentrações de CMC. (A) CMC 5%; (B) CMC 7,5%.

As microagulhas apresentam alturas médias de  $0,430 \pm 0,004$  mm para 5% de CMC e  $0,430 \pm 0,002$  mm para 7,5% de CMC. Como o aumento da concentração de CMC aumenta a viscosidade da solução de partida o preenchimento do molde poderia ser afetado. Por isso, realizou-se a análise estatística das alturas das MAs que não revelou diferenças significativas entre a altura das MAs de 5% e 7,5% de CMC ( $p > 0,05$ ). Na figura 15 apresenta-se um diagrama de barras da média das alturas das MAs para as diferentes concentrações de CMC, com os respectivos desvios padrão e as diferenças estatísticas.

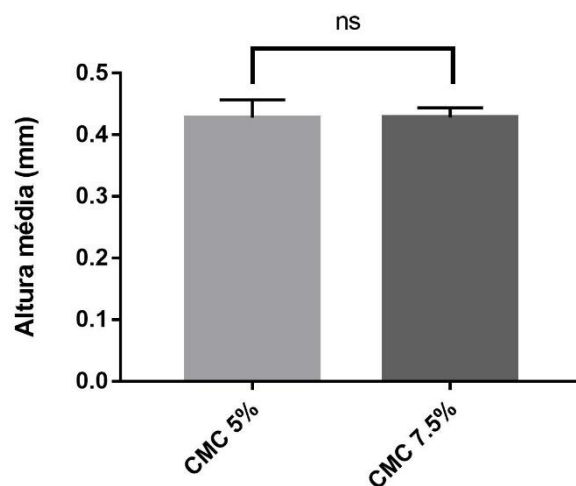


Figura 15: Altura média (mm) das MAs obtidas para as diferentes concentrações de CMC (5% e 7,5% (% m/v)) com os valores de p obtidos pelo teste t (ns – não significativo).

O teste de compressão axial foi realizado para avaliar a força mecânica das MAs, os resultados obtidos apresentam-se na figura 16.

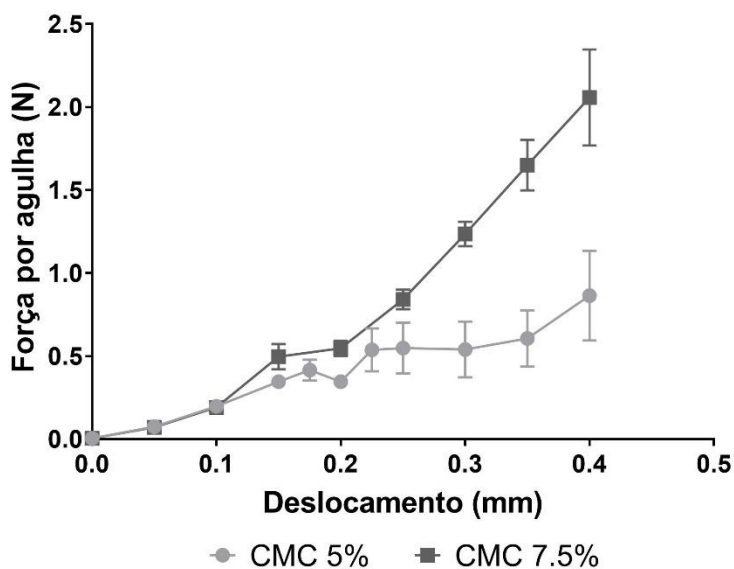


Figura 16: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de carboximetilcelulose (5% e 7,5% (% m/v)).

Este gráfico mostra-nos que o aumento da concentração de CMC promove um aumento na força mecânica das MAs a partir do deslocamento de 0,1 mm (Figura 16). A força semelhante que se verifica entre os deslocamentos de 0 e 0,1 mm para as duas amostras pode relacionar-se com o aspeto das MAs visível na Figura 14. Para ambas as concentrações produziram-se MAs com as pontas preenchidas, deste modo ambas as amostras suportam forças semelhantes na ponta das MAs. No entanto, à medida que avançamos no corpo das MAs aquelas que não estão preenchidas, CMC 5%, suportam forças inferiores. Na figura 17 podemos observar qual o comportamento das MAs após a compressão axial para 4 deslocamentos diferentes (0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm). Verifica-se a compressão das MAs de CMC 5%, enquanto que as de CMC 7,5% dobram ao invés de comprimirem.

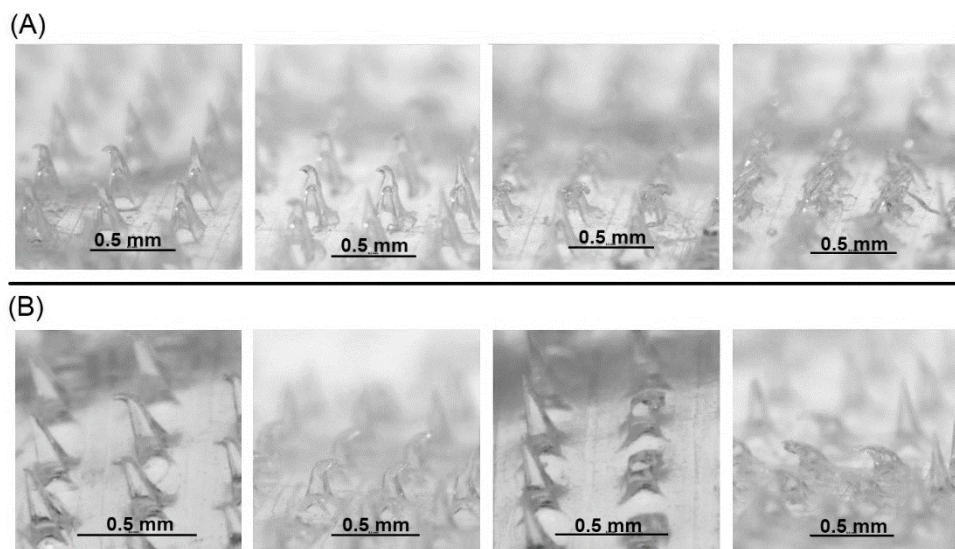


Figura 17: Fotografias das MAs obtidas na lupa para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de CMC 5%; (B) Amostra de CMC 7,5%.

Para verificar se a força suportada pelas MAs era significativamente diferente realizaram-se testes estatísticos e os dados encontram-se representados na figura 18. Para o deslocamento de 0 mm as diferenças não são significativas, para todos os restantes deslocamentos verificam-se diferenças significativas entre a força suportada pelas MAs

( $p < 0,05$ ). Sendo a força suportada pelas MAs de CMC 7,5% significativamente superior relativamente às MAs de CMC 5%.

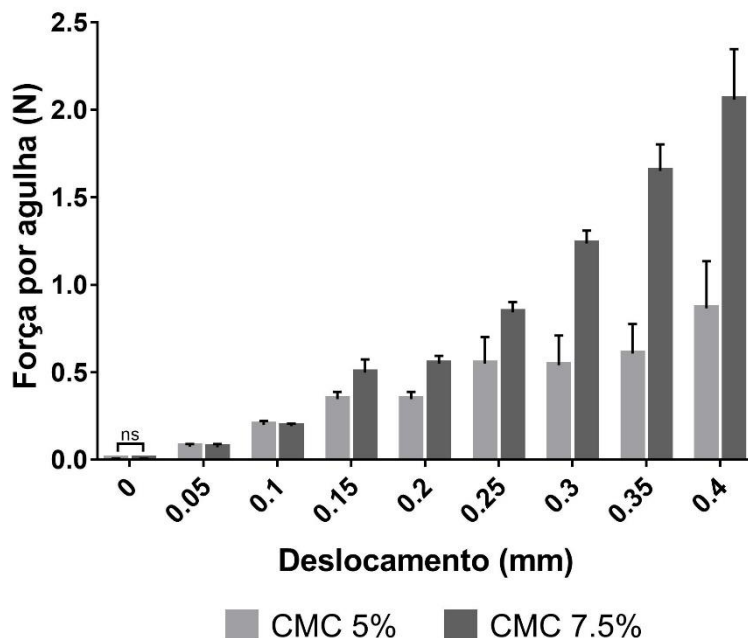


Figura 18: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de carboximetilcelulose (5% e 7,5% (% m/v)) com os valores de  $p$  não significativos obtidos pelo teste de  $t$  não emparelhado (ns – não significativo).

Por se verificar que as MAs de 5% CMC se encontravam pouco preenchidas no seu corpo, testamos outro método para preencher os moldes. Neste método adicionou-se solução do polímero durante a secagem do sistema de MAs. O método não se revelou eficaz, pois não foi possível produzir MAs totalmente preenchidas com a solução de CMC 5%. Apenas se obtiveram MAs completas na extremidade do sistema onde se verificou maior acumulação de polímero. Adicionalmente, devido à adição de solução durante a secagem formaram-se bolhas na base do sistema de MAs. Com a solução de CMC 7,5% obtiveram-se MAs completas, o que já se tinha conseguido anteriormente, mas observou-se também a formação de bolhas. Desta forma, decidimos optar pelo método mais simples, sem adição de solução durante a secagem, já que o método mais complexo não resultou em MAs mais preenchidas e uniformes. Na figura 19 apresentam-se as fotografias obtidos por microscopia ótica das MAs produzidas pela adição de solução durante a secagem.

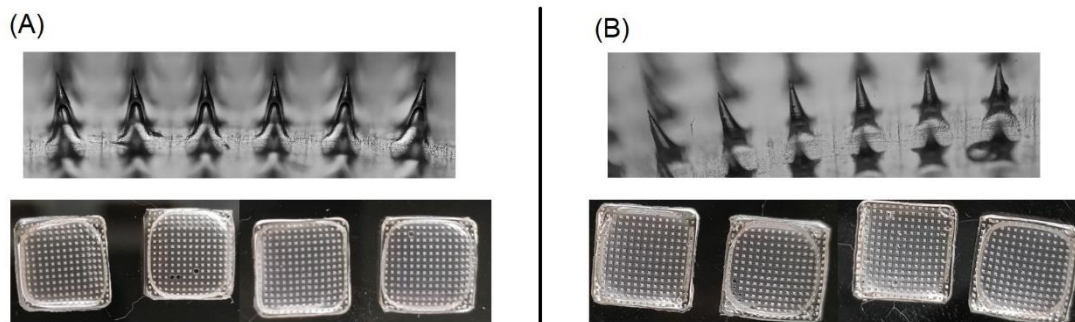


Figura 19: Fotografias das microagulhas produzidas por adição durante a secagem, obtidas no microscópio ótico, e dos sistemas de MAs para as diferentes concentrações de CMC. (A) CMC 5%; (B) CMC 7,5%.

Tendo em conta os resultados obtidos para as concentrações de CMC testadas determinou-se que 7,5% (% m/v) de CMC seria a melhor concentração a utilizar na produção de MAs. Justifica-se a escolha pelo melhor aspeto morfológico das MAs, mais preenchidas, com pontas mais afiadas e por suportarem força mecânica superior. Para outros sistemas de MAs solúveis de CMC na literatura são reportadas concentrações mais baixas (100–102) de CMC. Lee *et al.* (103) reporta a utilização de concentrações mais elevadas mas recorrem à utilização de CMC de ultrabaixa viscosidade. No entanto, reportam MAs de aspeto semelhante às obtidas com 7,5% (% m/v), preenchidas e afiadas (100,101,103).

#### 4.1.2. Otimização da concentração de ácido cítrico

O AC é o agente reticulante utilizado neste estudo e a experiência preliminar com filmes mostrou que a sua concentração tem um efeito importante nas propriedades do hidrogel. Neste sentido, testamos três concentrações de AC, nomeadamente 5%, 7,5% e 10% (% m/v), as quais foram escolhidas com base no comportamento observado com os filmes, preparados previamente pelo método de Capanema *et al.* (95). A experiência com os filmes permitiu depreender que concentrações superiores a 10% de AC nas MAs não iriam possibilitar a absorção satisfatória de fluido.

Na lupa observou-se para todas as concentrações de ácido cítrico a produção de MAs e sistemas de MAs totalmente completos (Figura 20). As MAs com 10% de AC apresentam o melhor aspeto morfológico, com pontas bem definidas e menos



irregularidades ao longo do seu corpo, quando comparadas com as MAs produzidas com 5% e 7,5% de AC. É importante realçar que estas irregularidades são apenas utilizadas como comparação entre as diferentes amostras, pois para o aspeto geral das MAs estas não são significativas. A presença de pontas afiadas e bem definidas é uma característica de interesse pois estudos prévios reportam que a pele pode ser perfurada mais facilmente se a ponta das MAs for mais afiada (89,104).

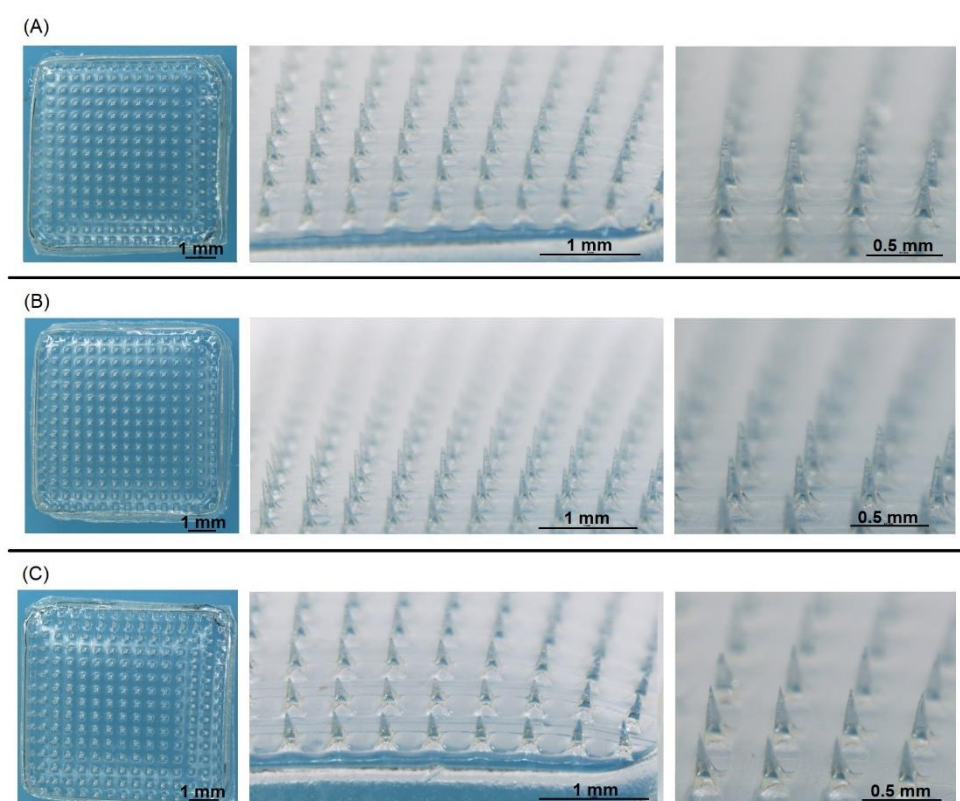


Figura 20: Fotografias dos sistemas de MAs obtidas na lupa. (A) AC 5%; (B) AC 7,5%; (C) AC 10%.

As microagulhas apresentam alturas médias de  $0,43 \pm 0,03$  mm para 5% de AC,  $0,42 \pm 0,03$  mm para 7,5% de AC e  $0,40 \pm 0,03$  mm para 10% de AC. A análise estatística revelou diferenças significativas entre a altura das MAs de 5% e 7,5% de AC ( $p < 0,05$ ), entre as MAs de 5% e 10% ( $p < 0,05$ ) e entre as MAs de 7,5% e 10% de AC ( $p < 0,05$ ). Na figura 21 apresenta-se um diagrama de barras da média das alturas das MAs para as diferentes concentrações de AC, no mesmo diagrama encontram-se representadas as diferenças estatísticas para cada par analisado.

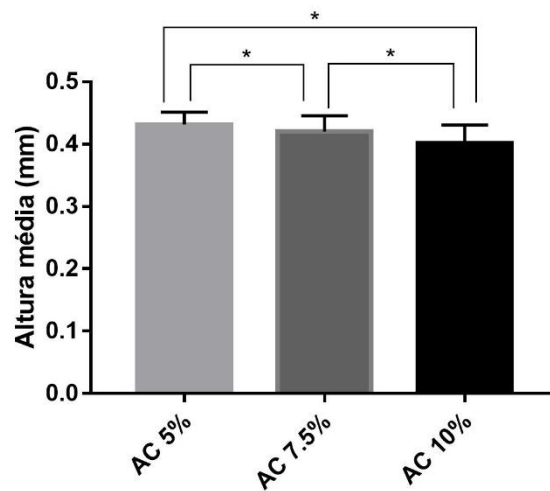


Figura 21: Diagrama de barras da altura média (mm) das MAs obtidas para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%, 7,5% e 10% (% m/v)) com os valores de  $p$  obtidos pelo teste de Tukey (\* –  $p < 0,05$ ).

O teste de compressão axial realizou-se para avaliar a força mecânica das MAs e os resultados obtidos apresentam-se na figura 22.

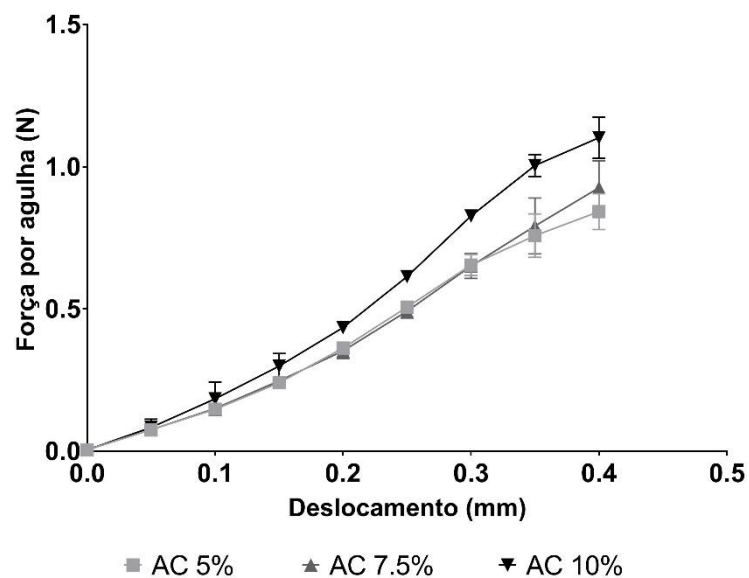


Figura 22: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%, 7,5% e 10% (% m/v)).



Relativamente à força mecânica podemos aferir que as MAs com 5% e 7,5% de AC apresentam força mecânica semelhante entre elas e inferior relativamente às MAs com 10% de AC (Figura 22). Este comportamento está de acordo com o aumento de agente reticulante estar associado ao aumento do número de ligações entre os grupos funcionais das cadeias poliméricas, aumentando a rigidez e coesão da rede do polímero reticulado (95). Estudos anteriores reportam que a força de aplicação manual média é de 30 N, o que para o nosso sistema de MAs corresponde a 0,13 N/agulha (83). Desta forma, prevê-se que as MAs produzidas necessitem de suportar 0,13 N/agulha, para conseguirem perfurar a pele. Contudo, é importante ter em conta que existem vários fatores que podem influenciar a força necessária para inserir as MAs na pele, sendo este valor apenas uma estimativa teórica. As MAs de 5% de AC suportam mais de 0,13 N/agulha a partir de um deslocamento de ~0,087 mm, as de 7,5% de AC a partir de ~0,086 mm, e as de 10% de AC a partir de ~0,093 mm, sendo que até estes deslocamentos dobram com o aumento da força aplicada. Estes resultados mostram que as MAs com 5% e 7,5% de AC aguentam a força teoricamente necessária para penetrar a pele para um deslocamento mais curto, isto pode ser resultado de estas MAs apresentarem pontas menos afiadas do que as de 10% de AC que serão mais frágeis para o mesmo deslocamento por serem mais afiadas. Todavia por serem mais afiadas podem conseguir *in vivo* uma inserção mais fácil como é reportado em estudos anteriores (89,104). As curvas no gráfico (Figura 22) mostram-nos ainda que as MAs, independentemente da concentração de AC, não apresentam força de falha, isto é não quebram. Ao invés de quebrar dobram à medida que a sonda se desloca e lhes aplica força crescente, este comportamento está ilustrado na Figura 23 para as três amostras. Do ponto de vista da segurança do paciente é preferível este comportamento, pois se as MAs quebrarem podem deixar resíduos indesejáveis na pele.

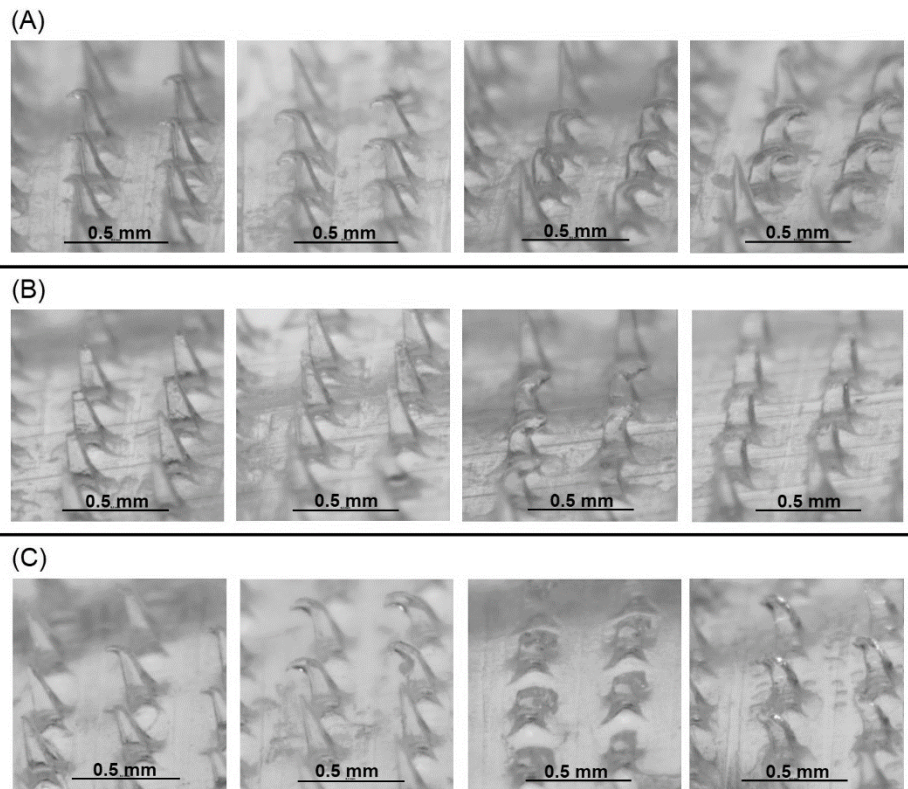


Figura 23: Fotografias das MAs obtidas na lupa para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de AC 5%; (B) Amostra de AC 7,5%; (C) Amostra de AC 10%.

Lee *et al.* (103) reportou MAs piramidais de CMC, produzidas por micromoldagem, que não apresentam um ponto de transição distinto indicativo de falha das MAs durante o teste de compressão axial. As MAs mostram uma deformação progressiva com o deslocamento da sonda e o aumento da força aplicada (103). Raphael *et al.* (105) reporta a produção de microagulhas de CMC, por micromoldagem, que perante um teste axial também curvam. Sendo reportado que as MAs começam a curvar significativamente quando uma força de  $0,00702 \pm 0,00208$  N/agulha é aplicada, e essa é interpretada como a força de falha apesar das MAs não quebrarem (105). Esta curvatura ocorre para um deslocamento entre 5–20  $\mu\text{m}$ . Raphael *et al.* mostra ainda que as MAs produzidas conseguem penetrar a pele da orelha de ratinhos, o que é interpretado como uma indicação de que têm força mecânica suficiente (105). Yan *et al.* (100), produziu MAs de CMC e nanocompósitos de CMC, por micromoldagem, que apresentam forças de falha

entre os 5-11 mN, força semelhante à reportada no artigo referido anteriormente (105), e que também foram capazes de penetrar pele de porco e humana com sucesso.

O comportamento, perante o teste mecânico, das MAs produzidas nesta dissertação estão de acordo com o comportamento de outras MAs de CMC reportadas na literatura (100,103,105). Tendo em conta que as MAs preparadas apresentam para um deslocamento entre 5–20  $\mu\text{m}$  suportar forças aproximadamente entre 0,017 e 0,023 N/agulha, indica assim que são mais fortes do que aquelas reportadas por Raphael *et al.* (105) e Yan *et al.* (100). Os dados reportados para a força de inserção das MAs podem indicar que as MAs desenvolvidas na presente dissertação possivelmente conseguiriam penetrar a pele de ratinhos, porco ou pele humana, visto que possuem força mecânica superior. Não obstante, é necessário notar que os artigos apresentados referem-se a MAs de CMC solúveis, consequentemente utilizam apenas CMC e não CMC reticulada. É também importante realçar que os estudos utilizam diferentes tipos de CMC, com diferentes graus de substituição e de polimerização, e em diferente concentração daquelas preparadas no nosso estudo. Para além das características do material, é importante considerar também que a pele possui propriedades e características variadas que introduzem um nível de complexidade significativo, como a diferente composição celular e diferente nível de hidratação que variam ao longo das camadas da pele, e com o local do corpo (106). Deste modo, as MAs podem comportar-se e falhar de forma diferente quando aplicadas na pele (105,106).

No sentido de avaliar se as forças suportadas pelas diferentes amostras apresentavam diferenças significativas realizou-se a análise estatística e os dados encontram-se representados na figura 24. Os dados permitem inferir relativamente à comparação das MAs com concentração de 5% e 7,5% de AC que apenas para o deslocamento de 0,2 e 0,4 mm ( $p < 0,05$ ) se verificam diferenças significativas. Para as concentrações de 5% e 10% de AC para todos os deslocamentos, exceto 0 mm, se verificam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Finalmente, para as concentrações de 7,5% e 10% não se verificam diferenças significativas para 0 e 0,1 mm, verificando-se para os restantes deslocamentos ( $p < 0,05$ ). Como as MAs com concentração de 10% de AC apresentam força mecânica significativamente superior a partir de 0,05 mm de deslocamento será daqui em diante utilizada apenas a concentração de 10% (% m/v) de AC para fabricar MAs.

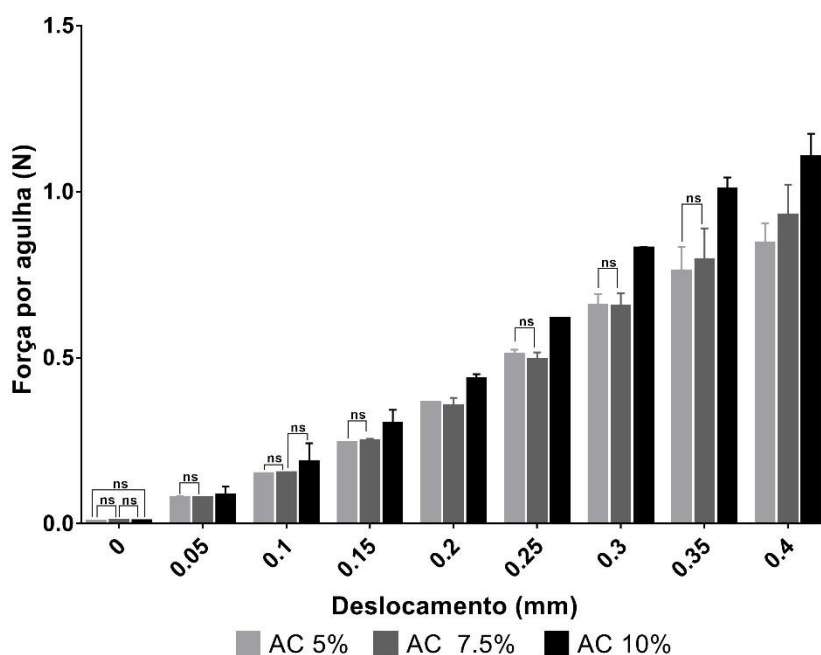


Figura 24: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de ácido cítrico (5%,7,5% e 10% (% m/v)) com os valores de p não significativos obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo).

Estas amostras foram também analisadas por espectroscopia de infravermelho, de forma a confirmar a sua estrutura. Realizamos esta análise para estas amostras por já ser uma formulação mais otimizada, e pelo grande objetivo de confirmar a reação de reticulação. Na figura 25 apresentam-se os espectros das amostras reticuladas, bem como dos respetivos compostos puros. O espectro de FTIR das amostras de CMC reticulada com AC mostraram bandas aos  $3358\text{ cm}^{-1}$  (alongamento do O-H),  $2920\text{ cm}^{-1}$  (alongamento do  $\text{CH}_2$ ),  $1586\text{ cm}^{-1}$  (vibração do  $\text{COO}^-$ ),  $1412\text{ cm}^{-1}$  (vibração do  $\text{COO}^-$ ),  $1322\text{ cm}^{-1}$  (vibração do  $\text{COO}^-$ ),  $1261\text{ cm}^{-1}$  (vibração do alongamento do C-O) e aos  $1053\text{ cm}^{-1}$  (alongamento do C-O-C). Adicionalmente, os espectros das amostras reticuladas apresentam um pico característico nos  $1719\text{ cm}^{-1}$  relativo ao alongamento do grupo C=O de ácidos carboxílicos e dos grupos éster. É reportado na literatura que a coexistência de carboxilatos (bandas nos  $1586\text{ cm}^{-1}$ ,  $1412\text{ cm}^{-1}$  e  $1322\text{ cm}^{-1}$ ) e de ácidos carboxílicos (bandas nos  $1719\text{ cm}^{-1}$  e  $1261\text{ cm}^{-1}$ ) ocorre devido à substituição do  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  nas cadeias da CMC durante a acidificação promovida pelo AC (95). A vibração aumentada nos  $1261\text{ cm}^{-1}$  nas amostras reticuladas é atribuída ao C-O das ligações éster formadas (95). Para além disso, a

vibração observada aproximadamente aos  $1719\text{ cm}^{-1}$  indica mudanças nas ligações éster resultado da reação de reticulação (107,108).

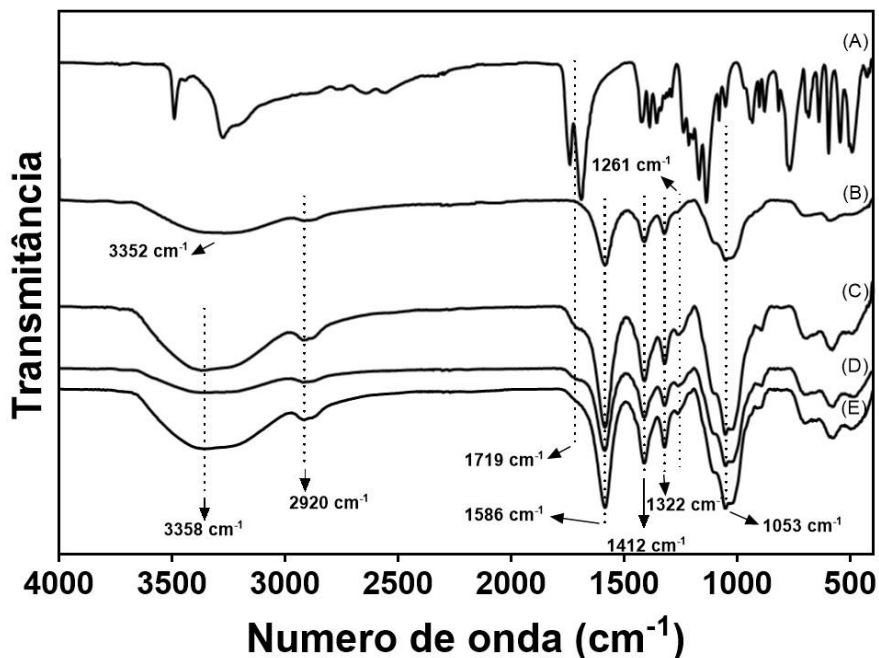


Figura 25: Espectro de FTIR das amostras reticuladas e dos compostos puros constituintes. (A) AC; (B) CMC; (C) CMC 7,5% + AC 5%; (D) CMC 7,5% + AC 7,5%; (E) CMC 7,5% + AC 10%.

Zhou *et al.* (109) reportou que existem duas etapas principais da reação de ácidos carboxílicos polifuncionais com celulose, e estas são a ligação dos ácidos carboxílicos polifuncionais por esterificação com um grupo hidroxilo da celulose e a reação adicional – por esterificação – com outro grupo hidroxilo da celulose resultando numa ligação cruzada entre as cadeias de celulose. A estrutura resultante da reação de reticulação da CMC com o AC encontra-se representada na figura 26.

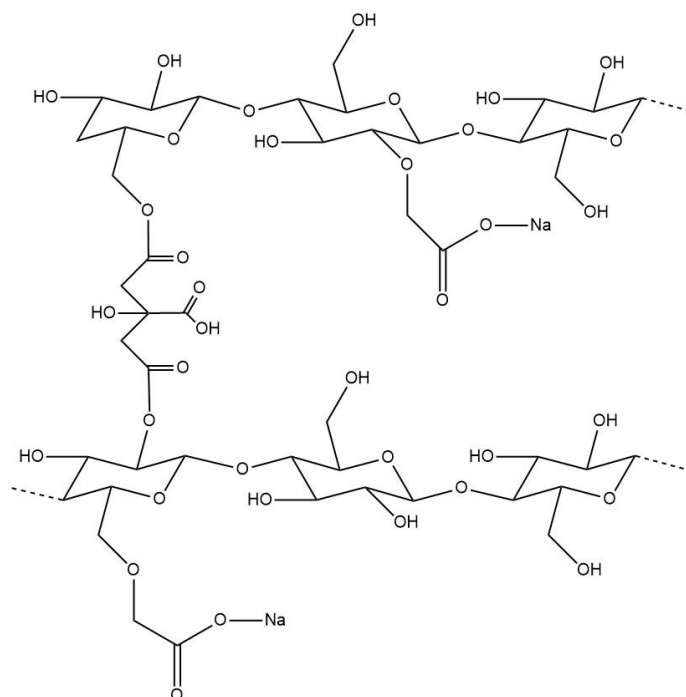


Figura 26: Representação esquemática da carboximetilcelulose reticulada com ácido cítrico.

É também reportado na literatura que o mecanismo da reação de reticulação por esterificação entre a CMC e o AC é baseado na formação de um anidrido intermediário (109,110). Assim, a temperaturas elevadas (acima de 60 °C) o ácido cítrico forma um anidrido cíclico intermediário que esterifica os grupos hidroxilo reativos da cadeia de CMC adjacente. Após esta ligação a outra unidade de ácido carboxílico do AC forma um segundo anidrido cíclico com o ácido carboxílico adjacente. Por sua vez o segundo anidrido cíclico irá esterificar os grupos hidroxilo reativos de outra molécula de CMC, resultando na reticulação por esterificação de duas moléculas de CMC. A representação esquemática deste mecanismo encontra-se na figura 27.

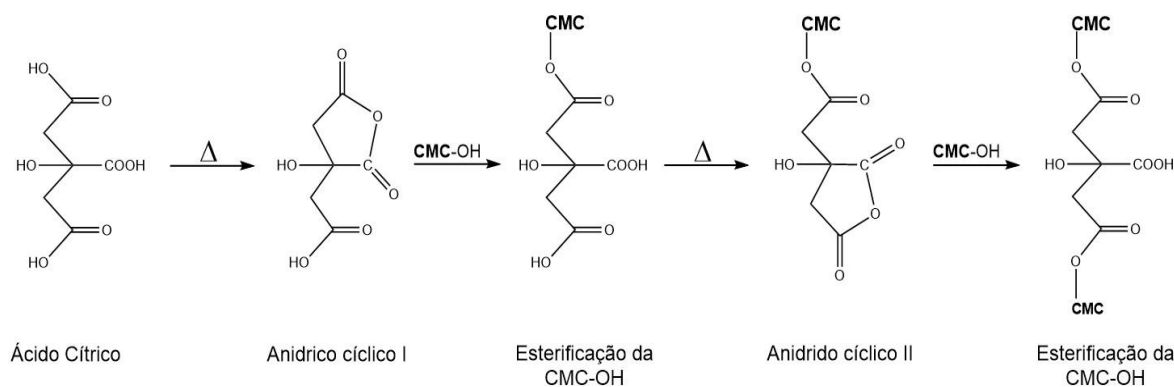


Figura 27: Representação esquemática da reação de reticulação entre a CMC e o AC.

#### 4.2. Incorporação de celulose microcristalina na formulação das microagulhas

Com o intuito de utilizar a CM como agente de reforço mecânico das MAs investigamos três concentrações diferentes, 5%, 10% e 15% (% m/v, relativamente à concentração total de CM). As MAs foram preparadas com as concentrações fixas de 7.5% e 10% (% m/v) de CMC e AC, respetivamente, escolhidas na otimização prévia. Na lupa foi possível observar MAs e sistemas de MAs completos para todas as concentrações de CM. Constata-se que o aumento da concentração de CM leva ao aumento da opacidade, bem como da irregularidade da superfície das MAs, sendo aquelas com maior concentração de CM as mais opacas e irregulares. Novamente aqui, a irregularidade da superfície é apenas um parâmetro de comparação entre as amostras, pois para o aspeto geral não são significativas. Na figura 28 apresentam-se as fotografias obtidas na lupa das MAs das diferentes amostras.

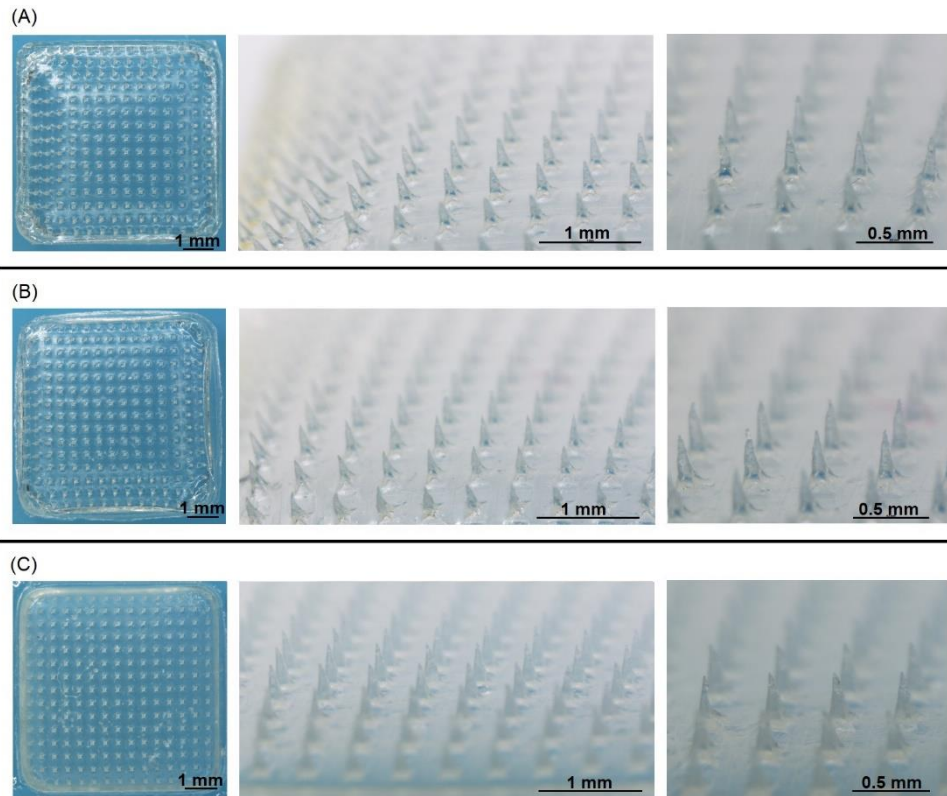


Figura 28: Fotografias dos sistemas de MAs obtidas na lupa. (A) CM 5%; (B) CM 10%; (C) CM 15%.

As microagulhas exibem alturas médias de  $0,40 \pm 0,02$  mm para 5% de CM,  $0,41 \pm 0,02$  mm para 10% de CM e  $0,40 \pm 0,03$  mm para 15% de CM. A análise estatística revelou diferença significativa apenas entre a média das alturas das MAs de 10% e 15% de CM ( $I < 0,05$ ). Na figura 29 apresenta-se um diagrama de barras da média das alturas das MAs para as diferentes concentrações de CM, bem como as diferenças estatísticas para cada par analisado.



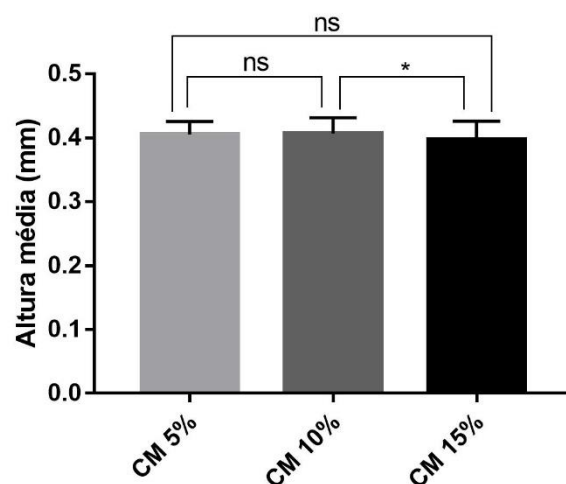


Figura 29: Diagrama de barras da altura média (mm) das MAs para as diferentes concentrações de CM (5%, 10% e 15% (% m/v)) com os valores de p obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo, \* –  $p < 0,05$ ).

O teste de compressão axial realizou-se para avaliar a força mecânica das MAs e os resultados obtidos apresentam-se na figura 30.

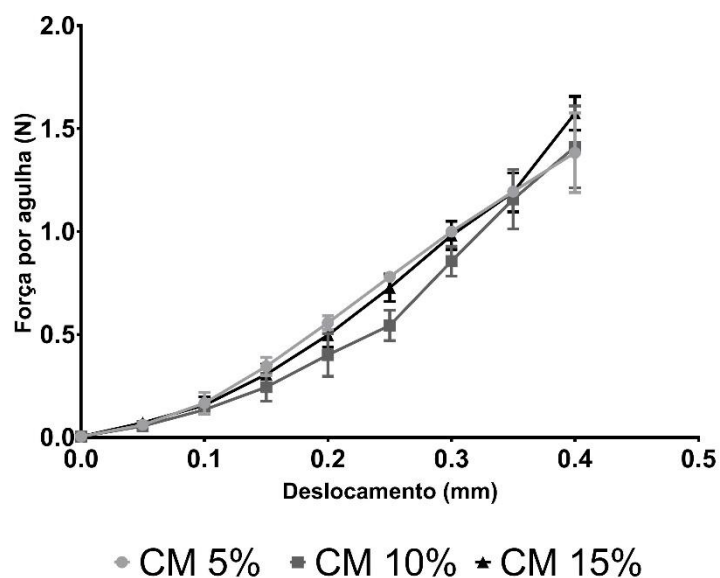


Figura 30: Gráfico da força por agulha (N) em função do deslocamento (mm) para as diferentes concentrações de celulose microcristalina (5%, 10% e 15% (% m/v)).

Como discutido anteriormente, o valor teoricamente necessário para o nosso sistema de MAs penetrar a pele seria 0,13 N/agulha (83). Este valor é suportado a partir do deslocamento de ~0,091 mm para 5% CM, ~0,098 mm para 10% CM e ~0,085 mm para 15% CM. O que mostra que a adição de CM aumenta a força mecânica das MAs pois, aquelas com a mesma composição sem CM suportam menor força para os mesmos deslocamentos. No entanto, o gráfico mostra-nos que não existe uma correlação entre o aumento da concentração de CM e o aumento da força mecânica das MAs já que, no intervalo de 0,1 a 0,35 mm as amostras com 5% de CM, a menor concentração, são as que apresentam suportar força mecânica superior. O resultado esperado seria o contrário do obtido pois, se a CM é utilizada como agente de reforço (99), a maior concentração de CM nas MAs deveria conferir-lhes maior força mecânica. Contudo, é de notar as dificuldades encontradas para fazer o teste de compressão axial, isto porque os sistemas de MAs não apresentam uma base plana, o que dificultou a preparação dos mesmos para o teste mecânico. Sendo fundamental para a realização do teste que estes estejam planos e completamente apoiados na base de suporte. Ao tentar que ficassem planos com a base de suporte facilmente quebravam perante a força aplicada na sua base com uma lamela. Tendo em conta o objetivo final das MAs serem aplicadas na pele, não é desejado que quebrem quando lhes aplicamos força, é desejado que a base do sistema seja flexível o suficiente para se adaptar aos contornos da pele sem fraturar (85). Também para as amostras com CM, tal como verificado para as amostras do ponto 3.4, as curvas no gráfico (Figura 30) mostram-nos que independentemente da concentração de CM, as MAs não apresentam força de falha, isto é não quebram. Ao invés de quebrar dobram à medida que a sonda se desloca e aplica força crescente, este comportamento está ilustrado na figura 31.

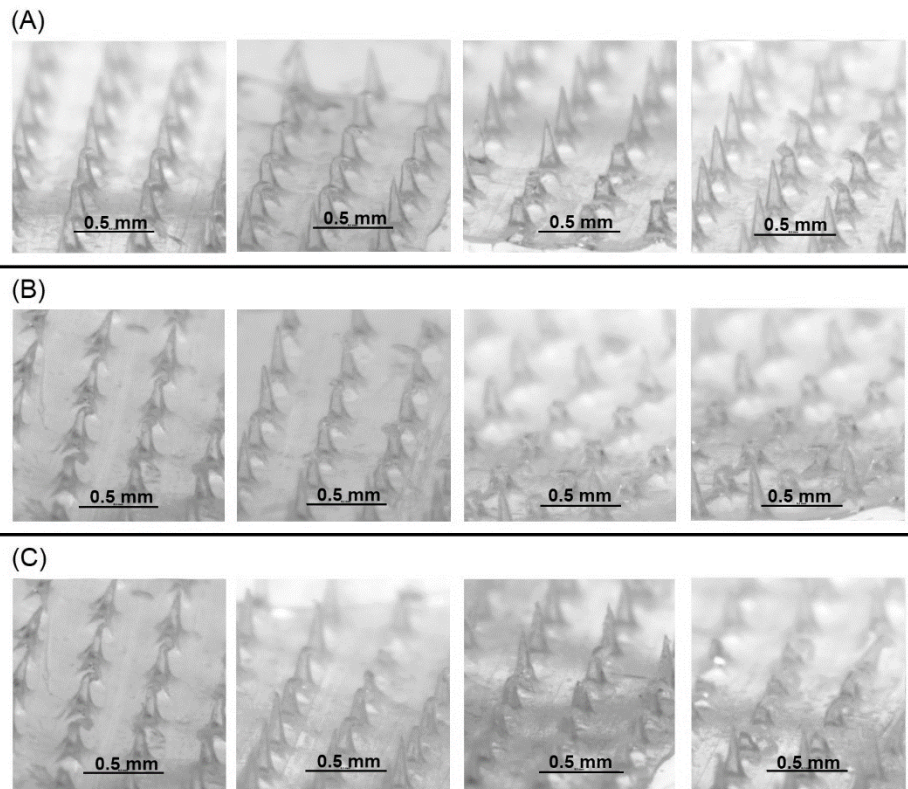


Figura 31: Fotografias obtidas pela lupa das MAs para os deslocamentos de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mm, respetivamente da esquerda para a direita, durante o teste de compressão axial. (A) Amostra de CM 5%; (B) Amostra de CM 10%; (C) Amostra de CM 15%.

De forma a avaliar se as MAs produzidas com CM possuem força mecânica significativamente superior relativamente às produzidas sem CM realizaram-se testes estatísticos. Comparou-se a força mecânica da amostra de CMC 7,5% + AC 10%, aquela escolhida no ponto 3.4, e as amostras com as diferentes concentrações de CM. Os resultados do teste estatístico encontram-se representados na figura 32.

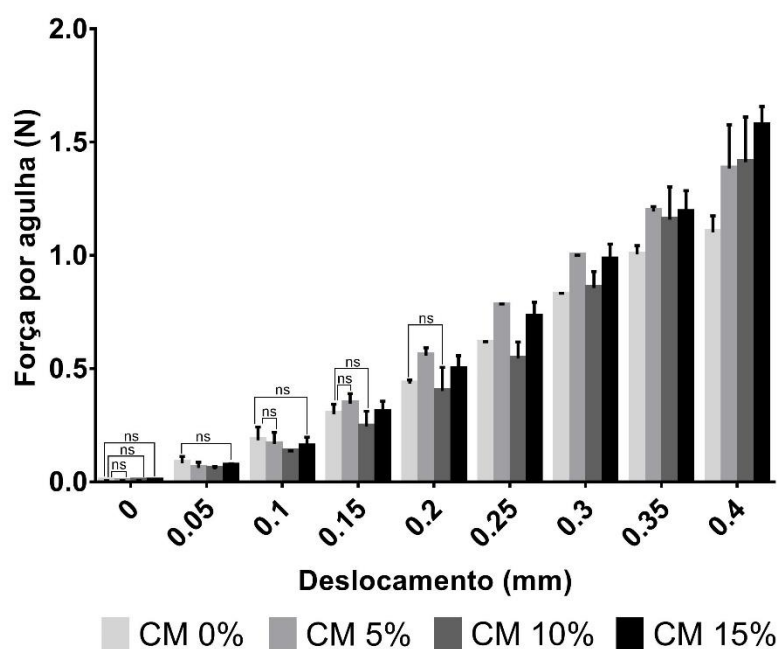


Figura 32: Gráfico de barras da força por agulha em função do deslocamento para as diferentes concentrações de celulose microcristalina (0%, 5%, 10% e 15% (% m/v)) com os valores de p não significativos obtidos pelo teste de Tukey (ns – não significativo).

Relativamente à concentração de 0% CM a força suportada é significativamente superior na amostra de 5% CM para os deslocamentos de 0,2 a 0,4 ( $p < 0,05$ ), na amostra de 10% CM para os deslocamentos de 0,3 a 0,4 mm ( $p < 0,05$ ) e na amostra de 15% CM para os deslocamentos de 0,15 a 0,4 mm ( $p < 0,05$ ). Conclui-se então que os sistemas de MAs com 5% e 15% de CM suportam forças significativamente superiores para os mesmos 5 deslocamentos, enquanto que os com 10% de CM suportam forças superiores apenas para 3 deslocamentos. Assim, apesar de verificarmos que a adição de CM aumenta a força mecânica das MAs, aquelas com menor concentração de CM são as que suportam forças superiores a par daquelas com a maior concentração. Por conseguinte, os resultados não evidenciam a necessidade de adicionar uma concentração superior a 5% de CM.

As amostras foram também analisadas por espectroscopia de FTIR, de forma a monitorizar a sua estrutura. Na figura 33 apresentam-se os espectros das amostras reticuladas, bem como dos compostos puros que compõe essas amostras. A amostra de CM pura apresenta picos aos 3498 e 3394  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento do O–H) e aos 1107  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento do C–O–C). Os espectros das MAs com CM apresentam picos nos números

de onda semelhantes aos verificados para as amostras sem CM (capítulo anterior) pois estes estão relacionados com a reação de reticulação que ocorre maioritariamente entre a CMC e o AC.

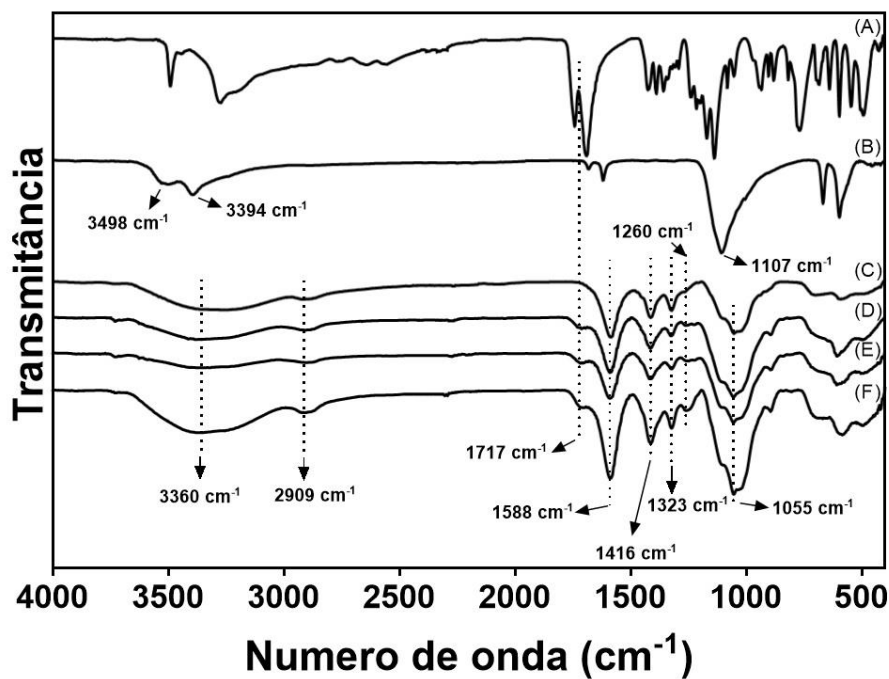


Figura 33: Espectro de FTIR das amostras reticuladas e dos compostos puros constituintes. (A) AC; (B) CMC; (C) CM; (D) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%; (E) CMC 7,5% + AC 10% + CM 10%; (F) CMC 7,5% + AC 10% + CM 15%.

Constatamos com os resultados obtidos que a melhor formulação seja aquela com 5% (% m/v) de CM, possuindo melhores características morfológicas, MAs mais uniformes e com pontas mais definidas, e mecânicas, suportando força mecânica superior.

#### 4.3. Determinação do intumescimento, citotoxicidade e capacidade de extração de analitos das microagulhas *in vitro*

Após a otimização das concentrações de CMC, AC e CM, avançamos para os testes *in vitro* de intumescimento e citotoxicidade. Para realizar estes testes escolhemos as microagulhas de CMC 7,5% + AC 10% as de CMC 7,5% + AC 10% + CM 5% (todas as concentrações em % m/v), dado que são os sistemas de MAs que suportam maior força mecânica e apresentam melhor morfologia.

### 4.3.1. Avaliação do intumescimento das microagulhas

Começamos então por avaliar o intumescimento das MAs realizando o teste de intumescimento por aplicação das MAs num gel de agarose (1,4% m/m) através de parafilme, e os resultados obtidos apresentam-se na figura 34.

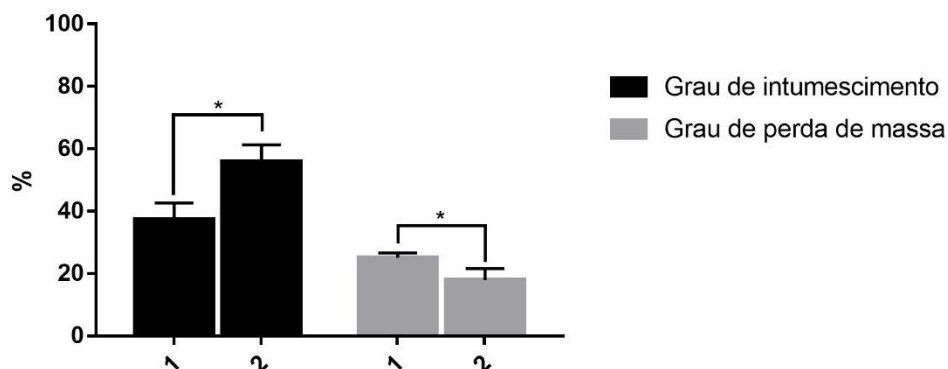


Figura 34: Diagrama de barras que apresenta o grau de intumescimento e a perda de massa. No eixo das abcissas: (1) CMC 7,5% + AC 10%; (2) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.

Os resultados mostram que as MAs com CM 5% (Figura 34) apresentam uma percentagem de intumescimento mais elevada e de perda de massa inferior. A observação do parafilme no microscópio revelou que todas as amostras penetraram o parafilme e por isso contactaram com o gel de agarose. A análise estatística confirma que as diferenças entre o intumescimento e a perda de massa das duas amostras são significativas ( $p < 0,05$ ). A perda de massa é superior a 20% para a amostra CMC 7,5% e AC 10% (Figura 34), e esta será resultado da dissolução de CMC e AC não reticulados. Isto posto será importante otimizar também o processo de reticulação de forma a diminuir a dissolução, e consequentemente a perda de massa. Na figura 35 apresentam-se fotografias obtidas na lupa antes e depois do intumescimento das MAs. É possível observar o aumento de volume das MAs, sendo principalmente visível o aumento da sua base.

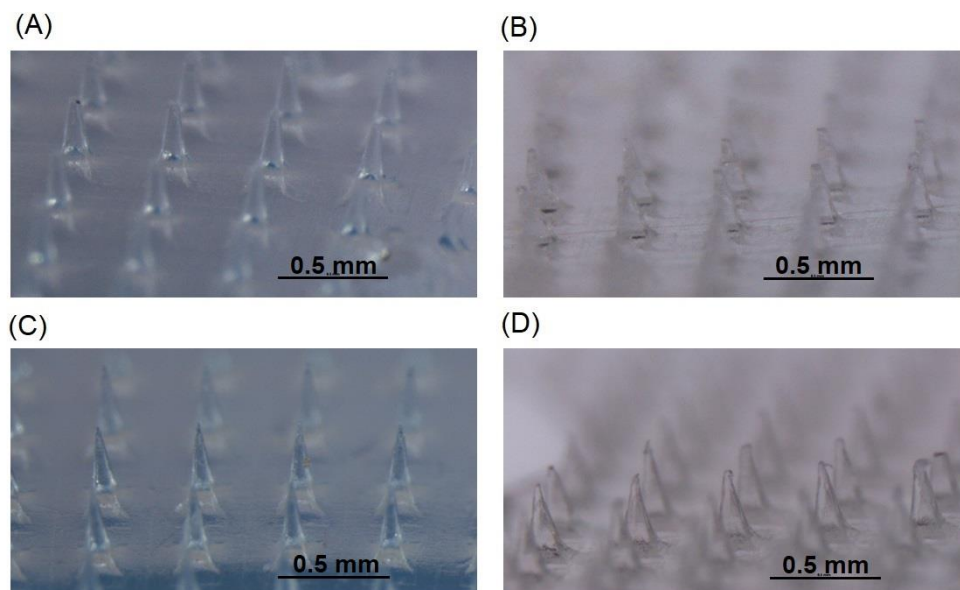


Figura 35: Fotografias das MAs obtidas na lupa antes ((A), (C)) e depois do intumescimento ((B) e (D)). (A) e (B): CMC 7,5% + AC 10%; (C) e (D): CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.

O grau de intumescimento observado está bastante abaixo dos valores reportados na literatura para outras MAs intumescíveis. Nomeadamente, Chang *et al.* reporta a produção de MAs com ácido hialurónico metacrilatado que após 30 min de inserção no gel de agarose com o parafilme apresentam intumescimento de 125% a 250%, dependendo do grau de reticulação (32).

Ao observar as MAs na lupa antes e depois do intumescimento procedeu-se também à medição da altura e largura da base. Os resultados apresentam-se na figura 36 e mostram, para ambas as amostras, que com o intumescimento há a diminuição da altura das MAs e o aumento da largura da base. O aumento da largura da base é indicativo da absorção de fluido, do intumescimento. A diminuição da altura das MAs pode estar associada à perda de massa constatada anteriormente (Figura 34). A análise estatística indica que a diminuição da altura da base e o aumento da largura da base são significativos para cada uma das duas amostras. Tendo em conta a Figura 34, distingue-se que as MAs com CM 5% exibem maior grau de intumescimento e menor grau de perda de massa. No entanto, quando observamos a figura 36 não se percebe que a altura e largura da base antes e depois do intumescimento seja diferente para as duas amostras. O que é confirmado pela

análise estatística que revela que entre as duas amostras não se apuram diferenças significativas entre a altura e largura antes e depois do intumescimento. Seria pelo menos esperado um maior aumento da largura da base nas MAs com CM 5%, pois o intumescimento das MAs tipicamente é mais visível na base das mesmas.

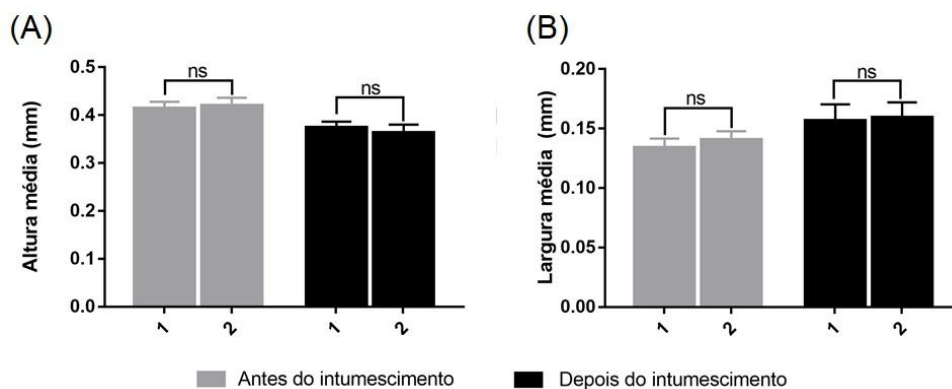


Figura 36: Diagrama de barras da (A) altura média antes e depois do intumescimento e da (B) largura média antes e depois do intumescimento. No eixo das abcissas: (1) CMC 7,5% + AC 10%; (2) CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.

Os resultados obtidos permitem inferir que as amostras com CM apresentam maior grau de intumescimento e menor grau de perda de massa quando comparadas com as amostras sem CM. Perante isso, as amostras de CMC 7,5% + AC 10% + CM 5% exibem características superiores relativamente à sua capacidade de intumescimento.

#### 4.3.2. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O efeito da CMC, AC e CM na viabilidade celular de queratinócitos HaCaT foi avaliado através da atividade metabólica pelo ensaio do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). A figura 37 mostra os resultados da viabilidade celular para o controlo negativo e para as amostras de CMC 7,5% + AC 10% e CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%. Como seria de esperar, valores de crescimento celular normais foram obtidos para o controlo, ou seja, 100% de viabilidade celular. Foi testado o tempo de exposição de 24 h e para esse tempo ambas as amostras apresentam-se não citotóxicas para as células HaCaT. As células expostas às MAs de CMC 7,5% + AC 10% mostraram viabilidade celular de  $85,71 \pm 8,37\%$ , e as expostas às MAs de CMC 7,5% + AC 10% + CM



5% evidenciam viabilidade celular de  $75,06 \pm 6,02\%$ . Estes valores encontram-se no intervalo considerado não citotóxico, pois um material é considerado citotóxico quando a viabilidade das células é reduzida mais de 30% segundo o ISO 10993-5:209(E) (111). Então, ambos os sistemas de MAs não são citotóxicos para as células HaCaT, o que indica que serão seguros para serem utilizados em aplicações biomédicas.

Capanema *et al.* (95) reporta a avaliação da citotoxicidade de filmes de CMC, AC e poli(etileno glicol) em células renais embrionárias humanas (HEK293T), também pelo método do MTT. As células expostas aos filmes mostraram viabilidade celular de ~95%. Previamente ao ensaio as amostras foram esterilizadas com radiação UV durante 60 min. Ghorpade *et al.* (110) reporta a avaliação da citotoxicidade também em filmes de CMC, AC e poli(etileno glicol) mas em linhas celulares de fibroblastos de ratinhos (L929), pelo método do MTT. As células mostraram viabilidades superiores a 90%. De antemão as amostras foram esterilizadas. Assim, os valores de viabilidade celular para o nosso ensaio são inferiores contudo, as amostras não foram esterilizadas durante um longo período de tempo como reportam estes artigos. Essa esterilização estará na base da menor toxicidade verificada. À vista disto, apesar dos valores de viabilidade celular obtidos mostrarem que as MAs não são citotóxicas para as células HaCaT, poderá recorrer-se também à esterilização com UV para melhorar os resultados.

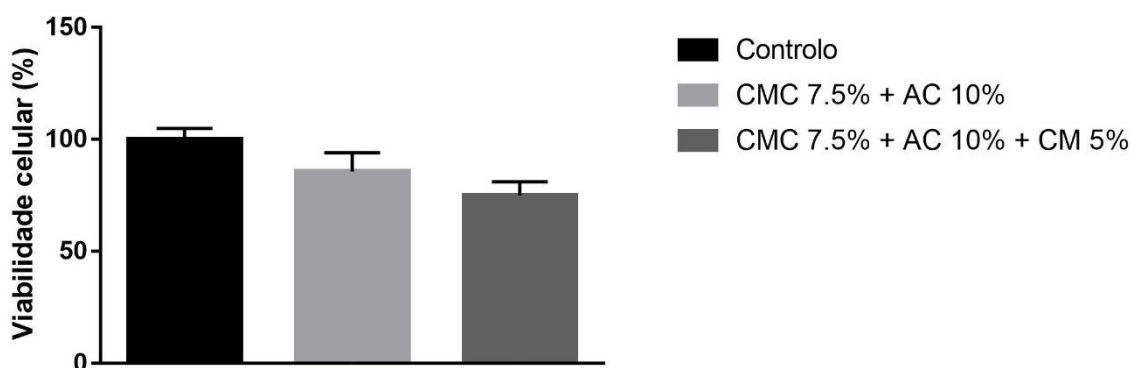


Figura 37: Diagrama de barras da viabilidade celular (%) das células HaCaT quando expostas às amostras de CMC 7,5% + AC 10% e CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%.

## 5. Conclusões

Neste trabalho desenvolveram-se microagulhas intumescíveis biopoliméricas de CMC, AC e CM. Iniciámos o estudo com a otimização da concentração de CMC que permitiu depreender que o aumento da concentração de CMC aumenta a força mecânica das MAs e melhora o seu aspeto morfológico. Todavia, uma concentração superior a 7,5% (% m/v) produz uma solução de partida demasiado viscosa que impede o sucesso no preenchimento do molde. Por conseguinte, definimos que 7,5% (% m/v) de CMC seria a concentração escolhida. Seguidamente, a otimização da concentração de AC permitiu constatar que o aumento de AC também aumenta a força mecânica das MAs. Também produz MAs com melhor aspeto morfológico. Porém, concentrações demasiado elevadas de AC são indesejáveis pois, levam ao aumento da rigidez do polímero reticulado e consequentemente menos liberdade para absorção de fluidos. Portanto, estabelecemos que a melhor concentração de AC seria 10% (% m/v) relativamente à concentração total de CMC. Com a intenção de melhorar a estabilidade mecânica dos sistemas de MAs adicionou-se CM à formulação. A correlação esperada entre o aumento da concentração de CM e o aumento da força mecânica das MAs não se obteve. Ainda assim, a adição de CM resultou de facto no aumento da força mecânica das MAs relativamente àquelas sem CM. Como não se verifica que com aumento da concentração de CM a força mecânica aumente na mesma ordem, e tendo em conta que a CM torna os sistemas de MAs mais quebradiços não existem evidências que justifiquem a adição de mais de 5% (% m/v) de CM à formulação. Sendo possível com 5% (% m/v) CM obter MAs com melhor aspeto morfológico e força mecânica superior. Após os resultados obtidos no teste de intumescimento e da citotoxicidade concluímos que a melhor formulação para produzir MAs seria CMC 7,5% + AC 10% + CM 5%, pois apresenta maior grau de intumescimento e menor grau de perda de massa e não são citotóxicas.

Como passo seguinte no trabalho poderá ser importante a otimização do processo de reticulação de forma a maximizar a quantidade de CMC que reticula com o AC. Para além disso é necessário averiguar se as MAs possuem de facto capacidade para extrair analitos de forma a inferir se podem ou não ser utilizadas na monitorização de analitos presentes no fluido intersticial. Posteriormente, é fundamental testar a inserção e a sua capacidade de extração de fluido intersticial *in vivo*, de forma a demonstrar que estes sistemas de MAs têm potencial para serem incorporados na rotina de pacientes e

profissionais médicos com o grande objetivo final de tornar a extração e monitorização de analitos um processo mais agradável, fácil e acessível para todos.

## 6. Bibliografia

1. Wiedersberg S, Guy RH. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *Journal of Controlled Release*. 2014;190:150–6.
2. Lee H, Song C, Baik S, Kim D, Hyeon T, Kim D-H. Device-assisted transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;127:35–45.
3. Donnelly RF, Singh TRR, Larrañeta E, McCrudden MTC. *Microneedles for Drug and Vaccine Delivery and Patient Monitoring*. United Kingdom: John Wiley & Sons; 2018. 353 p.
4. Donnelly R, Mooney K, Caffarel-Salvador E, Torrisi B, Eltayib E, McElnay J. Microneedle-Mediated Minimally Invasive Patient Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2014;36(1):10–7.
5. Samant PP, Prausnitz MR. Mechanisms of sampling interstitial fluid from skin using a microneedle patch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(18):4583–8.
6. Prausnitz MR. Microneedles for transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(5):581–7.
7. Tuan-Mahmood T-M, McCrudden MTC, Torrisi BM, McAlister E, Garland MJ, Singh TRR, et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;50(5):623–37.
8. Yan X-X, Tang G, Hu R, Yang B, Zhang L-L, Xu B. Analysis of Process Parameters and Performance Test for Fabricating Stainless-steel Metal Microneedles. *Sensors and Materials*. 2018;30(6):1333.
9. Chandrasekaran S, Brazzle JD, Frazier AB. Surface micromachined metallic microneedles. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2003;12(3):281–8.
10. Kishino A, Yanagida T. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*. 1988;334(6177):74–6.
11. Bystrova S, Luttge R. Micromolding for ceramic microneedle arrays. *Microelectronic Engineering*. 2011;88(8):1681–4.
12. Rejinold NS, Shin J-H, Seok HY, Kim Y-C. Biomedical applications of microneedles in therapeutics: recent advancements and implications in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13(1):109–31.
13. Wang M, Hu L, Xu C. Recent advances in the design of polymeric microneedles for transdermal drug delivery and biosensing. *Lab on a Chip*. 2017;17(8):1373–87.
14. Larrañeta E, Lutton REM, Woolfson AD, Donnelly RF. Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture

- and commercial development. *Materials Science and Engineering R*. 2016;104:1–32.
15. Augustine R, Rajendran R, Cvelbar U, Mozetič M, George A. *Biopolymers for Health, Food, and Cosmetic Applications*. Em: *Handbook of Biopolymer-Based Materials*. Germany: Wiley-Blackwell; 2013. p. 801–49.
  16. Fonseca DFS, Vilela C, Silvestre AJD, Freire CSR. A compendium of current developments on polysaccharide and protein-based microneedles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;136:704–28.
  17. Pattanashetti NA, Heggannavar GB, Kariduraganavar MY. *Smart Biopolymers and their Biomedical Applications*. *Procedia Manufacturing*. 2017;12:263–79.
  18. Indermun S, Luttge R, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, Modi G, et al. Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014;185:130–8.
  19. Ventrelli L, Marsilio Strambini L, Barillaro G. *Microneedles for Transdermal Biosensing: Current Picture and Future Direction*. *Advanced Healthcare Materials*. 2015;4(17):2606–40.
  20. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. *Anatomy and Physiology of the Skin: Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011;3(4):203–13.
  21. Moss GPJ. *Introduction*. Em: *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2015. p. 1–40.
  22. McLafferty E, Hendry C, Farley A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*. 2012;27(3):35–42.
  23. Hao Y, Li W, Zhou X, Yang F, Qian Z. *Microneedles-Based Transdermal Drug Delivery Systems: A Review*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2017;13(12):1581–97.
  24. Wiig H, Swartz MA. *Interstitial Fluid and Lymph Formation and Transport: Physiological Regulation and Roles in Inflammation and Cancer*. *Physiological Reviews*. 2012;92(3):1005–60.
  25. Gerstel MS, Place VA. *Drug delivery device*. US Patent US3964482A, 1976.
  26. Henry S, McAllister DV, Allen MG, Prausnitz MR. *Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87(8):922–5.
  27. Hu L, Liao Z, Hu Q, Maffucci KG, Qu Y. *Novel Bletilla striata polysaccharide microneedles: Fabrication, characterization, and in vitro transcutaneous drug delivery*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;117:928–36.

28. He M, Yang G, Zhang S, Zhao X, Gao Y. Dissolving Microneedles Loaded With Etonogestrel Microcrystal Particles for Intradermal Sustained Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(4):1037–45.
29. Chen M-C, Ling M-H, Lai K-Y, Pramudityo E. Chitosan Microneedle Patches for Sustained Transdermal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*. 2012;13(12):4022–31.
30. Jin J, Reese V, Coler R, Carter D, Rolandi M. Chitin Microneedles for an Easy-to-Use Tuberculosis Skin Test. *Advanced Healthcare Materials*. 2014;3(3):349–53.
31. Liu S, Jin M, Quan Y, Kamiyama F, Kusamori K, Katsumi H, et al. Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics and safety after application to the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;86(2):267–76.
32. Chang H, Zheng M, Yu X, Than A, Seeni RZ, Kang R, et al. A Swellable Microneedle Patch to Rapidly Extract Skin Interstitial Fluid for Timely Metabolic Analysis. *Advanced Materials*. 2017;29(37):1702243.
33. Ito Y, Matsumoto K, Osakama N, Yoshioka R, Kobuchi S, Sakaeda T, et al. Dissolving Microneedles as Skin Allergy Test Device. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2017;40(4):531–4.
34. Tsioris K, Raja WK, Pritchard EM, Panilaitis B, Kaplan DL, Omenetto FG. Fabrication of Silk Microneedles for Controlled-Release Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*. 2012;22(2):330–5.
35. Chen BZ, Ashfaq M, Zhu DD, Zhang XP, Guo XD. Controlled Delivery of Insulin Using Rapidly Separating Microneedles Fabricated from Genipin-Crosslinked Gelatin. *Macromolecular Rapid Communications*. 2018;39(20):1800075.
36. Li QY, Zhang JN, Chen BZ, Wang QL, Guo XD. A solid polymer microneedle patch pretreatment enhances the permeation of drug molecules into the skin. *RSC Advances*. 2017;7(25):15408–15.
37. Lee K, Lee CY, Jung H. Dissolving microneedles for transdermal drug administration prepared by stepwise controlled drawing of maltose. *Biomaterials*. 2011;32(11):3134–40.
38. Kim Y-C, Park J-H, Prausnitz MR. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(14):1547–68.
39. Johnson AR, Caudill CL, Tumbleston JR, Bloomquist CJ, Moga KA, Ermoshkin A, et al. Single-Step Fabrication of Computationally Designed Microneedles by Continuous Liquid Interface Production. *PLOS ONE*. 2016;11(9):e0162518.
40. Kolli CS. Microneedles: bench to bedside. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(9):1081–8.

41. Quinn HL, Courtenay AJ, Kearney M-C, Donnelly RF. *Microneedle Technology. Em: Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery.* United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2015. p. 179–208.
42. Donnelly RF, Singh TRR, Tunney MM, Morrow DIJ, McCarron PA, O'Mahony C, et al. *Microneedle Arrays Allow Lower Microbial Penetration Than Hypodermic Needles In Vitro.* *Pharmaceutical research.* 2009;26(11):2513–22.
43. Bal SM, Caussin J, Pavel S, Bouwstra JA. *In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin.* *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008;35(3):193–202.
44. Donnelly RF, Singh TRR, Garland MJ, Migalska K, Majithiya R, McCrudden CM, et al. *Hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced transdermal drug delivery.* *Advanced Functional Materials.* 2012;22(23):4879–90.
45. Wang PM, Cornwell M, Prausnitz MR. *Minimally Invasive Extraction of Dermal Interstitial Fluid for Glucose Monitoring Using Microneedles.* *Diabetes Technology & Therapeutics.* 2005;7(1):131–41.
46. Wang QL, Zhu DD, Chen Y, Guo XD. *A fabrication method of microneedle molds with controlled microstructures.* *Materials Science and Engineering: C.* 2016;65:135–42.
47. Yan X-X, Liu J-Q, Jiang S-D, Yang B, Yang C-S. *Fabrication and testing analysis of tapered silicon microneedles for drug delivery applications.* *Microelectronic Engineering.* 2013;111:33–8.
48. Tomono T. *Puncture performance of sharpen microneedles by using inclined contact UV lithography.* *Microsystem Technologies.* 2018;24(9):3589–99.
49. Yerramreddy TR, Milewski M, Penthala NR, Stinchcomb AL, Crooks PA. *Novel 3-O-pegylated carboxylate and 3-O-pegylated carbamate prodrugs of naltrexone for microneedle-enhanced transdermal delivery.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2010;20(11):3280–3.
50. Martanto W, Davis SP, Holiday NR, Wang J, Gill HS, Prausnitz MR. *Transdermal Delivery of Insulin Using Microneedles in Vivo.* *Pharmaceutical Research.* 2004;21(6):947–52.
51. Ding Z, Van Riet E, Romeijn S, Kersten GFA, Jiskoot W, Bouwstra JA. *Immune Modulation by Adjuvants Combined with Diphtheria Toxoid Administered Topically in BALB/c Mice After Microneedle Array Pretreatment.* *Pharmaceutical Research.* 2009;26(7):1635–43.
52. Ameri M, Kadkhodayan M, Nguyen J, Bravo JA, Su R, Chan K, et al. *Human Growth Hormone Delivery with a Microneedle Transdermal System: Preclinical Formulation, Stability, Delivery and PK of Therapeutically Relevant Doses.* *Pharmaceutics.* 2014;6(2):220–34.

53. Uddin MJ, Scoutaris N, Klepetsanis P, Chowdhry B, Prausnitz MR, Douroumis D. Inkjet printing of transdermal microneedles for the delivery of anticancer agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;494(2):593–602.
54. Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AVS, O’Mahony C, et al. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *Journal of controlled releas*. 2012;159(1):34–42.
55. Zhang Y, Brown K, Siebenaler K, Determan A, Dohmeier D, Hansen K. Development of Lidocaine-Coated Microneedle Product for Rapid, Safe, and Prolonged Local Analgesic Action. *Pharmaceutical Research*. 2012;29(1):170–7.
56. Cormier M, Johnson B, Ameri M, Nyam K, Libiran L, Zhang DD, et al. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *Journal of Controlled Release*. 2004;97(3):503–11.
57. Daddona PE, Matriano JA, Mandema J, Maa Y-F. Parathyroid hormone (1-34)-coated microneedle patch system: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment of osteoporosis. *Pharmaceutical Research*. 2011;28(1):159–65.
58. Zhu Q, Zarnitsyn VG, Ye L, Wen Z, Gao Y, Pan L, et al. Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(19):7968–73.
59. Koutsonanos DG, Martin M del P, Zarnitsyn VG, Sullivan SP, Compans RW, Prausnitz MR, et al. Transdermal Influenza Immunization with Vaccine-Coated Microneedle Arrays. *PLOS ONE*. 2009;4(3):e4773.
60. Miyano T, Tobinaga Y, Kanno T, Matsuzaki Y, Takeda H, Wakui M, et al. Sugar Micro Needles as Transdermic Drug Delivery System. *Biomedical Microdevices*. 2005;7(3):185–8.
61. McCormick CL. Structural Design of Water-Soluble Copolymers. Em: Shalaby SW, McCormick CL, Butler GB, editores. *Water-Soluble Polymers*. Washington, DC: American Chemical Society; 1991. p. 2–24.
62. Kunduru KR, Basu A, Domb AJ. Biodegradable Polymers: Medical Applications. Em: John Wiley & Sons, Inc., editor. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 1–22.
63. Hong X, Wei L, Wu F, Wu Z, Chen L, Liu Z, et al. Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine. *Drug Design, Development and Therapy*. 2013;7:945–52.
64. Gomaa YA, Garland MJ, McInnes F, El-Khordagui LK, Wilson C, Donnelly RF. Laser Engineered Dissolving Microneedles for Active Transdermal Delivery of Nadroparin Calcium. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2012;82(2):299–307.



65. Ito Y, Yamazaki T, Sugioka N, Takada K. Self-dissolving micropile array tips for percutaneous administration of insulin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(2):835–41.
66. Lee JW, Choi S-O, Felner EI, Prausnitz MR. Dissolving Microneedle Patch for Transdermal Delivery of Human Growth Hormone. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2011;7(4):531–9.
67. Sullivan SP, Koutsonanos DG, Martin M del P, Lee J-W, Zarnitsyn V, Murthy N, et al. Dissolving Polymer Microneedle Patches for Influenza Vaccination. *Nature medicine*. 2010;16(8):915–20.
68. Mukerjee EV, Collins SD, Isseroff RR, Smith RL. Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and in situ analysis. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2004;114(2):267–75.
69. Strambini LM, Longo A, Scarano S, Prescimone T, Palchetti I, Minunni M, et al. Self-powered microneedle-based biosensors for pain-free high-accuracy measurement of glycaemia in interstitial fluid. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;66:162–8.
70. Gupta J, Denson DD, Felner EI, Prausnitz MR. Rapid Local Anesthesia in Humans Using Minimally Invasive Microneedles: *The Clinical Journal of Pain*. 2012;28(2):129–35.
71. Davis SP, Martanto W, Allen MG, Prausnitz MR. Hollow metal microneedles for insulin delivery to diabetic rats. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2005;52(5):909–15.
72. Pettis RJ, Ginsberg B, Hirsch L, Sutter D, Keith S, McVey E, et al. Intradermal microneedle delivery of insulin lispro achieves faster insulin absorption and insulin action than subcutaneous injection. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2011;13(4):435–42.
73. Belshe RB. Current status of live attenuated influenza virus vaccine in the US. *Virus Research*. 2004;103(1):177–85.
74. Leroux-Roels I, Vets E, Freese R, Seiberling M, Weber F, Salamand C, et al. Seasonal influenza vaccine delivered by intradermal microinjection: A randomised controlled safety and immunogenicity trial in adults. *Vaccine*. 2008;26(51):6614–9.
75. Beran J, Ambrozaitis A, Laiskonis A, Mickuviene N, Bacart P, Calozet Y, et al. Intradermal influenza vaccination of healthy adults using a new microinjection system: a 3-year randomised controlled safety and immunogenicity trial. *BMC Medicine*. 2009;7(1):13.
76. Holland D, Booy R, De Looze F, Eizenberg P, McDonald J, Karrasch J, et al. Intradermal influenza vaccine administered using a new microinjection system produces superior immunogenicity in elderly adults: a randomized controlled trial. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(5):650–8.

77. Arnou R, Icardi G, De Decker M, Ambrozaitis A, Kazek M-P, Weber F, et al. Intradermal influenza vaccine for older adults: a randomized controlled multicenter phase III study. *Vaccine*. 2009;27(52):7304–12.
78. Donnelly RF, Singh TRR, Alkilani AZ, McCrudden MTC, O'Neill S, O'Mahony C, et al. Hydrogel-forming microneedle arrays exhibit antimicrobial properties: Potential for enhanced patient safety. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;451(1):76–91.
79. Caffarel-Salvador E, Brady AJ, Eltayib E, Meng T, Alonso-Vicente A, Gonzalez-Vazquez P, et al. Hydrogel-Forming Microneedle Arrays Allow Detection of Drugs and Glucose In Vivo: Potential for Use in Diagnosis and Therapeutic Drug Monitoring. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0145644.
80. Romanyuk AV, Zvezdin VN, Samant P, Grenader MI, Zemlyanova M, Prausnitz MR. Collection of Analytes from Microneedle Patches. *Analytical Chemistry*. 2014;86(21):10520–3.
81. Davis SP, Prausnitz MR, Allen MG. Fabrication and characterization of laser micromachined hollow microneedles. Em: *TRANSDUCERS '03 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Digest of Technical Papers (Cat No03TH8664)*. 2003. p. 1435–8 vol.2.
82. Davidson A, Al-Qallaf B, Das DB. Transdermal drug delivery by coated microneedles: Geometry effects on effective skin thickness and drug permeability. *Chemical Engineering Research and Design*. 2008;86(11):1196–206.
83. Larrañeta E, Moore J, Vicente-Pérez EM, González-Vázquez P, Lutton R, Woolfson AD, et al. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;472(1–2):65–73.
84. Lutton REM, Moore J, Larrañeta E, Ligett S, Woolfson AD, Donnelly RF. Microneedle characterisation: the need for universal acceptance criteria and GMP specifications when moving towards commercialisation. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015;5(4):313–31.
85. Donnelly RF, Majithiya R, Singh TRR, Morrow DIJ, Garland MJ, Demir YK, et al. Design, Optimization and Characterisation of Polymeric Microneedle Arrays Prepared by a Novel Laser-Based Micromoulding Technique. *Pharmaceutical Research*. 2011;28(1):41–57.
86. Zahn JD, Talbot NH, Liepmann D, Pisano AP. Microfabricated Polysilicon Microneedles for Minimally Invasive Biomedical Devices. *Biomedical Microdevices*. 2000;2(4):295–303.
87. Pearton M, Saller V, Coulman SA, Gateley C, Anstey AV, Zarnitsyn V, et al. Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(3):561–9.

88. Gomaa YA, Morrow DIJ, Garland MJ, Donnelly RF, El-Khordagui LK, Meidan VM. Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: Assessments by transepidermal water loss. *Toxicology in Vitro*. 2010;24(7):1971–8.
89. Davis SP, Landis BJ, Adams ZH, Allen MG, Prausnitz MR. Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *Journal of Biomechanics*. 2004;37(8):1155–63.
90. Gittard SD, Chen B, Xu H, Ovsianikov A, Chichkov BN, Monteiro-Riviere NA, et al. The effects of geometry on skin penetration and failure of polymer microneedles. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2013;27(3):227–43.
91. Donnelly RF, Garland MJ, Morrow DIJ, Migalska K, Singh TRR, Majithiya R, et al. Optical coherence tomography is a valuable tool in the study of the effects of microneedle geometry on skin penetration characteristics and in-skin dissolution. *Journal of Controlled Release*. 2010;147(3):333–41.
92. Ito Y, Inagaki Y, Kobuchi S, Takada K, Sakaeda T. Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin in Dermal Interstitial Fluid Using Dissolving Microneedles. *International Journal of Medical Sciences*. 2016;13(4):271–6.
93. Lendlein A, Sisson A. *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications*. John Wiley & Sons; 2011. 58 p.
94. Sannino A, Madaghiele M, Conversano F, Mele G, Maffezzoli A, Netti PA, et al. Cellulose Derivative–Hyaluronic Acid-Based Microporous Hydrogels Cross-Linked through Divinyl Sulfone (DVS) To Modulate Equilibrium Sorption Capacity and Network Stability. *Biomacromolecules*. 2004;5(1):92–6.
95. Capanema NSV, Mansur AAP, de Jesus AC, Carvalho SM, de Oliveira LC, Mansur HS. Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;106:1218–34.
96. Coma V, Sebti I, Pardon P, Pichavant FH, Deschamps A. Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*. 2003;51(3):265–71.
97. Demitri C, Sole RD, Scalera F, Sannino A, Vasapollo G, Maffezzoli A, et al. Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;110(4):2453–60.
98. Glusker JP. Citrate conformation and chelation: enzymic implications. *Accounts of Chemical Research*. 1980;13(10):345–52.
99. Trache D, Hussin MH, Hui Chuin CT, Sabar S, Fazita MRN, Taiwo OFA, et al. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;93:789–804.

100. Yan L, Raphael AP, Zhu X, Wang B, Chen W, Tang T, et al. Nanocomposite-Strengthened Dissolving Microneedles for Improved Transdermal Delivery to Human Skin. *Advanced Healthcare Materials*. 2014;3(4):555–64.
101. Park Y-H, Ha SK, Choi I, Kim KS, Park J, Choi N, et al. Fabrication of degradable carboxymethyl cellulose (CMC) microneedle with laser writing and replica molding process for enhancement of transdermal drug delivery. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2016;21(1):110–8.
102. Marin A, Andrianov AK. Carboxymethylcellulose–Chitosan-coated microneedles with modulated hydration properties. *Journal of Applied Polymer Science*. 2011;121(1):395–401.
103. Lee JW, Park J-H, Prausnitz MR. Dissolving Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Biomaterials*. 2008;29(13):2113–24.
104. Gill HS, Denson DD, Burris BA, Prausnitz MR. Effect of microneedle design on pain in human subjects. *The Clinical journal of pain*. 2008;24(7):585–94.
105. Raphael AP, Crichton ML, Falconer RJ, Meliga S, Chen X, Fernando GJP, et al. Formulations for microprojection/microneedle vaccine delivery: Structure, strength and release profiles. *Journal of Controlled Release*. 2016;225:40–52.
106. Crichton ML, Donose BC, Chen X, Raphael AP, Huang H, Kendall MAF. The viscoelastic, hyperelastic and scale dependent behaviour of freshly excised individual skin layers. *Biomaterials*. 2011;32(20):4670–81.
107. Azeredo HMC, Kontou-Vrettou C, Moates GK, Wellner N, Cross K, Pereira PHF, et al. Wheat straw hemicellulose films as affected by citric acid. *Food Hydrocolloids*. 2015;50:1–6.
108. Bagheri L, Yarmand M, Madadlou A, Mousavi ME. Transglutaminase-induced or citric acid-mediated cross-linking of whey proteins to tune the characteristics of subsequently desolvated sub-micron and nano-scaled particles. *Journal of Microencapsulation*. 2014;31(7):636–43.
109. Zhou YJ, Luner P, Caluwe P. Mechanism of crosslinking of papers with polyfunctional carboxylic acids. *Journal of Applied Polymer Science*. 1995;58(9):1523–34.
110. Ghorpade VS, Yadav AV, Dias RJ, Mali KK, Pargaonkar SS, Shinde PV, et al. Citric acid crosslinked carboxymethylcellulose-poly(ethylene glycol) hydrogel films for delivery of poorly soluble drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;118:783–91.
111. ISO P. 10993–5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. ISO: Geneva, Switzerland. 2009;