



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos Inovadores utilizando Materiais Poliméricos Porosos contendo Nanocelulose**

**Flávia Pinto Morais**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Medicinal**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto

**Covilhã, outubro de 2017**



## **Dedicatória**

Para os meus pais e avó.

*O único lugar em que o sucesso vem antes do trabalho  
é no dicionário, por força da ordem alfabética!*

Einstein, Albert





## **Agradecimentos**

Ao longo deste trabalho encontra-se um ano de grande esforço e dedicação que me fez crescer como pessoa e investigadora e em conhecimento. Este trabalho foi realizado no Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, entidades às quais quero agradecer, por terem disponibilizado as condições necessárias ao desenvolvimento do trabalho experimental. Para além disso, ao longo deste caminho pude contar com algumas pessoas, a quem também gostaria de agradecer.

À minha orientadora, a Professora Doutora Joana Curto, pelo conhecimento e todos os conselhos que colocou à disposição, pela disponibilidade, incansável apoio, dedicação e motivação incansáveis durante este ano de trabalho e pelo incentivo em cada ideia que me surgia, aconselhando-me e fazendo-me acreditar no meu valor.

À Unidade de Investigação FibEnTech, ao seu Coordenador Professor Manuel José Santos Silva, ao Professor Rogério Simões responsável pelo Grupo de Investigação, e aos Investigadores e Professores do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, sem os quais não seria possível ter acesso aos laboratórios e equipamentos para a realização do trabalho experimental.

À Doutora Ana Paula Gomes do Centro de Ótica por todo o tempo despendido e disponibilidade na aquisição de imagens do Microscópio Eletrónico de Varrimento e às Professoras Doutoradas Ana Carreira, Lurdes Ciríaco e Maria José Pacheco pela disponibilização do fármaco Diclofenac.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Jessica Ferreira, Pedro Videira e Diogo Santos pelo ambiente de trabalho saudável, boa disposição, espírito de equipa, companhia e ajuda em todos os momentos e às investigadoras Sónia Sousa e Vera Costa e técnica Kátia Monteiro pela prontidão de auxílio e esclarecimento de dúvidas durante todo o trabalho.

Aos meus colegas de curso, por vivenciarem comigo esta etapa.

Aos meus grandes amigos Marisa Pinheiro, Tatiana Freire, Patrícia Quelhas, Francisco Figueira e Cátia Miguel, por acreditarem em mim, pelo apoio, honestidade, paciência em momentos de desespero e por desculparem a ausência em momentos de convivência e demonstrarem que não há tempo que detenha a amizade, e ao meu treinador e amigo Doutor Bruno Silva, todos os conhecimentos transmitidos, ajuda, dedicação, amizade e convivência nestes longos anos.

Ao meu namorado e amigo André Franco, por me ajudar a fazer acreditar na conclusão desta etapa, pelo apoio ao longo deste percurso, por todo o companheirismo e dedicação demonstrados e pelas palavras de incentivo e gestos encorajadores nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, ao meu pai e à minha avó pela força impulsionadora e incentivo de fazer mais e melhor, por me ajudarem a ser a pessoa que me tornei hoje, pelo esforço, compreensão, conselhos, orientação e amor condicional. Sem o vosso apoio não teria sido possível esta longa etapa da minha vida.

A todos, o meu sincero muito obrigada!

## **Resumo**

O desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos utilizando materiais poliméricos biocompatíveis, recorrendo à manipulação de fibras de celulose na escala nano e à simulação computacional 3D constitui um exemplo de investigação multidisciplinar na área de Química Medicinal. O objetivo principal é o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos constituídos por uma matriz polimérica 3D de nanocelulose, com otimização da porosidade, para aplicações em terapêuticas orais em que a libertação controlada apresenta vantagens relativamente aos sistemas existentes. Utilizou-se a celulose nanofibrilada, desconstruída a partir da celulose vegetal, comparando-a com a celulose bacteriana, e com a carboximetilcelulose. Foi possível obter sistemas de entrega de fármacos com cinéticas de libertação diferenciadas e caracterizar as matrizes produzidas utilizando imagens SEM. A caracterização das estruturas incluiu a quantificação das dimensões das fibras e dos poros, recorrendo a programas de análise de imagem. Verificou-se que os sistemas produzidos a partir de celulose nanofibrilada apresentavam distribuições de tamanhos de poro com maior variabilidade, o que se traduziu numa cinética de libertação irregular. Posteriormente efetuou-se a simulação computacional da matriz polimérica e verificou-se que seria possível obter com os mesmos elementos fibrosos uma matriz com uma distribuição de poros mais regular. Produziram-se essas estruturas partir da celulose nanofibrilada, controlando as condições de dispersão das cadeias poliméricas e formação da estrutura 3D do gel, por manipulação das variáveis de processo da filtração. Utilizou-se a reticulação de um polímero auxiliar, o alginato, de forma a fixar e manter a estrutura pretendida. A cinética de libertação do sistema de entrega de fármacos contendo a matriz otimizada permitiu concluir que a obtenção de poros mais regulares se traduziu numa libertação controlada mais uniforme e numa melhoria significativa do sistema. Finalmente, produziram-se sistema inovadores combinando a matriz 3D de celulose nanofibrilada com carboximetilcelulose, uma vez que se provou que a sua presença permite aumentar a afinidade com a água. Conclui-se que foi possível evitar a libertação do Diclofenac no pH ácido do estômago e que a simulação computacional 3D é uma ferramenta útil para projetar sistemas de libertação controlada para diferentes aplicações terapêuticas.

## **Palavras-chave**

Celulose Nanofibrilada, Cinética de Libertação Controlada, Porosidade, Simulação Computacional 3D, Sistemas de Entrega de Fármacos



## **Abstract**

The development of Drug Delivery Systems using biocompatible polymeric materials, with manipulation of cellulose fibers at the nano scale and 3D computer simulation, is an example of multidisciplinary research in the field of Medicinal Chemistry. The main purpose is the development of drug delivery systems consisting of a 3D polymer matrix of nanocellulose, with porosity optimization, for applications in oral therapeutics in which controlled release presents advantages over existing systems. The nanofibrillated cellulose, deconstructed from vegetable cellulose, was compared to bacterial cellulose and carboxymethylcellulose. It was possible to obtain drug delivery systems with differentiated release kinetics and to characterize the matrices produced using SEM images. The characterization of the structures included the quantification of the dimensions of the fibers and the pores, using image analysis software's. Systems produced from nanofibrillated cellulose were found to have pore size distributions with greater variability, which resulted in irregular release kinetics. By using the computational simulation of the polymer matrix, it was verified that it would be possible to obtain a matrix with a more regular pore distribution with the same fibrous elements. These structures were produced from the nanofibrillated cellulose, controlling the conditions of dispersion of the polymer chains and formation of the 3D structure of the gel, by manipulation of the process variables of the filtration. Crosslinking of an auxiliary polymer, the alginate, was used to fix and maintain the desired structure. The release kinetics of the drug delivery system containing the optimized nanocellulose matrix have proved that more regular pores resulted in a more uniform release kinetics and a significant improvement of the system. Finally, innovative systems were produced by combining the 3D matrix of nanofibrillated cellulose with carboxymethylcellulose, since it has been proved that its presence allows the increase of the affinity with water. It has been concluded that it was possible to avoid the release of Diclofenac in the acidic pH of the stomach and that the 3D computational simulation is a useful tool to design controlled release systems for different therapeutic applications.

## **Keywords**

3D Computational Simulation, Controlled Release Kinetics, Drug Delivery Systems, Nanofibrillated Cellulose, Porosity



# Índice

## Capítulo I:

1. Preâmbulo e Objetivos	3
--------------------------	---

## Capítulo II:

2. Revisão Bibliográfica	7
2.1. Nanotecnologia	7
2.1.1. Nanomedicina	7
2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos	9
2.2.1. Definição	9
2.2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos de Base Polimérica	10
2.2.2.1. Sistemas de Liberação Controlados por Difusão	11
2.2.2.2. Sistemas de Liberação Ativados pelo Solvente	12
2.2.2.3. Sistemas de Liberação Controlados por Ação Química	13
2.3. Uso de Polímeros no Desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos	14
2.3.1. Alginato	14
2.3.2. Celulose	15
2.3.2.1. Estrutura da Celulose	16
2.3.2.2. Derivados da Celulose	17
2.3.2.2.1. Carboximetilcelulose	17
2.3.2.2.3. Nanocelulose	18
2.3.2.2.3.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)	19
2.3.2.2.3.2. Celulose Bacteriana (CB)	21
2.4. Diclofenac, um Anti-Inflamatório Não Esteroide (AINE)	22
2.4.1. Farmacologia	23
2.4.2. Características Físico-Químicas	23
2.4.3. Farmacocinética	24
2.4.3.1. Absorção	24
2.4.3.2. Distribuição	25
2.4.3.3. Metabolismo	25
2.4.3.4. Excreção/ Eliminação	25
2.4.4. Mecanismo de Ação	25
2.4.5. Classificação Biofarmacêutica	25
2.5. Cinética de Liberação em Sistemas de Entrega de Fármacos	26
2.5.1. Modelos Matemáticos para a Cinética de Liberação de Fármacos em	26
Sistemas Poliméricos	26
2.5.2. Fatores que afetam a Cinética de Liberação de Fármacos	29
2.6. Simulação Computacional e Modelação 3D de Redes de Materiais	30
Poliméricos	30

## Capítulo III:

3. Materiais e Métodos	39
3.1. Materiais	39
3.1.1. Equipamentos	39
3.1.2. Reagentes	40
3.2. Métodos	40
3.2.1. Obtenção de Estruturas	40

3.2.1.1. Obtenção de Estruturas em Filme	41
3.2.1.1.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)	41
3.2.1.1.2. Celulose Bacteriana (CB)	41
3.2.1.2. Obtenção de Estruturas em Gel	41
3.2.1.2.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)	41
3.2.1.2.2. Celulose Bacteriana (CB)	41
3.2.2. Produção de Sistemas de Entrega de Fármacos	42
3.2.2.1. Produção de DDS Poliméricos	42
3.2.2.1. Produção de DDS Poliméricos com o fármaco Diclofenac	42
Incorporado	42
3.2.3. Teor de Massa Seca	42
3.2.4. Microscopia Eletrônica de Varrimento	43
3.2.5. Tratamento e Análise de Imagem	44
3.2.6. Quantificação de Grupos Acídicos Totais dos Diferentes Materiais Nanocelulósicos	45
3.2.7. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à técnica de Reflexão Total Atenuada	45
3.2.8. Espectroscopia de Raio-X por Dispersão em Energia	45
3.2.9. Simulação Computacional	46
3.2.10. Estudos Cinéticos de Libertação do Fármaco Diclofenac	46
3.2.10.1. Curva de Calibração do Fármaco Diclofenac	47
3.2.11. Análise Estatística	47
<u>Capítulo IV:</u>	
4. Resultados e Discussão	51
4.1. Caracterização Estrutural dos DDS	51
4.1.1. Propriedades Estruturais dos DDS	53
4.1.1.1. DDS sem Materiais Celulósicos Incorporados	53
4.1.1.1.1. DDS sem Materiais Celulósicos Incorporados contendo Diclofenac	54
4.1.1.2. Celulose Nanofibrilada (CNF)	56
4.1.1.2.1. DDS com CNF incorporada	57
4.1.1.3. Celulose Bacteriana (CB)	58
4.1.1.3.1. DDS com CB incorporada	59
4.1.1.4. Carboximetilcelulose (CMC)	60
4.1.1.4.1. DDS com CMC incorporada	61
4.1.2. Tratamento e Análise de Imagem	62
4.1.2.1. Caracterização das dimensões das fibras na rede 3D dos diferentes materiais celulósicos incorporados nos DDS	63
4.1.2.2. Caracterização das dimensões dos poros na rede 3D dos diferentes materiais celulósicos incorporados nos DDS	65
4.2. Caracterização Química dos DDS	73
4.2.1. Quantificação dos Grupos Acídicos Totais	73
4.2.1.1. Celulose Nanofibrilada	74
4.2.1.2. Celulose Bacteriana	74
4.2.2. FTIR-ATR	74
4.2.2.1. Celulose <i>Kraft</i> branqueada de <i>Eucalipto globulus</i>	74
4.2.2.2. Celulose Nanofibrilada	75
4.2.2.3. Celulose Bacteriana	75
4.2.2.4. Carboximetilcelulose	76
4.2.2.5. Diclofenac	76



4.2.2.6. Sistemas de Entrega de Fármacos	76
4.2.2.6.1. DDS de Alginato Sem Materiais Celulósicos	
Incorporados	76
4.2.2.6.2. DDS de Alginato com o fármaco Diclofenac	
Incorporado	76
4.2.2.6.3. DDS com CNF Incorporada	77
4.2.2.6.4. DDS com CB Incorporada	77
4.2.2.6.5. DDS com CMC Incorporada	77
4.2.3. EDX	78
4.3. Simulações Computacionais	82
4.3.1. Quantificação dos Poros e da sua Variabilidade	84
4.4. Estudos Cinéticos de Libertação do Fármaco Diclofenac	88
4.4.1. Comparação da Cinética de Libertação dos Diferentes DDS	88
4.4.2. Influência dos Diferentes Materiais Celulósicos Incorporados nos DDS na Cinética de Libertação do Diclofenac	92
4.4.3. Medicamentos Convencionais Comercialmente Disponíveis: Comparação da Cinética de Libertação do Diclofenac dos Diferentes DDS Otimizados	93
4.5. <i>Design</i> de Novos DDS Combinados	95
<u>Capítulo V:</u>	
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	105
<u>Capítulo VI:</u>	
6. Referências Bibliográficas	111
<u>Anexos</u>	
Anexo A. Lista de Publicações	III
Anexo B. Análise dos Poros	XXIX
Anexo C. Normas ISO	XXXIII
Anexo D. Quantificação dos Grupos Acídicos	XXXVI
Anexo E. FTIR-ATR	XLI
Anexo F. Listagem de Documentos	XLVIII



## Lista de Figuras

### Capítulo II:

<b>Figura 2.1</b> - Ilustração de diferentes nanoestruturas utilizadas em nanomedicina e do seu tamanho aproximado (adaptado de (Larrañeta et al. 2016)).	8
<b>Figura 2.2</b> - Esquema do efeito da concentração do fármaco no organismo (adaptado de (Coelho et al. 2010)).	10
<b>Figura 2.3</b> - Esquemática de um sistema de reservatório (adaptado de (Pezzini, Silva, and Ferraz 2007)).	11
<b>Figura 2.4</b> - Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que aumentam de tamanho e sofrem erosão: (1) matriz no estado seco; (2) início da hidratação e aumento da matriz; (3) e (4) aumento da hidratação e aumento da matriz; (5) aumento da erosão das cadeias poliméricas; (6) separação das cadeias poliméricas com liberação rápida do fármaco restante (adaptado de (Lopes, Lobo, and Costa 2005)).	12
<b>Figura 2.5</b> - Esquema de um DDS controlado osmoticamente (adaptado de (Coelho et al. 2010)).	12
<b>Figura 2.6</b> - Liberação do fármaco, resultante do “swelling” de uma matriz polimérica (adaptado de (Coelho et al. 2010)).	13
<b>Figura 2.7</b> - Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.	13
<b>Figura 2.8</b> - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (1) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (2) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (3) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (4) fármaco disperso ou adsorvido molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (adaptado de (Schaffazick et al. 2003)).	13
<b>Figura 2.9</b> - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos MG, que constituem a molécula de alginato. Em (1) tem-se a sequência M-M; em (2) uma sequência G-G e em (3) uma sequência M-G-M (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais) (adaptado de (Garcia-Cruz, Foggetti, and Da Silva 2008)).	15
<b>Figura 2.10</b> - Estrutura molecular do monômero da glucose em cadeia linear (A) e em cadeia cíclica (B), bem como do polímero natural celulose e da sua unidade monomérica celobiose (C) (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais) (adaptado de (Klemm et al. 2005)).	16
<b>Figura 2.11</b> - Estrutura molecular 3D do polímero natural celulose (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).	16
<b>Figura 2.12</b> - Representação esquemática da parede celular onde se encontram as fibrilas da celulose (adaptado de (Zimmermann, Pöhler, and Geiger 2004)).	17
<b>Figura 2.13</b> - Estrutura molecular de uma unidade da CMC, em 2D (A) e em 3D (B) (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).	17
<b>Figura 2.14</b> - Imagem de um gel de CNF.	19
<b>Figura 2.15</b> - Mecanismo de oxidação seletiva do C6 dos grupos hidroxilos primários da celulose mediada por TEMPO (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais) (adaptado de (Pierre et al. 2017)).	20
<b>Figura 2.16</b> - Imagem de uma membrana de CB.	21
<b>Figura 2.17</b> - Esquemática geral da organização estrutural da CB (adaptado de (Sulaeva et al. 2015)).	22
<b>Figura 2.18</b> - Estrutura molecular do Diclofenac, em 2D (A) e em 3D (B)	

(elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).	23
<b>Figura 2.19</b> - Fatores que influenciam a cinética e o mecanismo de libertação dos fármacos a partir de DDS poliméricos (adaptado de (Varma et al. 2004)).	30
<b>Figura 2.20</b> - Cronologia de vários modelos desenvolvidos e implementados para materiais fibrosos/porosos ao longo dos anos.	31
<b>Figura 2.21</b> - Comportamento das propriedades das estruturas após tratamento mecânico (adaptado de (Levlin and Soderhjelm 1999)).	32
<b>Figura 2.22</b> - Exemplo de uma estrutura de rede 3D de fibras simulada pelo modelo de Niskanen & Alava (adaptado de (Alava and Niskanen 2006)).	33
<b>Figura 2.23</b> - Esquematização da deposição das fibras na matriz 3D seguida de extração de planos e inflexão destas na medida de se adequarem à estrutura subjacente (adaptado de (Curto et al. 2011)).	33
<b>Figura 2.24</b> - Design do método Latin Hypercube a 3 dimensões, com uma projeção do topo dos planos x2-x3 (adaptado de (Santner, Williams, and Notz 2003)).	34
<b>Figura 2.25</b> - Exemplo de uma árvore de decisão/regressão obtida pelo software MATLAB® (adaptado de (Curto 2011)).	35
<b>Figura 2.26</b> - Metodologia usada nas simulações computacionais e caracterização experimental para otimizar e desenvolver novos nanomateriais porosos para aplicações biomédicas (adaptado de (Videira et al. 2016)).	36
<b>Figura 2.27</b> - Exemplo de uma simulação computacional de um material celulósico poroso, através do modelo validado por Curto et al. (2011) (adaptado de (Curto et al. 2016)).	36
 <u>Capítulo III:</u>	
<b>Figura 3.1</b> - Curva de calibração do Diclofenac, obtida num comprimento de onda máximo de 276 nm.	47
 <u>Capítulo IV:</u>	
<b>Figura 4.1</b> - Metodologia experimental descrevendo os resultados obtidos em cada etapa realizada.	51
<b>Figura 4.2</b> - Imagens SEM de uma esfera de alginato, em corte transversal, com vista da sua periferia (a) e da sua cavidade (b), com uma ampliação de 50x.	53
<b>Figura 4.3</b> - Imagens SEM do interior de uma esfera de alginato, com ampliação de 500x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 5000x (d), e da sua periferia, com uma ampliação de 5000x (e) e 15000x (f).	54
<b>Figura 4.4</b> - Imagens SEM de uma esfera de alginato contendo Diclofenac, em corte transversal, com vista da sua periferia (a) e da sua cavidade (b), com uma ampliação de 50x.	55
<b>Figura 4.5</b> - Imagens SEM de esferas de alginato (a) e de alginato contendo Diclofenac (b), em corte transversal, com medições dos sistemas, com uma ampliação de 50x.	55
<b>Figura 4.6</b> - Imagem SEM do interior de uma esfera de alginato contendo Diclofenac, com ampliação de 500x (a), 10000x (b), 15000x (c) e 20000x (d), e da sua periferia, com ampliação de 500x (e) e 10000x (f).	56
<b>Figura 4.7</b> - Imagens SEM da CNF em forma de gel, com uma ampliação de 150x (a), 500x (b), 6000x (c) e 10000x (d), e com medições de fibras, com uma ampliação de 500x (e) e 10000 (f).	57
<b>Figura 4.8</b> - Imagem SEM de um DDS com CNF incorporada, em corte transversal, com uma ampliação de 50x.	58
<b>Figura 4.9</b> - Imagens SEM do interior de um DDS com CNF incorporada, com ampliação de 500x (a), 1000x (b), 15000x (c) e 20000 (d).	58

- Figura 4.10** - Imagens SEM de um corte da membrana de CB, com ampliação de 50x (a), 500x (b), 6000x (c) e 10000x (d). 59
- Figura 4.11** - Imagem SEM de um corte da membrana de CB, com medições de fibras, com uma ampliação de 10000x. 59
- Figura 4.12** - Imagem SEM de um DDS com CB incorporada, em corte transversal, com uma ampliação de 50x. 60
- Figura 4.13** - Imagens SEM do interior de um DDS com CB incorporada, com ampliação de 500x (a), 10000x (b), 15000x (d) e 20000x (e). 60
- Figura 4.14** - Imagem SEM da CMC em forma de sal sódico, com uma ampliação de 50x (a) e com fibras na sua composição, com uma ampliação de 500x (b). 61
- Figura 4.15** - Imagens SEM dos DDS com CMC incorporada, em corte transversal, com vista da periferia (a) e da cavidade (b), com uma ampliação de 50x. 61
- Figura 4.16** - Imagens SEM da rede 3D da CMC no interior dos DDS, com uma ampliação de 500x (a), 1000x (b), 3000x (c), 6000x (d), 10000x (e) e 15000x (f). 62
- Figura 4.17** - Binarização das imagens SEM das diferentes redes 3D de CNF, CB e CMC realizadas pelas metodologias de análise de imagem que permitem relacionar propriedades das fibras e dos poros (ampliação CNF: 20000x; ampliação CB: 10000x; ampliação CMC: 6000x). 63
- Figura 4.18** - Comparação dos histogramas referentes à área dos poros na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS, através da metodologia do Esprit 1.9 da Bruker ((a) e (b)) e do método de colocação de vetores ((a), (b) e (c)). 69
- Figura 4.19** - Correlação e comparação da área dos poros da rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS com o diâmetro médio, comprimento e largura. 70
- Figura 4.20** - Correlação e comparação da área e do comprimento dos poros da rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS com o diâmetro médio, largura, circularidade, projeção X e Y, rugosidade e forma. 71
- Figura 4.21** - Distribuição dos poros com diferentes tamanhos na rede 3D da CNF (a), CB (b) e CMC (c) no interior dos DDS. 72
- Figura 4.22** - Espectro da análise por EDX do interior dos DDS. 79
- Figura 4.23** - Imagem SEM (esquerda) e mapa de EDX (direita) da amostra no interior dos DDS, com 500x de ampliação, para o átomo de Cl. 80
- Figura 4.24** - Mapas de EDX do interior dos DDS, com uma ampliação de 10000x, para os diferentes elementos químicos que constituem a amostra. 81
- Figura 4.25** - Imagem SEM (a) e mapa de EDX da amostra no interior dos DDS, com 10000x de ampliação, para o C e o O (b), o Ca (c) e o Cl (d). 81
- Figura 4.26** - Imagens computacionais da deposição da primeira fibra (a), da deposição de fibras que não se depositam sobre outras pois, o espaço ocupado por outras fibras não vai ser sobreposto (b) e da organização espacial das fibras na matriz 3D (c). 82
- Figura 4.27** - Imagem explicativa da obtenção de resultados computacionais. O simulador computacional simula a rede 3D dos DDS obtida experimentalmente (a) através da deposição de fibras nesta matriz (b), exemplificada por simulações estruturais (adaptado de (Sampson 2001)) (c), obtendo portanto uma rede 3D computacional onde estas fibras se encontram, com seleção de local representativo desta matriz (d). 83
- Figura 4.28** - Imagens obtidas computacionalmente da rede porosa 3D da CNF (a) e da sua binarização (b), realizadas pela metodologia de análise de imagem DiamterJ do programa ImageJ. 84
- Figura 4.29** - Comparação da variabilidade da área dos poros na rede 3D experimental e computacional da CNF. 86
- Figura 4.30** - Imagens obtidas computacionalmente da rede porosa 3D da CNF após uma otimização no simulador computacional (a) e da sua binarização (b),

realizadas pela metodologia de análise de imagem DiamterJ do programa ImageJ.	86
<b>Figura 4.31</b> - Variabilidade da área dos poros na rede 3D otimizada da CNF.	87
<b>Figura 4.32</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos, em meios com pH diferentes.	89
<b>Figura 4.33</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos otimizados através de simulação computacional, em meios com pH diferentes.	90
<b>Figura 4.34</b> - DDS antes (esquerda) e após (direita) dos estudos cinéticos de liberação do Diclofenac.	92
<b>Figura 4.35</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS otimizados com e sem materiais poliméricos incorporados, em meios com pH diferentes.	92
<b>Figura 4.36</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados e numa cápsula de liberação prolongada, em meios com pH diferentes.	94
<b>Figura 4.37</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados e num comprimido de liberação prolongada, em meios com pH diferentes.	95
<b>Figura 4.38</b> - Imagens SEM da rede 3D da CNF/CMC 0,1% no interior dos DDS, com uma ampliação de 20000x (a) e 30000x (b), da CNF/CMC 0,01%, com uma ampliação de 10000x (c) e 20000x (d), e da CNF/CMC 0,001%, com uma ampliação de 10000x (e) e 20000x (f).	97
<b>Figura 4.39</b> - Comparação dos histogramas referentes à área dos poros na rede 3D da CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001%.	99
<b>Figura 4.40</b> - Distribuição dos poros com diferentes tamanhos na rede 3D da CNF/CMC 0,01% (a) e CNF/CMC 0,001% (b).	99
<b>Figura 4.41</b> - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em novos DDS promissores combinados, em meios com pH diferentes.	100

## Lista de Tabelas

### Capítulo II:

<b>Tabela 2.1</b> - Dimensões de nanomateriais celulósicos (adaptado de (Osong, Norgren, and Engstrand 2016)).	18
<b>Tabela 2.2</b> - Propriedades físico-químicas do Diclofenac, bem como as suas vantagens (L. Yang and Fassihi 1997).	24
<b>Tabela 2.3</b> - Valores do expoente de libertação (n) na equação de Peppas e mecanismo de libertação do fármaco associado (adaptado de (Ritger and Peppas 1987)).	29

### Capítulo III:

<b>Tabela 3.1</b> - TMS obtido para diferentes materiais utilizados nos estudos, bem como o tempo utilizado para cada um.	43
<b>Tabela 3.2</b> - Condições de Operação para o método de FTIR-ATR.	45

### Capítulo IV:

<b>Tabela 4.1</b> - Materiais utilizados para os DDS em estudo, tanto à escala molecular e nanométrica como simulações computacionais.	52
<b>Tabela 4.2</b> - Caracterização das propriedades das fibras encontradas na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS utilizando ferramentas de análise de imagem.	64
<b>Tabela 4.3</b> - Caracterização das propriedades dos poros encontrados na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS utilizando ferramentas de análise de imagem.	67
<b>Tabela 4.4</b> - Resultados obtidos para o teor de grupos ácidos totais para a pasta de celulose Kraft branqueada de Eucalipto globulus, através da norma SCAN-CM 65:02 e de uma alteração à mesma.	74
<b>Tabela 4.5</b> - Percentagem atômica dos elementos presentes no interior dos DDS, com uma ampliação de 500x.	80
<b>Tabela 4.6</b> - Percentagem atômica dos elementos presentes no interior dos DDS, com uma ampliação de 10000x.	80
<b>Tabela 4.7</b> - Caracterização das propriedades dos poros na rede 3D da CNF obtida pelo simulador computacional, através da análise de imagem realizada pela ferramenta DiameterJ do programa ImageJ.	85
<b>Tabela 4.8</b> - Caracterização das propriedades dos poros na rede 3D otimizada da CNF obtida pelo simulador computacional, através da análise de imagem realizada pela ferramenta DiameterJ do programa ImageJ.	87
<b>Tabela 4.9</b> - Registo das massas pesadas dos DDS otimizados, antes e após os estudos cinéticos, e índice de “swelling” para cada sistema.	91
<b>Tabela 4.10</b> - Registo das massas pesadas dos DDS não-celulósicos, antes e após os estudos cinéticos.	93
<b>Tabela 4.11</b> - Caracterização das propriedades dos poros encontrados na rede 3D da CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001% no interior dos DDS utilizando uma análise Esprit.	98
<b>Tabela 4.12</b> - Índice de “swelling” para os novos DDS combinados.	101





## **Lista de Acrónimos**

2D	Duas Dimensões
3D	Três Dimensões
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção
AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroide
CB	Celulose Bacteriana
CMC	Carboximetilcelulose
CMF	Celulose Microfibrilada
CNF	Celulose Nanofibrilada
COX	Ciclooxigenase
DDS	Drug Delivery Systems (Sistemas de Entrega de Fármacos)
EDX	Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (Espectroscopia de Raio-X por Dispersão em Energia)
FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Reflexão Total Atenuada)
NCC	Nanocristais de celulose
NFC	Nanofibras de celulose
RBA	Relative Bonded Area (Área Relativa de Ligação)
SEM	Scanning electron microscopy (Microscopia Eletrónica de Varrimento)
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil
TMS	Teor de Massa Seca



# Capítulo I

## Preâmbulo e Objetivos



# 1. Preâmbulo e Objetivos

A entrega controlada de fármacos é considerada como uma das mais promissoras aplicações da nanomedicina pois permite reduzir a toxicidade do fármaco mantendo os efeitos terapêuticos. A utilização de partículas transportadoras na escala nano, isto é com uma das dimensões inferior a 100 nm (Jong and Borm 2008), pode conduzir ao aumento da biocompatibilidade e segurança, possibilitando o desenvolvimento de fármacos mais seguros (Owen et al. 2015; Jong and Borm 2008).

Os nanomateriais poliméricos apresentam grande importância na área farmacêutica em virtude de possuírem tamanho reduzido, elevada área e carga superficiais, entre outras propriedades, que os tornam eficientes sistemas em aplicações na liberação controlada de fármacos (Jorfi and Foster 2015). Desta forma, surgiu a necessidade da produção de sistemas de entrega de fármacos utilizando materiais poliméricos devido à baixa incidência de efeitos secundários, à eficácia terapêutica e à biocompatibilidade. Sistemas de entrega de fármacos contendo celulose têm muitas vantagens quando comparados com as formas convencionais de dosagem uma vez que são solúveis em água ou solventes orgânicos e não alteram as condições de liberação do fármaco (Moulton and Wallace 2014; Jorfi and Foster 2015). O interesse pela aplicação de novas formas de materiais celulósicos, como a carboximetilcelulose, a celulose nanofibrilada e a celulose bacteriana, tem originado uma grande atividade em torno do isolamento e caracterização dos mesmos.

Um dos fármacos promissores a incorporar nestes sistemas é o Diclofenac uma vez que não é estável no ambiente ácido do estômago, estando associado a efeitos gastrointestinais como ulcerações e hemorragias (Yang and Fassihi 1997; Mehta, Bhasin and Dham 2008).

A relevância da otimização das propriedades estruturais, no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, para alcançar as funcionalidades pretendidas é crucial. A estrutura 3D, a porosidade, a espessura e a área relativa de ligação de um sistema polimérico são determinantes para otimizar a função de transporte e liberação dos sistemas de distribuição. O desenvolvimento de um simulador computacional validado experimentalmente (Curto et al. 2011) permite, recorrendo a estudos de simulação e à organização de dados utilizando árvores de decisão/regressão, projetar novos materiais otimizados. A identificação das propriedades das micro e nano fibras de celulose, e das estruturas por elas formadas, que mais influenciam as propriedades do sistema poroso é determinante em aplicações tais como o transporte e liberação controlada de moléculas terapêuticas.

Tendo em consideração todos estes factos, esta presente dissertação tem como objetivos:

- Desenvolver sistemas de entrega de fármacos partindo de nanocelulose e derivados de celulose como unidades estruturais;
- Comparar e caracterizar estruturalmente e quimicamente as unidades estruturais utilizadas para a produção destes sistemas;
- Otimizar a porosidade 3D recorrendo a métodos de simulação computacional;
- Integrar dados de métodos de análise 2D com dados das propriedades estruturais dos nanomateriais porosos do simulador computacional;
- Comparação de dados experimentais com dados computacionais;
- Estudar a cinética de libertação do fármaco a partir dos sistemas produzidos;
- *Design* de novos sistemas de entregas do fármaco combinados, pela análise da cinética de libertação de fármacos e de resultados computacionais.

Esta dissertação está, então, organizada em 5 capítulos. Neste primeiro capítulo, está apresentado o contexto do trabalho, com foco sobre o tema em estudo, os objetivos e a estrutura do mesmo. O capítulo II introduz o conceito e discussão sobre nanotecnologia, com foco na nanomedicina, sistemas de entrega de fármacos, com o uso de polímeros no seu desenvolvimento e o Diclofenac, como um fármaco incorporado nestes, bem como o conceito da cinética de libertação de fármacos e simulação computacional. O capítulo III descreve os materiais e métodos utilizados para executar o trabalho experimental. O capítulo IV centra-se na apresentação e discussão dos resultados obtidos, ilustrados com imagens SEM e análise de imagem, figuras das simulações computacionais e gráficos. O capítulo V conclui o trabalho efetuado e propõe pesquisas para eventuais trabalhos futuros. E por fim, o capítulo VI apresenta uma listagem das referências bibliográficas utilizadas para a realização desta dissertação.

# Capítulo II

## Revisão Bibliográfica





## 2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma das subdisciplinas da nanotecnologia, a nanomedicina, e a sua aplicação promissora no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos. Referem-se exemplos de polímeros utilizados para o desenvolvimento destes sistemas, bem como o fármaco que será incorporado nestes, o Diclofenac. A revisão bibliográfica inclui a cinética de libertação de fármacos, modelação e simulações computacional 3D de materiais poliméricos porosos.

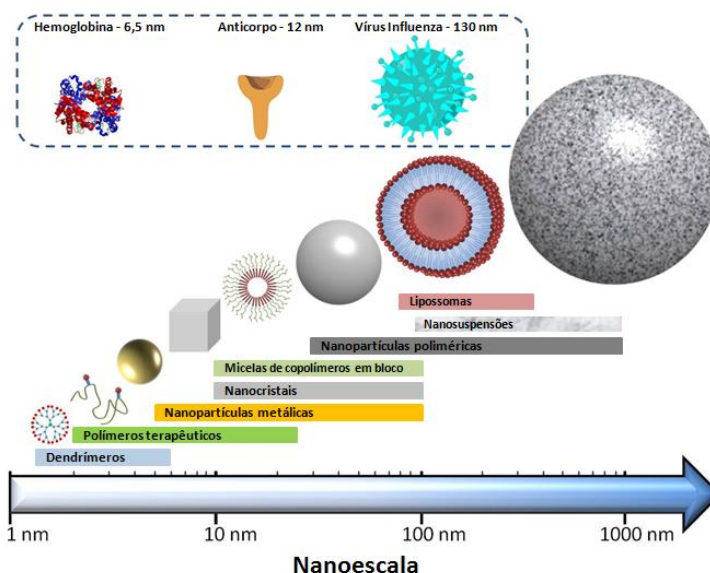
### 2.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia envolve o *design*, produção, caracterização e aplicação de materiais em escala nano, providenciando novas e avançadas tecnologias. As nanotecnologias são promissoras para a obtenção de benefícios económicos e tecnológicos significativos, no entanto existe apenas um conhecimento limitado do seu potencial de perigo, por exemplo, devido a exposição a estes nanomateriais, quer no meio ambiente, quer através de produtos de consumo. Desta forma, os desafios associados à nanosegurança são globais. Um exemplo onde a nanosegurança é particularmente importante é a entrega de fármacos uma vez que compreende, pelo menos, dois componentes: o fármaco, devido ao seu mecanismo de libertação para um alvo específico bem como a sua ADME (administração, distribuição, metabolismos e excreção), e o nanotransportador, devido à incorporação e libertação de fármacos, estabilidade da formulação, biocompatibilidade, biodistribuição e direcionamento e, ainda, funcionalidade (Jong and Borm 2008; Owen et al. 2015). A variação do tamanho, forma, química superficial, composição e agregação das nanopartículas faz com que as propriedades se alterem, aumentando a capacidade de interagirem com organismos. Assim, a investigação da nanotoxicidade do complexo nanopartícula-fármaco é necessária, tal como a discriminação entre o fármaco e as nanopartículas por si só não pode ser realizada (Krug and Wick 2011; Jong and Borm 2008).

#### 2.1.1. Nanomedicina

A nanomedicina, uma área da ciência relativamente recente, tem sido responsável por impulsionar diversos estudos ao longo dos últimos anos. Esta tecnologia alcança a medicina, resolvendo problemas relacionados com o diagnóstico, tratamento e/ou prevenção de doenças a nível molecular, assim como na criação de novos e efetivos agentes terapêuticos (Owen et al. 2015). A entrega de fármacos e terapia génica são consideradas como uma das mais promissoras aplicações da nanomedicina, fazendo uso de nanopartículas transportadoras com um diâmetro menor que 100 nm, por definição (Jong and Borm 2008).

Conseqüentemente, a nanomedicina opera ao mesmo nível de muitos fenômenos biológicos já que a grande maioria das moléculas, estruturas e processos do organismo humano ocorrem nesta mesma ordem de grandeza (Larrañeta et al. 2016), como pode ser visível na Figura 2.1. No entanto, na administração de fármacos pode ser necessário tamanhos de nanopartículas relativamente grandes para transportar quantidades suficientes do fármaco ou para atravessar membranas específicas, como é o caso da barreira hematoencefálica (Jong and Borm 2008).



**Figura 2.1** - Ilustração de diferentes nanoestruturas utilizadas em nanomedicina e do seu tamanho aproximado (adaptado de (Larrañeta et al. 2016)).

Estas nanopartículas têm sido consideradas como uma forma atrativa para fins médicos devido às suas características únicas, como a grande relação superfície-massa, propriedades quânticas e a capacidade de serem funcionalizadas, ou seja, a sua capacidade de adsorver/ligar e transportar fármacos, sondas e/ou proteínas. A sua composição pode variar de materiais de origem biológica ou sintética, resultando em diferentes interações possíveis com células-alvo (Jong and Borm 2008).

O desenvolvimento de terapias utilizando polímeros tem-se revelado promissor em nanomedicina pois estes apresentam propriedades substancialmente diferentes, relativamente a outros materiais convencionais, incluindo a acumulação passiva em locais alvo e soluções personalizadas de engenharia para exigências clínicas específicas. A extensa versatilidade dos próprios polímeros abre novos horizontes inovadores para coagir problemas cirúrgicos, tal como infeções, regeneração de tecidos, reconstrução e tratamentos de oncologia (Markman et al. 2013; Azzopardi, Conlan and Whitaker 2016). Desta forma, a aplicação da nanotecnologia na medicina contribui para diagnósticos mais eficazes, bem como para a redução das doses terapêuticas, através da utilização de sistemas de entrega de fármacos e diminuição dos efeitos adversos associados.

## **2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos**

O fármaco, sendo uma substância química de constituição definida com aplicações como agente preventivo, curativo ou diagnóstico, engloba todos os compostos bioativos com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético. Desta forma, quando um fármaco é administrado, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo e a maior parte é desperdiçada, isto devido à sua distribuição por todos os tecidos e à sua metabolização ou excreção/eliminação antes de atingir o local de ação (Rosen and Abribat 2005). Por estas razões, surgiu a necessidade de desenvolver soluções terapêuticas que permitam controlar a capacidade e o tempo de libertação do fármaco em áreas específicas do organismo, para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados (Safari and Zarnegar 2014). Estas soluções terapêuticas designam-se de sistemas de entrega de fármacos.

### **2.2.1. Definição**

O termo “*sistema de entrega de fármacos*”, do inglês “Drug Delivery Systems” (DDS), define-se como uma formulação ou um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo, melhorando a sua eficácia e segurança por meio do controlo da taxa, tempo e local de libertação do fármaco no corpo. Este processo inclui a administração do produto terapêutico, a libertação dos compostos ativos pelo produto e o transporte subsequente destes compostos através das membranas biológicas para o local de ação (Mura, Nicolas, and Couvreur 2013). No *design* de DDS deve ter-se em conta a especificidade do alvo do fármaco, a redução da toxicidade mantendo de igual forma os efeitos terapêuticos, o reforço da biocompatibilidade/biodegradabilidade e segurança, o desenvolvimento mais acelerado de novos fármacos seguros, entre outros (Owen et al. 2015). Assim, o principal objetivo da utilização de um DDS é, além de proporcionar um composto biologicamente ativo de uma forma controlada por um período de tempo e com uma determinada taxa de libertação, conseguir manter o nível do fármaco no corpo dentro da janela terapêutica, reduzindo assim os picos de concentração sanguínea do fármaco (libertação em pulso). A utilização de DDS evita que se ultrapasse a faixa tóxica e que a concentração decaia para a sub-terapêutica, contribuindo para uma maior eficácia do sistema (Coelho et al. 2010), como representado na Figura 2.2.

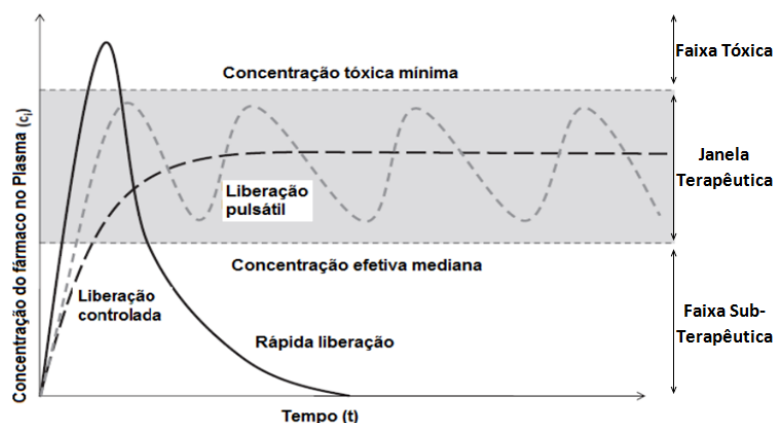


Figura 2.2 - Esquema do efeito da concentração do fármaco no organismo (adaptado de (Coelho et al. 2010)).

Na entrega de um fármaco convencional, a concentração do fármaco na corrente sanguínea sobe quando é administrado, atinge um pico e, em seguida, desce. No entanto, com DDS, a taxa de liberação do fármaco corresponde à taxa de eliminação deste; portanto, sua concentração encontra-se dentro da janela terapêutica durante um tempo mais longo. Desta forma, este padrão de liberação é altamente benéfico para fármacos que são rapidamente metabolizados e eliminados do corpo após administração (Rosen and Aribat 2005). Devido à ligação seletiva, os efeitos terapêuticos do fármaco são expressos apenas em locais terapêuticos e não causam efeitos secundários tóxicos em locais não terapêuticos. O direcionamento do fármaco é conseguido por um transportador que tem uma afinidade específica para determinados órgãos, tecidos ou células. Assim, o fármaco pode exibir as suas atividades farmacológicas apenas no local específico em que o transportador o entrega (Yokoyama 2005).

Os DDS, de acordo com os variados critérios, são classificados consoante os materiais utilizados (poliméricos ou não), o tipo de agente terapêutico incorporado (proteínas, material genético, moléculas de baixo peso molecular), o estado físico (líquido, sólido ou semi-sólido), a via de administração, a forma como o fármaco se encontra imobilizado no sistema, entre outros (Tiwari et al. 2012; Zhang, Chan and Leong 2013; Zelikin, Ehrhardt and Healy 2016; Safari and Zarnegar 2014).

### 2.2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos de Base Polimérica

Os mais recentes sistemas de liberação são constituídos por matérias à base de polímeros. Pela sua variedade, versatilidade e propriedades, estes materiais são uma das classes mais investigada no desenvolvimento de DDS (Arafa and Ayoub 2017). De facto, o desenvolvimento atual de novos DDS mais sofisticados e eficientes anda a par com o desenvolvimento de novos polímeros, com propriedades cada vez mais específicas (Kim et al. 2009; Villanova, Oréfice and Cunha 2010).

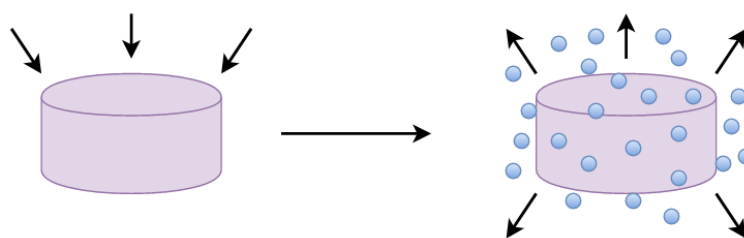
Na última década, os polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, não imunogênicos, naturais, semissintéticos e sintéticos são os mais comumente utilizados para DDS uma vez que fornecem uma boa especificidade/libertação e baixa toxicidade (Mogoşanu et al. 2016; Sun et al. 2017; Safari and Zarnegar 2014).

Os DDS preparados a partir de materiais poliméricos, de acordo com o mecanismo de libertação das formas farmacêuticas, podem ser classificados em sistemas de libertação controlados por difusão, que se subdividem em sistemas de reservatório e sistemas matriciais; em sistemas de libertação ativados pelo solvente, que incluem sistemas de libertação controlados pela pressão osmótica e pela absorção de água (“swelling”); e, por fim, em sistemas de libertação controlados por ação química, que se encontram subdivididos em sistemas de cadeia pendentes e em sistemas biodegradáveis (Jain 2008).

No entanto, alguns DDS não se inserem perfeitamente em nenhuma destas três categorias, uma vez que não existe um mecanismo dominante responsável pela libertação do fármaco, sendo este determinado por uma combinação dos vários mecanismos possíveis.

### **2.2.2.1. Sistemas de Libertação controlados por Difusão**

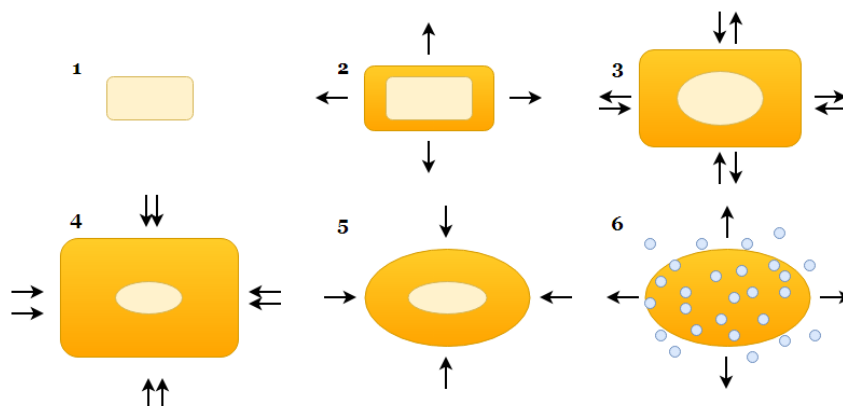
Um sistema de reservatório consiste num dispositivo constituído por um fármaco, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável. Como mostrado na Figura 2.3, o fármaco é libertado por difusão através da membrana de revestimento, que tanto pode ser microporosa, onde a difusão do fármaco no meio, que estiver perfazendo estes, determinará o processo de libertação, ou não apresentar poros, onde a libertação é controlada pela difusão da substância ativa através do polímero (Pezzini, Silva and Ferraz 2007; Li and Mooney 2016). As propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, naturalmente, a taxa de libertação do fármaco.



**Figura 2.3** - Esquemática de um sistema de reservatório (adaptado de (Pezzini, Silva and Ferraz 2007)).

A utilização de sistemas matriciais permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos, podendo ser definido como um sistema que controla a libertação da substância ativa, molecularmente dispersa ou dissolvida num suporte resistente à desintegração (Moraes et al. 2014). Nas matrizes hidrofóbicas, o fármaco é libertado essencialmente por difusão, podendo mesmo haver um mecanismo de erosão associado. Porém, nas matrizes hidrofílicas (Figura 2.4) a libertação é regulada por processos de crescimento, difusão e erosão, isto é, quando o fármaco entra em contacto com os fluidos

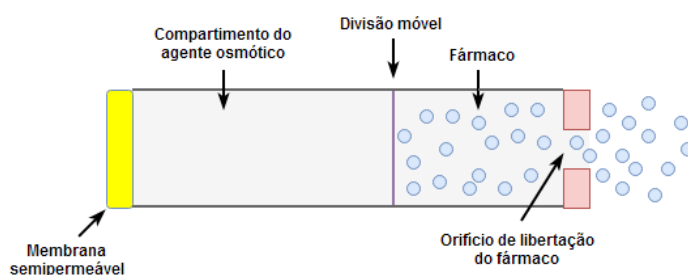
gastrointestinais, o polímero na sua superfície é hidratado e aumenta de tamanho, formando uma camada gelificada, sendo dissolvida posteriormente, promovendo libertação da forma farmacêutica por erosão ou difusão (Pezzini, Silva and Ferraz 2007).



**Figura 2.4** - Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que aumentam de tamanho e sofrem erosão: (1) matriz no estado seco; (2) início da hidratação e aumento da matriz; (3) e (4) aumento da hidratação e aumento da matriz; (5) aumento da erosão das cadeias poliméricas; (6) separação das cadeias poliméricas com libertação rápida do fármaco restante (adaptado de (Lopes, Lobo and Costa 2005)).

### 2.2.2.2. Sistemas de Libertação Ativados pelo Solvente

Nos sistemas controlados osmoticamente (Figura 2.5) a forma farmacêutica é constituída por um núcleo, contendo um agente osmótico, revestido com uma membrana semipermeável, possuindo um orifício feito a laser, através da qual um solvente sem ou com uma pequena quantidade de fármaco flui para uma câmara na qual está contido (Coelho et al. 2010). Quando o solvente penetra no núcleo (atraído pelo agente osmótico), aumenta a pressão interna, o que resulta na libertação do fármaco dissolvido ou disperso, através do orifício na membrana.



**Figura 2.5** - Esquema de um DDS controlado osmoticamente (adaptado de (Coelho et al. 2010)).

Os sistemas de libertação controlados pela absorção de água (“*swelling*”), esquematizado na Figura 2.6, são baseados numa cadeia de ligação cruzada polimérica hidrofílica, sendo capaz de absorver grandes quantidades de água sem se dissolver. Esta absorção de água permite que o fármaco no interior do sistema se difunda para o exterior a uma velocidade que depende da quantidade de água que entra na matriz polimérica (Coelho et al. 2010).

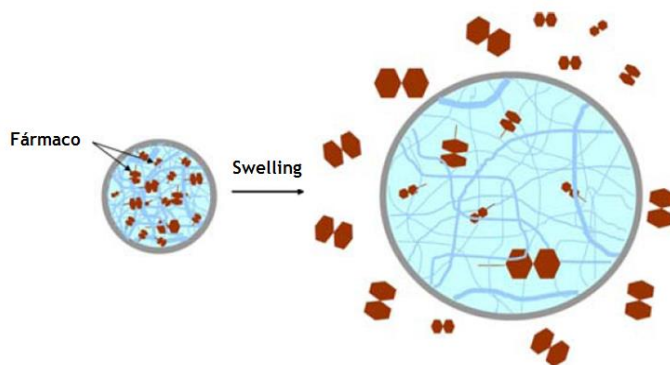


Figura 2.6 - Libertação do fármaco, resultante do “swelling” de uma matriz polimérica (adaptado de (Coelho et al. 2010)).

### 2.2.2.3. Sistemas de Libertação Controlados por Ação Química

Nos sistemas de cadeias pendentes, também designados de pró-fármacos (Figura 2.7), as moléculas de fármaco encontram-se quimicamente ligadas à cadeia de polímeros por ligações suscetíveis de degradação, sendo que estas ligações são quebradas por hidrólise ou por ação enzimática, *in vivo*, originando uma liberação controlada do fármaco (Dubey et al. 2016; Yang et al. 2016).

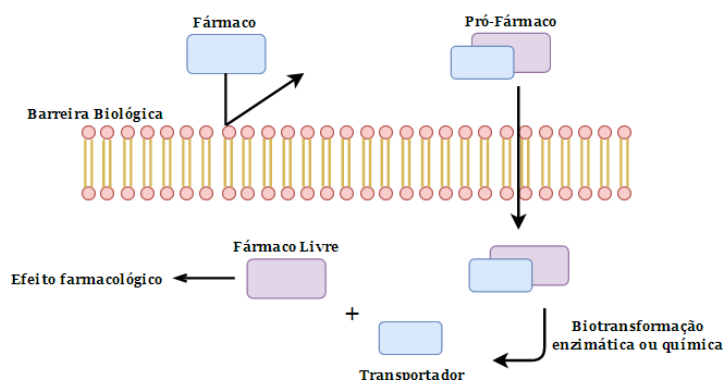


Figura 2.7 - Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.

Nos sistemas biodegradáveis, esquematizado na Figura 2.10, o fármaco é disperso ou dissolvido numa matriz polimérica biodegradável, sendo a taxa de liberação controlada pela desintegração da matriz, provocada pela biodegradação do polímero (Schaffazick et al. 2003).

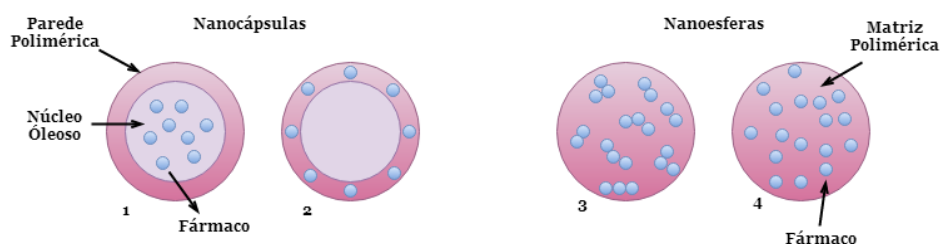


Figura 2.8 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (1) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (2) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (3) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (4) fármaco disperso ou adsorvido molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (adaptado de (Schaffazick et al. 2003)).

## **2.3. Uso de Polímeros no Desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos**

Os polímeros, devido às suas características como a eficácia terapêutica, biocompatibilidade e baixa incidência de efeitos secundários, tornam-se muito vantajosos na produção de DDS (Kierys, Grochowicz and Kosik 2015; Oliveira et al. 2015). Em consequência, a substância ativa pode ser facilmente misturada, dissolvida ou dispersa neste. Por outro lado, o polímero poderá revestir e envolver o núcleo, produzindo uma membrana suficientemente forte para se manter íntegra durante as operações a que for sujeita.

Os polímeros oferecem uma vasta variedade de propriedades como a difusidade, a permeabilidade e a solubilidade, que podem ser combinadas de forma a atingir o tipo desejado de libertação do fármaco (Zhang et al. 2015). O mecanismo pelo qual ocorre a libertação deste é influenciado pela estrutura do polímero utilizado nos DDS. Na verdade, o grau de porosidade do polímero prevalece na taxa de libertação do fármaco, sendo que quanto maior a porosidade, maior a taxa de libertação (Hansen 2013).

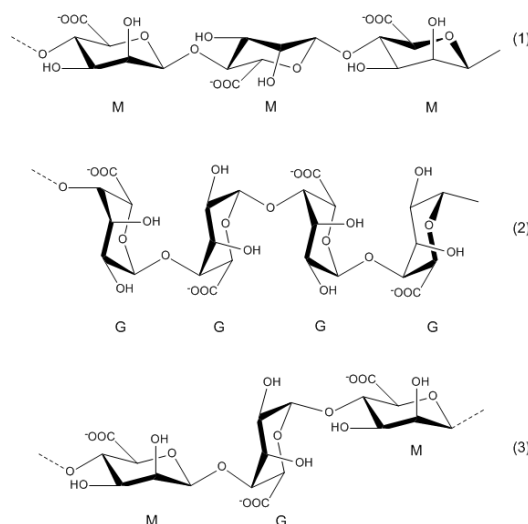
Nos últimos anos, devido aos seus benefícios, os polímeros naturais têm sido objeto de investigação na área biomédica e farmacêutica, comparativamente aos relativos sintéticos. Exemplos destes polímeros naturais incluem o alginato e a celulose, que se encontram presentes abundantemente em organismos naturais (Petersen and Gatenholm 2011). O sistema de entrega que irá ser estudado é inovador, uma vez que inclui uma matriz polimérica 3D de nanocelulose.

### **2.3.1. Alginato**

O alginato, sendo um polissacarídeo de ocorrência natural, detém um grande potencial no que respeita ao seu uso em DDS pela sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Xu et al. 2007; Hua et al. 2010). Este polímero é isolado a partir de algas castanhas (*Phaeophyceae*), as quais são extraídas com uma solução alcalina diluída que solubiliza o ácido algínico presente, podendo ser convertido num sal do qual o alginato é a forma principal atualmente utilizada (Tønnesen and Karlsen 2002).

A estrutura do alginato (Figura 2.9) consiste em cadeias lineares de monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por ligações (1 $\rightarrow$ 4) em várias proporções. Estas moléculas estão arranjadas na forma de blocos de ácidos manurónico (M) ou gulurónico (G), ligados de forma que a sequência seja alternada. O alginato é constituído por blocos homopoliméricos, M e G, e por blocos heteropoliméricos MG (Garcia-Cruz, Foggetti and Silva 2008; Islam and Karim 2010).





**Figura 2.9** - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos MG, que constituem a molécula de alginato. Em (1) tem-se a sequência M-M; em (2) uma sequência G-G e em (3) uma sequência M-G-M (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais) (adaptado de (Garcia-Cruz, Foggetti and Silva 2008)).

A hidratação do ácido algínico leva à formação de um “gel ácido” de alta viscosidade devido à ligação intermolecular. Após a gelificação, as moléculas encontram-se fisicamente aprisionadas no interior da matriz de alginato, conseguindo migrar para o meio envolvente (Tønnesen and Karlsen 2002).

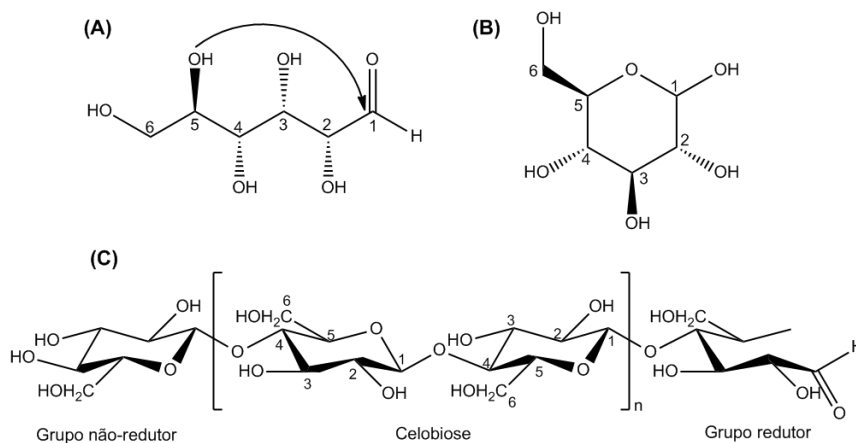
Os íons divalentes e multivalentes, em contacto com o alginato, formam géis e precipitados e os vários catiões apresentam diferente afinidade para este polímero. O alginato com grande quantidade de blocos de ácido gulurónico confere maior resistência ao gel comparativamente aos que possuem maior quantidade de ácido manurónico, isto porque existe uma maior afinidade dos resíduos de ácido gulurónico com os íons divalentes. Depreende-se assim que a transmitância, o “swelling” e a viscoelasticidade das membranas de gel do alginato são altamente afetadas pela razão M/G (Tønnesen and Karlsen 2002).

O alginato, juntamente com os íons bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo), pode formar uma estrutura reticulada e, por isso, tem sido utilizado para produzir DDS. A gelificação do alginato, através do gotejamento numa solução contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$ , permite a formação de grumos esféricos com formas e tamanhos regulares e uma superfície lisa, e que podem retardar a libertação do fármaco incorporado (Hua et al. 2010).

### 2.3.2. Celulose

A celulose, sendo um dos polímeros mais abundantes do planeta, pode ser sintetizada por bactérias sob condições de cultura específicas, produzida e distribuída por fontes como animais marinhos, plantas e fontes bacterianas (Eichhorn et al. 2010). A fórmula empírica do polímero da celulose é  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ , onde “n” é o grau de polimerização. Este polímero é linear, resistente e fibroso, constituído por unidades de glicose, como esquematizado na Figura 2.10,

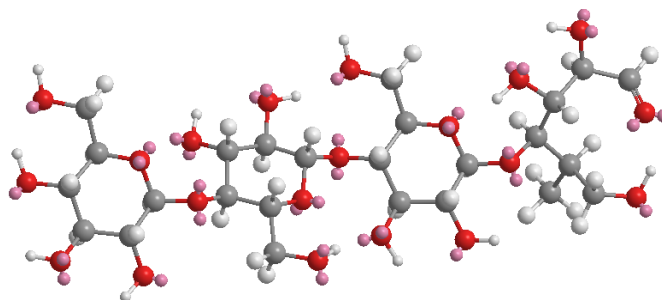
interligadas por ligações glicosídicas B (1→4), apresentando pontos reativos representados pelas funções dos grupos hidroxilo (Mousa, Dong, and Davies 2016). Esta ligação resulta na rotação de 180° do plano das unidades alternadas da glucose, sendo que duas de anéis glicosídico invertidos entre si formam uma unidade de celulose denominada celobiose (Klemm et al. 2005). Tendo em conta a função da matéria-prima e do modo de isolamento, o grau de polimerização da celulose varia, principalmente, entre 5000 e 10000 (Jorfi and Foster 2015).



**Figura 2.10** - Estrutura molecular do monómero da glucose em cadeia linear (A) e em cadeia cíclica (B), bem como do polímero natural celulose e da sua unidade monomérica celobiose (C) (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais) (adaptado de (Klemm et al. 2005)).

### 2.3.2.1. Estrutura da Celulose

Na estrutura 3D da celulose (Figura 2.11), as ligações de hidrogénio entre o grupo hidroxilo e o oxigénio dos anéis adjacentes das moléculas de celulose estabilizam a ligação das mesmas, resultando numa configuração linear das moléculas. Durante a biossíntese, estas ligações promovem a acumulação paralela de múltiplas cadeias de celulose, formando fibrilas elementares que se agregam e originam microfibrilas maiores. Dessa forma, as redes de ligações intra e intermoleculares fazem da celulose um polímero relativamente estável, e também confere às fibrilas rigidez na direção axial (Moon et al. 2011).



**Figura 2.11** - Estrutura molecular 3D do polímero natural celulose (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).

A celulose é organizada de maneira hierárquica no interior das plantas lignocelulósicas. Compreendendo a estrutura da parede celular encontram-se duas estruturas menores, isto é, a parede primária e mais externa, e a parede secundária, dividida em três camadas, onde se encontram as microfibrilas, com unidades de celulose unidas por uma matriz de hemicelulose

e lignina (Dufresne 2013; Abdul Khalil et al. 2014). A Figura 2.12 esquematiza uma representação da celulose nas fibras.

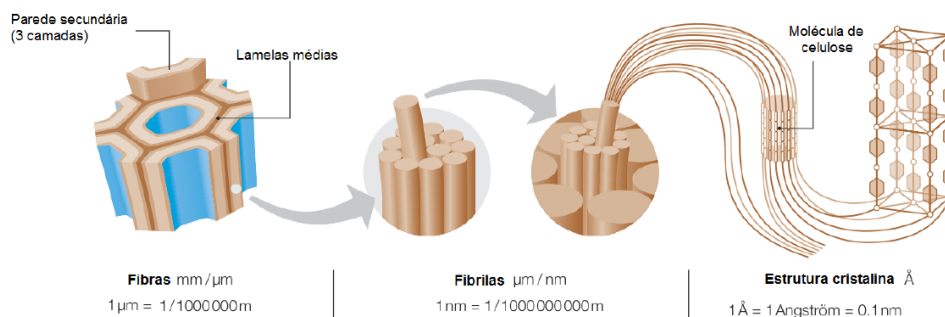


Figura 2.12 - Representação esquemática da parede celular onde se encontram as fibrilas da celulose (adaptado de (Zimmermann, Pöhler, and Geiger 2004)).

### 2.3.2.2. Derivados da Celulose

Os derivados de celulose devem passar através do corpo humano de forma segura e podem, ainda, ser quebrados pelas enzimas digestivas, resultando em metabolitos naturais no trato gastrointestinal. Estes derivados tiveram um grande impacto no desenvolvimento de várias tecnologias e formas de dosagem farmacêuticas, sendo por isso muito utilizados na indústria, como aglutinantes, no revestimento de comprimidos e como moduladores na preparação de fármacos de liberação controlada (Kamel et al. 2008; Sindhu, Prasanth and Thakur 2015). Um exemplo destes derivados mais atrativos para a entrega de fármacos é a carboximetilcelulose (CMC).

#### 2.3.2.2.1. Carboximetilcelulose (CMC)

A CMC (Figura 2.13) é um éter policarboxílico da celulose, produzido pela reação de Williamson, que se estabelece pelo tratamento da celulose com ácido monocloroacético na presença de hidróxido de sódio, em excesso (Caraschi and Filho 1999). A sua fórmula empírica é  $[C_6H_{10-x}O_5(CH_2CO_2)_x]_n$ , onde o grau de substituição é representado por “x” e o grau de polimerização por “n”, sendo o fator que afeta a viscosidade (Varshney and Naithani 2011; Nóbrega and Amorim 2015). Este polímero tem estabilidade química elevada, é seguro, não-tóxico, biocompatível, biodegradável e solúvel em água com grupos carboxilato e hidroxilo, uma vez que permite interações com partículas metálicas (Butun et al. 2011).

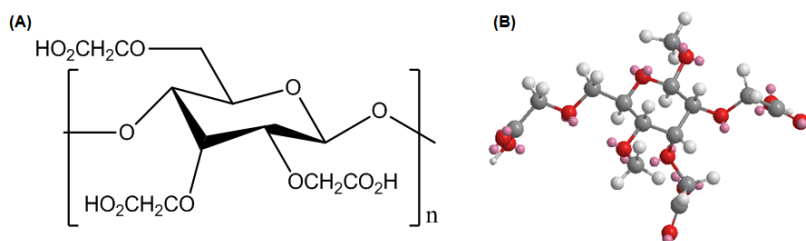


Figura 2.13 - Estrutura molecular de uma unidade da CMC, em 2D (A) e em 3D (B) (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).

A CMC, devido às suas características, tem sido largamente utilizada em DDS. Efentakis et al, em 1997, analisaram os efeitos de excipientes no “swelling” e na liberação de fármacos em sistemas matriciais. Deste estudo concluíram que o “swelling” e a liberação de fármacos têm um comportamento diretamente e inversamente proporcional, respetivamente, em relação às quantidades de CMC presentes (Efentakis, Vlachou and Choulis 1997). Por outro lado, outro estudo realizado por Rao et al, em 2001, permitiu verificar que a liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais de CMC é mais lenta quando comparada com sistemas que continham outro polímero (Rao, Veni and Jayasagar 2001), sendo isto importante quando incorporada no desenvolvimento de DDS. Estudos mais recentes utilizaram ainda a CMC como um hidrogel para a incorporação de amoxicilina, concluindo que este DDS é eficaz como um agente antibacteriano (Sood et al. 2017).

### **2.3.2.3. Nanocelulose**

A celulose, na forma de nanocelulose é um polímero com uma das dimensões de na escala nano, e que pode ser manipulado beneficiando do desenvolvimento da nanotecnologia e ser utilizado no desenvolvimento de materiais inovadores. A nanocelulose é descrita como a parte dos materiais lignocelulósicos que compreende a celulose cristalina (altamente ordenada) e a celulose amorfa (altamente desordenada), com pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (menor ou igual a 100 nm). Geralmente, a família da nanocelulose pode ser dividida em três tipos: nanocristais de celulose (NCC), também designada por celulose nanocristalina, nanocristais, nanowhiskers ou apenas whiskers; nanofibras de celulose (CNF), sinónimos de celulose microfibrilada (CMF), celulose nanofibrilada (CNF) e nanofibras de celulose; e celulose bacteriana (CB), também nomeada de celulose microbiana (Osong, Norgren and Engstrand 2016; Ruiz-Palomero, Soriano and Valcárcel 2016). A Tabela 2.1 permite a comparação destes tipos de nanocelulose apresentando uma distribuição das suas dimensões, confirmadas por microscopia e análise de imagem (Osong, Norgren and Engstrand 2016).

**Tabela 2.1** - Dimensões de nanomateriais celulósicos (adaptado de (Osong, Norgren, and Engstrand 2016)).

<b>Nanomateriais celulósicos</b>	<b>Largura (nm)</b>	<b>Comprimento (nm)</b>	<b>Aspect ratio (comprimento/largura)</b>
<b>Nanocristais de celulose (NCC)</b>	2-20	100-600	10-100
<b>Celulose Microfibrilada (CMF)</b>	10-100	500-10000	50-100
<b>Celulose Nanofibrilada (CNF)</b>	2-10	>10000	>1000
<b>Celulose Bacteriana (CB)</b>	10-40	>1000	100-150

Para além das dimensões, a porosidade é outra característica da nanocelulose. Aplicando diferentes tratamentos às estruturas celulósicas consegue-se obter diversos derivados também com diferentes porosidades. Na medida de analisar os poros das nanopartículas há que ter em conta várias propriedades, compreendendo assim a sua estrutura (Anexo B).

A nanocelulose, sendo um material natural nanométrico, possui diversas características diferentes quando comparada com a celulose à escala micro presente nos materiais tradicionais como o papel, incluindo a morfologia especial e as dimensões geométricas, cristalinidade, área superficial específica elevada, propriedades reológicas, comportamento cristalino líquido, orientação específica, reatividade química de superfície, biocompatibilidade, biodegradabilidade, falta de toxicidade, entre outros (Lin and Dufresne 2014). Todas estas podem ser classificadas em propriedades mecânicas, químicas e biológicas. Para além destas propriedades únicas, a nanocelulose pode ser também amplamente aplicada em implantes médicos, na engenharia dos tecidos, em sistemas de entrega de fármacos, cicatrização de ferimentos, aplicações cardiovasculares, bem como outras aplicações médicas (Debele, Mekuria and Tsai 2016; Mondal 2017), e em materiais funcionais, como materiais óticos, devido à sua elevada transparência, materiais onde a propriedade de barreira seletiva ao oxigénio é importante, espumas e aerogéis, etc (Österberg and Cranston 2014; J. H. Kim et al. 2015; Jorfi and Foster 2015).

#### **2.3.2.3.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)**

A CNF é descrita como um nanomaterial celulósico longo e flexível, obtido a partir de fibras de celulose por desintegração mecânica (Missoum, Belgacem, and Bras 2013). A CNF consiste em nanofibras de celulose longas, flexíveis e emaranhadas, com aspeto visual de um gel viscoso, de coloração esbranquiçada (Figura 2.14) (Klemm et al. 2011; Abdul Khalil et al. 2014). Este gel forma-se devido ao forte aumento da área superficial específica e, consequentemente, ao maior número de ligações de hidrogénio (provenientes dos grupos hidroxilo) para o mesmo volume em comparação com fibras celulósicas nativas (Missoum, Belgacem, and Bras 2013).



**Figura 2.14** - Imagem de um gel de CNF.

A CNF apresenta dois inconvenientes principais associados às suas propriedades físicas intrínsecas. O primeiro é o elevado número de grupos hidroxilo, que levam a fortes interações de hidrogénio entre duas nanofibrilas e a estrutura de gel uma vez produzida. A segunda

desvantagem é a elevada hidrofiliabilidade deste material, limitando a sua utilização em várias aplicações, tais como revestimento de papel (aumento do efeito de desidratação) ou compósitos (tendência para formar aglomerados em polímeros petroquímicos). Desta forma, uma solução mais viável para contrapor estes factos é a modificação da superfície química para reduzir o número de interações hidroxilo e também para aumentar a compatibilidade com várias matrizes (Missoum, Belgacem, and Bras 2013).

Para uma obtenção de partículas menores e mais homogêneas, estes tratamentos podem ser repetidos, podendo ocorrer danos mecânicos significativos na estrutura das fibras de celulose, em comparação com outros processos (Moon et al. 2011). As nanofibrilas podem apresentar zonas com elevada intensidade de fibrilações. Para além deste tratamento mecânico, a obtenção e a separação da CNF a partir da parede celular necessita também de algum tipo de tratamento químico, tais como a hidrólise ácida e a oxidação mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxyl (TEMPO). Em relação ao primeiro método, o ácido hidrolisa essencialmente as zonas amorfas da celulose visto que se encontram desorganizadas, enquanto as zonas cristalinas são insolúveis e de difícil acesso ao ácido nas condições em que este é inserido, pois possuem menos locais potenciais de hidrólise, levando mais tempo a serem quebradas (Oke 2010). Já o princípio básico da oxidação das fibras de celulose através do TEMPO (Figura 2.15) consiste em oxidar de forma altamente seletiva o carbono 6 dos grupos hidroxilos primários da celulose em meio aquoso introduzindo grupos funcionais carboxílicos e grupos aldeídos com carga iónica, criando repulsões electroestáticas fortes entre as fibrilas, levando a que se separem (Pierre et al. 2017). Os grupos aldeídos são completamente oxidados em grupos carboxílicos, caso se verifique uma agitação homogênea do sistema.

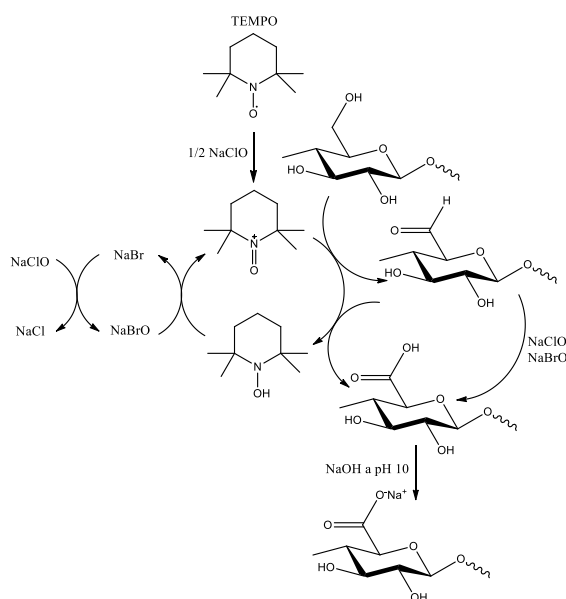


Figura 2.15 - Mecanismo de oxidação seletiva do C6 dos grupos hidroxilos primários da celulose mediada por TEMPO (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Moraes) (adaptado de (Pierre et al. 2017)).

Além destes métodos, pode-se realizar uma combinação entre eles, a fim de melhorar a qualidade da fibrilação da parede celular. A produção da CNF pode combinar as técnicas anteriormente descritas, aplicando um pré-tratamento das fibras e só posteriormente o tratamento final de nanofibrilação (Chinga-Carrasco 2011).

#### **2.3.2.3.2. Celulose Bacteriana (CB)**

A CB é um polissacarídeo produzido por microrganismos do género *Gluconacetobacter*, sendo o mais utilizado o microrganismo da estirpe *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinus*) (Almeida et al. 2014). No entanto, existem outras espécies com capacidade de produzir celulose porém, nem todas são capazes de a secretar na forma de fibrilas extracelulares e em quantidades significativamente elevadas para garantir o seu interesse a nível industrial. Espécies dos géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*, sendo esta última a única do tipo gram-positiva, são exemplos de bactérias produtoras de celulose (Chen et al. 2011; Cheng, Catchmark, and Demirci 2011; Dayal et al. 2013), onde ocorre fermentação de açúcares. Esta celulose, com um conteúdo em água superior a 90%, apresenta-se na forma de uma membrana humedecida e intumescida (Silva et al. 2014), como mostrado na Figura 2.16.



**Figura 2.16** - Imagem de uma membrana de CB.

No processo de produção da CB, a celulose é obtida a partir de pequenas unidades, formando as fibrilas na escala nanométrica (Fu, Zhang, and Yang 2013; Lin and Dufresne 2014). O cultivo é realizado em meio abundante em glicose, sob condições aeróbias e com temperatura controlada (Trovatti et al. 2012; Abeer, Mohd Amin, and Martin 2014). Durante a biossíntese, as cadeias de glicose produzidas são perfiladas pelos poros que compõem a parede celular do microrganismo. A combinação dessas cadeias origina estruturas fibrilares, que se agregam formando uma rede de nanofibras (Sulaeva et al. 2015), conforme esquematizado na Figura 2.17.

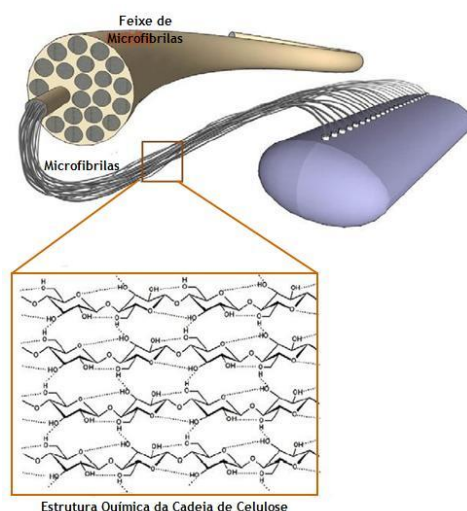


Figura 2.17 - Esquemática geral da organização estrutural da CB (adaptado de (Sulaeva et al. 2015)).

As propriedades da CB que a tornam única e promissora têm sido as responsáveis por toda a procura da mesma em diversas áreas, principalmente biomédica e medicina moderna (Ullah, Santos, and Khan 2016; Petersen and Gatenholm 2011). Estas características que tornam a CB um biomaterial de excelência são a sua capacidade de retenção de água, pois é altamente hidrofílica, sendo capaz de reter cerca de 200 vezes o seu peso em água (Esa, Tasirin, and Rahman 2014); a sua permeabilidade seletiva, que pode ser alterada com tratamentos após a sua produção; e as suas excelentes propriedades físicas e mecânicas, obtidas devido à sua estrutura e à alta cristalinidade da celulose. Este material possui ainda elevada resistência mecânica, estabilidade e baixa densidade, podendo ser modificadas devido a diferentes tratamentos aplicados à celulose após produção. A sua elevada cristalinidade (60 e 90%), elevada porosidade (94%) pois, a hidrofiliidade é explicada pela presença de estruturas porosas no interior da membrana e, também, depende da extensão da área superficial interior dos espaços intersticiais da matriz hidratada, elevada pureza química e a sua estrutura reticulada de fibras ultrafinas entrelaçadas, que formam uma espécie de rede tridimensional (Mohd Amin et al. 2012; Trovatti et al. 2012; Osong, Norgren, and Engstrand 2016) são outras características que a tornam um material promissor para várias aplicações médicas, como é o caso dos DDS (Ullah et al. 2017).

## 2.4. Diclofenac, um Anti-Inflamatório Não-Esteroide (AINE)

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) constituem uma classe de fármacos amplamente prescritos e usados como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios. Como mecanismo de ação promovem a inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), isoenzimas da ciclooxigenase, convertendo o ácido araquidónico em diferentes prostanóides, como o



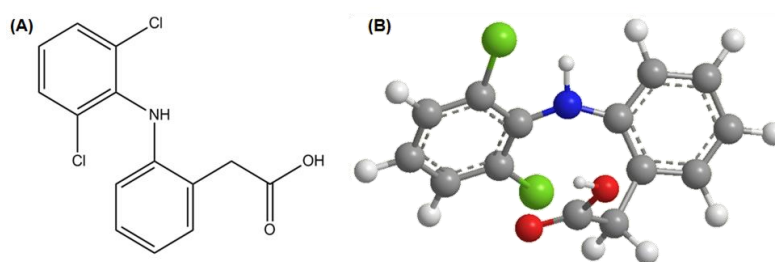
tromboxano A<sub>2</sub>, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e as prostaglandinas (PG) PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e PGE<sub>2</sub>, os quais atuam como mediadores inflamatórios (Makhija and Somani 2010). Entre os AINEs destaca-se o Diclofenac.

### 2.4.1. Farmacologia

O Diclofenac pertence ao subgrupo dos AINEs derivados do ácido fenilacético, utilizado principalmente na forma de sal sódico. Este fármaco é largamente prescrito para o alívio da dor, tratamento de estados inflamatórios e desordens músculo-esqueléticas. Possui ainda propriedades antipiréticas e analgésicas (Geller et al. 2012). Porém, o seu uso é limitado pela alta incidência de efeitos adversos, principalmente sobre o trato gastrointestinal, incluindo irritação, hemorragias, ulceração e, eventualmente perfuração na parede gástrica pois, tal como outros AINEs, não é estável no ambiente ácido do estomago (Philip and Philip 2010; L. Yang and Fassihi 1997; S. K. Mehta, Bhasin, and Dham 2008).

### 2.4.2. Características Físico-Químicas

O Diclofenac, ácido [2-(2,6-diclorofenil) amino] fenilacético, ilustrado na Figura 2.21, apresenta fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, com um máximo de absorvância de 276 nm, e duas características importantes relativamente às suas propriedades físico-químicas. Primeiramente, a sua solubilidade depende do pH da solução pois, em soluções ácidas, a solubilidade deste fármaco é menor que 1 mg/mL e aumenta em valores de pH acima de 6,5. Além disso, o Diclofenac sofre ciclização intramolecular em meio ácido (suco gástrico), podendo causar a sua inativação. Como consequência desta ciclização, o sódio é eliminado levando à diminuição da sua solubilidade (Palomo, Ballesteros, and Frutos 1999). Deste modo, a formação de um sistema de entrega de fármacos contendo o Diclofenac poderá tornar-se vantajosa.



**Figura 2.18** - Estrutura molecular do Diclofenac, em 2D (A) e em 3D (B) (elaborado no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais).

A molécula de Diclofenac, a partir de um ponto de vista da sua estrutura (Figura 2.18), é um híbrido entre derivados da classe do ácido fenâmico e do ácido acético. A sua característica é a presença de um grupo amino secundário (N-H) em ponte com dois anéis aromáticos, representando a fonte de uma série de pontes de hidrogênio intramoleculares em direção a um átomo de cloro e a um grupo carboxílico do outro anel aromático desta molécula. Existem, também, outras pontes de hidrogênio entre grupos carboxílicos de duas moléculas

diferentes do fármaco, formando, assim, um dímero. Esta forma de dímero representa uma unidade estrutural do estado sólido do Diclofenac, como a da maioria dos ácidos carboxílicos. Todas estas ligações envolvem grupos hidrofílicos no interior do dímero inter e intramolecularmente e, portanto, torna este fármaco menos disponível para interações intermoleculares com o meio ambiente, como as moléculas de água do solvente (Fini, Cavallari, and Ospitali 2010).

Este fármaco apresenta, ainda, algumas propriedades bastante interessantes, estando descritas na Tabela 2.2 bem como a vantagem de cada uma.

Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas do Diclofenac, bem como as suas vantagens (L. Yang and Fassihi 1997).

Propriedades físico-químicas		Vantagens	
Faixa de fusão	(283-285)°C	Assegura a estabilidade nas temperaturas utilizadas pela técnica de granulação por fusão	
pKa (a 25°C)	Diclofenac	3,8±0,2	Como pKa do Diclofenac é menor que o pKa do seu sal sódico, considera-se um ácido mais forte com tendência à ionização
	Sal sódico	4,0±0,2	
Lipofilicidade	Diclofenac	4,75	Moléculas hidrofílicas e encontram-se preferencialmente nos compartimentos também hidrofílicos do organismo (corrente sanguínea)
	Sal sódico	3,9 e 13,4 em pH 7,4	

### 2.4.3. Farmacocinética

A farmacocinética é o estudo do destino dos fármacos no organismo após sua administração, abrangendo processos de absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e excreção (e eliminação).

#### 2.4.3.1. Absorção

O Diclofenac é frequentemente administrado oralmente, porém também pode ser administrado por via tópica, intravenosa, intramuscular e rectal (Davies and Anderson 1997). O Diclofenac possui uma rápida absorção por via oral, ligação às proteínas plasmáticas de mais de 99%, com picos de concentrações plasmáticas atingidas cerca de 30 minutos após a administração e meia-vida terminal no plasma de 1-2 horas (Geller et al. 2012). Quando ingerido por via oral, o Diclofenac está sujeito a metabolismo de primeira passagem com cerca de 60%, atingindo a circulação sistêmica na sua forma inalterada, o que pode explicar o efeito terapêutico ser consideravelmente mais longo que a meia-vida plasmática (Davies and Anderson 1997). No entanto, o Diclofenac é capaz de entrar no líquido sinovial, onde as concentrações podem persistir e continuar a exercer uma resposta terapêutica, mesmo quando ocorre diminuição das concentrações plasmáticas.

#### **2.4.3.2. Distribuição**

O volume aparente de distribuição do Diclofenac está compreendido entre 5 e 10 L nos seres humanos (0,1 a 0,2 L/kg), o que sugere que a ligação ao tecido é sensivelmente inferior à ligação às proteínas plasmáticas (Davies and Anderson 1997).

#### **2.4.3.3. Metabolismo**

O Diclofenac sofre metabolização pelo citocromo P450, nomeadamente as subfamílias CYP2C9, 3A4 e 3A5, que executam a hidroxilação, em fase I, e a conjugação, em fase II, sendo que o seu principal metabolito, em seres humanos, o 4'-hidroxiclofenac, é metabolizado por CYP2C9 (Elzayat et al. 2016). Outros metabolitos, como 5-hidroxiclofenac, 3'-hidroxiclofenac e 4',5-hidroxiclofenac têm 30% de atividade anti-inflamatória e antipirética em modelos animais (Geller et al. 2012).

#### **2.4.3.4. Excreção/ Eliminação**

O Diclofenac é eliminado de forma rápida, principalmente pelo metabolismo, com 90% da depuração do fármaco, com período de duração entre 3 a 4 horas (Davies and Anderson 1997). A excreção ocorre principalmente na urina (60%), bem como, na biliar (35%), sob a forma de glicuronosídeo (substância produzida pela ligação do ácido glicurónico a uma outra substância via ligação glicosídica) e conjugados de sulfato. Desta forma, menos de 1% é excretado como Diclofenac inalterado (Geller et al. 2012).

#### **2.4.4. Mecanismo de Ação**

A ação anti-inflamatória do Diclofenac ocorre pela inibição da migração dos leucócitos e das COX-1 e COX-2, levando posteriormente à inibição da síntese periférica de prostaglandinas redutoras, que sensibilizam recetores de dor. A inibição destas proporciona uma ação analgésica. O efeito antipirético pode, ainda, ser devido à ação sobre o hipotálamo, resultando numa dilatação periférica, aumentando o fluxo sanguíneo local e subsequentemente uma dissipação de calor (Eslampour et al. 2013).

#### **2.4.5. Classificação Biofarmacêutica**

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico, o Diclofenac pode ser classificado como um fármaco de Classe II pois, apresenta alta permeabilidade, mas com solubilidade em meio aquoso insuficiente para dissolver a dose inteira no trato gastrointestinal (Chuasuwat et al. 2009). Para estes fármacos, a dissolução é, então, o passo limitante na absorção (Bertocchi et al. 2005).

## **2.5. Cinética de Liberação em Sistemas de Entrega de Fármacos**

A liberação de fármacos é um processo no qual um soluto migra da posição inicial do sistema polimérico para uma superfície em redor do polímero e, posteriormente para o meio de liberação envolvente. Este processo, aparentemente simples, é afetado por múltiplos fatores como propriedades físico-químicas dos solutos, características estruturais dos sistemas, o meio de liberação e possíveis interações entre estes fatores. Numa forma geral, a difusão do soluto, o “swelling” da matriz polimérica e a sua degradação são fatores importantes no transporte de solutos a partir de matrizes poliméricas com fármacos incorporados (Yao and Weiyuan 2010).

Nos DDS, os fármacos encontram-se dispersos homogeneamente nas matrizes com capacidade de serem erodíveis, sendo que a erosão do polímero determina a liberação da substância ativa, ou de serem poliméricas, hidrofílicas e dilatáveis, sendo que neste caso a liberação do fármaco é determinada pela formação de uma camada de gel e da sua dinâmica em função do tempo, bem como a porosidade desta matriz (Gainza et al. 2015; Hwang et al. 2017). O percurso que o fármaco percorre aquando da difusão é definido pela espessura deste gel, isto é quanto maior a sua espessura, menor a taxa de liberação da substância ativa (Varma et al. 2004).

Quando um fármaco é encapsulado num DDS, existe a necessidade de prever a sua liberação, recorrendo, então, a modelos cinéticos que relacionam a quantidade de fármaco libertado ao longo do tempo. Diversos modelos matemáticos apareceram, e continuam a ser desenvolvidos na atualidade, com o objectivo de interpretar o fenómeno da liberação de fármacos (Coutelieris and Delgado 2012). Assim, estes modelos tornam-se tão importantes no desenvolvimento de novos DDS como na verificação experimental do processo de liberação.

### **2.5.1. Modelos Matemáticos para a Cinética de Liberação de Fármacos em Sistemas Poliméricos**

A difusão de fármacos através de sistemas poliméricos em “swelling” depende do tamanho da molécula terapêutica, grau de “swelling” e tamanho da matriz 3D ou peso molecular entre a reticulação da rede polimérica, além de outras características estruturais do polímero (Peppas and Reinhart 1983). Na difusão Fickiana há um aumento linear da absorção de água em função da raiz quadrada do tempo. Este tipo de difusão pode ser observada quando a escala do tempo de relaxação macromolecular é zero ou infinito, quando comparada com o tempo necessário para estabelecer um perfil de concentração no polímero em estudo. Por outro lado, no transporte não Fickiano, a escala do tempo de relaxação macromolecular e a

difusão assemelham-se e são controladas pela taxa global de absorção penetrante (Satish, Satish, and Shivakumar 2006).

De acordo com a primeira lei de Fick da difusão (Eq. 2.1) o fluxo de partículas é proporcional ao gradiente de concentração, e este é proporcional à velocidade de migração das partículas (Zarzycki et al. 2010). Esta equação pode ser aplicada em sistemas de reservatório onde uma membrana polimérica de hidrogénio envolve um volume de fármacos.

$$N_A = -D \frac{dC_A}{dx} \quad (2.1)$$

Onde:

$N_A$  - Fluxo do fármaco;

$D$  - Coeficiente de difusão do fármaco;

$C_A$  - Concentração do fármaco.

Quando o coeficiente de difusão é conhecido, é possível calcular a velocidade de migração das partículas durante a difusão em função do tempo, e deduzir a equação da taxa de variação da concentração destas na região não homogênea. A segunda lei de Fick (Eq. 2.2) relaciona a taxa de variação da concentração com o tempo num ponto, e a variação da concentração nas vizinhanças deste ponto. Esta lei pode ser aplicada em sistemas matriciais onde o fármaco também é disperso em toda a matriz polimérica (Zarzycki et al. 2010).

$$\frac{dC_A}{dx} = D \frac{d^2C_A}{dx^2} \quad (2.2)$$

Na difusão de uma substância ativa numa matriz polimérica deve-se considerar a sua solubilidade nesta matriz, pois, se fármaco estiver disperso na mesma, à medida que for solubilizado na matriz acontecerá a difusão. Porém, se a substância ativa estiver solubilizada no polímero esta etapa é suprimida e a difusão é mais rápida. Quando o sistema entra em contato com a água deve-se considerar também a hidratação e geleificação das cadeias poliméricas (Suave et al. 2006). Não existe um único tipo de curva de liberação de fármacos. No entanto, alguns modelos teóricos podem ser definidos.

O modelo cinético de ordem zero (Eq. 2.3) é utilizado para descrever a cinética de dissolução de sistemas que não sofrem desintegração e libertam o fármaco lentamente, sendo que a sua taxa de libertação é independente da sua libertação (Shaikh, Kshirsagar, and Patil 2015). Este modelo pode ser aplicado em sistemas transdérmicos bem como sistemas em formas revestidas com fármacos de baixa solubilidade encapsulados, sistemas osmóticos, entre outros (Dash et al. 2010).

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (2.3)$$

Onde:

$Q_t$  - Quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ;

$Q_0$  - Quantidade inicial de fármaco na solução;

$K_0$  - Constante de dissolução de ordem zero.

Por outro lado, o modelo cinético de primeira ordem (Eq. 2.4) descreve a absorção e eliminação de alguns fármacos. Este modelo pode ser aplicado em sistemas que contêm fármacos solúveis em água, em matrizes porosas (Dash et al. 2010; Shaikh, Kshirsagar, and Patil 2015).

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1}{2.303}t \quad (2.4)$$

Onde:

$K_1$  - Constante de dissolução de primeira ordem.

Outro modelo proposto tem em consideração a equação de Higuchi (Eq. 2.5) que descreve uma cinética de libertação num sistema matricial monolítico com uma geometria simples de filmes finos com efeitos marginais insignificantes (Zarzycki et al. 2010).

$$\frac{M_t}{A} = (D(2C_0 - C_s)C_s t)^{1/2} \text{ para } C_0 \gg C_s \quad (2.5)$$

Onde:

$M_t$  - Quantidade absoluta cumulativa de fármaco liberada no tempo  $t$ ;

$A$  - Área superficial do sistema de libertação controlada exposta no meio de libertação;

$D$  - Difusividade do fármaco no polímero;

$C_0$  - Concentração inicial do fármaco;

$C_s$  - Solubilidade do fármaco no polímero.

A equação (2.5) pode ser simplificada na seguinte equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K\sqrt{t} \quad (2.6)$$

Onde:

$M_\infty$  - Quantidade absoluta cumulativa de fármaco liberada no tempo  $t$ , que deve ser igual à quantidade inicial de fármaco no sistema no tempo  $t=0$ ;

$K$  - Constante do sistema.

Este mecanismo de libertação é baseado na lei de Fick e depende da raiz quadrada do tempo, mas, quando essa equação é utilizada em sistemas de “swelling” pode ser insuficiente, já que estes podem ser erodíveis, tendo em conta a relaxação das cadeias poliméricas (Lopes, Lobo, and Costa 2005).

Ritger & Peppas (1987) desenvolveram outra equação empírica (Eq. 2.7) que assume uma função de baixa potência dependente do tempo (Zarzycki et al. 2010; Grassi and Grassi 2005; Ritger and Peppas 1987). Este modelo correlaciona a quantidade de fármaco libertada por

unidade de tempo a partir de uma forma farmacêutica com a exponencial do tempo decorrido (Shaikh, Kshirsagar, and Patil 2015).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \times t^n \quad (2.7)$$

Onde:

$\frac{M_t}{M_\infty}$  - Liberação fracionada;

k - Constante estrutural/ geométrica para um sistema particular;

n - Expoente de liberação característico do mecanismo de liberação.

Esta equação é válida para os primeiros 60% de liberação, assumindo perfeitas condições *sink* e de fronteira. Os valores de “n” podem diferir para os sistemas de entrega com diferentes geometrias e mecanismos de liberação (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3** - Valores do expoente de liberação (n) na equação de Peppas e mecanismo de liberação do fármaco associado (adaptado de (Ritger and Peppas 1987)).

Exponente (n) em sistemas			Mecanismo de liberação de fármacos
Filme	Cilíndricos	Esféricos	
0.5	0.45	0.43	Difusão controlada
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Transporte anômalo
1.0	0.89	0.85	“swelling” controlado

### 2.5.2. Fatores que afetam a Cinética de Liberação de Fármacos

A viabilidade de um fármaco num DDS é determinada pelos aspetos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. A liberação do fármaco, que descreve a biodisponibilidade sistêmica, é o primeiro passo neste sistema e, na maioria dos casos, pode ser manipulada pela otimização das várias formulações e das variáveis poliméricas (Varma et al. 2004).

A liberação do fármaco a partir de um DDS polimérico pode ser controlada otimizando a concentração inicial do fármaco no sistema, a solubilidade do fármaco, a porosidade e tortuosidade do sistema polimérico, a forma da matriz e o tamanho (Varma et al. 2004). Desta forma, os fatores que afectam a cinética de liberação, e, por conseguinte, que podem ser manipulados para se obter uma cinética desejada estão ilustrados na Figura 2.19.

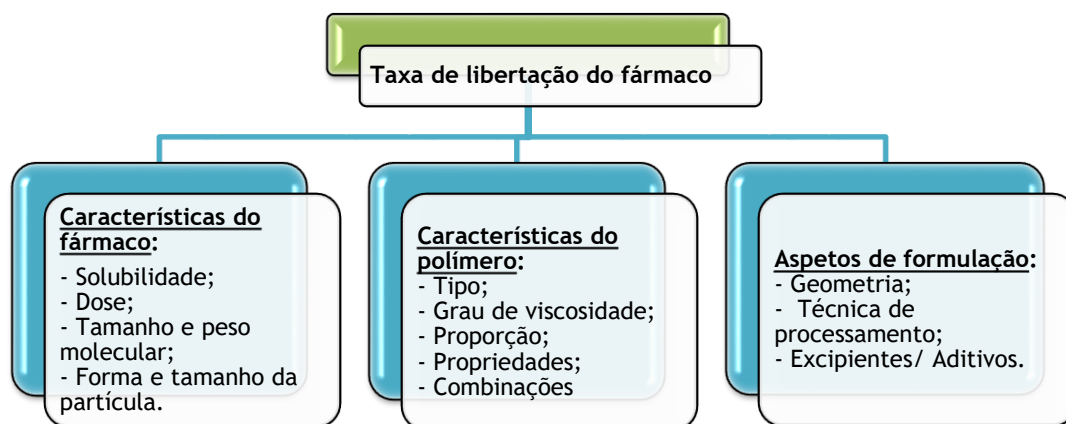


Figura 2.19 - Fatores que influenciam a cinética e o mecanismo de liberação dos fármacos a partir de DDS poliméricos (adaptado de (Varma et al. 2004)).

## 2.6. Simulação Computacional e Modelação 3D de Redes de Materiais Poliméricos

Muitas propriedades físicas são difíceis ou mesmo impossíveis de estudar por métodos experimentais convencionais. À medida que o poder de computação aumentou, tornou-se possível modelar algumas destas propriedades através de códigos computacionais. Tal como num processo experimental, é possível variar os “input”, ou variáveis de entrada, e observar como os “output”, ou variáveis de saída, do processo são afetados. Estes estudos são chamados de experiências computacionais e, cada vez mais, são utilizados como substitutos e auxiliares de processos experimentais (Santner, Williams, and Notz 2003).

No desenvolvimento de DDS na área de Química Medicinal, a otimização das propriedades estruturais para alcançar funcionalidades pretendidas é crucial. Assim, a utilização de modelos computacionais 3D demonstrou ser uma ferramenta de elevado potencial para melhorar a eficácia de DDS. A estrutura 3D e a porosidade de um DDS polimérico são determinantes para otimizar a função de transporte e liberação de fármacos a partir destes sistemas (Y. R. Bhardwaj et al. 2014). A Figura 2.20 mostra uma cronologia de vários modelos desenvolvidos e implementados de materiais fibrosos/porosos, que permitiram estudos computacionais 3D de materiais celulósicos porosos atualmente.



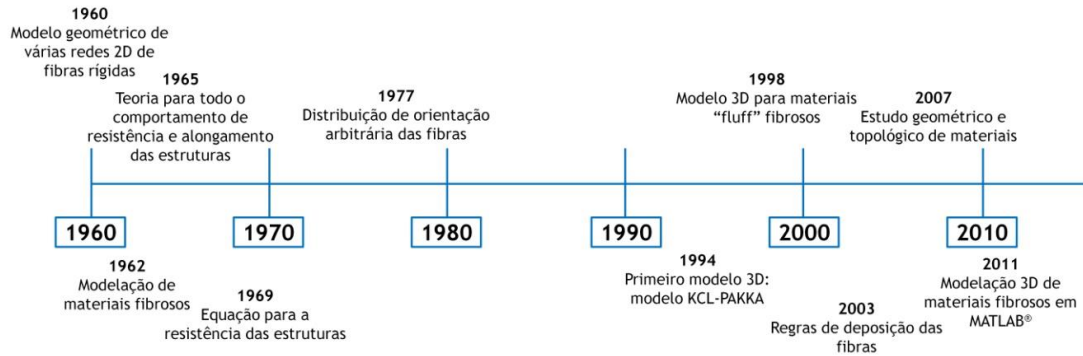


Figura 2.20 - Cronologia de vários modelos desenvolvidos e implementados para materiais fibrosos/porosos ao longo dos anos.

Corte & Kallmes, em 1960, apresentaram um modelo sobre a geometria de várias redes 2D de fibras rígidas (Corte and Kallmes 1960), sendo estas obtidas colocando os centros das fibras uniforme e aleatoriamente ou com diferentes regras de floclação numa área retangular ou quadrada, com uma orientação das fibras ajustada por amostras de distribuições conhecidas (Lavrykov et al. 2012). Estes autores consideraram relações entre várias propriedades geométricas da rede, tais como o número de cruzamentos das fibra e tanto o comprimento médio do segmento entre cruzamentos e as propriedades básicas das fibras e da estrutura, como o comprimento médio das fibras e o número das mesmas (Heyden 2000). Com este trabalho desenvolvido, a modelação de materiais fibrosos aparece pela primeira vez, em 1962 (Kallmes and Corte 1962). Porém, estes modelos apenas consideravam a posição da fibra no plano, ignorando a sua disposição no espaço. Em 1965, Kallmes e Pérez também admitiram uma teoria para todo o comportamento de resistência e alongamento das estruturas, baseando-se na suposição de tensão uniforme e considerando que a força total nas fibras que atravessam uma linha depende de três fatores: a força na fibra de orientação  $\theta$ ; o número de fibras que atravessam as linhas; e a probabilidade de uma fibra atravessar a linha com uma determinada resistência. Este último fator tem em conta as fibras não-retas que não apresentam qualquer resistência e as fibras que não apresentam qualquer resistência devido a falhas de ligação nas suas extremidades, sendo função da área relativa de ligação (RBA) (Heyden 2000). Em 1969, Page propôs a seguinte equação para a resistência das estruturas ("T") sob tensão uniaxial:

$$\frac{1}{T} = \frac{9}{8Z} + \frac{12 A_f \rho_f 9,81}{b P l_f RBA} \quad (2.8)$$

Onde "Z" é a resistência à tração no intervalo zero; "Af" a área transversal; "pf" a densidade das fibras; "b" a resistência à deformação por unidade de área; "P" o perímetro transversal e "lf" o comprimento médio da fibra (Heyden 2000). A Figura 2.21 apresenta um gráfico do comportamento das propriedades das estruturas face ao tratamento mecânico aplicado. É de notar que a tração aumenta com o tratamento, logo, tendo em conta a equação (2.8), a resistência da estrutura vai aumentar, aumentando assim a RBA.

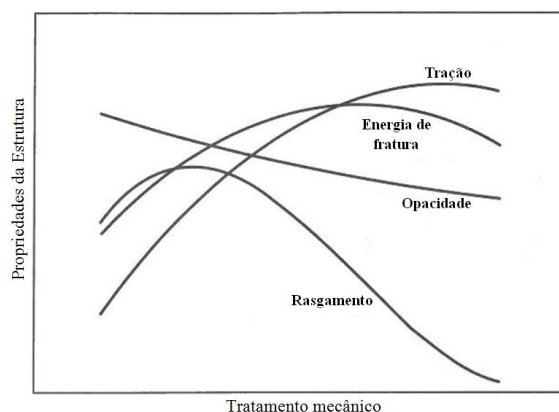


Figura 2.21 - Comportamento das propriedades das estruturas após tratamento mecânico (adaptado de (Levlin and Soderhjelm 1999)).

Em 1977, Komori e Makishima consideraram que as fibras possuíam uma distribuição de orientação arbitrária, apresentando as seguintes equações para uma disposição tridimensional das fibras:

$$n_c = \frac{(n_f l_f)^2 c^2}{L^2 \pi} \quad (2.9)$$

$$l_s = \frac{l_f n_f c}{2 n_c} \quad (2.10)$$

As equações (2.9) e (2.10) são indicadas para o número médio de cruzamentos numa fibra (“ $n_c$ ”) num quadrado de comprimento lateral “ $L$ ”, ocupado por “ $n_f$ ” fibras de comprimento médio “ $l_f$ ” e comprimento médio livre “ $l_s$ ” num segmento numa fibra. O índice de curvatura médio “ $c$ ” indica a distância entre os pontos finais divididos pelo comprimento da fibra (Heyden 2000).

Em 1994, Niskanen & Alava sugeriram o primeiro modelo 3D (Figura 2.22), propondo o modelo KCL-PAKKA que simula a geometria 3D de estruturas com uma disposição aleatória das fibras no plano xy. Para além deste fator, a flexibilidade das fibras faz com que estas ocupem a dimensão z igualmente, isto é, se conformam umas às outras de acordo com o valor *input* para a flexibilidade das mesmas, obtendo-se então as estruturas 3D (Niskanen and Alava 1994; Alava and Niskanen 2006). Em 1998, Heyden & Gustafsson propuseram um modelo 3D para materiais “fluff” fibrosos. Neste modelo, cada fibra é representada por um arco de um único círculo e colocada numa “caixa” formando uma rede periódica porém, a flexão das fibras que ocorre quando estas se ajustam à estrutura já formada não é descrita (Heyden 2000). Com o passar dos anos, o modelo KCL-PAKKA sofreu melhorias e, só em 2003, Provatas & Uesaka apresentaram regras de deposição das fibras (Provatas and Uesaka 2003).

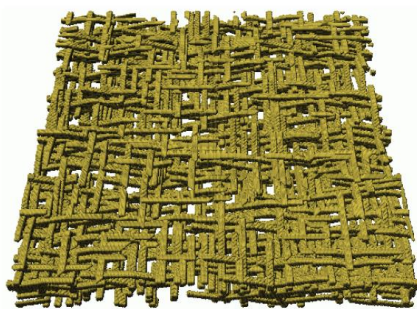


Figura 2.22 - Exemplo de uma estrutura de rede 3D de fibras simulada pelo modelo de Niskanen & Alava (adaptado de (Alava and Niskanen 2006)).

Em 2007, Levitz contribuiu principalmente para o estudo geométrico e topológico de materiais, apresentando três níveis de análise. O primeiro nível consiste na porosidade dos materiais, avaliada por imagens 3D, sendo definida como a razão entre o volume de vazios e o volume estudado, ou seja, a nível computacional, é a razão entre o número de voxéis pertencentes à fase do poro e o número total de voxéis. O segundo consiste em parâmetros como a área específica, avaliada por medidas estereológicas, sendo definida como a razão entre a superfície humedecida e o volume total, obtendo-se informações sobre as propriedades morfológicas 3D dos materiais em estudo a partir de medições 2D. Por fim, o terceiro nível consiste numa análise topológica relacionada com a conectividade (ou percolação) da rede dos materiais definida pela identificação dos contactos entre fibras e pelo processo de esqueletização que simplifica o espaço dos poros (ou fibras) para redes sob a forma de nós conectados (Bloch and Roscoat 2009).

Em 2011, um modelo de modelação 3D de materiais fibrosos desenvolvido e implementado em MATLAB®, baseado no modelo KCL-PAKKA, foi apresentado e validado por Curto et al., baseando-se num autómato celular, no qual existe uma divisão cartesiana das células, fazendo com que cada fibra seja representada como uma sequência de voxéis, sendo que cada um ocupa um volume pré-estabelecido e que pode ser definido pelo utilizador (Curto et al. 2011), como mostrado na Figura 2.23.

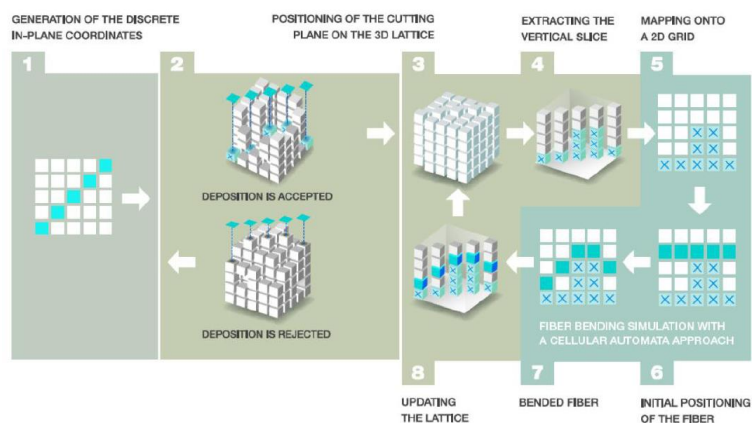


Figura 2.23 - Esquemática da deposição das fibras na matriz 3D seguida de extração de planos e inflexão destas na medida de se adequarem à estrutura subjacente (adaptado de (Curto et al. 2011)).

Para se obter um modelo realista é deveras relevante selecionar os passos determinantes do processo, na medida de se obter uma compreensão do mecanismo a nível atômico, bem como informações 3D para o revestimento do polímero e de moléculas a serem consideradas para o transporte. Assim, as unidades estruturais são modeladas de acordo com as suas dimensões, flexibilidade e colapso (Martins et al. 2016). Para tal, deve-se selecionar os *inputs* para se calcular os *outputs* de uma experiência computacional, atingindo objetivos específicos. Estes *inputs* selecionados constituem o “*design experimental*”. O método de simulação utilizado para o modelo validado por Curto et al. (2011) baseia-se em *designs* gerados a partir do “Latin Hypercube Sampling”. Este método consiste em dividir o espaço formado por duas variáveis num quadrado  $n \times n$  subdividido e selecionar, na amostra, os  $n$  pontos em cada subquadrado de forma que não haja dois pontos ocupando a mesma linha ou coluna, podendo também ser aplicado para 3 dimensões (Santner, Williams, and Notz 2003), como mostrado na Figura 2.24.

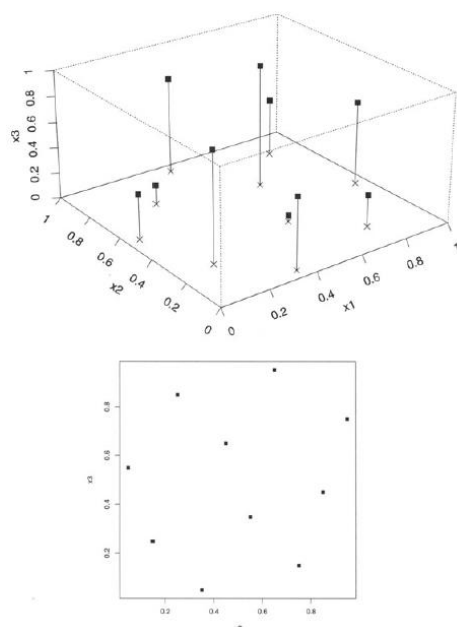


Figura 2.24 - Design do método *Latin Hypercube* a 3 dimensões, com uma projeção do topo dos planos  $x_2$ - $x_3$  (adaptado de (Santner, Williams, and Notz 2003)).

Os parâmetros de entrada (*inputs*) deste mesmo modelo são a relação comprimento/largura, a espessura da parede, a espessura do lúmen, a flexibilidade da unidade estrutural e a resolução (número de camadas no sentido da espessura). O espaço é descrito como uma grelha uniforme cartesiana das células de modo que cada unidade estrutural no modelo seja representada por uma sequência de células (Curto et al. 2011). As fibras são, ainda, depositadas uma a uma, ocupando cada fibra o seu espaço. Caso alguma destas sofra rejeição, o processo de deposição sofre repetição. Dependendo da sua posição, dimensão e flexibilidade, a fibra obedece à estrutura subjacente (Curto, Rodrigues, and Santos Silva 2015; Ferreira et al. 2016).

O esquema sequencial da deposição das fibras no simulador computacional (Figura 2.23) pode ser descrito do seguinte modo:

- i) Criar uma unidade estrutural (fibra) na direção do plano xy;
- ii) Testar a regra de deposição de partículas: caso a fibra não for aceite, o ensaio de deposição é repetido;
- iii) Extração da parte exterior do plano da rede 3D, onde o processo de flexão ocorre;
- iv) Deposição da fibra de acordo com a flexibilidade e conformação desta para a superfície subjacente;
- v) Atualização da rede 3D.

As árvores de decisão/regressão são uma técnica de tomada de decisão fiável e eficaz que proporciona alta precisão de classificação com uma representação simples de conhecimentos adquiridos. Ao utilizar árvores de decisão/regressão, o próprio processo de tomada de decisão pode ser facilmente validada. Devido a estas razões, as árvores de decisão/regressão são especialmente apropriadas para apoiar o processo de tomada de decisão em áreas de saúde. A linguagem MATLAB® tem capacidade de expressar matemática computacional, sendo que com isto é possível criar árvores de decisão/regressão. Estas árvores preveem respostas aos dados. Para prever uma resposta, segue-se as decisões na árvore a partir do nó da raiz até ao nó das folhas, visto que este contém as respostas. Também é possível facultarem respostas nominais, como “verdadeiro” ou “falso”, e darem respostas numéricas. A Figura 2.25 representa um exemplo de uma árvore de decisão/regressão realizada com 1000 simulações, podendo verificar-se que o que mais influencia a espessura da estrutura é a flexibilidade da unidade estrutural.

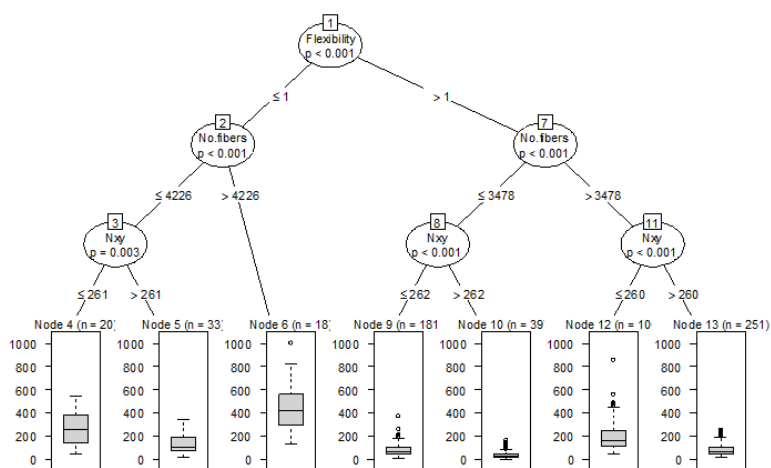


Figura 2.25 - Exemplo de uma árvore de decisão/regressão obtida pelo software MATLAB® (adaptado de (Curto 2011)).

Implementar uma metodologia (Figura 2.26) para estas simulações computacionais e para uma caracterização experimental das estruturas é fundamental pois, com esta didática é possível otimizar e desenvolver novos materiais porosos com diferentes aplicações biomédicas.

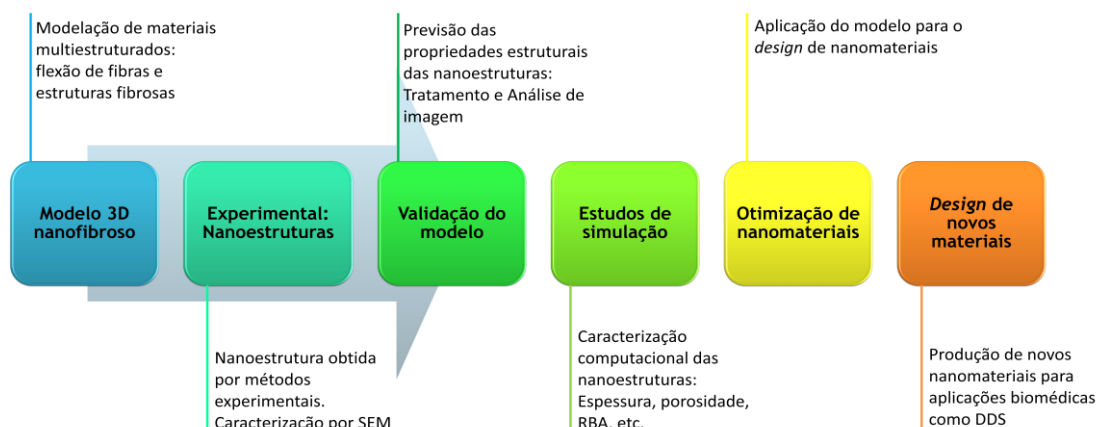


Figura 2.26 - Metodologia usada nas simulações computacionais e caracterização experimental para otimizar e desenvolver novos nanomateriais porosos para aplicações biomédicas (adaptado de (Videira et al. 2016)).

A obtenção de dados que refletem dados experimentais, a simulação 3D de sistemas e economizar tempo e recursos a nível experimental são vantagens deste modelo computacional. O benefício da simulação computacional em 3D proporciona um grande avanço na investigação na medida que as moléculas terapêuticas encontram-se neste formado. Para além disso, a possibilidade de compreender interações entre um DDS e estes fármacos é outra vantagem. A Figura 2.27 mostra um exemplo de uma estrutura em rede 3D de fibras de um material celulósico poroso simulada computacionalmente por este modelo referido.

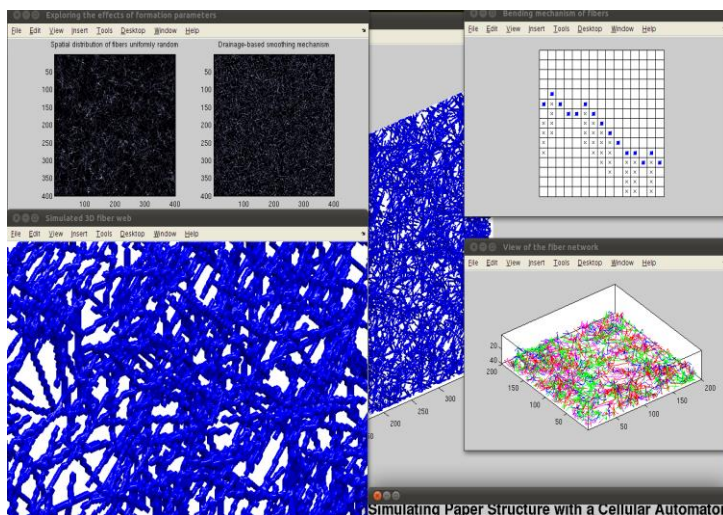


Figura 2.27 - Exemplo de uma simulação computacional de um material celulósico poroso, através do modelo validado por Curto et al. (2011) (adaptado de (Curto et al. 2016)).

# Capítulo III

## **Materiais e Métodos**





## **3. Materiais e Métodos**

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados, referindo o equipamento e os reagentes necessários ao longo dos estudos realizados. Por outro lado, também serão descritos os métodos usados, nomeadamente, obtenção de estruturas em filme e em gel, produção de DDS, TMS, SEM, tratamento e análise de imagem, quantificação de grupos acídicos totais, FTIR-ATR, EDX, simulação computacional e estudos cinéticos de libertação do Diclofenac.

### **3.1. Materiais**

#### **3.1.1. Equipamentos**

As pesagens foram realizadas numa balança analítica marca Mettler, modelo Toledo AG104. As medidas dos valores de pH foram realizadas com um medidor Metrohm, modelo 827 pH lab. O TMS foi determinado ainda com uma balança de infravermelhos marca Mettler, modelo LJ16 Moisture Analyzer.

Na caracterização estrutural, interna e externa, dos materiais usados e dos DDS foram realizadas usando um Microscópio Eletrónico de Varrimento, marca Hitachi (Tokyo, Japan), modelo S-2700, o EMS K850 Critical Point Drier e Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, United Kingdom), do Laboratório Ótico, da Faculdade das Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior.

Na caracterização química dos materiais foi utilizado um conductímetro inoLab Cond. Level 2 para determinar os seus grupos acídicos totais, o FTIR-ATR Thermo-Nicolet IS10 e o EDX da Bruker 129 eV.

Para os estudos cinéticos de libertação utilizou-se uma placa de aquecimento e agitação, com velocidade controlada, marca Heidolph, modelo MR3001K. As determinações espectrofotométricas foram efectuadas utilizando um espectrofotómetro Helios Omega UV-Vis.

Ainda se utilizaram programas para o desenho das estruturas dos materiais utilizados nos estudos, para o tratamento e análise de imagem, para as simulações computacionais e para análise estatística, o ChemDraw Ultra 12.0.2, Esprit 1.9 e a ferramenta DiameterJ do programa ImageJ, o MATLAB® versão 7.9 (R 2009b) e o Microsoft Office Excel 2007, respetivamente.

### **3.1.2. Reagentes**

Os materiais celulósicos utilizados para a produção dos DDS foram a CNF e a CB. A CNF foi produzida em laboratório pela nossa unidade de investigação FibEnTech, uma vez que foram utilizados para estudos anteriores (Curto et al. 2016) e a CB, produzida por uma bactéria da estirpe *Gluconacetobacter sacchari* no CICECO - Instituto de Materiais de Aveiro e Departamento de Química da Universidade de Aveiro, foi fornecida pelo grupo de investigação do Professor Doutor Armando Silvestre (Almeida et al. 2014). Outro material celulósico que também foi utilizado nestes DDS foi a CMC porém adquirida pela Sigma-Aldrich, tendo alta viscosidade (1500-3000)cP em 1% H<sub>2</sub>O (25°C) e pureza analítica. A celulose *Kraft* branqueada de *Eucalypto globulus*, também produzida em laboratório, foi igualmente utilizada não na produção destes sistemas mas em outros estudos de caracterização.

Os outros químicos usados, como o alginato de sódio, tendo alta viscosidade, e o cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), foram adquiridos pela BDH Chemicals Ltd, England, também para a produção dos DDS. O fármaco incorporado nos DDS utilizado foi o Diclofenac de Sódio (>99%), obtido pela Sigma-Aldrich. Também, ainda, foram utilizados dois medicamentos convencionais (Voltaren Retard® e Diclofenac Mylan), fornecidos por uma farmacêutica local.

Em relação à caracterização estrutural dos materiais celulósicos, nomeadamente o SEM, utilizou-se gluteraldeído, obtido pela Agar Scientific, e o etanol, fornecido por Manuel Vieira & C<sup>a</sup> (Irmão) Sucrs, Lda. Em relação à caracterização química destes a nível dos grupos ácidos totais utilizou-se ácido clorídrico (HCl), adquirido à Merck, hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl), adquiridos à Sigma-Aldrich. Por fim, em relação aos meios para o estudo cinético de libertação utilizou-se fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e HCl, adquiridos à Sigma-Aldrich. Todos os produtos químicos mencionados foram de pureza analítica.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Obtenção de Estruturas**

Na medida de alcançar todos os estudos de caracterização dos materiais celulósicos utilizados, estes tiveram que sofrer vários processos, entre os quais a obtenção de estruturas em filme e em gel, para a CNF e a CB que se encontravam em suspensão e em membrana, respetivamente.

### **3.2.1.1. Obtenção de Estruturas em Filme**

#### **3.2.1.1.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)**

Para se obter estruturas de CNF em filme, filtrou-se 200 mL da suspensão num funil de Büchner, durante 40 minutos. As estruturas obtidas dispostas em discos de 98 mm passaram previamente pela prensa, onde se retirou o excesso de água, de acordo com a norma ISO de prensagem (ISO 5269/1) (Anexo C1), com adaptações relativas ao tamanho dos discos usados. De seguida, foram secas sob tensão, num laboratório com temperatura e humidade controladas, segundo a norma ISO 5269/1.

#### **3.2.1.1.2. Celulose Bacteriana (CB)**

Para se obter a estrutura em filme da CB, a primeira etapa remete à desintegração da membrana de CB a 30000 revoluções, por duas vezes, segundo a norma ISO 5263/1 (Anexo C2), através de um desintegrador de acordo com a referida norma. De seguida, procedeu-se à filtração, com duração de 45 minutos, usando um funil de Büchner e papel de filtro, com recurso à bomba de água, lavando o filtrado (2x1L). A estrutura obtida foi sujeita a prensagem e a secagem, seguindo um procedimento idêntico ao referido no subcapítulo 3.2.1.1.1.

### **3.2.1.2. Obtenção de Estruturas em Gel**

#### **3.2.1.2.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)**

Através de uma consolidação estrutural de 500 mL da suspensão de CNF num funil de Büchner com papel de filtro, previamente pesado, com recurso a uma trompa de água, obteve-se uma estrutura de CNF em gel. Esta consolidação estrutural decorreu durante 1 hora e 45 minutos. Após esse tempo, recolheu-se a estrutura em gel para uma placa de petri, assim como o papel de filtro, reservando no frigorífico para posterior análise. O filtrado também foi recolhido pois ainda poderia conter algumas nanofibras que passaram através do papel de filtro neste processo.

#### **3.2.1.2.2. Celulose Bacteriana (CB)**

Para se obter uma estrutura em gel da CB, numa primeira instância foi necessário uma desconstrução da membrana de CB, realizando para tal o processo de desintegração, segundo a norma ISO 5263/1, utilizando um desintegrador de acordo com a referida norma. Seguidamente uma consolidação estrutural da suspensão anterior, num funil de Büchner com papel de filtro, previamente pesado, com recurso a uma trompa de água, foi realizada. Esta consolidação decorreu durante 1 hora e 45 minutos. Após esse tempo, a estrutura em gel, o papel de filtro e o filtrado foram recolhidos seguindo o procedimento descrito no subcapítulo 3.2.1.2.1.

## **3.2.2. Produção de Sistemas de Entrega de Fármacos**

### **3.2.2.1. Produção de DDS poliméricos**

Os DDS usados para os estudos foram produzidos em forma de esferas. Estas esferas foram preparadas por mistura da solução de Alginato 2% (m/v) com o polímero (CNF em gel ou CB em gel ou solução de CMC 2% (m/v)), numa proporção 2:1, homogeneizada a 1000 rpm, cerca de 30 minutos. Após este processo, a mistura preparada foi em seguida adicionada gota a gota a uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,2M, com o auxílio de uma pipeta graduada, de forma a obter, aproximadamente, 100 esferas. Estas esferas resultantes foram então deixadas nesta solução durante 24 h para o seu endurecimento (Vijayalakshmi, Gomathi, and Sudha 2014). Por fim, as esferas foram filtradas e enxaguadas e lavadas com água destilada, com posterior secagem.

### **3.2.2.2. Produção de DDS poliméricos com o Fármaco Diclofenac Incorporado**

De forma a incorporar o Diclofenac nos DDS poliméricos adicionou-se uma solução de Diclofenac 1% (m/v) à mistura preparada com a solução de Alginato 2% (m/v) com o polímero, numa proporção 2:2:1. De seguida, para a produção destes DDS, também esféricos utilizou-se o método descrito no subcapítulo 3.2.1.1.

Por outro lado, ainda se produziram outras esferas de forma a comparar a influência dos materiais celulósicos nos DDS. Para isso, estes não foram introduzidos, originando DDS esféricos com apenas a solução de Alginato 2% (m/v) e a solução Diclofenac 1% (m/v), numa proporção 1:1.

### **3.2.3. Teor de Matéria Seca**

A determinação do teor de matéria seca (TMS) em amostras aplica-se a materiais húmidos sujeitos a aquecimento em condições controladas de laboratório, extraindo toda a água possível, para se obter um material completamente seco.

Para determinar o TMS de vários materiais utilizados nos estudos, colocou-se uma quantidade de amostra na balança de infravermelhos, seguindo a norma ISO 638 (Anexo C3). A Tabela 3.1 mostra o tempo utilizado, para a determinação do TMS dos diferentes materiais, bem como o valor obtido, controlando este de 30 em 30 minutos para uma melhor obtenção de resultados.

**Tabela 3.1** - TMS obtido para diferentes materiais utilizados nos estudos, bem como o tempo utilizado para cada um.

<b>Materiais</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>TMS (%)</b>
Papel de filtro <sup>†</sup>	30	100
Pasta de celulose <i>Kraft</i>	240	5,80
Gel de CNF	240	4,08
Gel de CB	240	1,3
Cristais de CMC	30	97,01

\*Mantido num laboratório com temperatura e humidade controladas (norma ISO 5269/1).

### **3.2.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento**

A caracterização morfológica das matrizes poliméricas e os diâmetros correspondentes das fibras e dos poros foram investigados utilizando o método de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM). O SEM é um método de microscopia eletrónica capaz de produzir imagens de alta definição da amostra. Para imagens SEM convencionais, as amostras devem ser eletricamente condutoras e ligadas ao suporte para evitar a acumulação de cargas eletrostáticas na superfície.

Numa primeira instância, para manter a estrutura porosa das amostras para a análise de SEM, estas foram imersas numa solução de glutaraldeído 2,5% (m/v) num período de 24h, com auxílio de um suporte de amostras. Posteriormente, estas foram tratadas com soluções de etanol de concentrações graduadas, durante 10 minutos cada, a fim de substituir a água com etanol. Subsequentemente, as amostras são secas pelo método CO<sub>2</sub> Critical Point Drying, utilizando o equipamento EMS K850 Critical Point Drier, com aquecimento termo-eletrónico, arrefecimento adiabático e controlo de temperatura de +5°C no arrefecimento e de +35°C no aquecimento (Junior et al. 2004). Este método consiste na utilização de CO<sub>2</sub> para substituir qualquer água na amostra por uma série de desidratação. As amostras são colocadas na câmara de pressão, que é pré-resfriada e imediatamente preenchida com CO<sub>2</sub> líquido a partir do cilindro de gás, com um ponto crítico a 31°C e 1072 psi. Aquece-se apenas acima da temperatura crítica, atingindo assim uma pressão crítica, em condições de trabalho cerca de 35°C e 1500 psi.

Após este tratamento, as amostras foram colocadas sobre um suporte de alumínio com recurso a uma fita adesiva de lado duplo. De seguida, as amostras foram cobertas de ouro utilizando um Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, United Kingdom), a fim de se tornarem melhores condutores. Por fim, após este revestimento, as amostras foram analisadas no SEM com um detetor Bruker operando a 20 kV e em diferentes ampliações.

### 3.2.5. Tratamento e Análise de Imagem

As imagens obtidas a partir do SEM foram processadas e analisadas, recorrendo a uma metodologia sistemática e com critérios bem definidos utilizando um programa de tratamento de imagem, o Esprit 1.9 (Bruker, Germany), que permite realizar medições na imagem e dispor os resultados de várias formas, relacionando diferentes propriedades. O processo para efetuar esta metodologia pode ser esquematizado da seguinte forma:

- i) **“Filters”**: Configurar e ajustar as propriedades;
- ii) **“Binarization”**: Corrigir o gradiente das sombras; reduzir ruído; obter um detalhe da imagem; melhorar as arestas, criando contraste maior entre zonas claras e escuras;
- iii) **“Morphology”**: Medição correta dos poros;
- iv) **“Analysis”**: Inserir tamanho mínimo em pixéis do poro;
- v) **“Accept/Reject”**: Escolher filtros referentes às propriedades dos poros, coincidindo com os limites definidos pelos filtros;
- vi) **“Display”**: Coloração das partículas e nível de transparência.

Para além deste programa de análise de imagem, também foi utilizado o ImageJ, recorrendo à ferramenta DiameterJ, com capacidade de caracterizar medições de poros e de nanofibras e analisar uma imagem, detetando os diâmetros das fibras em cada pixel ao longo de um eixo. O processo para efetuar esta metodologia recorre-se, primeiramente, a uma calibração da imagem e, posteriormente, a uma segmentação/ binarização desta imagem. Este último processo converte a imagem numa representação binária, onde os poros se apresentam numa cor escura e as fibras numa cor clara. Como este programa contém algoritmos capazes de realizar este processo automaticamente, gerando diferentes imagem por cada um, é necessário uma metodologia para selecionar a imagem com melhor segmentação (Hotaling et al. 2015), nomeadamente:

- ✓ Não se encontrarem presentes fibras parcialmente segmentadas;
- ✓ Não se encontrarem cavidades nas interseções entre fibras;
- ✓ As fibras segmentadas serem representativas de fibras reais;
- ✓ As segmentações representarem de forma precisa o diâmetro real das fibras.

A fim de se obter a imagem com melhor segmentação, pede-se ao programa para gerar todos os resultados possíveis a nível dos poros e fibras para posterior análise.

### **3.2.6. Quantificação de Grupos Acídicos Totais dos Diferentes Materiais Nanocelulósicos**

O teor de grupos acídicos presentes em nanoceluloses é bastante relevante uma vez que permite inferir acerca da sua capacidade de ligação com outros materiais, visto que a carga aniônica das fibrilas resulta da ionização destes grupos.

Com intuito de avaliar a quantidade de grupos acídicos totais presentes nos materiais nanocelulósicos utilizados para a produção de DDS, foi levado a cabo o método de titulação conductimétrica, segundo a norma SCAN-CM 65 (Scan-test, 2002) (Anexo C4), realizando uma modificação da mesma, ou seja, ajustando-se apenas as quantidades de reagentes envolvidos.

### **3.2.7. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à técnica de Reflexão Total Atenuada**

A espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é um método que permite caracterizar, identificar e quantificar muitas substâncias, sejam estas sólidas, líquidas ou gasosas.

Nos últimos anos, a técnica de reflexão total atenuada (ATR) acoplada ao FTIR contribuiu para análises de sólidos e líquidos. Esta técnica mede mudanças que ocorram aos raios infravermelhos, devido à sua interação com a amostra.

A caracterização química dos materiais utilizados em estudo, nomeadamente uma análise direta da superfície das amostras, foi executada utilizando FTIR em modo ATR. Com as condições de operação descritas na Tabela 3.2, obtiveram-se os espectros referentes a cada amostra e, posteriormente, foi realizada uma comparação dos mesmos.

**Tabela 3.2** - Condições de Operação para o método de FTIR-ATR.

<b>Condições de Operação</b>	
<b>Nº de Scans</b>	128; 32
<b>Resolução</b>	4 cm <sup>-1</sup>
<b>Gama de comprimento de onda</b>	600 a 4000 cm <sup>-1</sup>

### **3.2.8. Espectroscopia de Raio-X por Dispersão em Energia**

Para a caracterização química das amostras a nível elementar é utilizado o método de espectroscopia de raio-X por dispersão em energia (EDX), estando acoplada ao SEM.

O EDX, utilizando os raios-X emitidos pela amostra, é uma técnica de identificação elementar com capacidade de fornecer dados qualitativos e quantitativos, permitindo determinar quais os elementos presentes numa amostra e em que proporções. Este método utiliza um feixe acelerado de elétrons para excitar os elétrons da camada de valência dos átomos da amostra. Quando são irradiados pelo feixe, os elétrons em diferentes níveis energéticos de cada elemento químico são expulsos e substituídos por outros, sendo esta diferença quantificada pelo detetor do SEM permitindo, assim, identificar todos os elementos da amostra.

### **3.2.9. Simulação Computacional**

Para o estudo da Simulação Computacional, foi utilizado um simulador, desenvolvido e validado em MATLAB® versão 7.9 (R 2009b), para simular computacionalmente materiais poliméricos porosos em redes 3D (Curto et al. 2011).

### **3.2.10. Estudos Cinéticos de Liberação do Fármaco Diclofenac**

Após a obtenção das esferas poliméricas com a encapsulação do fármaco Diclofenac (inicialmente pesadas), os estudos cinéticos foram realizados em triplicado por 6h a  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  e 100 rpm, aproximadamente. Nas primeiras 2h de ensaio, utilizou-se a solução tampão HCl a pH 2. De seguida, elevou-se o pH a 6,6 com a solução tampão fosfato e mantida a este valor por mais 2h de ensaio. Por fim, nas últimas 2h, um pH um pouco mais elevado (7,4; solução tampão fosfato) foi usado para terminar os ensaios (González-Rodríguez et al. 2002). Posteriormente foram retiradas várias amostras ao longo do tempo e analisadas pelo método de espectroscopia de UV-Vis, utilizando um espectrofotómetro Helios Omega UV-Vis e uma célula de quartzo com um percurso ótico de 1 cm. Durante o estudo, alíquotas de 5 ml foram retiradas ao longo do tempo (volume restaurado com a mesma quantidade de líquido que foi removido) e a concentração de Diclofenac foi acedida por espectroscopia UV-Vis a 276 nm (máximo de absorvância do Diclofenac), sendo por isso os resultados cinéticos obtidos para este comprimento de onda fixo. A cinética de liberação do Diclofenac foi analisada através de gráficos de tempo vs. percentagem libertada, para as diferentes formulações.

Após estes estudos cinéticos, os DDS foram retirados da solução tampão fosfato a pH 7,4 e, utilizando papel antiaderente, o excesso de água na superfície foi cuidadosamente removida para posterior pesagem. Caso a massa das esferas aumente, o índice de “swelling” (%) é calculado segundo a seguinte expressão:

$$\text{Índice de "swelling" (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde “ $m_1$ ” é a massa das esferas antes dos estudos cinéticos e “ $m_2$ ” é a massa das esferas após os estudos cinéticos (R. Mehta et al. 2013).



### 3.2.10.1. Curva de Calibração do Fármaco Diclofenac

Para converter os valores de absorvência, registados para as amostras recolhidas durante o estudo de libertação do Diclofenac, em concentração, é necessário recorrer a uma curva de calibração. Desta forma, para a obtenção desta curva padrão, que relaciona a concentração do fármaco com a absorvência, foram analisadas diferentes amostras com concentrações conhecidas. Estas amostras foram preparadas pelo método de diluição a partir de uma solução de Diclofenac 0,5% (m/v) em concentrações de ordem decrescente. As diferentes amostras foram colocadas em células de quartz do espectrofotómetro operando a 276 nm para medição. As absorvências apresentadas foram registadas e relacionadas com a concentração inicial do Diclofenac de forma a se obter a curva padrão (Figura 3.1).

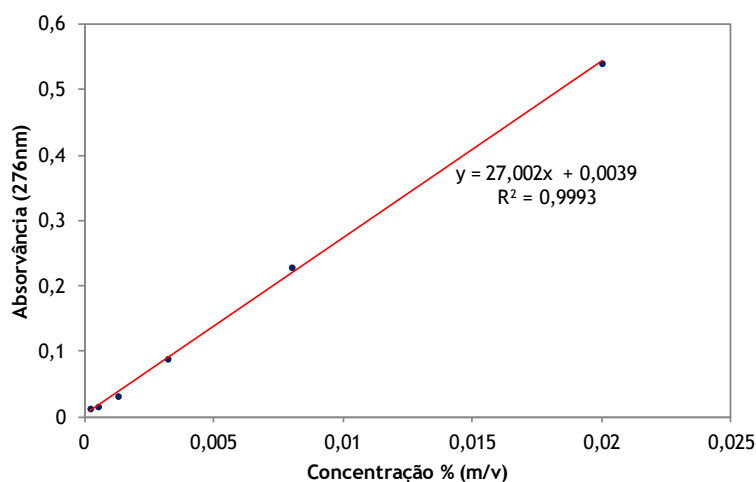


Figura 3.1 - Curva de calibração do Diclofenac, obtida num comprimento de onda máximo de 276 nm.

### 3.2.11. Análise Estatística

Todos os dados obtidos para os diferentes estudos foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 2007.



# Capítulo IV

## Resultados e Discussão



## 4. Resultados e Discussão

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos da caracterização estrutural e química dos materiais utilizados nos DDS bem como as simulações computacionais dos mesmos. Também serão demonstrados estudos cinéticos otimizados de liberação do Diclofenac, relacionado estes dados experimentais com modelos matemáticos, e um *design* de novos DDS combinados. Numa forma de contextualização, a Figura 4.1 representa ainda um esquema da metodologia realizada com os resultados apresentados em cada etapa.

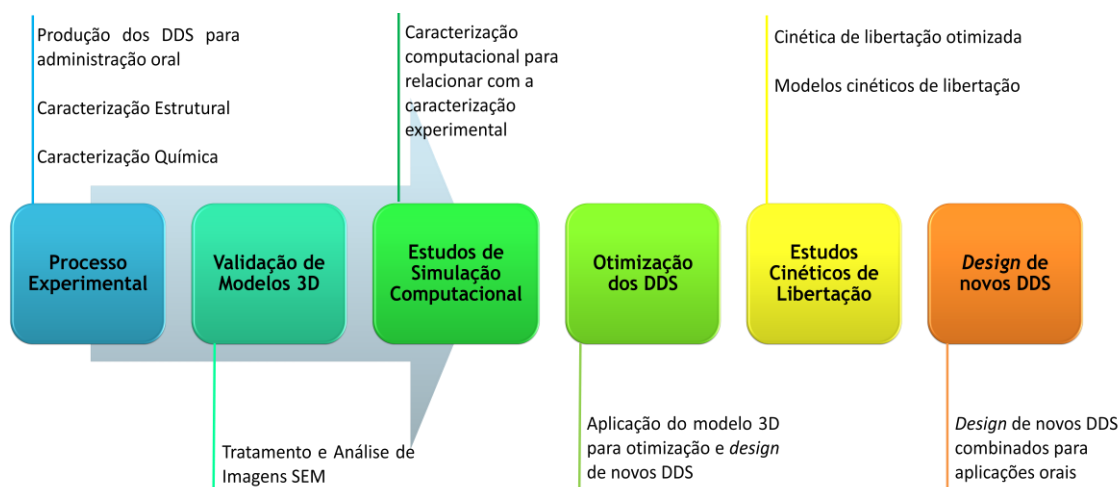
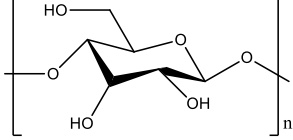
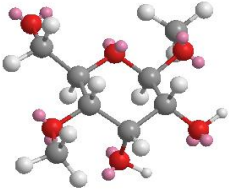

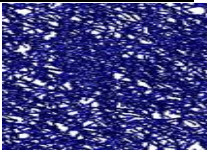

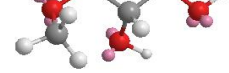
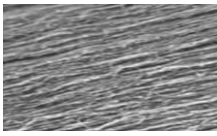
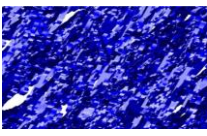
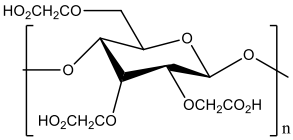
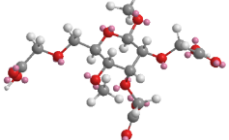
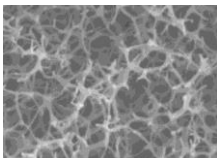
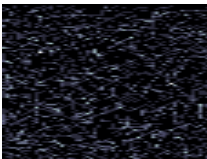
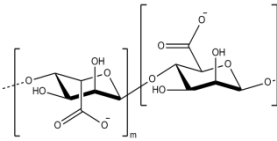
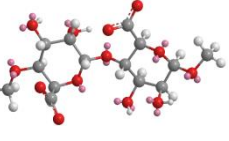
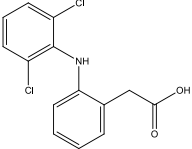
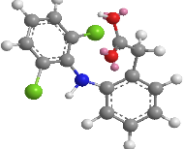


Figura 4.1 - Metodologia experimental descrevendo os resultados obtidos em cada etapa realizada.

### 4.1. Caracterização Estrutural dos DDS

Os materiais utilizados para a produção dos DDS em estudo são a CNF, CB e CMC, e o Alginato, sendo o Diclofenac a molécula terapêutica incorporada. Na Tabela 4.1 estão representados estes materiais, tanto à escala molecular e nanométrica como simulações computacionais obtidas de estudos anteriores (Curto et al. 2016; Ferreira et al. 2016).

Tabela 4.1 - Materiais utilizados para os DDS em estudo, tanto à escala molecular e nanométrica como simulações computacionais.

Materiais	Representação linear (2D)*	Representação 3D*	Nanoescala (SEM)	Simulação Computacional
Celuloses	CNF 			
	CB 			
	CMC 			
Alginato			—	—
Diclofenac			—	—

\*Representações elaboradas no programa ChemDraw Ultra 12.0.2, por Flávia Morais.

As representações lineares (2D) dos diferentes materiais apenas ilustram os átomos ligados entre si, não tendo em conta parâmetros eletrónicos e estéricos, bem como as posições espaciais dos átomos. No entanto, as representações 3D apresentam várias vantagens pois, as moléculas assumem uma conformação de mais baixa energia e a função da macromolécula está relacionada com a sua estrutura tridimensional, permitindo uma compreensão dos processos biológicos a nível atómico, e estudar interações entre proteínas, auxiliando no *design* molecular de inibidores ou ativadores específicos de candidatos a fármacos.

Tendo em conta os materiais celulósicos, por comparação da CNF e CB, apesar da origem ancestral ser a mesma, verifica-se que a sua representação à nanoescala é bem diferente, apresentando ambas um elevado nível de porosidade. Este facto também pode ser comprovado pela simulação computacional. Em relação à CMC, como tem grupos funcionais diferentes remete-se para que a sua estrutura também seja diferente, pelo que o sistema apresenta também elevada porosidade, tanto ao nível da escala nanométrica como na simulação computacional. As propriedades físico-químicas da CMC dependem do grau de substituição, de polimerização, da uniformidade da substituição dos grupos hidroxilo pelos grupos carboximetil ao longo da cadeia polimérica e da pureza do produto. A presença de substituintes diferentes na cadeia de celulose produz um afastamento das cadeias

poliméricas, permitindo uma maior penetração de água. Uma maior proximidade de grupos substituintes pode facilitar as interações entre grupos carboxílicos de unidades adjacentes e dificultar a sua dissociação. No caso de cadeias poliméricas menos substituídas ocorre agregação pois, as interações repulsivas de natureza eletrostática, que contribuem para a expansão das cadeias, são menos importantes. Já nas amostras mais substituídas, a densidade de carga é maior e as interações eletrostáticas são mais importantes, desfavorecendo assim, processos associativos. Desta forma, embora as cadeias poliméricas das amostras substituídas de CMC conservem parte da sua capacidade de interagir associativamente, as estruturas agregadas são menos estabilizadas e, portanto, mais facilmente dissociadas (Caraschi and Filho 1999).

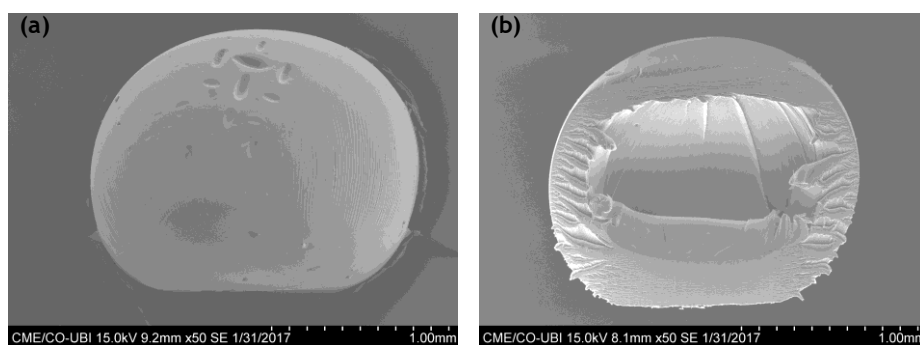
Desta forma, um estudo mais extensivo das propriedades destes materiais será apresentado nos subcapítulos seguintes.

#### **4.1.1. Propriedades Estruturais dos DDS**

A técnica de SEM foi realizada a fim de correlacionar propriedades estruturais com a composição química dos diferentes materiais utilizados nos DDS, permitindo um grande detalhe destes pela visualização da configuração da rede polimérica 3D. Desta forma, procedeu-se à análise da morfologia das amostras de Alginato, CNF, CB e CMC, submetidas a diferentes ampliações (de 50x a 20000x).

##### **4.1.1.1. DDS sem Materiais Celulósicos Incorporados**

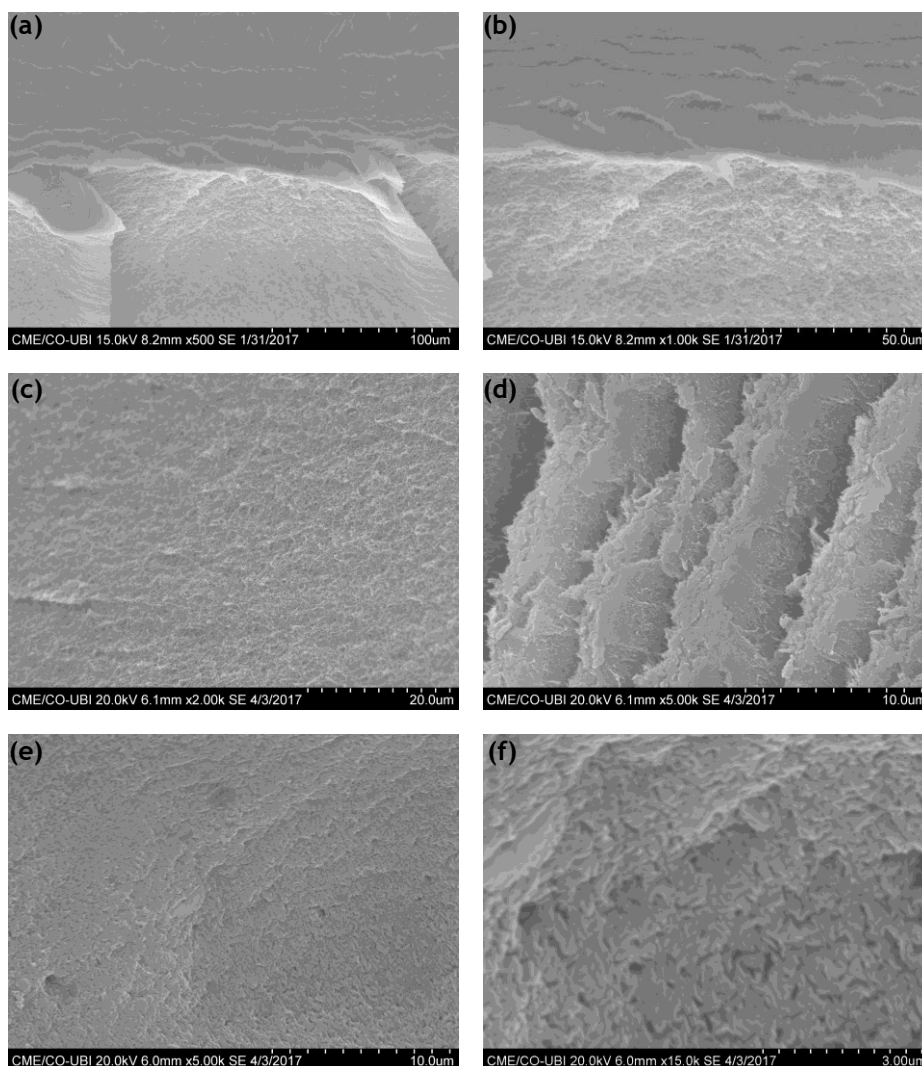
O alginato, quando gelificado, forma grumos esféricos com formas e tamanhos regulares bem como superfícies lisas (Tønnesen and Karlsen 2002), como mostrado na Figura 4.2.



**Figura 4.2** - Imagens SEM de uma esfera de alginato, em corte transversal, com vista da sua periferia (a) e da sua cavidade (b), com uma ampliação de 50x.

É de grande interesse que este polímero seja utilizado em DDS uma vez que confere grande estabilidade ao sistema e pode retardar a libertação de fármacos incorporados (Hua et al. 2010). A Figura 4.3(a-d) mostra ainda o interior da micropartícula de alginato, onde se pode observar a sua morfologia. Pela sua análise, verifica-se que este polímero não apresenta uma rede uniformemente estruturada no interior do DDS. Por comparação com a periferia deste

sistema (Figura 4.3(e-f)), observa-se uma estrutura bastante semelhante à anterior, logo este apresenta-se como um polímero uniforme quando gelificado.



**Figura 4.3** - Imagens SEM do interior de uma esfera de alginato, com ampliação de 500x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 5000x (d), e da sua periferia, com uma ampliação de 5000x (e) e 15000x (f).

#### **4.1.1.1.1. DDS sem Materiais Celulósicos Incorporados contendo Diclofenac**

O Diclofenac, molécula terapêutica utilizada nos estudos, é incorporado nestes DDS. A Figura 4.4 mostra as imagens SEM das micropartículas de alginato contendo Diclofenac. Nota-se que a superfície destas apresentam irregularidades comparadas com as esferas de alginato na Figura 4.2. Isto evidencia que o Diclofenac interfere na coacervação da esfera, com geometria não esférica. Esta forma colapsada da micropartícula também pode ser causa do efeito da concentração, isto é, quando se combina esta molécula com o polímero, a concentração da solução altera-se, conferindo uma menor estabilidade comparada com as outras esferas de alginato.



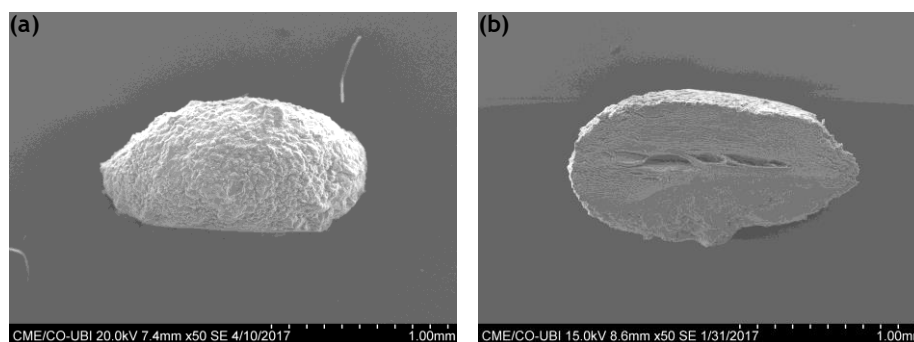


Figura 4.4 - Imagens SEM de uma esfera de alginato contendo Diclofenac, em corte transversal, com vista da sua periferia (a) e da sua cavidade (b), com uma ampliação de 50x.

Também é de verificar que, para além da forma, os tamanhos destes sistemas também se alteram pois, as esferas de alginato apresentam tamanhos de 1,77 mm de largura por 1,44 mm de comprimento enquanto as esferas de alginato com esta molécula terapêutica incorporada têm 548  $\mu$ m de largura por 1,56 mm de comprimento (Figura 4.5).

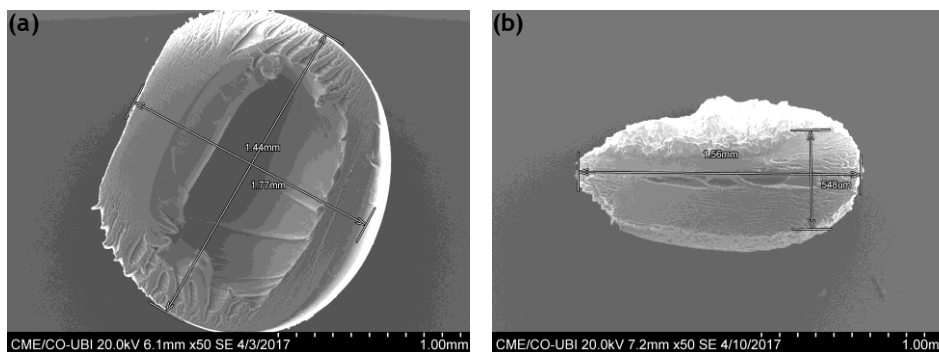


Figura 4.5 - Imagens SEM de esferas de alginato (a) e de alginato contendo Diclofenac (b), em corte transversal, com medições dos sistemas, com uma ampliação de 50x.

A Figura 4.6(a-d) mostra ainda o interior da micropartícula de alginato contendo Diclofenac, onde se pode observar a sua morfologia, sendo representada por zonas mais lisas e também sem uma rede uniformemente estruturada. Ainda em relação à periferia do DDS (Figura 4.6(e-f)), observa-se uma estrutura também semelhante à Figura 4.3(e-f) concluindo que uma molécula terapêutica incorporada não altera a morfologia do sistema, apenas a sua forma e dimensão.

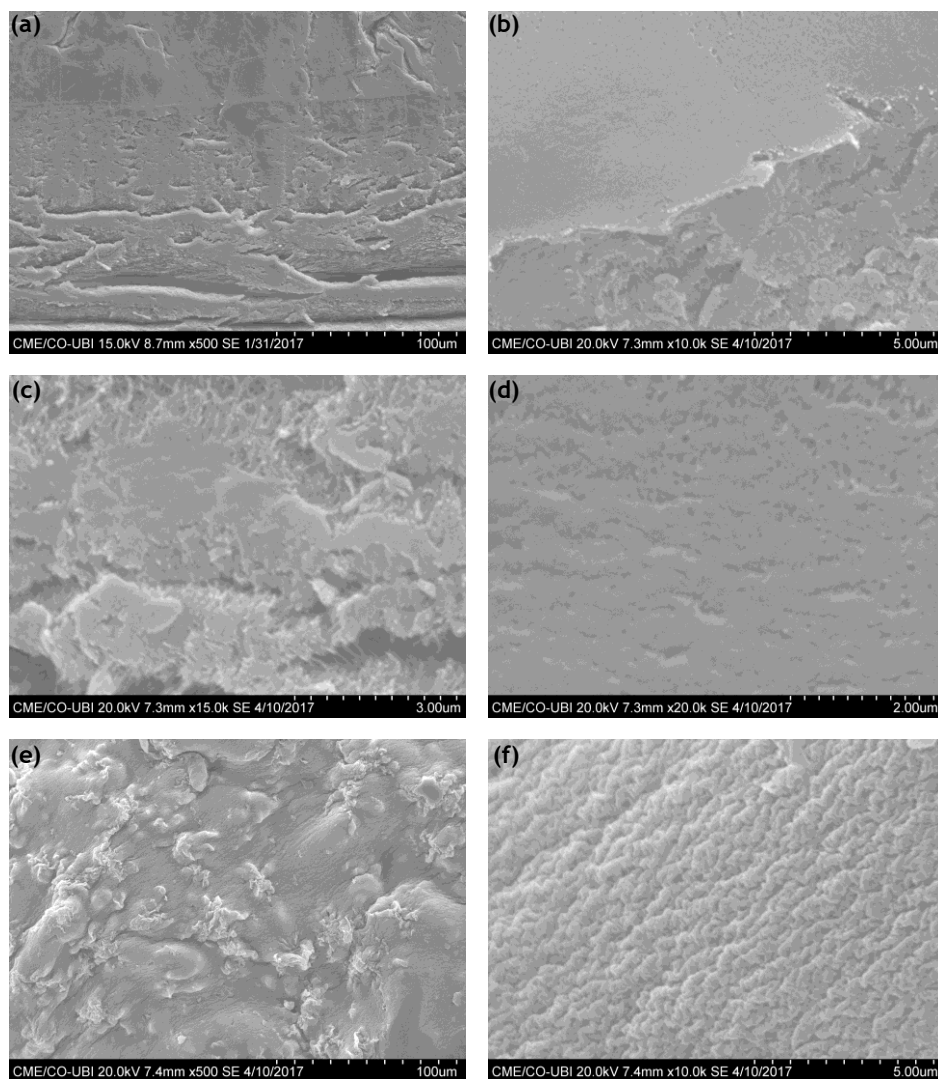


Figura 4.6 - Imagem SEM do interior de uma esfera de alginato contendo Diclofenac, com ampliação de 500x (a), 10000x (b), 15000x (c) e 20000x (d), e da sua periferia, com ampliação de 500x (e) e 10000x (f).

#### 4.1.1.2. Celulose Nanofibrilada (CNF)

A CNF foi obtida por destruturação das fibras de celulose após refinação, tratamento químico e mecânico (Curto et al. 2016). Após uma consolidação estrutural, este tipo de nanocelulose pode ser obtido na forma de gel. A estrutura e morfologia do gel de CNF está ilustrada na Figura 4.7(a-d). Tratando-se de um tipo de nanocelulose, a CNF apresenta medições de fibras inferiores a 100 nm, como 71,5 nm e 87,7 nm porém, também apresenta valores superiores a 100 nm, nomeadamente de 2,38 a 5,90  $\mu\text{m}$  (Figura 4.7(e-f)). Há uma variação de tamanhos a diferentes níveis na medida de tornar esta estrutura mais estável, o que não aconteceria se apenas apresentasse medidas na ordem da nanoescala. Existe, então, uma rede 3D a uma escala e, dentro desta, outra de diferentes dimensões.

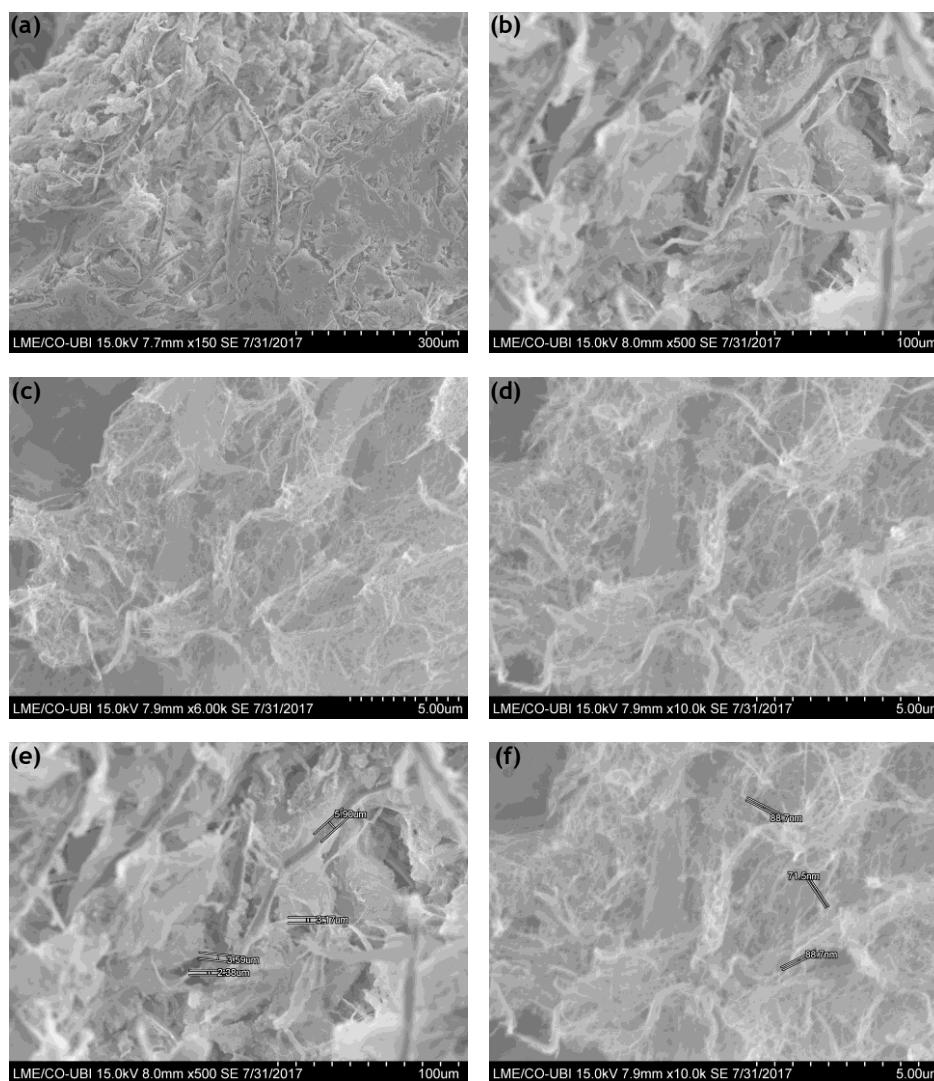


Figura 4.7 - Imagens SEM da CNF em forma de gel, com uma ampliação de 150x (a), 500x (b), 6000x (c) e 10000x (d), e com medições de fibras, com uma ampliação de 500x (e) e 10000 (f).

Por todas as diferentes propriedades e vantagens, também a CNF pode ser usada como matriz 3D em DDS.

#### 4.1.1.2.1. DDS com CNF Incorporada

Para uma análise da CNF incorporada nos DDS, procedeu-se ao corte transversal destes sistemas, na medida de analisar a sua composição, estrutura e morfologia. Na Figura 4.8 verifica-se dois planos relativamente ao DDS, conseguindo diferenciar a parte periférica do interior.

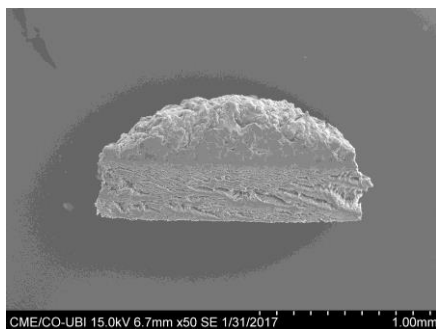


Figura 4.8 - Imagem SEM de um DDS com CNF incorporada, em corte transversal, com uma ampliação de 50x.

Relativamente ao interior deste DDS (Figura 4.9), verifica-se que existe uma estrutura em camadas reguladas e compactas, havendo separação entre elas. Apresenta-se, então, como um material polimérico com uma rede 3D aleatória e porosa. É possível ainda observar entre esta estrutura o efeito de ligação (*binding*) entre as fibras. Desta forma, a CNF é apresentada como um material multiestruturado, com estruturas muito finas na ordem da nanoescala.

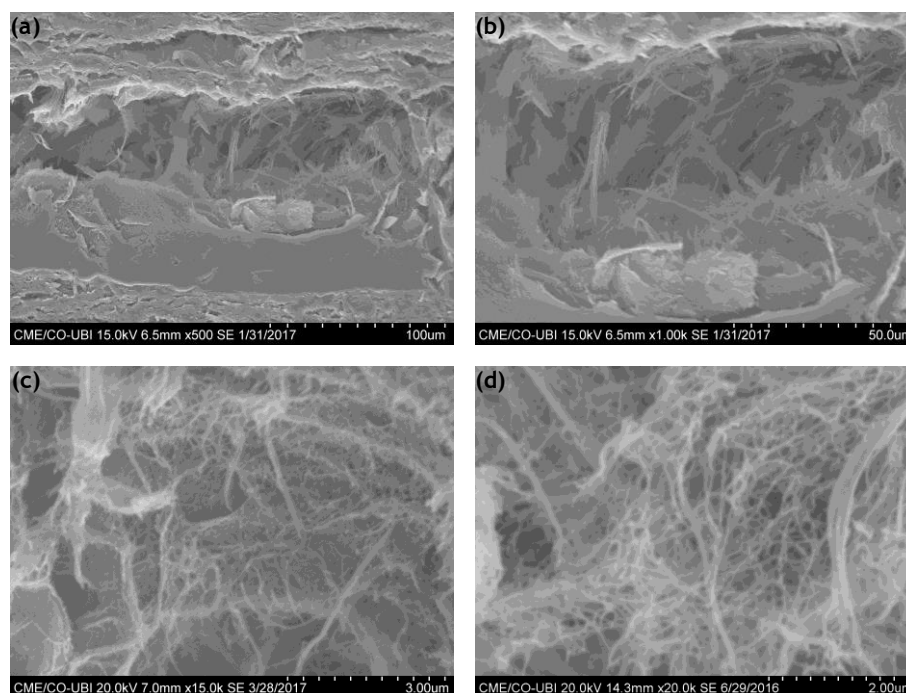


Figura 4.9 - Imagens SEM do interior de um DDS com CNF incorporada, com ampliação de 500x (a), 1000x (b), 15000x (c) e 20000 (d).

#### 4.1.1.3. Celulose Bacteriana (CB)

A CB, produzida em meio de cultura, em interface com o ar, é apresentada na forma de membrana, onde uma elevada quantidade de água se encontra retida na sua estrutura (Almeida et al. 2014). Ao analisar um corte desta membrana verifica-se que este tipo de nanocelulose apresenta uma rede tridimensional não ordenada nem orientada (Figura 4.10).

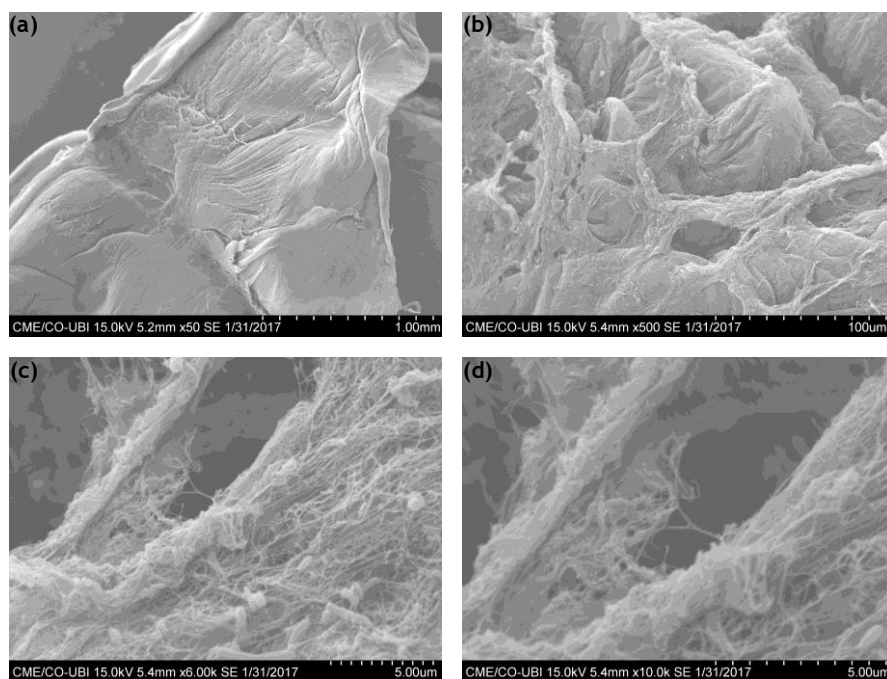


Figura 4.10 - Imagens SEM de um corte da membrana de CB, com ampliação de 50x (a), 500x (b), 6000x (c) e 10000x (d).

Tal como acontecia para a CNF, também é possível observar entre a estrutura da CB o efeito de ligação (*binding*) entre as fibras, com diâmetros inferiores a 100 nm, nomeadamente 39,7 nm (Figura 4.11).

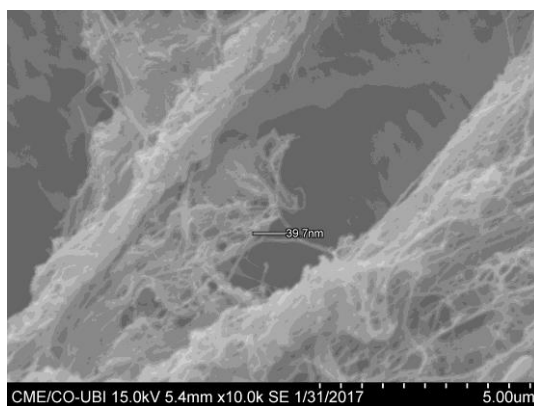


Figura 4.11 - Imagem SEM de um corte da membrana de CB, com medições de fibras, com uma ampliação de 10000x.

Da mesma forma que esta estrutura tem a capacidade de aprisionar água, também poderá armazenar moléculas terapêuticas, sendo isto uma vantagem quando utilizada em DDS.

#### 4.1.1.3.1. DDS com CB Incorporada

De forma equivalente, também os sistemas com CB incorporada foram cortados de forma a analisar a sua composição, estrutura e morfologia. Na Figura 4.12 verifica-se dois planos relativamente ao DDS, conseguindo diferenciar a parte periférica do interior, havendo parecências relativamente à CNF.

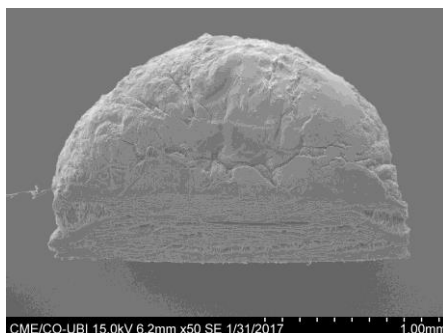


Figura 4.12 - Imagem SEM de um DDS com CB incorporada, em corte transversal, com uma ampliação de 50x.

Relativamente ao interior deste DDS (Figura 4.13), observa-se que existe uma estrutura em camadas com algum grau de separação, bem como fibrilas horizontais entre as camadas. Esta rede 3D é muito aberta, permitindo que a substância ativa se liberte mais facilmente, também de forma prolongada e controlada, não ficando tanto tempo armazenada no interior deste sistemas, conseguindo assim, atingir efeitos terapêuticos pretendidos rapidamente e de forma segura.

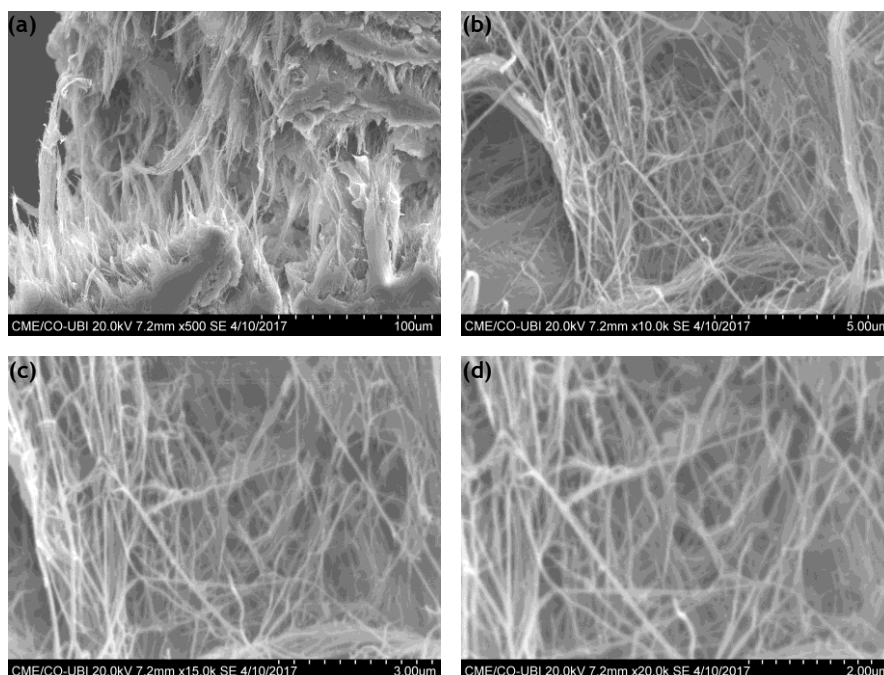
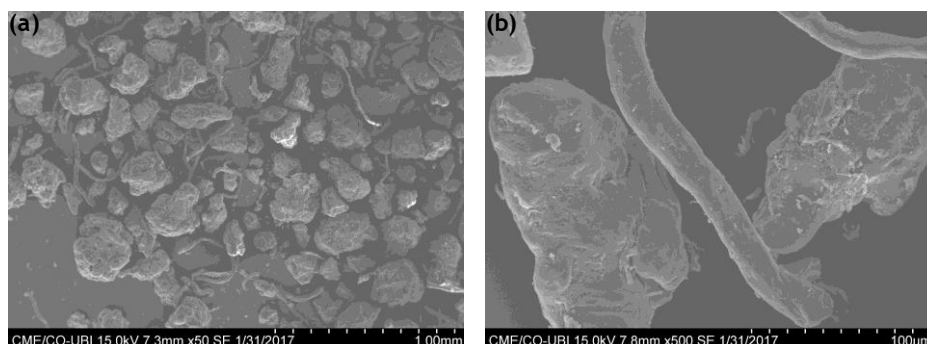


Figura 4.13 - Imagens SEM do interior de um DDS com CB incorporada, com ampliação de 500x (a), 10000x (b), 15000x (d) e 20000x (e).

#### 4.1.1.4. Carboximetilcelulose (CMC)

A CMC é um polímero aniônico derivado da celulose, apresentada na forma de sal sódico. De todas as propriedades descritas da CMC destacam-se as propriedades absorventes. Para garantir a obtenção destas propriedades, este derivado deve estar basicamente no estado não fibroso porém, pode conter no máximo 1% de fibra na sua composição (Gelman 1987), como

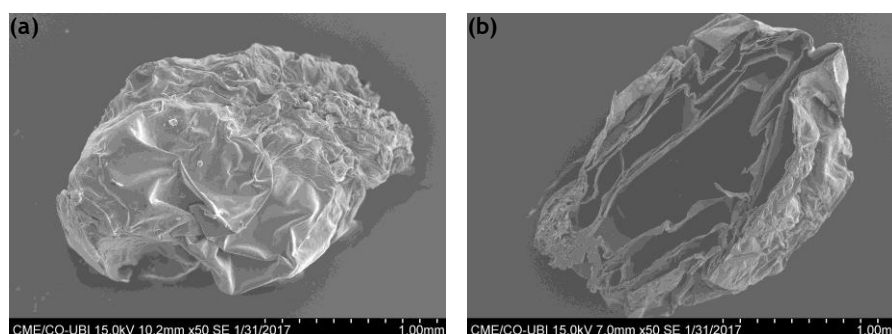
se encontra ilustrado na Figura 4.14. É devido a todas estas propriedades que a CMC pode ser utilizada na farmacologia incorporada num DDS.



**Figura 4.14** - Imagem SEM da CMC em forma de sal sódico, com uma ampliação de 50x (a) e com fibras na sua composição, com uma ampliação de 500x (b).

#### 4.1.1.4.1. DDS com CMC Incorporada

Também nos sistemas com CMC incorporada procedeu-se ao corte transversal destes (Figura 4.15) na medida de analisar a sua composição, estrutura e morfologia.



**Figura 4.15** - Imagens SEM dos DDS com CMC incorporada, em corte transversal, com vista da periferia (a) e da cavidade (b), com uma ampliação de 50x.

Este DDS é constituído por, alginato, em redor, e CMC, no seu interior, como é visível na Figura 4.16a, sendo o primeiro polímero representado pela zona mais compacta. Com uma variação crescente da ampliação, é possível verificar que a CMC forma uma rede 3D entrelaçada, uniforme e aberta, isto é, existem várias camadas na estrutura 3D (Figura 4.16(b-f)). Este tipo de estrutura possui capacidade de aprisionar grandes quantidades de água bem como moléculas terapêuticas devido à sua elevada porosidade, sendo isto uma vantagem uma vez que liberta estas de uma forma controlada.

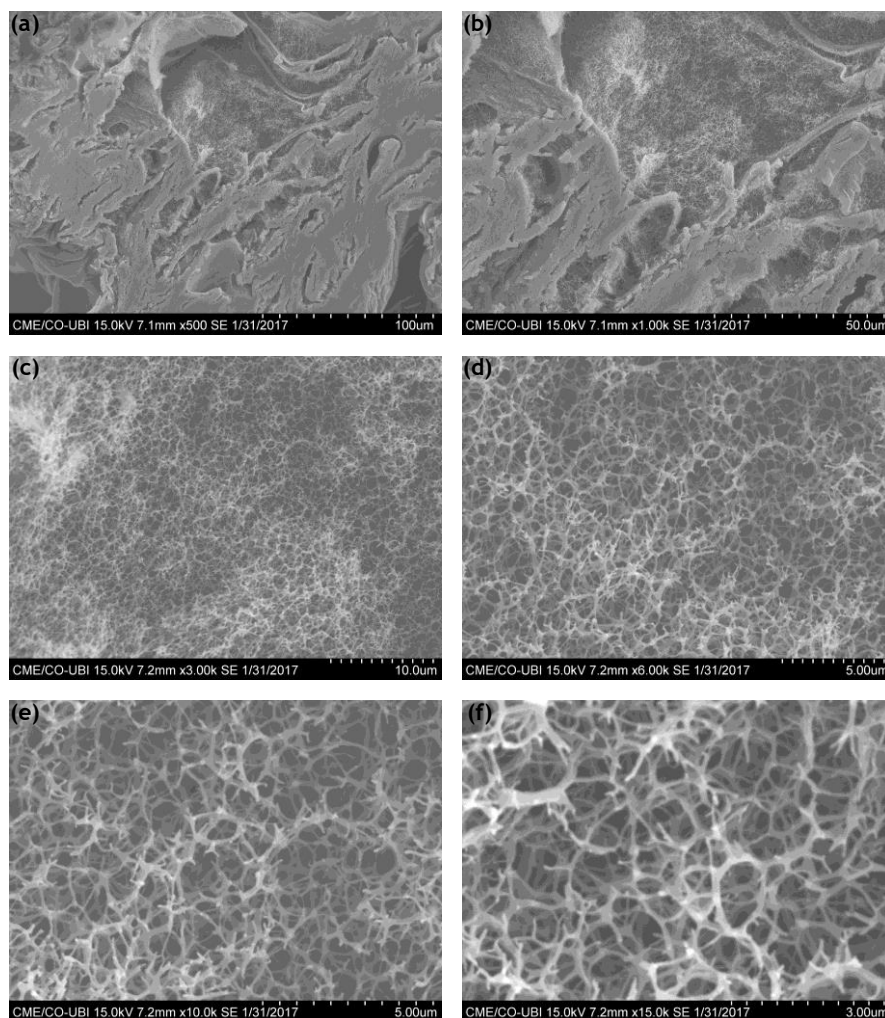


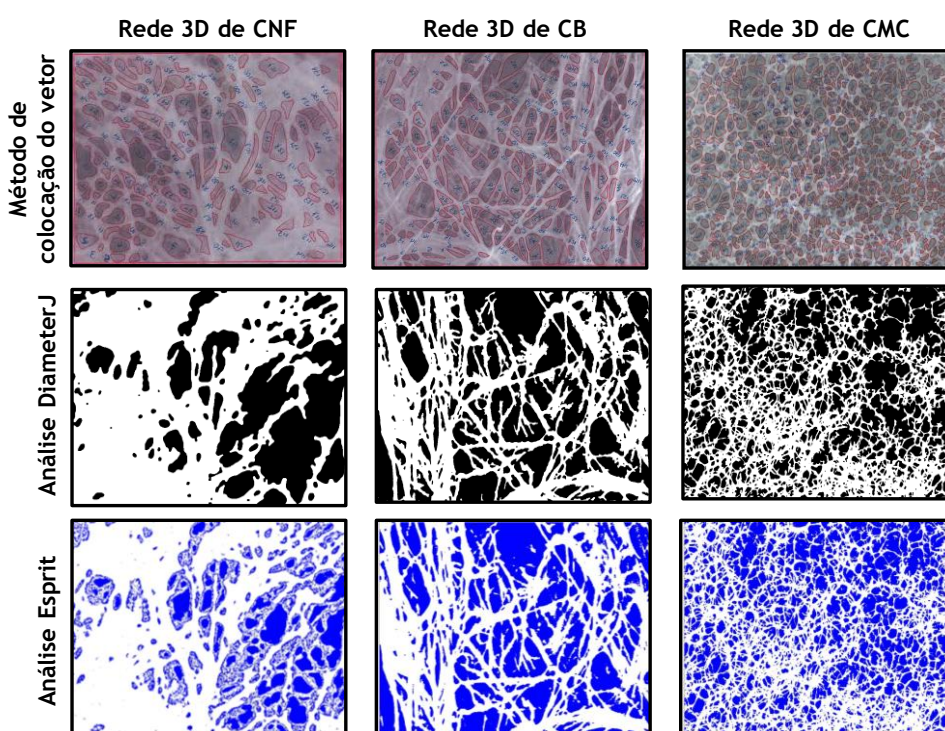
Figura 4.16 - Imagens SEM da rede 3D da CMC no interior dos DDS, com uma ampliação de 500x (a), 1000x (b), 3000x (c), 6000x (d), 10000x (e) e 15000x (f).

#### 4.1.2. Tratamento e Análise de Imagem

Após análise de todas as imagens SEM, realizou-se um posterior estudo através do programa Esprit 1.9 da Bruker, que transforma a maior parte dos poros em partículas, permitindo a medição de cada uma de forma automática, e da ferramenta DiameterJ do programa ImageJ, que para além de permitir a medição de poros também permite medições da espessura, diâmetro, comprimento e orientação das fibras. A utilização de programas de tratamento e análise de imagem implica uma definição de uma metodologia na qual é importante a escolha adequada dos filtros, utilização de parâmetros de análise de imagens otimizados e critérios de validação bem definidos. O processo para efetuar uma metodologia de análise de imagem através programa Esprit 1.9 da Bruker inicia-se pela escolha de filtros, seguindo de uma binarização, morfologia e análise. Através desta metodologia é possível obter resultados acerca de todas as propriedades dos poros (Anexo B). Já o processo para efetuar esta metodologia através da ferramenta DiameterJ inicia-se por várias segmentações da imagem. Após isso, uma seleção da melhor imagem segmentada é realizada, a fim de selecionar a imagem com as fibras mais representativas não parciais. A ferramenta DiameterJ não realiza



medições em zonas onde as fibras se sobrepõem e, além disso, também não analisa poros que estejam nos limites da imagem. Paralelamente foi também usado o método de colocação de vetores nas imagens selecionadas para se obter uma validação e comparação desta metodologia bem como outro tipo de resultados que os programas anteriormente referidos não permitem. Para os estudos de tratamento e análise de imagem foi selecionada uma fração da rede 3D dos materiais utilizados nos estudos no interior dos DDS das imagens SEM, que contivesse uma área elementar representativa tanto a nível das dimensões das fibras como dos poros. Esta área deve representar a amostra num todo para uma determinada propriedade e conter informações satisfatórias sobre a nanoestrutura de modo a ser estatisticamente representativa. A Figura 4.17 mostra uma binarização das imagens SEM obtidas pela metodologia anteriormente descrita, permitindo realizar medições e dispor os resultados de várias formas, relacionando diferentes propriedades das fibras e dos poros.



**Figura 4.17** - Binarização das imagens SEM das diferentes redes 3D de CNF, CB e CMC realizadas pelas metodologias de análise de imagem que permitem relacionar propriedades das fibras e dos poros (ampliação CNF: 20000x; ampliação CB: 10000x; ampliação CMC: 6000x).

#### **4.1.2.1. Caracterização das dimensões das fibras na rede 3D dos diferentes materiais celulósicos incorporados nos DDS**

A ferramenta DiameterJ do programa ImageJ bem como o método de colocação de vetores são as metodologias utilizadas que permitem uma análise das propriedades das fibras. Com a ferramenta DiameterJ obteve-se resultados para a largura e comprimento das fibras da rede 3D da CNF, CB e CMC. Já com o método de colocação de vetores obteve-se resultados para a largura, comprimento, número de cruzamentos e distribuição das fibras da rede 3D para os materiais celulósicos. A Tabela 4.2 apresenta a

caracterização das propriedades das fibras utilizando estas ferramentas de análise de imagem.

**Tabela 4.2** - Caracterização das propriedades das fibras encontradas na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS utilizando ferramentas de análise de imagem.

Caracterização das Fibras		Método de colocação do vetor			Análise DiameterJ				
		CNF	CB	CMC	CNF	CB	CMC		
Número		140	151	380	356	1366	4993		
Largura (nm)	Min.	27,0	26,9	26,8	10,9	9,8	16,3		
	Máx.	216	269	625	423,9	482,3	440,5		
	Média	64,6±29,7	87,3±42,1	148±80,7	68,5±33,9	77,2±38,9	99,6±47,2		
Comprimento médio (nm)		-	-	-	174±140	177±146	243±179		
Nº de cruzamentos entre fibras	Min.	2	2	4	-	-	-		
	Máx.	12	21	39	-	-	-		
	Média	4,19±2,46	6,31±4,11	16,1±9,23	-	-	-		
Comprimento médio entre cruzamentos (nm)		194±98,5	445±216	599±230	-	-	-		
Distribuição média	Quadrados	Número	1,39±0,898	1,61±0,963	4,07±1,17	-	-	-	
		Largura (nm)	50,5±28,9	77,7±45,8	134±55,4	-	-	-	
	Eixo X	Número		13,9±3,67	16,1±3,41	40,7±5,10	-	-	-
				13,9±4,31	16,1±4,58	40,7±3,16	-	-	-

As fibras encontradas na rede 3D de CNF (n=356) no interior dos DDS apresentaram uma largura e um comprimento médios de  $(68,5\pm 33,9)$  nm e  $(174\pm 140)$  nm, respetivamente. Porém, as fibras na rede 3D de CB (n=1366) e de CMC (n=4993) apresentaram valores mais elevados. Dos resultados obtidos, as fibras de CNF apresentam valores mais semelhantes aos das CB pois exibem uma largura de  $(77,2\pm 38,9)$  nm e um comprimento de  $(177\pm 146)$  nm, enquanto as fibras de CMC apresentam uma largura de  $(99,6\pm 47,2)$  nm e um comprimento de  $(243\pm 179)$  nm. As larguras médias das fibras CNF estão distribuídas entre 10,9 nm e 423,9 nm. Comparativamente, às de CB apresentaram uma distribuição de diâmetros semelhantes (entre 9,8 nm e 482,3 nm) enquanto as de CMC apresentaram uma distribuição de diâmetros maior (entre 16,3 nm e 440,5 nm). O método de colocação de vetores também apresentou valores muito semelhantes aos obtidos pela ferramenta DiameterJ, com larguras médias para as fibras de CNF (n=140), CB (n=151) e CMC (n=380) de  $(64,6\pm 29,7)$  nm,  $(87,3\pm 42,1)$  nm e  $(148\pm 80,7)$  nm, respetivamente. Como todos os valores se encontram na mesma gama para os dois métodos de análise, é possível validar esta metodologia (Hotaling et al. 2015).

Para além de todos estas propriedades, através do método de colocação de vetores é possível obter resultados acerca das interseções entre fibras na rede 3D, nomeadamente o número de vezes que cada uma se interseta bem como o comprimento entre cada interseção. As fibras de CNF na rede 3D intersetam-se, em média, aproximadamente 4 vezes, com um comprimento médio entre interseções de  $(194\pm 98,5)$  nm. Comparativamente, as fibras de CB e CMC na rede 3D intersetam-se mais vezes que as de CNF pois, em média, intersetam-se, aproximadamente 6 e 16 vezes, com um comprimento médio entre interseções de  $(445\pm 216)$  nm e  $(599\pm 230)$  nm, respetivamente. Já as fibras de CB se intersetam menos vezes que as fibras de CMC, com um comprimento médio entre estas interseções também menor. Também é possível ainda obter informações relativamente à distribuição das fibras (e dos poros) na rede 3D de CNF, CB e CMC no interior dos DDS, através deste método. Esta análise foi realizada através de uma grelha dividida em 100 quadrados, cada um com  $311 \text{ nm}^2$  (para a CNF),  $928 \text{ nm}^2$  (para a CB) e  $3460 \text{ nm}^2$  (para a CMC) de área. Em média, na rede 3D da CNF existe aproximadamente 1 fibra numa área de  $311 \text{ nm}^2$ , e 14 fibras numa área de  $3110 \text{ nm}^2$  (eixos X e Y). Na rede 3D da CB existem, em média, aproximadamente 2 fibras numa área de  $928 \text{ nm}^2$ , e 16 fibras numa área de  $9280 \text{ nm}^2$  (eixos X e Y). Por fim, em média, existem 4 fibras numa área de  $3460 \text{ nm}^2$ , e 41 fibras numa área de  $34600 \text{ nm}^2$  (eixos X e Y) na rede 3D de CMC.

#### **4.1.2.2. Caracterização das dimensões dos poros na rede 3D dos diferentes materiais celulósicos incorporados nos DDS**

A ferramenta DiameterJ do programa ImageJ, o programa Esprit 1.9 da Bruker bem como o método de colocação de vetores são as metodologias utilizadas que permitem uma análise das propriedades dos poros. Estas três metodologias de análise fornecem resultados, em comum, acerca da área, diâmetro médio, maior e menor, circularidade, projeção X e Y, rugosidade,

forma e distribuição dos poros da rede 3D da CNF, CB e CMC. A Tabela 4.3 apresenta a caracterização das propriedades dos poros utilizando estas ferramentas de análise de imagem.

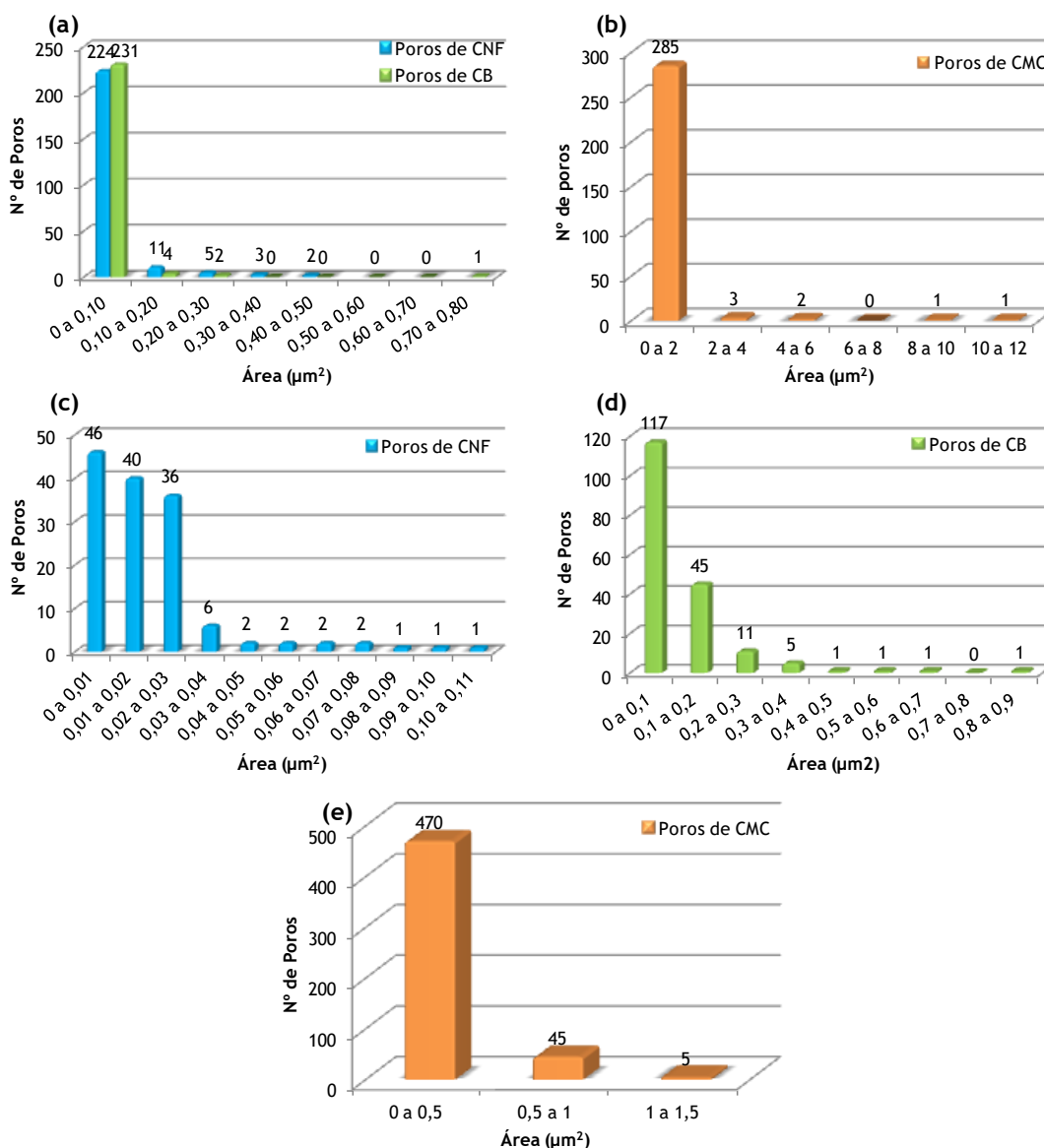
Os poros encontrados na rede 3D de CNF (n=73) no interior dos DDS apresentaram um diâmetro médio de poros de  $(132\pm 15,6)$  nm, com uma porosidade de 35% porém, com uma população maior (n=245) apresentaram  $(115\pm 10,9)$  nm de diâmetro médio. Isto indica que ao analisar um maior número de poros considera-se todas as dimensões possíveis que os poros podem apresentar, sejam elas de pequena ou grande dimensão. Comparativamente, os poros de CB (n=236) apresentaram um diâmetro médio de poros de  $(212\pm 23,9)$  nm, com uma porosidade de 48%, e para uma população semelhante (n=238) apresentaram  $(314\pm 39,1)$  nm de diâmetro médio. Esta distribuição de tamanhos de poros maior indicou que os dois poros analisados apresentavam grandes dimensões, obtendo-se por isso uma maior distribuição. Aos poros de CMC (n=1037) apresentaram  $(273\pm 27,0)$  nm de diâmetro médio, com uma porosidade de 51%, e para uma população menor (n=292) apresentaram  $(678\pm 130)$  nm de diâmetro médio. Esta grande discrepância de populações indicou que a segunda análise agrupou um maior número de poros, obtendo-se maiores dimensões com uma menor população. Apesar destas diferenças apresentadas, todos os poros da CNF, CB e CMC encontram-se na mesma gama de medições, sendo por isso estatisticamente similares. Este facto também é comprovado pelo método de colocação de vetores apresentando diâmetros médios de poros para a CNF (n=139), CB (n=182) e CMC (n=520) de  $(144\pm 61,9)$  nm,  $(318\pm 156)$  nm e  $(480\pm 318)$  nm. Por esta razão a metodologia aplicada também pode ser validada.

De acordo com o Anexo B, os poros encontrados na rede 3D de CNF (n=245), CB (n=238) e CMC (n=292) no interior dos DDS apresentam-se irregulares, quanto à circularidade e forma, e rugosos, quanto à rugosidade. Em relação à circularidade, os poros de CB apresentam valores mais elevados e os de CMC mais baixos, inferindo que esta última tem poros mais regulares. Em relação à rugosidade, os poros de CMC são mais rugosos uma vez que apresentam valores mais elevados para esta propriedade. Por fim, em relação à forma, os poros de CNF são os mais irregulares pois, apresentam valores mais baixos para esta propriedade. Porém, como a análise de imagem transforma os poros da rede 3D em partículas e ao comparar imagens SEM na literatura, conclui-se que os poros encontrados na rede polimérica dos materiais celulósicos apresentam grande regularidade. Comparativamente, com diferentes populações, os poros encontrados na rede 3D de CNF (n=73), CB (n=236) e CMC (n=1037) apresentam valores inferiores para a circularidade. Relativamente ao comprimento da projeção no eixo X e à altura da projeção no eixo Y, verifica-se que uma população maior de poros (CNF (n=245) e CB (n=238)) apresenta valores mais elevados para estas propriedades do que para uma população menor (CNF (n=139) e CB (n=182)), com exceção para os poros de CMC. Apesar destas diferenças apresentadas, também para estas propriedades todos os poros da CNF, CB e CMC encontram-se na mesma gama de medições, sendo por isso estatisticamente similares.

Tabela 4.3 - Caracterização das propriedades dos poros encontrados na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS utilizando ferramentas de análise de imagem.

Caracterização dos Poros		Método de colocação do vetor			Análise DiameterJ			Análise Esprit		
		CNF	CB	CMC	CNF	CB	CMC	CNF	CB	CMC
Número		139	182	520	74	236	1037	245	238	292
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		0,0191± 0,0181	0,0986± 0,109	0,217± 0,202	0,0260± 0,0797	0,0627± 0,150	0,105±0,37 0	0,00443± 0,00696	0,0241±0,05 73	0,253±1,03
Diâmetro médio (nm)	Min.	85,7±46,2	183±111	291±147	86,5±8,74	129±15,5	200±20,6	77,7±64,9	194±26,2	490±93,5
	Máx.	203±95,9	454±233	669±330	176±22,4	296±32,2	345±33,4	142±14,6	403±50,9	824±162
	Média	144±61,9	318±156	480±318	132±15,6	212±23,9	273±27,0	115±10,9	314±39,1	678±130
Circularidade (nm)		-	-	-	777±215	654±245	731±200	4130±2640	6590±3530	4020±2820
Projeção X (nm)		169±70,4	319±154	584±268	-	-	-	243±35,3	663±16,4	3820±1540
Projeção Y (nm)		187±92,2	448±234	606±304	-	-	-	272±40,0	942±21,4	4000±1610
Rugosidade		-	-	-	-	-	-	1890±537	1860±714	2240±1920
Forma (nm)		-	-	-	-	-	-	150±102	191±183	220±185
Porosidade (%)		-	-	-	34,6	48,4	50,7	-	-	-
Distribuição	Quadrado	Número	1,44±1,00	1,44±0,833	6,65±2,25	-	-	-	-	-
		Largura (nm)	100±76,3	177±110	662±233	-	-	-	-	-
	Eixo X	Número	14,4±4,99	14,4±2,63	66,5±14,2	-	-	-	-	-
			Eixo Y	14,4±3,81	14,4±2,91	66,5±6,01	-	-	-	-

Por comparação de todos os métodos de análise, verifica-se que os poros de CMC apresentam valores mais elevados para a área, seguida dos poros de CB e de CNF porém, com discrepância nas dimensões. Relativamente ao agrupamento dos poros de CNF (n=245), existe um maior número de poros na rede 3D com uma área inferior a  $0,01 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 224 poros. Entre  $0,01$  e  $0,02 \mu\text{m}^2$ , um total de 11 poros; entre  $0,02$  e  $0,03 \mu\text{m}^2$ , 5 poros; 3 poros entre  $0,03$  e  $0,04 \mu\text{m}^2$  e apenas 2 poros entre  $0,04$  e  $0,05 \mu\text{m}^2$ . Comparativamente, os poros de CB (n=238) apresenta semelhanças em relação a este agrupamento pois, existe um maior número de poros na rede 3D com uma área inferior a  $0,10 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 231 poros. Entre  $0,10$  e  $0,20 \mu\text{m}^2$ , um total de 4 poros; entre  $0,20$  e  $0,30 \mu\text{m}^2$ , 2 poros; e apenas 1 poro entre  $0,70$  e  $0,80 \mu\text{m}^2$ . Por fim, o agrupamento dos poros de CMC (n=292) apresenta grandes diferenças em relação aos outros materiais celulósicos pois, existe um maior número de poros na rede 3D com uma área inferior a  $2 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 285 poros. Entre  $2$  e  $4 \mu\text{m}^2$ , um total de 3 poros; entre  $4$  e  $6 \mu\text{m}^2$ , 2 poros; 1 poro entre  $8$  e  $10 \mu\text{m}^2$  e também apenas 1 poro entre  $10$  e  $12 \mu\text{m}^2$ . Porém, na imagem SEM pode-se observar que não existe nenhum poro com dimensões na ordem dos  $12 \mu\text{m}^2$ , logo conclui-se que esta metodologia agrupou vários poros considerando apenas um. Desta forma, existem mais de 292 poros nesta rede polimérica 3D. Com uma população diferente, esta distribuição também é, numa forma geral, diferente. Dos 139 poros encontrados na rede 3D de CNF, observa-se que existe um maior número de poros com uma área inferior a  $0,01 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 46 poros. Entre  $0,01$  e  $0,02 \mu\text{m}^2$ , 40 poros; entre  $0,02$  e  $0,03 \mu\text{m}^2$ , 36 poros; entre  $0,03$  e  $0,04 \mu\text{m}^2$ , 6 poros; entre  $0,04$  e  $0,05 \mu\text{m}^2$ , entre  $0,05$  e  $0,06 \mu\text{m}^2$ , entre  $0,06$  e  $0,07 \mu\text{m}^2$  e entre  $0,07$  e  $0,08 \mu\text{m}^2$ , apenas 2 poros; e, por fim, entre  $0,08$  e  $0,09 \mu\text{m}^2$ , entre  $0,09$  e  $0,10 \mu\text{m}^2$  e entre  $0,10$  e  $0,11 \mu\text{m}^2$ , apenas 1 poro. Dos 182 poros encontrados para a rede 3D de CB, observa-se que existe um maior número de poros com uma área inferior a  $0,1 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 117 poros. Entre  $0,1$  e  $0,2 \mu\text{m}^2$ , 45 poros; entre  $0,2$  e  $0,3 \mu\text{m}^2$ , 11 poros; entre  $0,3$  e  $0,4 \mu\text{m}^2$ , 5 poros; e entre  $0,4$  e  $0,5 \mu\text{m}^2$ , entre  $0,5$  e  $0,6 \mu\text{m}^2$ , entre  $0,6$  e  $0,7 \mu\text{m}^2$  e entre  $0,8$  e  $0,9 \mu\text{m}^2$ , apenas 1 poro, não existindo nenhum poro entre  $0,7$  e  $0,8 \mu\text{m}^2$ . Por fim, dos 520 poros encontrados na rede 3D de CMC, observa-se que existe um maior número de poros com uma área inferior a  $0,5 \mu\text{m}^2$ , nomeadamente 470 poros. Entre  $0,5$  e  $1 \mu\text{m}^2$ , 45 poros e entre  $1$  e  $1,5 \mu\text{m}^2$ , apenas 5 poros. De referir que esta gama de resultados encontra-se inferior a  $2 \mu\text{m}^2$  de área, o que não aconteceu com as medições obtidas pela metodologia anterior, na medida que tinha valores na ordem dos  $12 \mu\text{m}^2$ . A Figura 4.18 representa um histograma que compara estes agrupamentos de poros na rede 3D da CNF, CB e CMC, relativos à área dos mesmos.



**Figura 4.18** - Comparação dos histogramas referentes à área dos poros na rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS, através da metodologia do Esprit 1.9 da Bruker ((a) e (b)) e do método de colocação de vetores ((a), (b) e (c)).

A Figura 4.19 correlaciona ainda a área dos poros na rede 3D da CNF, CB e CMC com o seu diâmetro médio, comprimento e largura. Para todos os materiais celulósicos, infere-se que os poros com menor área apresentam um diâmetro, comprimento e largura também menores, e vice-versa. Existe, aproximadamente, uma relação de proporcionalidade direta entre cada uma das propriedades, para os poros de CNF e CB, e uma relação logarítmica crescente para os poros de CMC. O comportamento para estas três diferentes propriedades, nos poros de CNF e CB, é muito similar pois, para a mesma área apresentam valores semelhantes de diâmetro, comprimento e largura. Porém, para os poros de CMC, o comportamento para o diâmetro e comprimento é muito similar enquanto a relação da área com a largura apresenta valores inferiores para esta última propriedade.

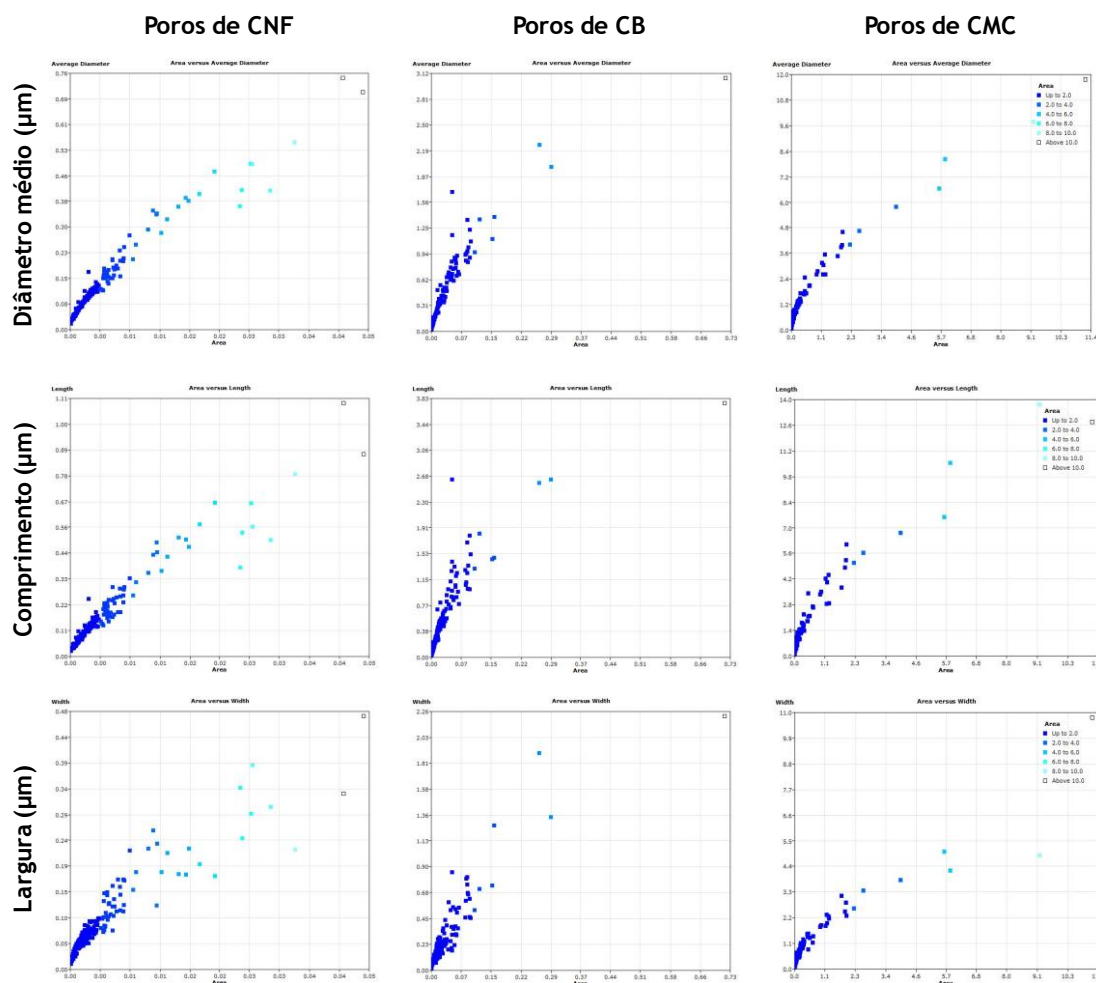


Figura 4.19 - Correlação e comparação da área dos poros da rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS com o diâmetro médio, comprimento e largura.

Os diagramas terciários permitem comparar e relacionar três das propriedades analisadas em simultâneo. Para este estudo, analisou-se a área e o comprimento dos poros na rede 3D dos DDS por comparação com todas as outras (Figura 4.20). Os poros de CNF e CB com valores entre 50 e 60% de área e comprimento apresentam resultados de 40 a 50% de diâmetro, enquanto os poros de CMC entre 0 e 10% de área e valores superiores a 50% de comprimento apresentam resultados de 40 a 50% de diâmetro, enquanto a largura varia de 20 a 50%. Poros entre 50 e 80% de área e comprimento, para a CNF, apresentam resultados de 20 a 50% de largura. Já poros entre 50 e 95% de área e comprimento, para a CB, apresentam resultados de 5 a 50 de largura. Quanto à circularidade, esta diminui com o aumento da área e do comprimento dos poros para os três materiais celulósicos. As projeções X e Y dos poros de CNF, CB e CMC são relativamente uniformes entre si. Quanto à rugosidade, esta diminui com o aumento da área e do comprimento também para os poros dos três materiais celulósicos. E, por fim, a forma dos poros da CNF e CB diminui com o aumento da área e do comprimento dos poros. Porém, poros de CMC entre 0 e 10% de área apresentam resultados crescentes de comprimentos e decrescentes em forma e áreas superiores a 10% apresentam valores



decrecentes de comprimento e crescentes em forma. Existe portanto uma relação de proporcionalidade inversa entre a área e a forma dos poros na rede 3D da CMC nos DDS.

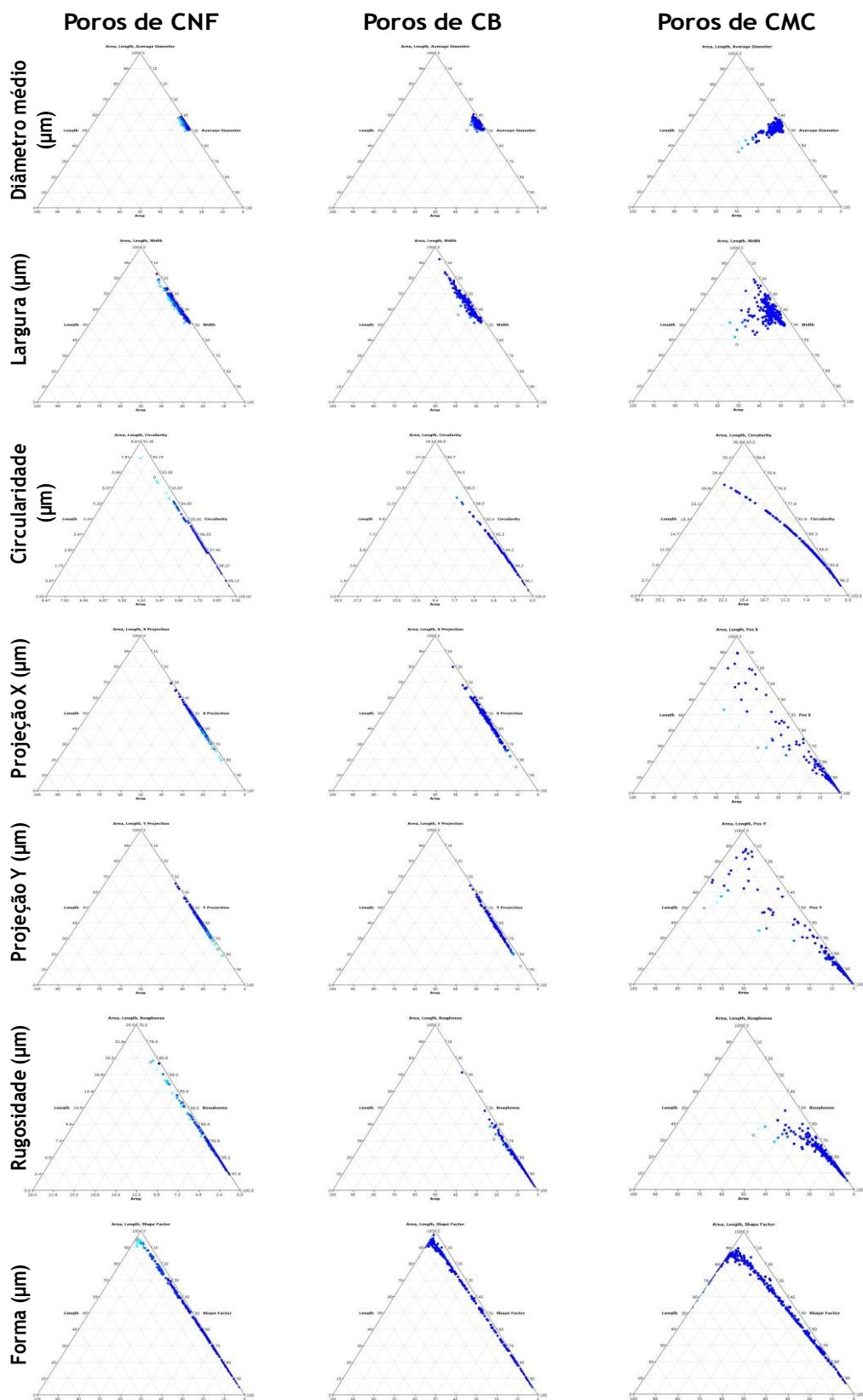
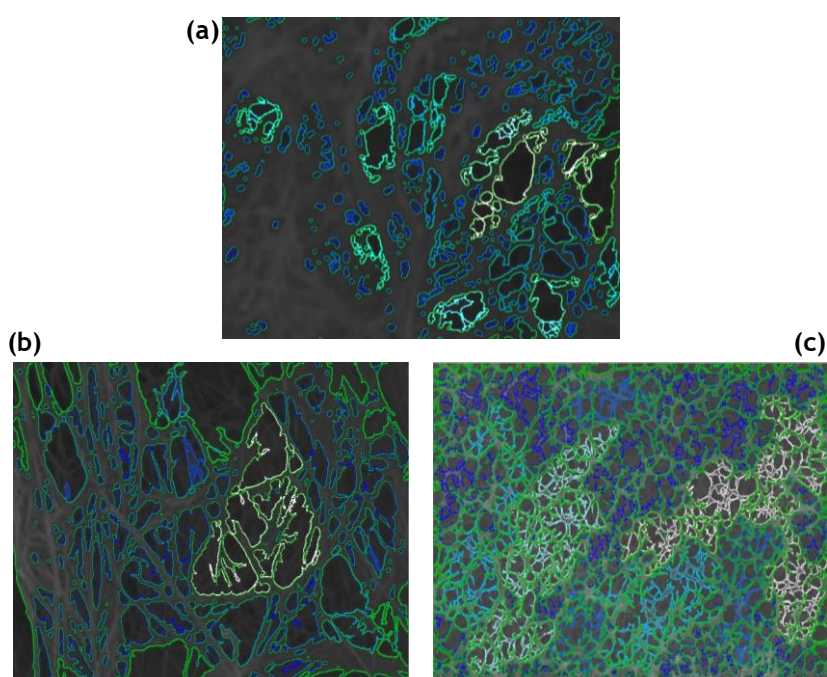


Figura 4.20 - Correlação e comparação da área e do comprimento dos poros da rede 3D da CNF, CB e CMC no interior dos DDS com o diâmetro médio, largura, circularidade, projeção X e Y, rugosidade e forma.

Também é possível ainda obter informações relativamente à distribuição dos poros na rede 3D de CNF, CB e CMC no interior dos DDS, através do método de colocação de vetores. Nas mesmas condições descritas anteriormente, na rede 3D da CNF, em média, existe aproximadamente 1 poro numa área de 311 nm<sup>2</sup>, e 14 poros numa área de 3110 nm<sup>2</sup> (eixos X e Y). Na rede 3D da CB existe, em média, aproximadamente 1 poro numa área de 928 nm<sup>2</sup>, e 14 poros numa área de 9280 nm<sup>2</sup> (eixos X e Y). Por fim, em média, existem aproximadamente 7 poros numa área de 3460 nm<sup>2</sup>, e 67 poros numa área de 34600 nm<sup>2</sup> (eixos X e Y), na rede 3D de CMC. A Figura 4.21 apresenta ainda a comparação da distribuição dos poros na rede 3D da CNF (área de fração de 13%), CB (área de fração de 12,4%) e CMC (área de fração de 23,9%) no interior dos DDS. O tamanho dos poros aumenta com a diminuição da coloração azul destes, verificando que a quantidade de poros com menores dimensões é superior.



**Figura 4.21** - Distribuição dos poros com diferentes tamanhos na rede 3D da CNF (a), CB (b) e CMC (c) no interior dos DDS.

Todos estes materiais celulósicos em estudo apresentam medições de fibras e poros na ordem da nanoescala e não só, permitindo que estes sejam multiestruturados e com grande estabilidade. Destes estudos conclui-se que a CMC apresenta maiores dimensões para as propriedades analisadas, seguida da CB e posteriormente da CNF porém, com uma área superficial maior em relação a estas últimas duas, e com diferentes valores de porosidade. Todavia, através de uma observação das imagens apresentadas verifica-se que os poros da CMC são os mais regulares e também menores que os da CB e maiores que os da CNF. Destes estudos também se concluiu que as propriedades da CNF e da CB apresentam grandes semelhanças.

## 4.2. Caracterização Química dos DDS

Para a caracterização química dos materiais celulósicos utilizados nos DDS, três métodos foram usados, nomeadamente, quantificação dos grupos ácidos totais, FTIR-ATR e EDX. Com o primeiro método, analisou-se os grupos carboxílicos expostos a interações nos diferentes materiais nanocelulósicos. Com o segundo método, analisou-se diretamente a superfície dos materiais utilizados nos estudos bem como os DDS produzidos. Em relação ao método de EDX, procedeu-se à análise elementar na cavidade dos DDS com o objetivo de provar que o Diclofenac se encontrava na matriz 3D no interior dos DDS e não na sua periferia.

### 4.2.1. Quantificação dos Grupos Ácidos Totais

O teor de grupos carboxílicos em nanoceluloses é bastante relevante uma vez que permite compreender a capacidade de ligação destes com outros materiais. Para a quantificação destes grupos, inicialmente, é usado HCl sendo responsável pela alteração das fibras para a forma protonada por reação com grupos  $H^+$  do ácido. Seguidamente decorre a titulação com NaOH. Numa primeira fase, a condutividade da solução diminui quando os grupos ácidos fortes são neutralizados com NaOH, isto é, quando não estão presentes grupos ácidos fortes, inicialmente ocorre uma ligeira redução da condutividade devido à neutralização dos protões libertados pelo sal. Numa segunda fase, ocorre a neutralização de grupos carboxílicos durante os quais a condutividade permanece praticamente inalterada pois, os iões  $Na^+$  adicionados são adsorvidos como contra-iões aos grupos  $COOH^-$  e os protões dissociados são neutralizados pelos iões  $OH^-$  adicionados. Por fim, numa terceira fase, a acumulação de NaOH em excesso leva a um aumento da condutividade. O teor de grupos COOH (X, em  $\mu mol/g$ ) é dado pela expressão:

$$X = \frac{[NaOH] \times V_2}{m} \quad (4.1)$$

Onde “[NaOH]” é a concentração exata da solução de NaOH ( $\mu mol/L$ ); “ $V_2$ ” é o volume de NaOH consumido no segundo ponto de equivalência (L); e “m” é a massa seca da amostra (g). A concentração exata da solução de NaOH também foi calculada pelo método condutivimétrico (Anexo D1), obtendo-se um valor médio de  $(0,0319 \pm 0,00421)$  mol/L.

A Tabela 4.4 mostra os resultados obtidos de ambos os métodos para a pasta de celulose *Kraft* branqueada de *Eucalypto globulus*, cujos gráficos das titulações se encontram no Anexo D2 e D3, respetivamente.

**Tabela 4.4** - Resultados obtidos para o teor de grupos acídicos totais para a pasta de celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*, através da norma SCAN-CM 65:02 e de uma alteração à mesma.

Método	X ( $\mu\text{mol/g}$ )
Norma SCAN-CM 65:02	100 $\pm$ 13,3
Alteração à norma SCAN-CM 65:02	130 $\pm$ 3,12

Para os dois métodos o valor obtido para o teor de grupos COOH encontra-se na ordem dos 100  $\mu\text{mol/g}$ .

#### 4.2.1.1. Celulose Nanofibrilada (CNF)

A obtenção da CNF necessita tanto de um tratamento mecânico como um tratamento químico. A CNF em estudo foi obtida por um processo de oxidação através do radical TEMPO. Estudos anteriores descrevem teores de grupos COOH para pastas de celulose tratadas com TEMPO entre os 300 e 500  $\mu\text{mol/g}$  (Abdul Khalil et al. 2014).

Neste estudo e através do método condutivimétrico, o valor médio resultante do teor de grupos acídicos totais para a CNF, cujos gráficos das titulações se encontram no Anexo D4, foi de (328 $\pm$ 68,9)  $\mu\text{mol/g}$ .

#### 4.2.1.2. Celulose Bacteriana (CB)

A CB é produzida de forma pura e livre de outros polímeros. Desta forma, o valor resultante do teor de grupos acídicos totais para este tipo de nanocelulose neste estudo, cujos gráficos das titulações se encontram no Anexo D5, foi de 175  $\mu\text{mol/g}$ , sendo este inferior ao obtido para a CNF porém, em comparação com a celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*, o resultado é mais elevado. Este facto indica que a CNF apresenta mais grupos reativos nas suas extremidades comparativamente à CB.

#### 4.2.2. FTIR-ATR

Através do método de FTIR-ATR foi possível analisar diretamente a superfície dos materiais utilizados nos estudos bem como dos DDS produzidos, cujos espectros de infravermelho (IV) estão apresentados no Anexo E.

##### 4.2.2.1. Celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*

A celulose *kraft* branqueada de *Eucalipto globulus* encontra-se na forma de pasta sem impurezas. A análise química desta celulose é importante uma vez que é o ponto de partida para a obtenção da nanocelulose, nomeadamente, a CNF.

Através da análise do espectro IV desta celulose (Anexo E1), observa-se existência de bandas atribuídas aos grupos hidroxílicos (estiramento O-H celulósico) em 3326,27  $\text{cm}^{-1}$ , deformação

axial dos grupos C-H em  $2918,06\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular dos grupos C-H em  $1314,39\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de ligações C-O de álcoois primários em  $1161,37\text{ cm}^{-1}$ , banda de absorção das ligações C-O-C em  $1028,91\text{ cm}^{-1}$  e ligações  $\beta$ -glicosídicas entre unidades de glicose em  $896,41\text{ cm}^{-1}$ , características da celulose.

#### **4.2.2.2. Celulose Nanofibrilada (CNF)**

O espectro obtido para o filme de CNF (Anexo E2) mostrou uma banda em  $3324,82\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração das ligações dos grupos -OH e em  $2893,50\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração das ligações dos grupos C-H. A banda encontrada em  $1645,85\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de ligações dos grupos de ácidos carboxílicos, C=O e C-O. A presença desta banda deve-se ao tratamento oxidativo mediado por TEMPO como parte do processo de produção da CNF. As faixas de absorção assimétricas de  $1427,92$  e  $1315,03\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupos do sal de ácido carboxílico, nomeadamente o COONa, encontrado após o tratamento químico. Os picos de  $1028,03$  e  $895,95\text{ cm}^{-1}$  estão associados ainda com as vibrações de ligações do polímero de celulose, C-O e C-H, presentes na cadeia do polímero. Como esta amostra estava na forma de filme é importante realizar várias réplicas em diferentes pontos para se obter uma representatividade da amostra. Através da análise de diferentes pontos no filme de CNF verificou-se grande semelhança nos espectros de IV.

A CNF encontra-se na forma de um gel. O espectro do gel da CNF (Anexo E2) apresentou semelhanças com o espectro obtido para o filme de CNF. Porém, observa-se uma banda mais larga em  $3332,12\text{ cm}^{-1}$  correspondendo à vibração das ligações dos grupos -OH, concluindo que esta amostra apresenta grandes quantidades de água.

#### **4.2.2.3. Celulose Bacteriana (CB)**

O espectro obtido para o filme de CB (Anexo E3) apresenta semelhanças com o espectro do filme da CNF. Porém, o pico correspondente às ligações dos grupos de ácidos carboxílicos, C=O e C-O, é mais intenso para a CNF concluindo que esta apresenta um teor de grupos COOH mais elevado que a CB (a  $1646,91\text{ cm}^{-1}$ ), tal como se verificou anteriormente. Neste espectro ainda se observam bandas na região de  $1160,62\text{ cm}^{-1}$  a  $1029,19\text{ cm}^{-1}$ , as quais correspondem a ligações C-O-C do anel (ligação glicosídica) e estiramento C-C e C-O, respetivamente. Tal como para o filme de CNF, também se realizaram várias réplicas ao filme de CB. Para este também se obteve uma grande semelhança para os espectros obtidos para os diferentes pontos analisados, podendo apenas um corresponder a uma representatividade da amostra.

A CB encontra-se na forma de uma membrana. O espectro da membrana da CB (Anexo E3) apresentou semelhanças com o espectro obtido para o filme de CB. A região de  $3344,90\text{ cm}^{-1}$  representa os grupos OH uma vez que a CB é composta por mais de 90% de água.

#### **4.2.2.4. Carboximetilcelulose (CMC)**

O espectro obtido para os cristais de CMC (Anexo E4) mostrou a  $3248,87\text{ cm}^{-1}$  uma banda referente à vibração de estiramento do grupo OH, enquanto a banda atribuída ao estiramento CH ocorreu na região entre  $2981,06\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1411,30\text{ cm}^{-1}$  e  $1322,53\text{ cm}^{-1}$  as bandas com picos intensos referem-se à vibração de dobramento dos grupos  $\text{CH}_2$  e OH, respectivamente. Em torno dos  $1019,25\text{ cm}^{-1}$  a banda observada deve-se, provavelmente, ao estiramento CH-O- $\text{CH}_2$ . O espectro mostrou ainda, uma banda em  $1586,51\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída à vibração antissimétrica do grupo  $\text{COO}^-$ .

#### **4.2.2.5. Diclofenac**

O Diclofenac, sendo o fármaco incorporado nos DDS, também foi sujeito a análise de FTIR-ATR. O espectro deste fármaco (Anexo E5) apresentou uma banda em  $3386,63\text{ cm}^{-1}$ , característica de grupos N-H e uma banda na região de  $3252,23\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à ligação NH-O. Na região de  $2980,89\text{ cm}^{-1}$  é observada uma banda que corresponde às vibrações  $\text{CH}_2$ . A banda intensa em  $1556,23\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração assimétrica  $\text{COO}^-$ , e em  $1572,41\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular NH e ao alongamento do anel. As bandas intensas em  $1497,61\text{ cm}^{-1}$  e  $1468,94\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao alongamento do anel. A banda intensa em  $1451,60\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular  $\text{CH}_2$ , a banda observada em  $1396,03\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento simétrico  $\text{COO}^-$  e as bandas intensas em  $765,18$  e  $744,70\text{ cm}^{-1}$  correspondem à deformação angular CH.

#### **4.2.2.6. Sistemas de Entrega de Fármacos**

##### **4.2.2.6.1. DDS de Alginato Sem Materiais Celulósicos Incorporados**

O espectro dos DDS de alginato (Anexo E6) apresentou uma banda em torno de  $3184,11\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento OH e a bandas em  $1585,95\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração assimétrica e simétrica, respectivamente, do estiramento  $\text{COO}^-$  devido à presença de grupos carboxílicos. Observa-se uma banda de baixa intensidade em  $814,72\text{ cm}^{-1}$  identificada como os estiramentos CO e CCH e uma outra banda em  $1408,38\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao estiramento  $\text{COO}^-$ . As bandas relativas, respectivamente, ao  $\text{CO}_2$  e CO são observadas em  $2981,14$  e  $2929,78\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $882,54\text{ cm}^{-1}$  é referente aos estiramentos C-C-O e C-C-H. Por fim, a banda, aproximadamente, em  $1030\text{ cm}^{-1}$  é referente aos estiramentos CO, CCO e CC.

##### **4.2.2.6.2. DDS de Alginato com o fármaco Diclofenac Incorporado**

O espectro dos DDS de alginato com o Diclofenac incorporado tem de apresentar características tanto do espectro dos DDS de alginato como do Diclofenac.

Por comparação do espectro dos DDS de alginato, o espectro dos DDS de alginato com o Diclofenac incorporado (Anexo E7) apresenta grandes semelhanças principalmente dos  $600$  aos  $1600\text{ cm}^{-1}$  e uma banda larga em torno de  $3327,39\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento OH. Por

outro lado, picos característicos do Diclofenac são também observados neste espectro. Na região de  $3366,63\text{ cm}^{-1}$  pode ser visualizado o pico referente ao estiramento da amina da estrutura do Diclofenac. Além disso, em  $1590,86\text{ cm}^{-1}$  indicou o estiramento das ligações C=C e em  $2359,10\text{ cm}^{-1}$  indicou o estiramento do grupo C=O do ácido carboxílico. Estes picos não estão presentes nos espectros dos DDS de alginato sem o fármaco, concluindo que o Diclofenac se encontrava no interior dos DDS. A banda a  $2981,08\text{ cm}^{-1}$  pode corresponder à junção das bandas do alginato do  $\text{CO}_2$  e ao OH da função ácida do Diclofenac.

#### **4.2.2.6.3. DDS com CNF Incorporada**

O espectro dos DDS com CNF incorporada tem de apresentar características tanto do espectro dos DDS de alginato como do filme de CNF, uma vez que não tinha água na sua composição.

O espectro dos DDS com CNF incorporada (Anexo E8) apresenta semelhanças com o espectro dos DDS de alginato nomeadamente a  $3184,03\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento OH e também dos 600 aos  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Por outro lado, bandas características do filme de CNF são também observadas neste espectro. A banda a  $2889,02\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração das ligações dos grupos C-H da CNF. Em  $1593,21\text{ cm}^{-1}$  a banda corresponde ao estiramento de ligações dos grupos de ácidos carboxílicos. As bandas a  $1388,21\text{ cm}^{-1}$  e  $1250,79\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupos do sal de ácido carboxílico, característico desta nanocelulose. Também as bandas a  $1026,60\text{ cm}^{-1}$  e  $952,83\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de ligações do polímero de celulose.

#### **4.2.2.6.4. DDS com CB Incorporada**

O espectro dos DDS com CB incorporada tem de apresentar características tanto do espectro dos DDS de alginato como do filme de CB, uma vez que não tinha água na sua composição.

O espectro dos DDS com CB incorporada (Anexo E9) também apresentou as mesmas características do espectro dos DDS de alginato. A banda a  $3222,09\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento OH e também dos 600 aos  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, bandas características do filme de CB também são observadas neste espectro. A banda a  $2889,29\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração das ligações dos grupos C-H. A banda correspondente às ligações dos grupos de ácidos carboxílicos encontra-se na região dos  $1589,82\text{ cm}^{-1}$ . Neste espectro também se observam as bandas de  $1151,09\text{ cm}^{-1}$  a  $1073,02\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à ligação C-O-C do anel e ao estiramento C-C e C-O, respetivamente.

#### **4.2.2.6.5. DDS com CMC Incorporada**

O espectro dos DDS com CMC incorporada tem de apresentar características tanto do espectro dos DDS de alginato como dos cristais de CMC.

O espectro com CMC incorporada (Anexo E10) apresenta semelhanças com o espectro dos DDS de alginato, nomeadamente em  $3345,47\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento OH bem como dos 600 aos  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Por outro lado, picos característicos dos cristais de CMC são também

observados neste espectro. Em  $3345,47\text{ cm}^{-1}$  também pode ser característica da banda referente à vibração de estiramento do grupo OH da CMC. Em  $1393,84\text{ cm}^{-1}$  e  $1251,06\text{ cm}^{-1}$  as bandas correspondem à vibração de dobramento dos grupos  $\text{CH}_2$  e OH, respetivamente. A banda em  $1576,37\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração antissimétrica do grupo  $\text{COO}^-$ . O espectro mostra também uma banda a  $2358,87\text{ cm}^{-1}$  correspondente à banda a  $2358,94\text{ cm}^{-1}$  do espectro da CMC. A banda a  $2981,03\text{ cm}^{-1}$  pode corresponder à junção das bandas do alginato do  $\text{CO}_2$  e ao estiramento CH da CMC.

### **4.2.3. EDX**

Os DDS são constituídos por alginato na sua superfície, materiais celulósicos no seu interior e Diclofenac aprisionado na sua rede tridimensional. Todos os polímeros contidos nestes sistemas têm na sua composição carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) porém, para além destes elementos químicos, o Diclofenac ainda apresenta na sua composição cloro (Cl) e azoto (N). Desta forma, com o intuito de provar que esta molécula terapêutica se encontrava no interior dos DDS, os elementos químicos que se deveriam destacar na análise por EDX seriam o Cl e o N uma vez que são os únicos distintos dos outros materiais.

Como a constituição de todos os DDS, a nível elementar, é a mesma, basta selecionar uma amostra para ser analisada. De todas as amostras analisadas pelo método de SEM, os DDS com CMC incorporada foram os que apresentaram boas condições para serem submetidos ao EDX, cuja profundidade de análise nestas amostras é em média, aproximadamente, 300 nm.

Com uma ampliação de 500x do interior do DDS, verifica-se que neste sistema há existência de C, O, ouro (Au), N, cálcio (Ca) e Cl (Figura 4.22).



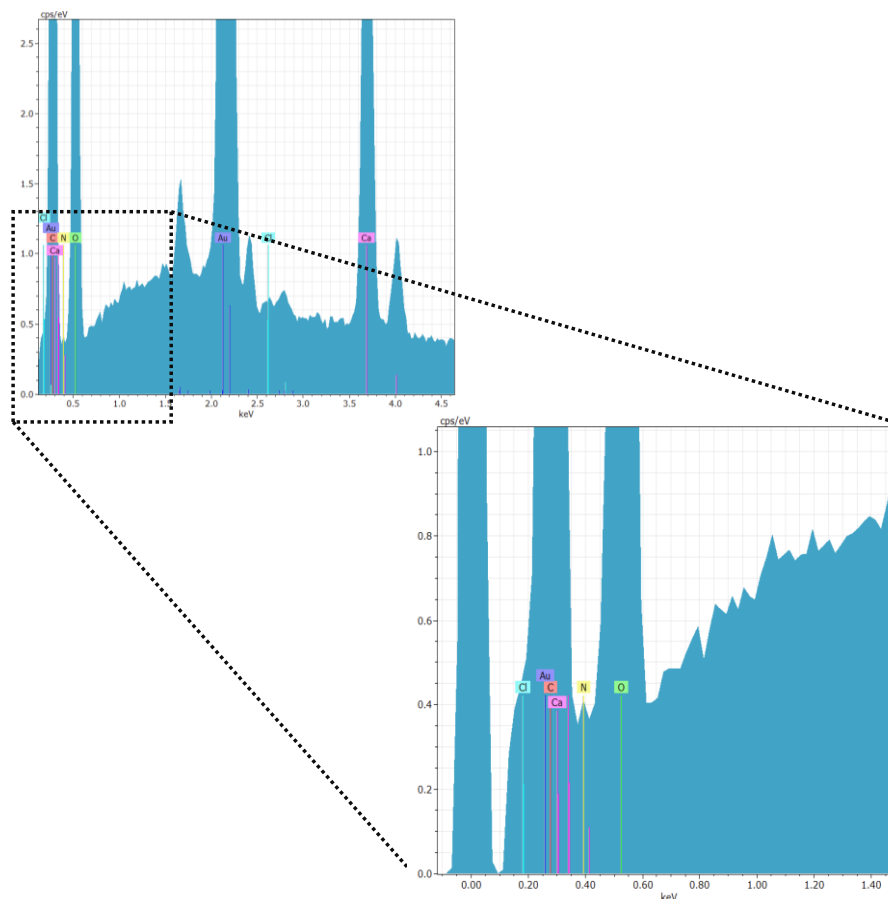


Figura 4.22 - Espectro da análise por EDX do interior dos DDS.

O espectro de EDX mostrou que os átomos de C e O existiam em maior quantidade isto porque todos os constituintes do DDS apresentam estes elementos químicos. A amostra também apresentou a presença de átomos de Au uma vez que estas amostras, antes de analisadas, têm de ser cobertas com ouro para se tornarem melhores condutores (como referido no subcapítulo 3.2.4). Devido à existência de uma grande percentagem de átomos de C e O, a quantidade do átomo de N na amostra não parece ser significativa porém, verifica-se um pequeno pico para este elemento, concluindo que no interior do DDS se encontrava a molécula terapêutica. Na amostra também é visível um pico referente ao átomo de Ca. A presença notória deste elemento deve-se ao processo de gelificação dos DDS na solução de  $\text{CaCl}_2$ , permitindo que este catião se ligue aos grupos carboxílicos do alginato expostos, através de forças intermoleculares. Por fim, o átomo de Cl presente na amostra pode ter origem de duas fontes, nomeadamente do Diclofenac no interior do sistema ou da solução de gelificação dos mesmos. A Tabela 4.5 mostra a percentagem atômica dos elementos presentes no interior dos DDS.

Tabela 4.5 - Percentagem atômica dos elementos presentes no interior dos DDS, com uma ampliação de 500x.

Elementos Químicos	% Atômica	% Erro Relativo
Carbono (C)	48,26	4,01
Oxigênio (O)	34,70	3,83
Ouro (Au)	5,75	2,37
Cálcio (Ca)	11,16	0,07
Cloro (Cl)	0,13	0,79

Na Figura 4.23 é apresentado o mapa de EDX da amostra a 500x de ampliação, no interior dos DDS, para o Cl uma vez que poderia ser indicativo de duas fontes.

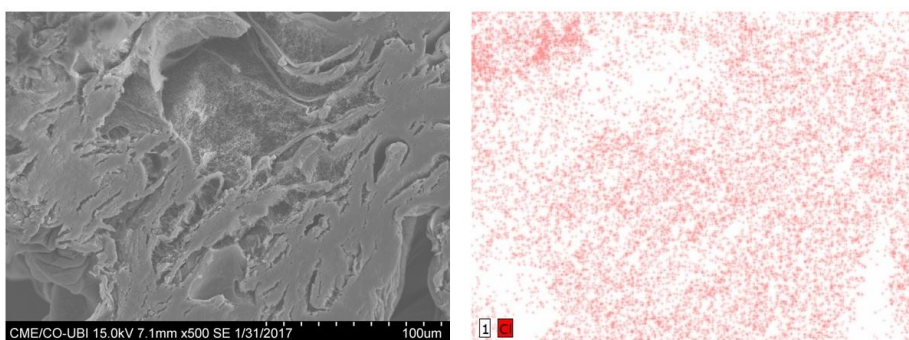


Figura 4.23 - Imagem SEM (esquerda) e mapa de EDX (direita) da amostra no interior dos DDS, com 500x de ampliação, para o átomo de Cl.

O átomo de Cl encontra-se em maior quantidade nas zonas mais compactas, indicando assim, que este elemento tinha origem da solução  $\text{CaCl}_2$  e não do Diclofenac.

Já com uma ampliação de 10000x do interior do DDS, onde a rede 3D é mais visível, verifica-se a existência dos mesmos elementos (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Percentagem atômica dos elementos presentes no interior dos DDS, com uma ampliação de 10000x.

Elementos Químicos	% Atômica	% Erro Relativo
Carbono (C)	39,27	1,78
Oxigênio (O)	39,93	2,57
Cálcio (Ca)	20,76	0,71
Cloro (Cl)	0,04	0,05

Os átomos de C e Cl aparecem em menor quantidade e os átomos de O e Ca em maior quantidade. Neste caso o átomo de Au não foi contabilizado uma vez que não pertence aos elementos pertencentes ao DDS. Pelas mesmas razões anteriormente descritas, o átomo de N também não foi contabilizado apesar de estar presente na sua composição. Na Figura 4.24 são ainda apresentados os mapas de EDX do interior do DDS, com uma ampliação de 10000x, onde é possível constatar a diferente distribuição dos elementos.

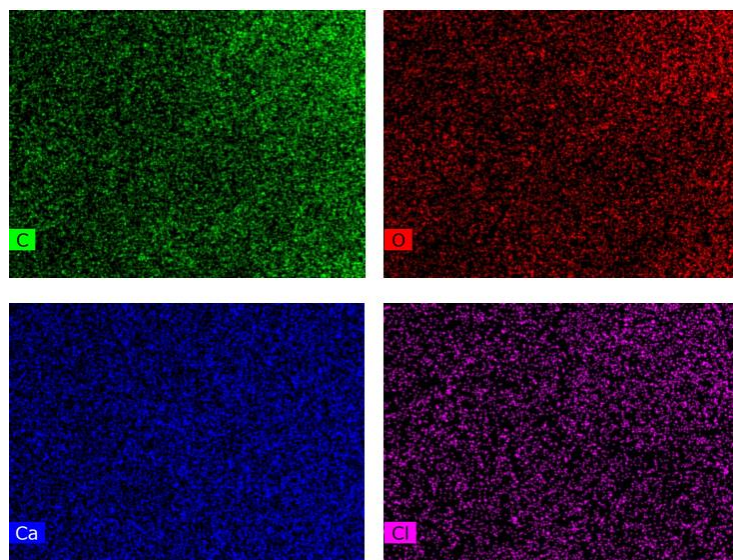


Figura 4.24 - Mapas de EDX do interior dos DDS, com uma ampliação de 10000x, para os diferentes elementos químicos que constituem a amostra.

Verifica-se que existe concordância entre a Figura 4.24 e a Tabela 4.6 pois o elemento Carbono está presente em maior quantidade, como seria de esperar para a celulose. Ao observar a rede 3D é de notar que o elemento C está maioritariamente presente nas fibras enquanto o átomo de O se encontra no seu interior em quantidade significativa, o que pode indicar que este último elemento se deve ao Diclofenac presente (Figura 4.25(b)). Nas Figuras 4.25(c) e (d) observa-se que tanto o átomo de Cl como o de Ca aparecem distribuídos uniformemente por toda a rede 3D, porém o átomo de Ca está presente em maior quantidade devido à captação deste elemento pelos grupos expostos do alginato, como referido anteriormente. O átomo de Cl, aparece em menor quantidade e por estar presente no Diclofenac, pode ser indicativo da retenção do Diclofenac no interior da rede 3D do DDS.

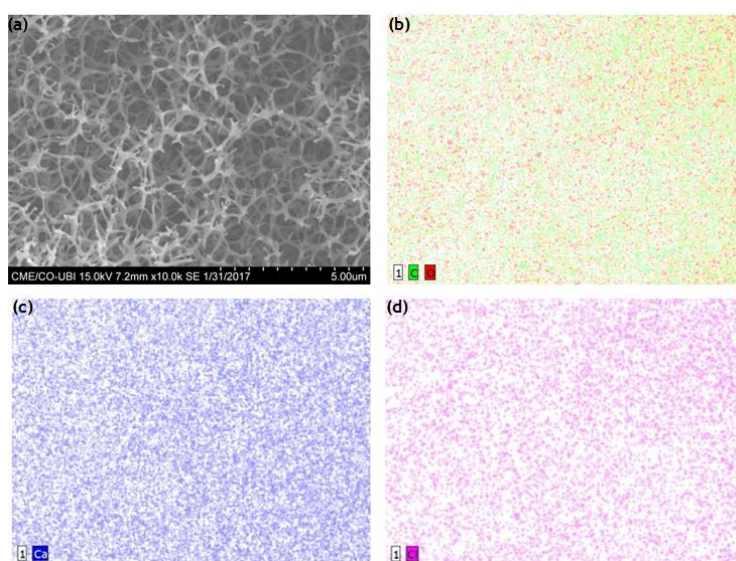
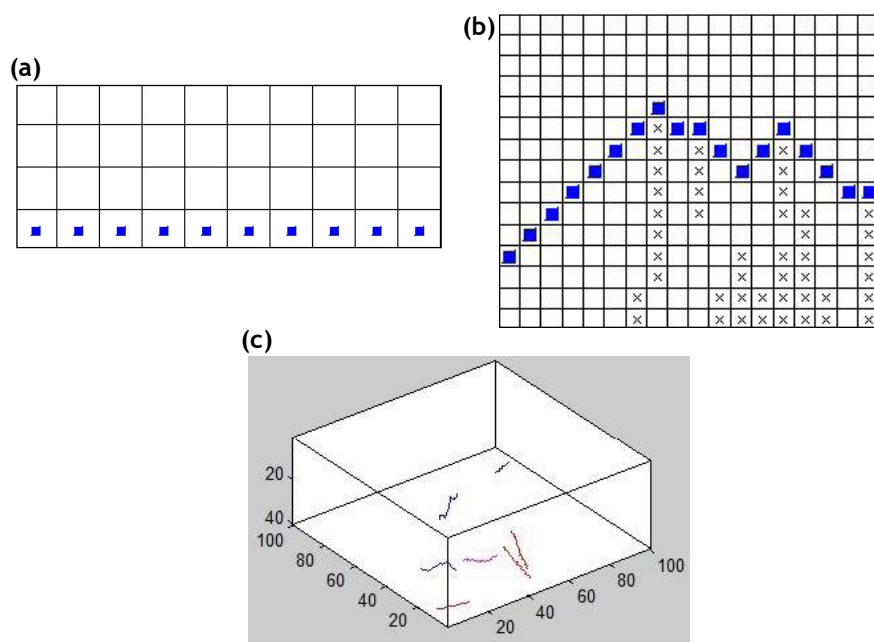


Figura 4.25 - Imagem SEM (a) e mapa de EDX da amostra no interior dos DDS, com 10000x de ampliação, para o C e o O (b), o Ca (c) e o Cl (d).

### 4.3. Simulações Computacionais

A integração dos dados obtidos dos métodos de análise de imagem é essencial para formar estruturas 3D no simulador computacional, modelo tridimensional de materiais fibrosos, implementado e validado em MATLAB®, em que as fibras são modeladas de acordo com as suas dimensões e flexibilidade (Curto et al. 2011). Nesta metodologia, as camadas poliméricas são formadas pela deposição sistemática de fibras únicas, uma de cada vez (Figura 4.26a). Dependendo da sua posição, dimensão e flexibilidade, a fibra ajusta-se à estrutura subjacente, ocupando o espaço livre acima das fibras já depositadas, tal como acontece no processo de obtenção do gel de nanocelulose por filtração. As fibras são posicionadas aleatoriamente e orientadas no plano xy (Figura 4.26c) para simular a formação das estruturas 3D produzidas no laboratório, usadas para validar o modelo. A porosidade, propriedade importante nas estruturas de celulose utilizadas nos DDS, é bem visível na rede polimérica 3D formada, sendo calculada a partir da razão entre vóxeis vazios e vóxeis totais(Figura 4.26b).

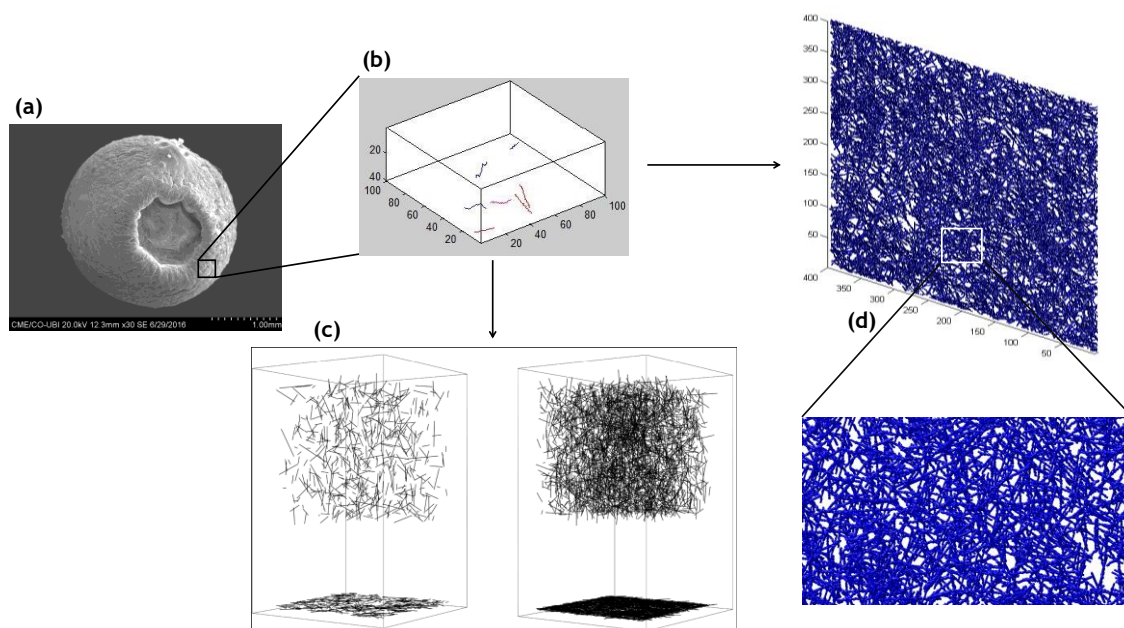


**Figura 4.26** - Imagens computacionais da deposição da primeira fibra (a), da deposição de fibras que não se depositam sobre outras pois, o espaço ocupado por outras fibras não vai ser sobreposto (b) e da organização espacial das fibras na matriz 3D (c).

De modo a estudar as estruturas celulósicas utilizadas nos DDS utilizou-se o simulador computacional para obter as estruturas computacionalmente (Figura 4.27). A partir da análise das estruturas produzidas, modificando as variáveis de entrada, criaram-se vários cenários e obtiveram-se computacionalmente as diferentes estruturas que será possível obter no laboratório, a partir dos mesmos elementos fibrosos, sem os custos de tempo e recursos associados. Este estudo permitiu obter diversas imagens computacionais, que foram analisadas de forma a compreender como seria possível com os mesmos elementos fibrosos



obter várias possibilidades para a porosidade, dimensão e variabilidade dos poros da matriz polimérica de nanocelulose. Os estudos de simulação computacional da matriz polimérica indicaram que seria possível obter com os mesmos elementos fibrosos uma matriz com uma distribuição de poros mais regular. Produziram-se essas estruturas no laboratório a partir da celulose nanofibrilada, controlando as condições de dispersão das cadeias poliméricas e formação da estrutura 3D do gel, por manipulação das variáveis de processo da filtração. Utilizou-se a reticulação de um polímero auxiliar, o alginato, de forma a fixar e manter a estrutura pretendida. A cinética de libertação dessa matriz comprovou que a obtenção de poros mais regulares se traduziu numa libertação controlada mais uniforme, tendo-se obtido uma melhoria significativa na cinética de libertação controlada.



**Figura 4.27** - Imagem explicativa da obtenção de resultados computacionais. O simulador computacional simula a rede 3D dos DDS obtida experimentalmente (a) através da deposição de fibras nesta matriz (b), exemplificada por simulações estruturais (adaptado de (Sampson 2001)) (c), obtendo portanto uma rede 3D computacional onde estas fibras se encontram, com seleção de local representativo desta matriz (d).

A porosidade global, a dimensão dos poros e a sua variabilidade são determinantes no desempenho do DDS. Desta forma, a simulação computacional foi utilizada como uma ferramenta para estudar a dimensão média dos poros e a sua variabilidade na rede 3D, comparando estes resultados com os obtidos experimentalmente.

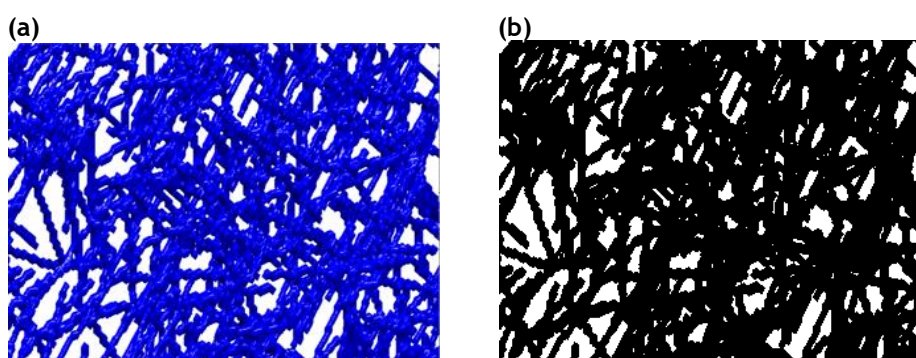
A validação do simulador computacional englobou a obtenção das matizes 3D de nanocelulose por filtração e fixação em gel, a preparação das amostras para o SEM por desidratação conservando os poros da rede polimérica 3D, seguida da obtenção das imagens SEM com o respetivo tratamento e análise de imagem. Posteriormente efetuaram-se as simulações computacionais destas redes 3D e obtiveram-se as respetivas imagens das estruturas porosas. Estas imagens provenientes do simulador foram analisadas utilizando a mesma metodologia de tratamento e análise de imagem, de forma a comparar os resultados das estruturas obtidas

por simulação com os resultados das estruturas reais obtidas no laboratório. Obtiveram-se estruturas com porosidade, dimensão e distribuição de poros idênticas podendo concluir-se que o simulador se encontra validado com os resultados obtidos em laboratório. A partir desta etapa de validação, tal como já se tinha feito para outras estruturas porosas (Curto et al. 2015), é possível garantir que as estruturas computacionais são similares às reais produzidas em laboratório, apresentando a mesma porosidade e distribuição de poros. Sendo assim utilizou-se o simulador computacional validado para efetuar estudos de simulação, compreender e otimizar as estruturas 3D porosas.

### **4.3.1. Quantificação dos Poros e da sua Variabilidade**

O simulador computacional é capaz de representar os elementos estruturais com sucesso, apresentando uma boa aproximação das estruturas obtidas experimentalmente e foi utilizado para otimização da porosidade, dimensão e distribuição de poros. As estruturas obtidas foram caracterizadas relativamente à sua porosidade, dimensões das fibras e de poros utilizando uma metodologia de tratamento e análise de imagem e ferramenta como o DiameterJ do programa ImageJ, com critérios bem definidos.

A título de exemplo, apresenta-se a simulação da rede 3D de CNF (Figura 4.28a) e a sua análise (Figura 4.28b) cujos resultados se apresentam na Tabela 4.7.



**Figura 4.28** - Imagens obtidas computacionalmente da rede porosa 3D da CNF (a) e da sua binarização (b), realizadas pela metodologia de análise de imagem DiameterJ do programa ImageJ.

**Tabela 4.7** - Caracterização das propriedades dos poros na rede 3D da CNF obtida pelo simulador computacional, através da análise de imagem realizada pela ferramenta DiameterJ do programa ImageJ.

Caracterização dos poros		Rede 3D computacional da CNF	Rede 3D experimental da CNF (Tabela 4.3)
Número		156	74
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		0,00960 $\pm$ 0,0129	0,0260 $\pm$ 0,0797
Diâmetro médio (nm)	Min.	63,6 $\pm$ 40,6	86,5 $\pm$ 8,74
	Máx.	150 $\pm$ 96,1	176 $\pm$ 22,4
	Média	106,8 $\pm$ 68,4	132 $\pm$ 15,6
Circularidade (nm)		543 $\pm$ 185	777 $\pm$ 215
Porosidade (%)		42,3	34,6

Segundo o tratamento e análise de imagem através da ferramenta DiameterJ, a porosidade da rede 3D computacional da CNF é de, aproximadamente, 42%. Como os resultados desta propriedade da rede 3D das imagens SEM para a CNF apresentam valores de 35%, aproximadamente, os resultados obtidos para as imagens computacionais podem ser validados experimentalmente. Para além deste parâmetro, todos os outros resultados desta estrutura porosa criada computacionalmente apresentam semelhanças com os resultados obtidos para as estruturas desenvolvidas em laboratório. Relativamente à variabilidade dos poros na rede 3D da CNF (Figura 4.29) verifica-se também algumas semelhanças nesta distribuição da área. Valores de área até 0,002  $\mu\text{m}^2$  existem 21 e 27 poros na rede 3D experimental e computacional, respetivamente. Entre 0,002  $\mu\text{m}^2$  e 0,004  $\mu\text{m}^2$ , existem 11 e 36 poros. Entre 0,004  $\mu\text{m}^2$  e 0,006  $\mu\text{m}^2$ , existem 10 e 28 poros. Entre 0,006  $\mu\text{m}^2$  e 0,008  $\mu\text{m}^2$ , existem 9 e 10 poros. Entre 0,008  $\mu\text{m}^2$  e 0,01  $\mu\text{m}^2$ , existem 2 e 10 poros. Entre 0,01  $\mu\text{m}^2$  e 0,03  $\mu\text{m}^2$ , existem 9 e 35 poros. Entre 0,03  $\mu\text{m}^2$  e 0,05  $\mu\text{m}^2$ , existem 5 e 6 poros. Entre 0,05  $\mu\text{m}^2$  e 0,07  $\mu\text{m}^2$ , existem 1 e 3 poros. Entre 0,07  $\mu\text{m}^2$  e 0,09  $\mu\text{m}^2$ , existe apenas 1 poro para a rede 3D computacional da CNF. Por fim, a partir dos 0,09  $\mu\text{m}^2$  de área, existem apenas 5 poros correspondentes à rede 3D experimental.

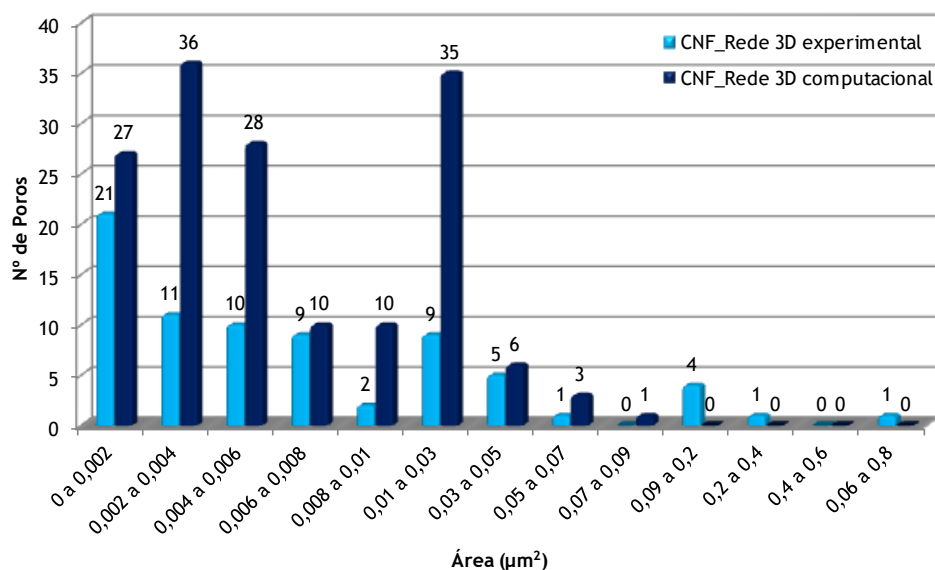


Figura 4.29 - Comparação da variabilidade da área dos poros na rede 3D experimental e computacional da CNF.

Com todos os resultados obtidos anteriormente, é possível validar experimentalmente este método computacional. Deste modo pode-se utilizar esta inovadora metodologia para otimizar computacionalmente as propriedades estruturais de nanomateriais porosos, de modo a extrapolar estes resultados computacionais para o laboratório, economizando tempo e recursos.

Anteriormente obteve-se uma imagem computacional com uma rede 3D da CNF mais aberta e com tamanhos irregulares de poros. Através de uma otimização computacional desta estrutura (Figura 4.30) é possível obter uma rede 3D da CNF mais fechada e regular, com dimensões e tamanhos de poros uniformizados. A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos da análise de imagem para a caracterização dos poros na rede 3D da CNF, utilizando a ferramenta DiameterJ do programa ImageJ.

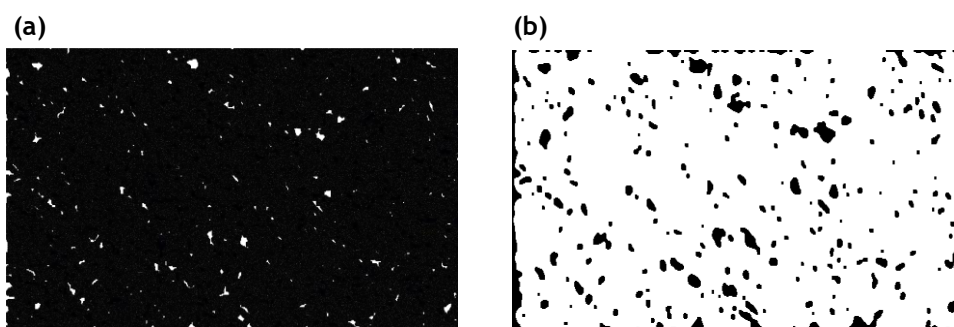


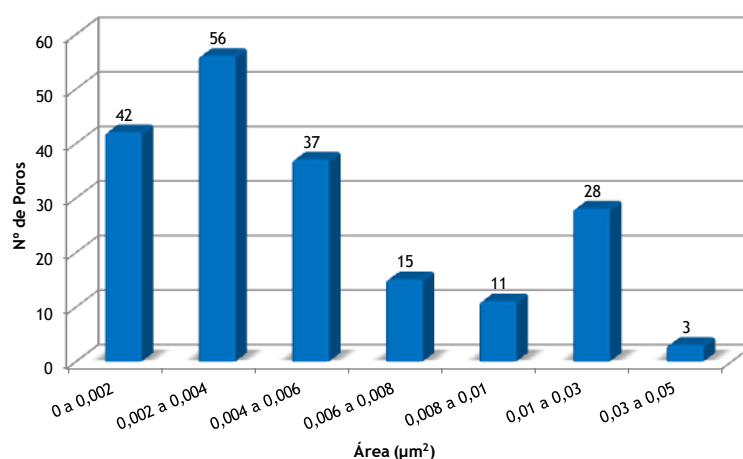
Figura 4.30 - Imagens obtidas computacionalmente da rede porosa 3D da CNF após uma otimização no simulador computacional (a) e da sua binarização (b), realizadas pela metodologia de análise de imagem DiameterJ do programa ImageJ.



**Tabela 4.8** - Caracterização das propriedades dos poros na rede 3D otimizada da CNF obtida pelo simulador computacional, através da análise de imagem realizada pela ferramenta DiameterJ do programa ImageJ.

Caracterização dos poros		Rede 3D computacional otimizada da CNF
Número		192
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		0,00590 $\pm$ 0,00624
Diâmetro médio (nm)	Min.	32,5 $\pm$ 18,4
	Máx.	141 $\pm$ 9,63
	Média	86,8 $\pm$ 14,1
Circularidade (nm)		619 $\pm$ 128
Porosidade (%)		39,8

Através da otimização da rede 3D da CNF computacionalmente obteve-se uma porosidade idêntica (39,8%) porém, com resultados de dimensões de poros menores. Relativamente à variabilidade e distribuição dos poros na rede 3D otimizada da CNF (Figura 4.31) verifica-se que os poros encontram-se mais concentrados, com tamanhos menores comparados com os resultados anteriormente discutidos. Para valores de área até 0,002  $\mu\text{m}^2$  existem 42 poros na rede 3D. Entre 0,002  $\mu\text{m}^2$  e 0,004  $\mu\text{m}^2$ , 56 poros. Entre 0,004  $\mu\text{m}^2$  e 0,006  $\mu\text{m}^2$ , 37 poros. Entre 0,006  $\mu\text{m}^2$  e 0,008  $\mu\text{m}^2$ , 15 poros. Entre 0,008  $\mu\text{m}^2$  e 0,01  $\mu\text{m}^2$ , 11 poros. Entre 0,01  $\mu\text{m}^2$  e 0,03  $\mu\text{m}^2$ , 28 poros. E, por fim, entre 0,03  $\mu\text{m}^2$  e 0,05  $\mu\text{m}^2$ , existem 3 poros na rede 3D otimizada da CNF.



**Figura 4.31** - Variabilidade da área dos poros na rede 3D otimizada da CNF.

Com estas informações 3D é possível, através de uma consolidação estrutural, obter uma estrutura de CNF com uma porosidade e distribuição de poros semelhante experimentalmente, obtendo-se uma cinética de libertação de fármacos mais controlada (subcapítulo 4.5) uma vez que esta molécula terapêutica tem de percorrer um caminho maior

para se libertar, ao contrário do que acontecia numa estrutura mais aberta uma vez que as dimensões da rede 3D são maiores.

## **4.4. Estudos Cinéticos de Libertação do Fármaco Diclofenac**

Nos estudos cinéticos de libertação do Diclofenac foram realizados ensaios para compreender o comportamento deste fármaco libertado nos diferentes DDS. Para além destes, também se estudou a influência dos materiais celulósicos para a libertação do Diclofenac, bem como a comparação dos DDS produzidos com medicamentos convencionais contendo esta substância ativa. As condições *in vitro* destes estudos devem mimetizar ao máximo as condições *in vivo*. Durante todo o tempo de ensaio, os DDS mantiveram-se em suspensão, em três meios de libertação a pH variáveis, a  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  (temperatura corporal). Utilizou-se um meio a pH 2 para mimetizar o pH do trato gastrointestinal (1-3,2); passado 2h de ensaio, aumentou-se o pH do meio para 6,6 mimetizando o duodeno (pH 5-7); por fim, nas últimas 2h de ensaio, utilizou-se um meio a pH 7,4, correspondendo ao pH do sangue e do íleo (7-7,5), mimetizando, respetivamente, o momento em que o fármaco entra na corrente sanguínea e os DDS se deslocam para o intestino delgado, completando assim, um ensaio de 6h, tempo suficiente para a substância ativa ter efeito terapêutico. Estes ensaios podem consistir, assim, uma importante etapa no desenvolvimento de novas formulações.

### **4.4.1. Comparação da Cinética de Libertação dos Diferentes DDS**

Os DDS poliméricos produzidos têm o objetivo de incorporar o Diclofenac na matriz polimérica 3D biocompatível de nanocelulose, controlar a libertação do Diclofenac no pH desejado e reduzir os efeitos adversos associados no pH ácido do estômago. O estudo do perfil de libertação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos produzidos foi realizado a fim de observar a quantidade deste fármaco libertada por unidade de tempo. A partir das absorvâncias lidas, pelo método de espectroscopia de UV-Vis, das amostras recolhidas ao longo do estudo, e utilizando a equação da curva padrão (Figura 3.1), elaborou-se o perfil da cinética de libertação do Diclofenac nos diferentes sistemas poliméricos (Figura 4.32).

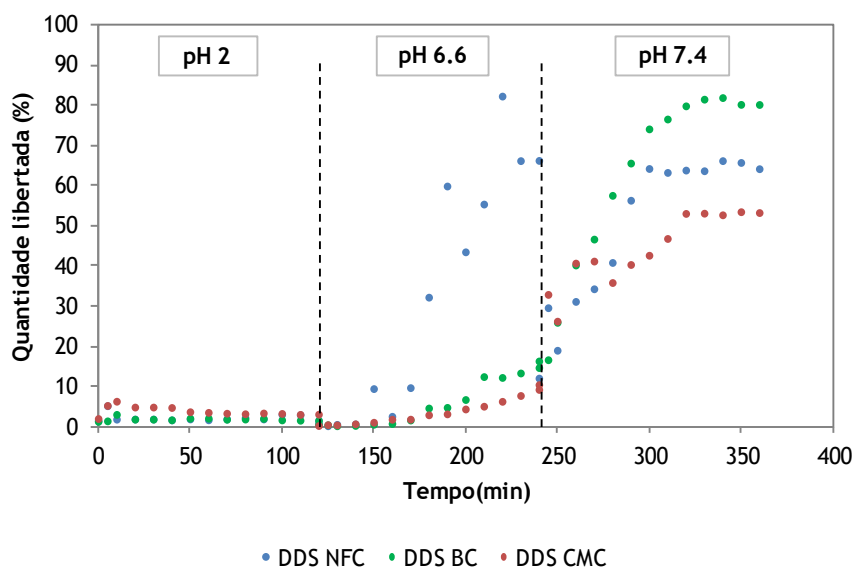


Figura 4.32 - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos, em meios com pH diferentes.

Os estudos *in vitro* de liberação do Diclofenac dos diferentes DDS poliméricos mostraram que a cinética de liberação não apresentou um perfil de liberação contínuo e regular ao longo das 6h de ensaio. A pH 2 observa-se que o perfil de liberação é semelhante entre os três sistemas, com concentrações de liberação baixas, ainda que o DDS com CMC atinja valores mais elevados de concentração de Diclofenac libertada. A pH 6,6 verifica-se um perfil de liberação completamente abrupto para o DDS com NFC, sendo os outros sistemas mais regulares. Porém, a pH 7,4 é notável uma maior liberação e também mais controlada pelos três sistemas. O DDS com BC é o que apresenta uma maior liberação (80,31%) e também mais controlada, enquanto o DDS com NFC apresentou 64,31% de liberação e o DDS com CMC apresentou 53,38%. Assim, os DDS produzidos com materiais nanocelulósicos são inovadores pois evitam a liberação do Diclofenac no estômago (pH 2) e o liberta a partir do trato gastrointestinal (pH 6,6) evitando os efeitos colaterais do ataque à mucosa do estômago.

Os DDS poliméricos foram obtidos pelo método de gelificação ionotrópica, formando uma estrutura reticulada de alginato e, quando os materiais nanocelulósicos foram incorporados nos DDS, uma rede polimérica 3D foi formada no interior destes sistemas. A pH baixo, o ácido algínico é formado a partir do alginato modificando a camada de gel destes sistemas. A erosão da camada de gel expõe gradualmente uma matriz mais seca e mais fechada uma vez que no meio aquoso circundante as moléculas de água não estão tão disponíveis, e consequentemente as ligações por pontes de hidrogénio também não. Esta matriz, porém pode ser hidratada ao mesmo tempo que o fármaco se dissolve no gel e se difunde para o meio envolvente, em pequenas quantidades (Tønnesen and Karlsen 2002). Já o aumento do pH altera a estrutura dos DDS e tornam-se mais porosos à medida que o ácido algínico se transforma num sal mais solúvel (Tønnesen and Karlsen 2002), e as interações de hidrogénio se tornam mais disponíveis. Assim, o fármaco pode-se difundir mais facilmente através da

matriz porosa 3D nanocelulósica. Os perfis de liberação dos diferentes DDS poliméricos apresentam diferenças uma vez que a matriz 3D também é diferente. O fármaco tem de percorrer diferentes percursos em cada matriz 3D para se libertar dos DDS produzidos.

Como um DDS tem o objetivo de libertar controladamente fármacos, uma otimização das propriedades dos DDS poliméricos nanocelulósicos é necessária para melhorar a sua cinética de liberação. Através do intenso estudo de simulação computacional realizado anteriormente para a otimização das propriedades dos DDS poliméricos, foi possível produzir novos e melhorados sistemas obtendo-se uma cinética de liberação mais controlada do Diclofenac (Figura 4.33), para ocorrer o efeito terapêutico de forma desejada.

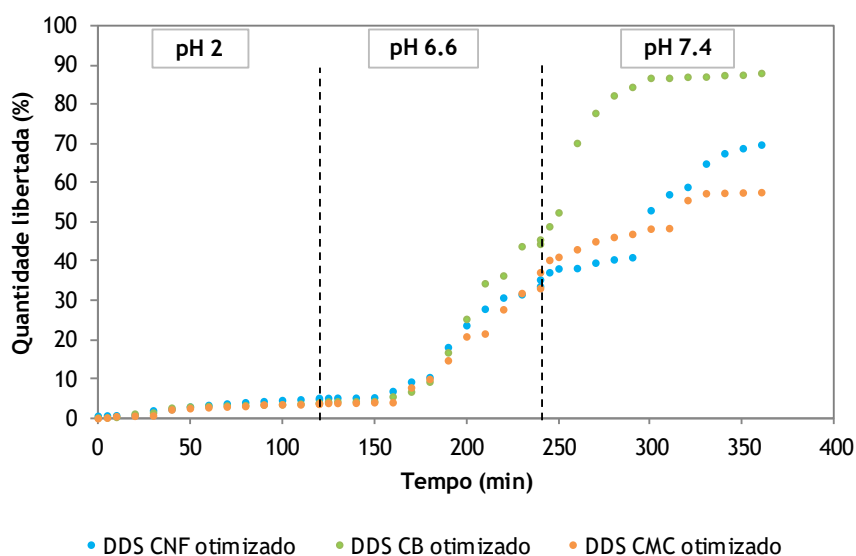


Figura 4.33 - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos otimizados através de simulação computacional, em meios com pH diferentes.

Tal como nos primeiros estudos *in vitro*, o perfil de liberação do Diclofenac é semelhante nos três DDS otimizados a pH 2, atingindo valores de concentração mais baixos que os primeiros DDS produzidos. A pH 6,6, o perfil de liberação continua a ser semelhante para estes três sistemas até aos 210 minutos, onde a concentração do fármaco libertado apresenta maiores valores para o sistema com CNF. A partir deste instante, o sistema contendo CB apresenta uma liberação do Diclofenac relativamente maior em comparação com os outros DDS poliméricos. Por fim, a pH 7,4 destaca-se uma maior e controlada liberação por parte destes sistemas, coincidindo com a aparência do meio turvo que se observou experimentalmente. O DDS com CB é o que apresenta uma quantidade de fármaco libertado maior (88%), estabilizando a partir dos 300 minutos. Em relação aos sistemas contendo CNF e CMC, ambos apresentam um perfil de liberação semelhante. Denota-se um aumento da quantidade de fármaco libertado por parte do DDS com CMC, em comparação com a CNF, até aos 300 minutos; a partir deste ponto, a quantidade de Diclofenac libertado pelo sistema de CNF (70%) supera a concentração de fármaco no meio, por parte do sistema de CMC (58%). Estes estudos refletem que há um aumento da liberação do fármaco no duodeno, continuando para

a corrente sanguínea apresentando uma estabilização final da sua libertação, de forma controlada. Porém, no estomago não ocorre uma libertação acentuada do Diclofenac, sendo isto vantajoso.

Por comparação dos estudos antes (Figura 4.32) e após (Figura 4.33) as simulações computacionais verifica-se que os DDS contendo CNF apresentaram mais benefícios da consolidação estrutural a nível da cinética. Pois, o perfil de libertação deixou de ser abrupto a pH 6.6 e começou a ser mais controlado. E a pH 7,4 o perfil de libertação é mais regular para o sistema otimizado. A cinética de libertação dos DDS otimizados com BC apresentou um perfil de libertação semelhante ao primeiro estudo *in vitro* e a cinética de libertação dos DDS otimizados com CMC apresentou um perfil de libertação mais controlado, principalmente a pH 7,4. Para os três sistemas poliméricos otimizados a quantidade de libertação de Diclofenac final é maior em relação aos primeiros estudos *in vitro*, não ficando uma quantidade significativa do fármaco retida no sistema. Desta forma, uma otimização dos sistemas permite uma melhor obtenção de resultados, com o auxílio de simulações computacionais.

Com o objetivo de classificar os DDS produzidos de acordo com o mecanismo de libertação da substância terapêutica, estes foram sujeitos a pesagem antes e após aos estudos cinéticos (Tabela 4.9). No final dos estudos cinéticos, as esferas apresentaram um peso superior comparativamente ao início. Este aumento de massa pode ser explicado pelo facto destes sistemas absorverem grande quantidade do meio envolvente sem se dissolver, permitindo que o fármaco se difunda do interior do DDS para o exterior. Desta forma, o mecanismo de libertação dos DDS otimizados é caracterizado pelo “swelling”, ou intumescimento da estrutura, sendo que a velocidade de libertação do fármaco depende da quantidade de meio que entra na matriz polimérica (Coelho et al. 2010). O índice de “swelling” (Eq. 3.1) é diferente para cada DDS otimizado.

**Tabela 4.9** - Registo das massas pesadas dos DDS otimizados, antes e após os estudos cinéticos, e índice de “swelling” para cada sistema.

DDS otimizados	Massas pesadas (g)		Índice de “swelling” (%)
	Antes dos estudos	Após estudos	
CNF	6,42	9,32	45,17
CB	5,70	8,36	46,67
CMC	7,84	8,82	12,50

Os DDS contendo CNF e CB apresentam um maior índice de “swelling” com os valores 45,17% e 46,67%, respetivamente, e os DDS contendo CMC apresentam um índice de “swelling” inferior (12,50%) ao final de 6h de ensaio, sendo isto comprovado pela observação da Figura 4.33. Numa forma mais visual, a Figura 4.34 mostra o aumento de tamanho dos DDS poliméricos devido a este mecanismo, bem como prova que o Diclofenac se libertou ao longo

do tempo devido à transparência das esferas obtidas no final e a sua opacidade no início, devida à presença do Diclofenac.



Figura 4.34 - DDS antes (esquerda) e após (direita) dos estudos cinéticos de liberação do Diclofenac.

#### 4.4.2. Influência dos Diferentes Materiais Celulósicos Incorporados nos DDS na Cinética de Liberação do Diclofenac

A fim de investigar a influência dos materiais celulósicos na liberação do Diclofenac ao longo do tempo foram realizados estudos *in vitro* de liberação da molécula terapêutica a partir dos DDS otimizados com e sem os diferentes materiais celulósicos incorporados. Nas mesmas condições anteriormente descritas, elaborou-se o gráfico que traduz o perfil de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados com e sem materiais celulósicos (Figura 4.35).

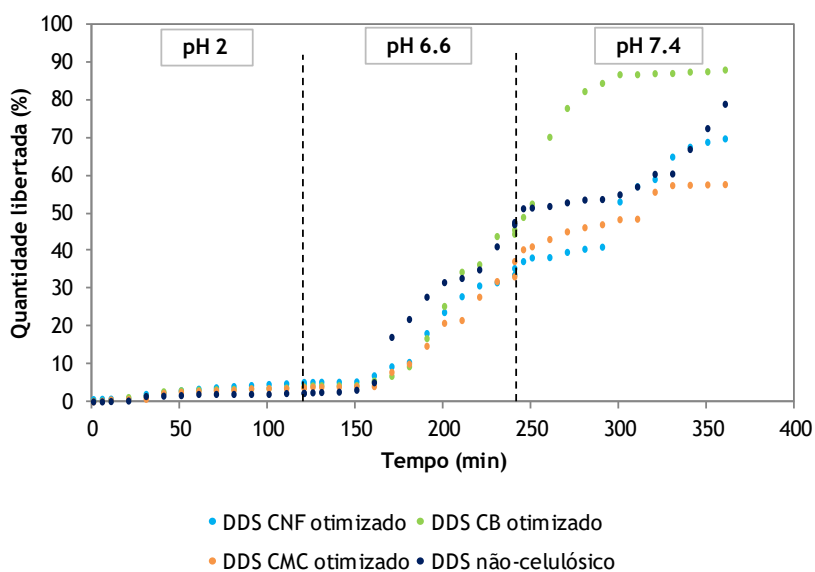


Figura 4.35 - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS otimizados com e sem materiais poliméricos incorporados, em meios com pH diferentes.

O perfil de liberação do Diclofenac é semelhante para todos os sistemas produzidos, com teores de concentração baixas, a pH 2. A pH 6,6, o perfil de liberação para estes quatro sistemas continua a ser semelhante até aos 170 minutos. A partir deste momento, a liberação do fármaco no sistema não-celulósico ultrapassa todos os outros, igualando a sua

concentração no meio com a do sistema contendo CB, aos 210 minutos. Por fim, a pH 7,4, é notável uma libertação não muito definida do sistema não-celulósico comparativamente com os outros três DDS otimizados. Em geral, ao longo de todo o ensaio a este pH, a quantidade de Diclofenac libertado pelo sistema não-celulósico (79%) é superior relativamente aos sistemas com CNF e CMC e inferior relativamente ao sistema com CB, verificando-se que ao final não existe uma estabilização da concentração no meio envolvente. Esta última observação poderá indicar que um sistema sem materiais celulósicos aumenta a retenção do fármaco encapsulado, não permitindo que este tenha um efeito terapêutico desejado total quando administrado. Porém, tanto com um sistema nanocelulósico como um sistema não-celulósico pode-se prolongar a administração quando o tratamento é mais agressivo, uma vez que as concentrações libertadas não são totais.

Na medida de também classificar o DDS não-celulósicos quanto ao mecanismo de libertação da substância terapêutica, estes também foram sujeitos a pesagem antes e após aos estudos cinéticos (Tabela 4.10).

**Tabela 4.10** - Registo das massas pesadas dos DDS não-celulósicos, antes e após os estudos cinéticos.

DDS	Massas pesadas (g)	
	Antes dos estudos	Após estudos
Não-celulósicos	6,52	4,78

Os DDS não-celulósicos, ao final dos estudos cinéticos, apresentaram um peso inferior comparativamente ao início. Este indício pode revelar que o fármaco é libertado por difusão através da membrana de revestimento, neste caso o Alginato. Desta forma, o DDS produzido apenas com este polímero pode ser classificado como um sistema de reservatório uma vez que não ocorre alterações a nível da matriz e permite que o fármaco se difunda do interior desta para o meio envolvente.

#### **4.4.3. Medicamentos Convencionais Comercialmente Disponíveis: Comparação da Cinética de Libertação do Diclofenac dos Diferentes DDS Otimizados**

O Diclofenac Mylan e o Voltaren® Retard são dois medicamentos convencionais de libertação prolongada, em cápsula e em comprimido, respetivamente, contendo Diclofenac como substância ativa. Como estes já se encontram disponíveis comercialmente realizaram-se estudos de libertação do Diclofenac destes medicamentos nas mesmas condições dos estudos cinéticos in vitro anteriormente descritas. Da mesma forma que nos subcapítulos 4.5.1. e 4.5.2., obteve-se o gráfico onde se compara, primeiramente, o perfil de libertação do Diclofenac nos diferentes DDS produzidos com uma cápsula de libertação prolongada (Figura 4.36).

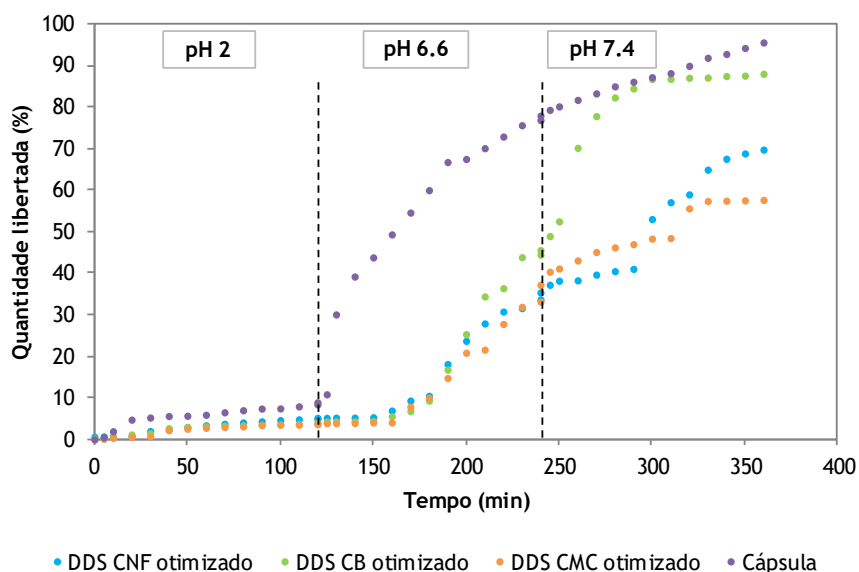


Figura 4.36 - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados e numa cápsula de liberação prolongada, em meios com pH diferentes.

O perfil de liberação do Diclofenac na cápsula é semelhante aos DDS otimizados até aos 20 minutos de ensaio. A partir deste momento, a quantidade libertada da substância ativa da cápsula é superior comparativamente aos outros sistemas, evidenciando que também se irá libertar no estômago. Numa observação experimental, notou-se que a cápsula se desfez aos 2 minutos de ensaio e as esferas nela contidas (com o fármaco encapsulado) libertaram-se rapidamente, depositando-se no fundo e não ficando em suspensão. Tal como aconteceu nestes ensaios, também poderá acontecer a deposição destas no estômago, logo, para além da liberação deste fármaco a pH 2, este fator também pode provocar os tais problemas gastrointestinais. Tanto a pH 6,6 como a pH 7,4, a quantidade de Diclofenac libertado da cápsula (96%) supera de forma abrupta a quantidade libertada deste fármaco dos DDS otimizados, sendo que ao final do ensaio a concentração não é constante podendo estar a libertar-se continuamente.

Estudou-se o perfil de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados e comparou-se com um comprimido comercial de liberação prolongada (Figura 4.37).



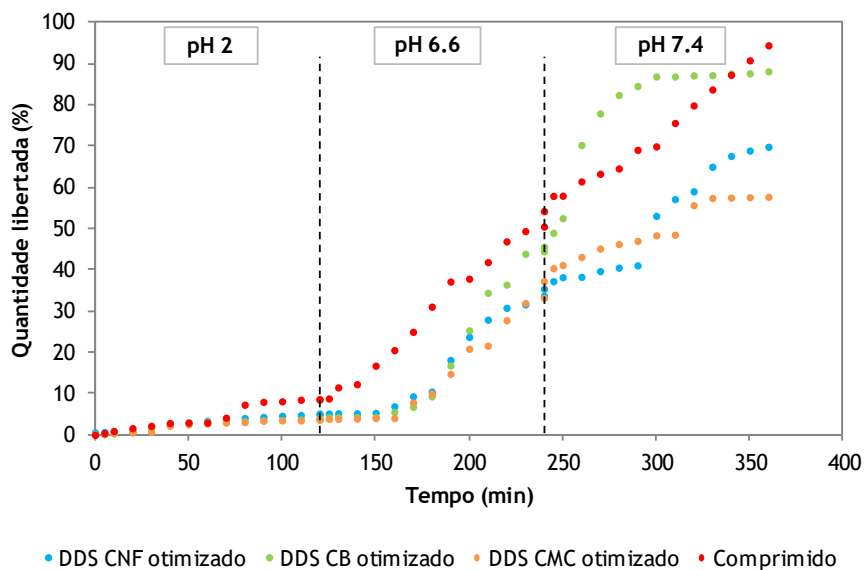


Figura 4.37 - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac nos diferentes DDS otimizados e num comprimido de liberação prolongada, em meios com pH diferentes.

A pH 2, o perfil de liberação do Diclofenac do comprimido é semelhante aos DDS otimizados até aos 80 minutos de ensaio porém, a partir deste instante, a concentração no meio para o comprimido torna-se superior relativamente aos outros sistemas, evidenciando que este também se liberta no estomago. A pH 6,6, a concentração de Diclofenac no meio continua a ser superior para o comprimido comparado com os outros DDS otimizados. Já a pH 7,4, a quantidade de Diclofenac libertado pelo comprimido (94%) é superior relativamente aos sistemas com CNF e CMC e inferior ao sistema com CB até aos 340 minutos, a partir daí supera este último. Numa observação experimental, verificou-se que o comprimido continha um revestimento, que se começou a libertar a pH 2, fazendo com que o comprimido se comece a desfazer. A pH 6,6 este continuou a desintegrar-se e, a pH 7,4, o comprimido já se encontrava quase todo desfeito, sendo por esta razão que concentração no meio também não é constante podendo estar a libertar-se continuamente.

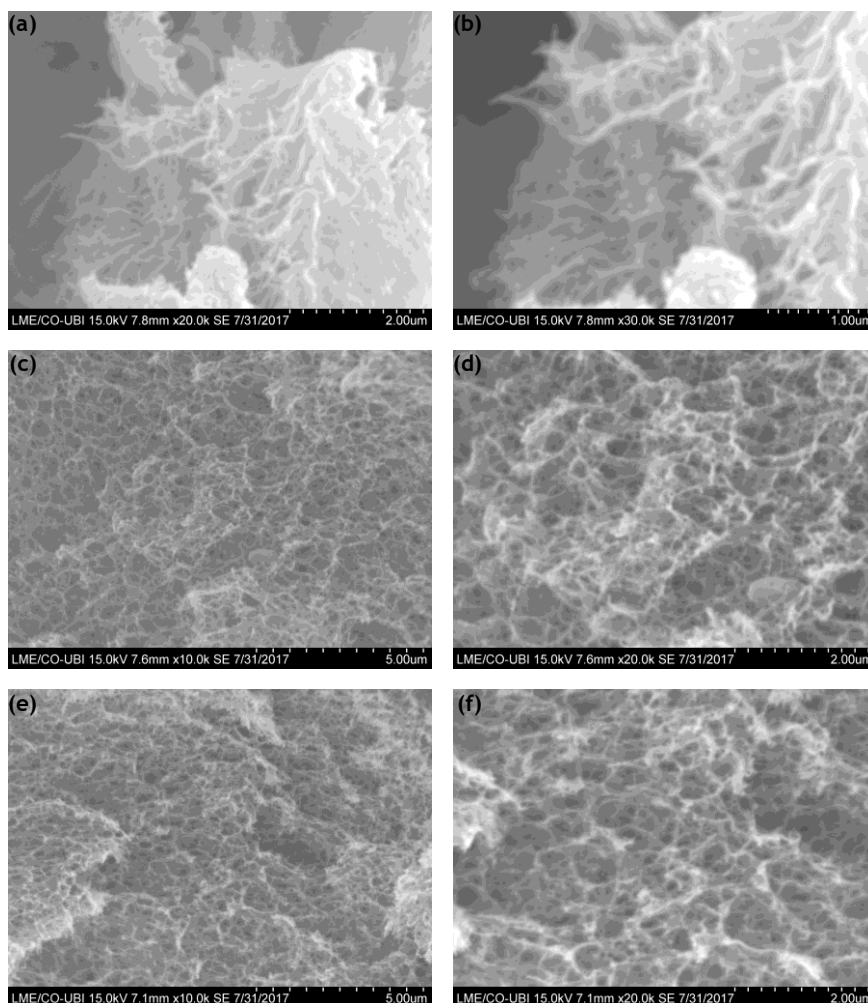
## 4.5. Design de Novos DDS Combinados

Através da caracterização estrutural e química, das simulações computacionais e estudos cinéticos de liberação realizados anteriormente, procedeu-se ao *design* de novos DDS promissores com uma combinação dos materiais nanocelulósicos naturais utilizados nos estudos. Curto et al. (2016) estudaram a hidrofobicidade de várias estruturas, incluindo a CNF e a CMC (Curto et al. 2016), através das medições do ângulo de contacto e das determinações experimentais 3D do tempo de penetração da gota na estrutura e da sua área de espalhamento, obtidas usando um protótipo ótico computacional desenvolvido (Curto et al. 2015). Estes estudos são vantajosos no que respeita à seleção de moléculas terapêuticas a

serem incorporadas nos DDS como também nas interações intermoleculares com o meio envolvente. Destes estudos concluiu-se que a CNF é a estrutura mais hidrofóbica e a CMC a mais hidrofílica, indicando que esta apresenta mais grupos OH disponíveis para interação com a água. Desta forma, será vantajoso utilizar-se a CMC como um agente aditivo para aumentar a afinidade com a água.

Para se estudar o efeito da concentração da CMC recorreu-se à produção de três DDS distintos, ou seja, utilizaram-se soluções de CMC com diferentes concentrações (0,1% (m/v), 0,01% (m/v) e 0,001% (m/v)). Inicialmente, em condições semelhantes descritas no subcapítulo 3.2.1.2.1, obtiveram-se três tipos de gel de CNF/CMC com diferentes tempos de consolidação estrutural. Os géis de CNF/CMC 0,1%, CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001% formaram-se após 9h, 6h e 8h, respetivamente. Comparativamente, o tempo de consolidação estrutural do gel de NFC é muito menor, concluindo que a incorporação de um agente aditivo permite que o gel se forme mais uniformemente, com diferentes ligações, num tempo mais prolongado. Após este procedimento, produziram-se estes novos DDS combinados, nas mesmas condições descritas no subcapítulo 3.2.2.

Ao combinar-se a CMC com a NFC poderá formar-se redes poliméricas 3D com maior capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água, continuando com propriedades como a biocompatibilidade, alto teor de água, baixa toxicidade, entre outras. Através da técnica de SEM (subcapítulo 3.2.4) foi possível observar a morfologia e estrutura da rede 3D destes novos DDS combinados (Figura 4.38). Os DDS com CNF/CMC 0,1% apresentam-se como uma estrutura em camadas regulares, com separação entre elas, com uma rede 3D aleatória e porosa, tal como se verificava para os DDS com CNF. Porém, os DDS com CNF/CMC 0,01% e com CNF/CMC 0,001% apresentam uma rede 3D entrelaçada, uniforme e aberta, mais semelhante com os DDS com CMC.



**Figura 4.38** - Imagens SEM da rede 3D da CNF/CMC 0,1% no interior dos DDS, com uma ampliação de 20000x (a) e 30000x (b), da CNF/CMC 0,01%, com uma ampliação de 10000x (c) e 20000x (d), e da CNF/CMC 0,001%, com uma ampliação de 10000x (e) e 20000x (f).

Relativamente às dimensões e propriedades dos poros desta nova matriz 3D, uma análise de imagem, utilizando o programa Esprit 1.9 da Bruker, foi realizada. Como os DDS com CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001% apresentaram uma matriz 3D mais definida, esta análise foi realizada para estas. A Tabela 4.11 apresenta a caracterização das propriedades dos poros destes DDS combinados utilizando esta ferramenta de análise de imagem.

**Tabela 4.11** - Caracterização das propriedades dos poros encontrados na rede 3D da CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001% no interior dos DDS utilizando uma análise Esprit.

Caracterização dos Poros		CNF/CMC 0,01%	CNF/CMC 0,001%
Número		338	401
Área ( $\mu\text{m}^2$ )		0,0154 $\pm$ 0,0864	0,00416 $\pm$ 0,0539
Diâmetro médio (nm)	Min.	119 $\pm$ 21,2	42,7 $\pm$ 10,5
	Máx.	192 $\pm$ 37,8	85,2 $\pm$ 22,0
	Média	160 $\pm$ 29,7	66,9 $\pm$ 17,3
Circularidade (nm)		3574 $\pm$ 2322	5063 $\pm$ 2542
Projeção X (nm)		700 $\pm$ 383	297 $\pm$ 36,6
Projeção Y (nm)		644 $\pm$ 342	257 $\pm$ 31,1
Rugosidade (nm)		1942 $\pm$ 1326	1331 $\pm$ 1181
Forma (nm)		200 $\pm$ 132	318 $\pm$ 197

Os poros encontrados na rede 3D de CNF/CMC 0,01% (n=338) no interior dos DDS apresentaram um diâmetro médio de poros de (160 $\pm$ 29,7) nm. Comparativamente, os poros de CNF/CMC 0,001% (n=401) apresentaram um diâmetro médio de poros inferior de (66,9 $\pm$ 17,3) nm, porém na mesma gama de medições. Segundo o Anexo B, os poros destas matrizes 3D apresentam-se irregulares, quanto à circularidade e forma, e rugosos, quanto à rugosidade. Relativamente ao comprimento da projeção no eixo X e à altura da projeção no eixo Y, verifica-se que os poros de CNF/CMC 0,01% apresentam valores mais elevados para estas propriedades do que os poros de CNF/CMC 0,001%. Comparativamente, os poros de CNF/CMC 0,01% apresentam valores mais elevados para a área do que os CNF/CMC 0,001% porém, com discrepância nas dimensões e na sua distribuição, como verificado na Figura 4.39.

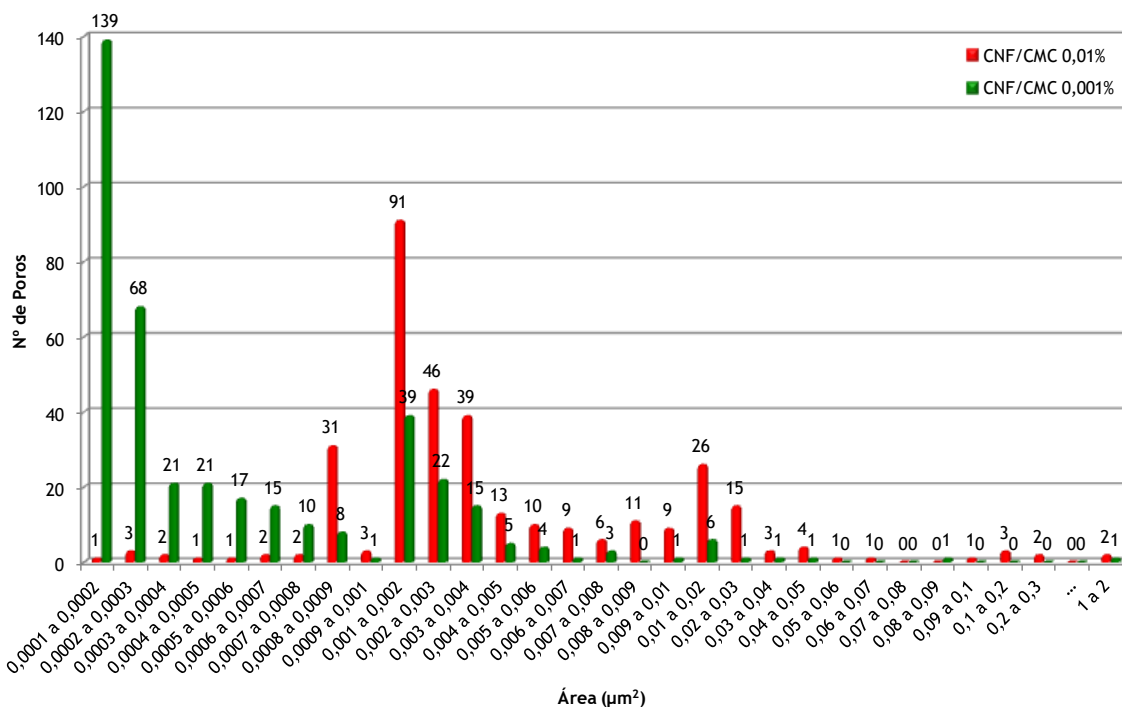


Figura 4.39 - Comparação dos histogramas referentes à área dos poros na rede 3D da CNF/CMC 0,01% e CNF/CMC 0,001%.

A Figura 4.40 apresenta ainda a comparação da distribuição dos poros na rede 3D da CNF/CMC 0,01% (área de fração de 20,7%) e CNF/CMC 0,001% (área de fração de 7,7%) no interior dos DDS. O tamanho dos poros aumenta com a diminuição da coloração azul destes, verificando que a quantidade de poros com menores dimensões é superior.

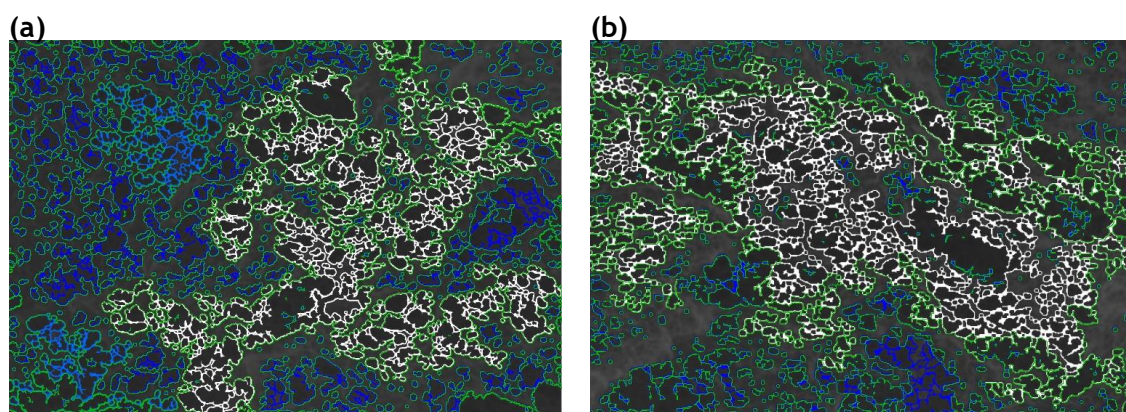


Figura 4.40 - Distribuição dos poros com diferentes tamanhos na rede 3D da CNF/CMC 0,01% (a) e CNF/CMC 0,001% (b).

Estes DDS foram também submetidos a estudos cinéticos e a estudos de “swelling”, descritos no subcapítulo 3.2.10. Nas mesmas condições anteriormente descritas, elaborou-se o gráfico que traduz o perfil de libertação do Diclofenac destes novos DDS produzidos (Figura 4.41).

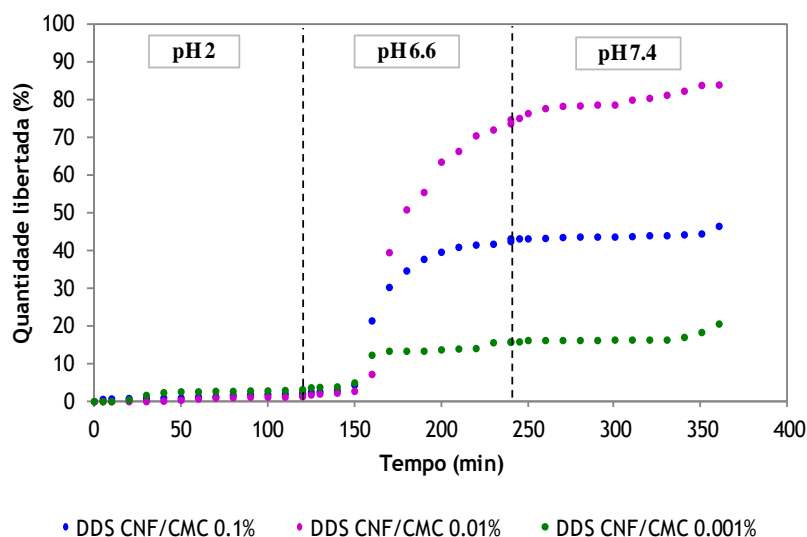


Figura 4.41 - Perfil da cinética de libertação do Diclofenac em novos DDS promissores combinados, em meios com pH diferentes.

Os perfis de libertação destes novos DDS produzidos apresentaram também uma libertação da molécula terapêutica com concentrações próximas de zero, a pH 2. Estes DDS são também vantajosos no que respeita a incorporar o Diclofenac uma vez que poderá evitar os efeitos secundários gástricos associados no estomago. Porém, ao longo do ensaio apresentaram diferenças cinéticas a nível de fármaco libertado e retido na matriz 3D pois, o perfil de libertação é semelhante. Os DDS com CNF/CMC 0,1% (m/v) apresentaram 47% de libertação do Diclofenac, os DDS com CNF/CMC 0,01% (m/v) apresentaram 84% e os DDS com CNF/CMC 0,001% (m/v) apresentaram 21%, aproximadamente. Com os estes resultados verifica-se que uma diluição de 1:10 da solução CMC 0,1% (m/v) nos DDS apresenta um perfil de libertação maior porém, uma diluição de 1:100 da solução CMC 0,1% (m/v) nos DDS apresenta um perfil de libertação menor, retendo uma maior quantidade de Diclofenac no seu interior ao longo do tempo. Comparativamente ao perfil de libertação dos DDS poliméricos otimizados (Figura 4.65) verifica-se que a pH 2 os novos DDS combinados apresentam uma libertação do fármaco inferior aos DDS otimizados. Ao final do ensaio verifica-se que a percentagem libertada pelo DDS otimizado com BC continua a ser superior relativamente a todos os DDS produzidos. Porém, o DDS com CNF/CMC 0,01% (m/v) apresenta uma percentagem final de libertação semelhante a este DDS. Por outro lado, o DDS com CNF/CMC 0,001% (m/v) é o que apresenta uma menor percentagem de libertação. Ao longo do ensaio verificou-se que os perfis cinéticos do Diclofenac a partir destes novos DDS combinados apresentaram uma libertação mais regular e mais controlada que os DDS poliméricos otimizados.

O índice de “swelling” para os novos DDS combinados também apresenta algumas diferenças (Tabela 4.12). Os DDS com CNF/CMC 0,01% (m/v) apresentam um maior índice de “swelling” (68,46%) enquanto os DDS com CNF/CMC 0,001% (m/v) apresentam um valor inferior (53,82%) Já os DDS com CNF/CMC 0,1% (m/v) apresentam um índice de “swelling” intermédio de

57,84%. Comparativamente aos DDS poliméricos otimizados (Tabela 4.9), estes novos DDS combinados apresentam valores superiores, indicando que a afinidade com a água é maior.

**Tabela 4.12** - Índice de “swelling” para os novos DDS combinados.

DDS Combinados	Índice de “swelling” (%)
CNF/CMC 0,1% (m/v)	57,84
CNF/CMC 0,01% (m/v)	68,46
CNF/CMC 0,001% (m/v)	53,82





# Capítulo V

## Conclusões e Perspetivas Futuras



## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Considerando os objetivos estabelecidos nesta dissertação, foi possível desenvolver novos sistemas de entrega de fármacos inovadores contendo diferentes unidades estruturais poliméricas, nomeadamente a celulose nanofibrilada, obtida a partir de celulose vegetal por combinação de processos químicos e mecânicos, a celulose bacteriana e a carboximetilcelulose.

Estes DDS desenvolvidos experimentalmente foram comparados e caracterizados através de uma metodologia de preparação e fixação de amostras, permitindo manter estas estruturas porosas e identificando unidades estruturais na nanoescala. A caracterização estrutural da matriz 3D destas estruturas foi realizada utilizando o método de SEM e métodos de tratamento e análise de imagem, utilizando programas de análise com critérios de validação bem definidos. Destes estudos, concluiu-se que os poros da CMC são mais regulares e também menores que os da CB e maiores que os da CNF. Estatisticamente, a rede polimérica 3D da CMC apresenta maiores dimensões para várias propriedades analisadas, seguida da CB e posteriormente da CNF, com diferentes valores de porosidade. Para além disso, concluiu-se que as propriedades da CNF e da CB apresentam grandes semelhanças. Para uma caracterização química realizou-se uma quantificação dos grupos ácidos totais, concluindo que a CNF apresenta mais grupos reativos nas suas extremidades comparativamente à CB, uma análise FTIR-ATR analisando diretamente a superfície dos materiais utilizados nos estudos e uma análise EDX, concluindo através destes últimos dois métodos, que o Diclofenac se encontrava no interior dos DDS.

Os resultados obtidos dos métodos de análise de imagem foram utilizados como dados de entrada, nomeadamente as propriedades das fibras, para formar estruturas 3D dos materiais utilizados nos estudos, através de simulações computacionais. O simulador teve capacidade de representar elementos estruturais destes materiais celulósicos com sucesso, apresentando uma eficaz modelação das estruturas obtidas em laboratório. Através da comparação das imagens obtidas das simulações computacionais para as estruturas porosas estudadas com as imagens SEM destas mesmas estruturas, utilizando o mesmo método de análise de imagem, concluiu-se que as redes poliméricas 3D apresentaram semelhanças, com valores de porosidade e variabilidade dos poros também idênticos. Desta forma, o simulador computacional foi validado experimentalmente para DDS contendo matrizes 3D de nanocelulose, tendo posteriormente sido utilizado para otimizar a porosidade e distribuição dos poros. Procedeu-se ao estudo do sistema utilizando simulações computacionais e tendo-se obtido para o caso da celulose nanofibrilada uma estrutura mais regular e com tamanho de poros mais uniformizados, obtida por simulação a partir dos mesmos elementos fibrosos.

Conseguiu-se produzir uma estrutura idêntica à otimizada computacionalmente, no laboratório, através da consolidação estrutural controlada.

Os estudos cinéticos de liberação do Diclofenac permitiram concluir que DDS com unidades estruturais diferentes apresentam perfis de liberação e quantidade libertada de fármaco também diferentes, sendo a porosidade determinante para conseguir uma cinética de liberação pretendida. O mecanismo descrito como “swelling” foi identificado como sendo o mecanismo de liberação da molécula terapêutica.

Foi possível produzir um DDS inovador que evita a liberação do Diclofenac no estômago (pH 2) e o liberta a partir do trato gastrointestinal (pH 6,6) evitando os efeitos colaterais do ataque à mucosa do estômago. Com os resultados de simulação computacional foi possível realizar uma consolidação das estruturas porosas 3D experimentalmente, tendo impacto na cinética de liberação. Esta otimização da estrutura revelou-se muito importante para a matriz formada a partir de CNF, obtendo-se com a estrutura otimizada uma cinética de liberação uniforme.

Pode concluir-se que os materiais celulósicos têm grande influência na cinética de liberação do Diclofenac, permitindo que este não fique tão retido no sistema de transporte.

Os estudos cinéticos realizados para formas de administração disponíveis comercialmente com a mesma substância terapêutica permitiram concluir que estas apresentam um perfil de liberação retardado até à dissolução da cápsula ou do sistema (mesmo no pH do estômago), seguido de uma elevação brusca, enquanto os DDS desenvolvidos apresentam um perfil de liberação controlado sem liberação significativa a pH ácido, apresentando assim uma funcionalidade inovadora.

Efetou-se o *design* de novos DDS combinando a CNF e várias concentrações de CMC, uma vez que se provou, através de estudos anteriores, que esta última aumenta a afinidade com água, parâmetro importante para os DDS. Destes estudos concluiu-se que estes novos DDS combinados apresentam diferenças a nível da rede polimérica 3D entre si porém, existem semelhanças com a rede 3D da CNF e CMC. Os estudos da cinética de liberação permitem concluir que estes apresentam semelhanças no perfil de liberação, com uma velocidade inicial de liberação semelhante, no entanto a quantidade libertada e retida da molécula terapêutica nos sistemas é muito diferente, o que se explica através do mecanismo de liberação em que a rede polimérica sofre intumescimento ou “swelling”. Os resultados obtidos, com cinéticas diferenciadas, permitiram concluir que é possível reter, transportar e libertar controladamente fármacos através de diferentes combinações de novos materiais à base de nanocelulose em sistemas de entrega de fármacos.

Em trabalhos futuros pretende-se continuar a utilizar o simulador computacional 3D validado para DDS contendo materiais nanocelulósicos de forma a desenvolver DDS para aplicações terapêuticas diversas, tais como por exemplo aplicações dérmicas, podendo extrapolar estes resultados para o laboratório eficazmente. Pretende-se também continuar com o *design* de novos DDS combinando os vários materiais celulósicos utilizados neste estudo, construindo a matriz polimérica a partir das unidades estruturais de CNF ou da CB e utilizando a CMC com a função de aditivo.



# Capítulo VI

## Referências Bibliográficas





## 6. Referências Bibliográficas

- Abdul Khalil, H.P.S, Davoudpour, Y., Islam, N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., Jawaid, M., Production and Modification of Nanofibrillated Cellulose Using Various Mechanical Processes: A Review, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 649-665.
- Abeer, M.M., Amin, M.C.I.M., Martin, C., A Review of Bacterial Cellulose-Based Drug Delivery Systems: Their Biochemistry, Current Approaches and Future Prospects, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 1047-1061.
- Alava, M., Niskanen, K., The Physics of Paper, *Rep. Prog. Phys.* 69 (2006) 669-723.
- Alcalá, M., González, I., Boufi, S., Vilaseca, F., Mutjé, P., All-Cellulose Composites from Unbleached Hardwood Kraft Pulp Reinforced with Nanofibrillated Cellulose, *Cellulose* 20 (2013) 2909-2921.
- Almeida, I.F., Pereira, T., Silva, N.H.C.S., Gomes, F.P., Silvestre, A.J.D., Freire, C.S.R., Lobo, J.M.S., Costa, P.C., Bacterial Cellulose Membranes as Drug Delivery Systems: An in Vivo Skin Compatibility Study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 332-336.
- Arafa, M.G., Ayoub, B.M., DOE Optimization of Nano-Based Carrier of Pregabalin as Hydrogel: New Therapeutic & Chemometric Approaches for Controlled Drug Delivery Systems, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41503.
- Azzopardi, E.A., Conlan, R.S., Whitaker, I.S., Polymer Therapeutics in Surgery: The next Frontier, *J. Interdiscip. Nanomed.* 1 (2016) 19-29.
- Bertocchi, P., Antoniella, E., Valvo, L., Alimonti, S., Memoli, A., Diclofenac Sodium Multisource Prolonged Release Tablets - A Comparative Study on the Dissolution Profiles, *J. Pharmaceut. Biomed.* 37 (2005) 679-685.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C., Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325-347.
- Bhardwaj, Y.R., Pareek, A., Jain, V., Kishore, D., Chemical Delivery Systems and Soft Drugs: Retrometabolic Approaches of Drug Design, *Saudi Pharm. J.* 22 (2014) 290-302.
- Bloch, J.F., Roscoat, S.R., 2009. Three-Dimensional Structural Analysis, in: 14th Fundamental Research Symposium, Oxford, 2009, pp. 599-664.
- Brito, B.S.L., Pereira, F.V., Jean, J.P.B., Preparation, Morphology and Structure of Cellulose Nanocrystals from Bamboo Fibers, *Cellulose* 19 (2012) 1527-1536.
- Bruschi, M.L., Modification of Drug Release, in: Bruschi, M.L. (Eds.), *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Elsevier, 2015, pp. 15-28.
- Butun, S., Ince, F.G., Erdugan, H., Sahiner, N., One-Step Fabrication of Biocompatible Carboxymethyl Cellulose Polymeric Particles for Drug Delivery Systems, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 636-643.
- Caraschi, J.C., Filho, S.P.C., Influência Do Grau de Substituição E Da Distribuição de Substituintes Sobre as Propriedades de Equilíbrio de Carboximetilcelulose Em Solução Aquosa, *Polímeros* 9 (1999) 70-77.
- Chen, H.H., Chen, L.C., Huang, H.C., Lin, S.B., In Situ Modification of Bacterial Cellulose Nanostructure by Adding CMC during the Growth of *Gluconacetobacter Xylinus*, *Cellulose* 18 (2011) 1573-1583.
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A., Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis, *Biomacromolecules* 12 (2011) 730-736.
- Chinga-Carrasco, G., Cellulose Fibres, Nanofibrils and Microfibrils: The Morphological Sequence of MFC Components from a Plant Physiology and Fibre Technology Point of View, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 417.

- Chuasuan, B., Binjesoh, V., Polli, J.E., Zhang, H., Amidon, G.L., Junginger, H.E., Midha, K.K., Shah, V.P., Stavchansky, S., Dressman, J.B., Barends, D.M., Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009): 1206-1219.
- Coelho, J.F., Ferreira, P.C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A.C., Góis, J.R., Gil, M.H., *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments*, *EPMA J.* 1 (2010) 164-209.
- Corte, H., Kallmes, J., *Statistical Geometry of a Fibrous Network, Formation and Structure of Paper 34* (1960) 13-46.
- Coutelieiris, F.A., Delgado, J.M.P.Q., *Transport Processes in Porous Media, Advanced Structured Materials*, Springer, 2012.
- Curto, J.M.R., Rodrigues, T.I.F., Santos Silva, M.J., *Optimization of Fibrous Structures with Cellulose Fibres, Polyacrylamide Polymers and CaCO<sub>3</sub> Fillers: Experimental Characterization for Computational Simulation*, *Materialwiss. Werkst.* 46 (2015) 434-439.
- Curto, J.M.R., *3D Computational Simulation and Experimental Characterization of Polymeric Stochastic Network Materials: Case Studies in Reinforced Eucalyptus Office Paper and Nanofibrous Materials*, Covilhã: Universidade da Beira Interior, 2011. Tese de Doutoramento.
- Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., *Three Dimensional Modelling of Fibrous Materials and Experimental Validation*, *Materialwiss. Werkst.* 42 (2011) 370-374.
- Curto, J.M.R., Mendes, A.O., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Fiadeiro, P.T., Ramos, A.M.M., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., *Development of an Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets*, in: *Advanced Structured Materials - Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design*, 2015, pp. 301-21.
- Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa, V.L.D., Martins, N.V., Videira, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Silva, M.J.S., *The Importance of Optimizing the 3D Structure When Developing Cellulosic Materials for Medical Applications: The Case of Drug Delivery Systems (DDS)*, in: *XXIII TECNICELPA - Conferência Internacional Da Floresta, Pasta E Papel*, 12-14 de Outubro, Porto, Portugal, 2016.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., *Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems*, *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010): 217-223.
- Davies, N.M., Anderson, K.E. *Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac: Therapeutic Insights and Pitfalls*, *Clin. Pharmacokinet.* 33 (1997) 184-213.
- Dayal, M.S., Goswami, N., Sahai, A., Jain, V., Mathur, G., Mathur, A., *Effect of Media Components on Cell Growth and Bacterial Cellulose Production from Acetobacter Aceti MTCC 2623*, *Carbohyd. Polym.* 94 (2013) 12-16.
- Debele, T.A., Mekuria, S.L., Tsai, H.C., *Polysaccharide Based Nanogels in the Drug Delivery System: Application as the Carrier of Pharmaceutical Agents*, *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 964-981.
- Dubey, R.D., Saneja, A., Gupta, P.K., Gupta, P.N., *Recent Advances in Drug Delivery Strategies for Improved Therapeutic Efficacy of Gemcitabine*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 93 (2016) 147-162.
- Dufresne, A., *Nanocellulose: A New Ageless Bionanomaterial*, *Mater. Today* 16 (2013) 220-227.
- Efentakis, M., Vlachou, M., Choulis, N.H., *Effects of Excipients on "swelling" and Drug Release from Compressed Matrices*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997): 107-112.
- Eichhorn, S.J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N.E., Capadona, J.R., Rowan, S.J., Wedge, C., Thielemans, W., Roman, M., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Keckes, J., Yano, H., Abe, K., Nogi, M., Nakagaito, A.N., Mangalam, A., Simonsen, J., Benight, A.S., Bismarck, A., Berglund, L.A., Peijs, T., *Review: Current International Research into Cellulose Nanofibres and Nanocomposites*, *J. Mater. Sci.* 45 (2010) 1-33.

- Elzayat, E.M., Abdel-Rahman, A.A., Ahmed, S.M., Alanazi, F.K., Habib, W.A., Abou-Auda, H.S., Sakr, A., Formulation and Pharmacokinetics of Multi-Layered Matrix Tablets: Biphasic Delivery of Diclofenac, *Saudi Pharm. J.* 25 (2016) 688-695.
- Esa, F., Tasirin, S.M., Rahman, N.A., Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, *Italian Oral Surgery* 2 (2014) 113-119.
- Eslampour, A., Malaekheh-Nikouei, B., Abrishami, M., Bayani, R., Efficacy of Extended-Release Oral Diclofenac in Postoperative Pain Management after Photorefractive Keratectomy, *J. Ocul. Pharmacol. Th.* 29 (2013) 670-73.
- Ferreira, J.S., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., 3D Computational Simulation of Drug Delivery Systems (DDS) Made from Carboxymethyl Cellulose (CMC), in: 1st Symposium of FibEnTech-Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2016, pp. 91-94.
- Fini, A., Cavallari, C., Ospitali, F., Diclofenac Salts. V. Examples of Polymorphism among Diclofenac Salts with Alkyl-Hydroxy Amines Studied by DSC and HSM, *Pharmaceutics* 2 (2010) 136-58.
- Fu, L., Zhang, J., Yang, G., Present Status and Applications of Bacterial Cellulose-Based Materials for Skin Tissue Repair, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1432-1442.
- Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J.L., Hernandez, R.M., Igartua, M., Advances in Drug Delivery Systems (DDSs) to Release Growth Factors for Wound Healing and Skin Regeneration, *Nanomed-Nanotechnol* 11 (2015) 1551-1573.
- Garcia-Cruz, C.H., Foggetti, U., Silva, A.N., Alginato Bacteriano: Aspectos Tecnológicos, Características E Produção, *Quim. Nova* 31 (2008) 1800-1806.
- Geller, M., Krymchantowski, A.V., Steinbruch, M., Cunha, K.S., Ribeiro, M.G., Oliveira, L., Ozeri, D., Paulo, J., Daher, L., Use of Diclofenac in Clinical Practice: Review of the Therapeutic Evidence and Pharmacologic Actions, *Rev. Bras. Clin. Med.* 10 (2012): 29-38.
- Gelman, R.A. Novel Salts of Carboxymethylcellulose. US Pat. 4650716, 17 Março. 1987. 9 p.
- González-Rodríguez, M.L., Holgado, M.A., Sánchez-Lafuente, C., Rabasco, A.M., Fini, A., Alginate/chitosan Particulate Systems for Sodium Diclofenac Release, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 225-234.
- Grassi, M., Grassi, G., Mathematical Modelling and Controlled Drug Delivery: Matrix Systems, *Curr. Drug Deliv.* 2 (2005) 97-116.
- Hansen, C.M., Hansen Solubility Parameters A User's Handbook, second ed., CRC Press, 2013.
- Heyden, S., Network Modelling for the Evaluation of Mechanical Properties of Cellulose Fibre Fluff, Suécia: Lund University, 2000. Tese de Doutoramento.
- Hotaling, N.A., Bharti, K., Kriel, H., Simon, C.G., DiameterJ: A Validated Open Source Nanofiber Diameter Measurement Tool, *Biomaterials* 61 (2015) 327-338.
- Hua, S., Ma, H., Li, X., Yang, H., Wang, A., pH-Sensitive Sodium Alginate/poly(vinyl Alcohol) Hydrogel Beads Prepared by Combined Ca<sup>2+</sup> Crosslinking and Freeze-Thawing Cycles for Controlled Release of Diclofenac Sodium, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 517-523.
- Hwang, K.M., Cho, C.H., Tung, N.T., Kim, J.Y., Rhee, Y.S., Park, E.S., Release Kinetics of Highly Porous Floating Tablets Containing Cilostazol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 115 (2017) 39-51.
- Islam, M.S., Karim, M.R., Fabrication and Characterization of Poly(vinyl Alcohol)/alginate Blend Nanofibers by Electrospinning Method, *Colloid. Surface. A* 366 (2010) 135-140.
- Jain, K.K., Drug Delivery Systems - An Overview, in: Jain, K.K. (Eds), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, N.J., 2008, pp. 1-150.
- Jong, W.H.D., Borm, P.J.A, Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards, *Int. J. Nanomed.* 3 (2008) 133-149.
- Jorfi, M., Foster, E.J., Recent Advances in Nanocellulose for Biomedical Applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) 41719.
- Junior, M.H.G., Sterzo, E.V., Macari, M., Boleli, I.C., Use of Scanning Electron Microscopy for

- the Evaluation of Intestinal Epithelium Integrity, *R. Bras. Zootec.* 33 (2004) 1500-1505.
- Kallmes, O.J., Corte, H., The Interpretation of Paper Properties in Terms of Structure, Formation and Structure of Paper 2 (1962) 351-368.
- Kamel, S., Ali, N., Jahangir, K., Shah, S.M., El-Gendy, A.A., Pharmaceutical Significance of Cellulose: A Review, *Express Polym. Lett.* 2 (2008) 758-778.
- Kierys, A., Grochowicz, M., Kosik, P., The Release of Ibuprofen Sodium Salt from Permanently Porous Poly(hydroxyethyl Methacrylate-Co-Trimethylolpropane Trimethacrylate) Resins, *Micropor. Mesopor. Mat.* 217 (2015) 133-40.
- Kim, J.H., Shim, B.S., Kim, H.S., Lee, Y.J., Min, S.K., Jang, D., Abas, Z., Kim, J., Review of Nanocellulose for Sustainable Future Materials, *Int. J. Pr. Eng. Man-GT* 2 (2015) 197-213.
- Kim, S., Kim, J.H., Jeon, O., Kwon, I.C., Park, K., Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 420-430.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A., Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angew. Chem. Int. Edit.* 44 (2005) 3358-3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A., Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 5438-5466.
- Krug, H.F., Wick, P., Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 1260-1278.
- Larrañeta, E., McCrudden M.T.C., Courtenay A.J., Donnelly, R.F., Microneedles: A New Frontier in Nanomedicine Delivery, *Pharm. Res.* 33 (2016) 1055-1073.
- Lavrykov, S., Lindström, S.B., Singh, K.M., Ramarao, B.V., 3D Network Simulations of Paper Structure, *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 27 (2012) 256-263.
- Levlin, J.E., Soderhjelm, L., Pulp and Paper Testing, Finnish Paper Engineers' Association and TAPPI, 1999.
- Li, J., Mooney, D.J., Designing Hydrogels for Controlled Drug Delivery, *Nat. Mater.* 1 (2016) 1-17.
- Lin, N., Dufresne, A., Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect, *Eur. Polym. J.* 59 (2014) 302-325.
- Lopes, C.M., Lobo, J.M.S., Costa, P., Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos." *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 41 (2005) 143-154.
- Makhija, D.T., Somani, R.R., Improvement of GI Tolerance of NSAIDs Using Oral Prodrug Approach, *Der Pharmacia Lett.* 2 (2010) 208-220.
- Markman, J.L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., Ljubimova, J.Y., Nanomedicine Therapeutic Approaches to Overcome Cancer Drug Resistance. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 65 (2013) 1866-1879.
- Martins, N.V.D.F., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., Development of Drug Delivery Systems (DDS) Coated with Polymeric Materials, in: 1st Symposium of FibEnTech-Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2016, pp. 95-98.
- Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P., Pawar, P., Formulation and in Vitro Evaluation of Eudragit S-100 Coated Naproxen Matrix Tablets for Colon-Targeted Drug Delivery System, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4 (2013) 31-41.
- Mehta, S.K., Bhasin K.K., Dham S., Energetically Favorable Interactions between Diclofenac Sodium and Cyclodextrin Molecules in Aqueous Media, *J. Colloid Interf. Sci.* 326 (2008) 374-381.
- Missoum, K., Belgacem, M.N., Bras, J., Nanofibrillated Cellulose Surface Modification: A Review, *Materials* 6 (2013) 1745-1766.
- Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A.M., Bejenaru, L.E., Bejenaru, C., Natural and Synthetic Polymers for Drug Delivery and Targeting, in: Grumezescu, A. (Eds), *Nanobiomaterials in Drug Delivery*, 2016, pp. 229-284.

- Mohd Amin, M.C.I., Ahmad, N., Halib, N., Ahmad, I., Synthesis and Characterization of Thermo- and pH-Responsive Bacterial Cellulose/acrylic Acid Hydrogels for Drug Delivery, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 465-473.
- Mondal, S., Preparation, Properties and Applications of Nanocellulosic Materials, *Carbohydr. Polym.* 163 (2017) 301-316.
- Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Youngblood, J., Martini, A., Nairn, J., Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3941-3994.
- Moraes, M.T., Debiassi, H., Carlesso, R., Franchini, J.C., Silva, V.R., Critical Limits of Soil Penetration Resistance in a Rhodic Eutrudox, *Rev. Bras. Cienc. Solo* 38 (2014) 288-98.
- Moulton, S.E., Wallace G.G., 3-Dimensional (3D) Fabricated Polymer Based Drug Delivery Systems, *J. Control. Release* 193 (2014) 27-34.
- Mousa, M.H., Dong, Y., Davies, I.J., Recent Advances in Bionanocomposites: Preparation, Properties, and Applications, *Int. J. Polym. Mater. Po.* 65 (2016) 225-254.
- Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P., Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery, *Nat. Mat.* 12 (2013) 991-1003.
- Niskanen, K.J., Alava, M.J., Planar Random Networks with Flexible Fibers, *Phys. Rev. Lett.* 73 (1994) 3475-3478.
- Nóbrega, K.C., Amorim, L.V., Influence of the Molar Mass of CMC in the Rheological Behavior and Filtration of Clay Suspensions, *Cerâmica* 61 (2015) 399-408.
- Ohkawa, K. Nanofibers of Cellulose and Its Derivatives Fabricated Using Direct Electrospinning, *Molecules* 20 (2015) 9139-9154.
- Oke, I., Nanoscience in Nature: Cellulose Nanocrystals, *SURG- Studies by Undergraduate Researchers at Guelph* 3 (2010) 77-80.
- Oliveira, M.F., Suarez, D., Rocha, J.C.B., Teixeira, A.V.N.C., Cortes, M.E., Sousa, F.B., Sinisterra, R.D., Electrospun Nanofibers of polyCD/PMAA Polymers and Their Potential Application as Drug Delivery System, *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* 54 (2015) 252-261.
- Osong, S.H., Norgren, S., Engstrand, P., Processing of Wood-Based Microfibrillated Cellulose and Nanofibrillated Cellulose, and Applications Relating to Papermaking: A Review, *Cellulose* 23 (2016) 93-123.
- Österberg, M., Cranston, E.D., Special Issue on Nanocellulose- Editorial, *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 29 (2014): 1-2.
- Owen, A., Rannard S., Bawa R., Feng S.S., Interdisciplinary Nanomedicine Publications through Interdisciplinary Peer-Review, *J. Interdiscip. Nanomed.* 1 (2015) 4-8.
- Palomo, M.E., Ballesteros, M.P., Frutos, P. Analysis of Diclofenac Sodium and Derivatives." *J. Pharm. Biomed.* 21 (1999) 83-94.
- Peppas, N.A., Reinhart, C.T., Solute Diffusion in Swollen Membranes. Part I. A New Theory, *J. Membrane Sci.* 15 (1983) 275-287.
- Petersen, N., Gatenholm, P., Bacterial Cellulose-Based Materials and Medical Devices: Current State and Perspectives, *Appl. Microbiol. Biot.* 91 (2011) 1277-1286.
- Pezzini, B.R., Silva, M.A.S., Ferraz, H.G., Formas Farmacêuticas Sólidas Orais de Liberação Prolongada: Sistemas Monolíticos E Multiparticulados, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 43 (2007) 491-502.
- Philip, A., Philip, B., Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches, *Oman Medical Journal* 25 (2010) 70-78.
- Pierre, G., Punta, C., Delattre, C., Melone, L., Dubessay, P., Fiorati, A., Pastori, N., Galante, Y.M., Michaud, P., TEMPO-Mediated Oxidation of Polysaccharides: An Ongoing Story, *Carbohydr. Polym.* 165 (2017) 71-85.
- Provatias, N., Uesaka, T., Modeling Paper Structure and Paper Press Interactions, *J. Pulp Pap. Sci.* 29 (2003) 332-340.

- Rao, Y.M., Veni, J.K., Jayasagar, G., Formulation and Evaluation of Diclofenac Sodium Using Hydrophilic Matrices, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 759-766.
- Ritger, P.L., Peppas, N.A., A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs, *J. Control. Release* 5 (1987) 23-36.
- Rosen, H., Abribat, T., The Rise and Rise of Drug Delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 381-385.
- Ruiz-Palomero, C., Soriano, M.L., Valcárcel, M., Nanocellulose as Analyte and Analytical Tool: Opportunities and Challenges, *TRAC-Trend Anal. Chem.* 87 (2016) 1-18.
- Safari, J., Zarnegar, Z., Advanced Drug Delivery Systems: Nanotechnology of Health Design A Review, *J. Saudi Chem. Soc.* 18 (2014) 85-99.
- Sampson, W.W., The structural characterisation of fibre networks in papermaking processes - A review, in: 12th Fundamental Research Symposium - Paper as a Network, Oxford, 2001, pp. 1205-1288.
- Santner, T., Williams, B., Notz, W., The Design and Analysis of Computer Experiments, Springer, New York, 2003.
- Satish, C.S., Satish, K.P., Shivakumar, H.G., Hydrogels as Controlled Drug Delivery Systems: Synthesis, Crosslinking, Water and Drug Transport Mechanism, *Indian J. Pharm. Sci.* 68 (2006) 133-140.
- Schaffazick, S., Guterres, S., Freitas, L., Pohlmann, A., Caracterização E Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração de Fármacos, *Quim. Nova* 26 (2003) 726-37.
- Shaikh, H.K., Kshirsagar, R.V., Patil, S.G., Mathematical Models for Drug Release Characterization: A Review, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4 (2015) 324-338.
- Silva, N.H.C.S., Filipe, A., Almeida, I.F., Costa, P.C., Rosado, C., Pascoal, C., Silvestre, A.J.D., Freire, C.S.R., Bacterial Cellulose Membranes as Transdermal Delivery Systems for Diclofenac: In Vitro Dissolution and Permeation Studies, *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 264-269.
- Sindhu, K.A., Prasanth, R., Thakur, V.K., Medical Applications of Cellulose and Its Derivatives: Present and Future, in: Thakur, V.K. (Eds), *Nanocellulose Polymer Nanocomposites*, Scrivener Publishing LLC, 2015, pp. 437-478.
- Sood, S., Gupta, V.K., Agarwal, S., Dev, K., Pathania, D., International Journal of Biological Macromolecules Controlled Release of Antibiotic Amoxicillin Drug Using Carboxymethyl Cellulose-Cl-Poly (Lactic Acid-Co-Itaconic Acid) Hydrogel, *Int. J. Biol. Macromol.* 101 (2017) 612-620.
- Suave, J., Dall'agnol, E.C., Pezzin, A.P.T., Silva, D.A.K., Meier, M.M., Soldi, V., Microencapsulação: Inovação Em Diferentes Áreas, *Revista Saúde E Ambiente* 7 (2006) 12-20.
- Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., Potthast, A., Bacterial Cellulose as a Material for Wound Treatment: Properties and Modifications: A Review, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1547-1571.
- Sun, Y., Su, J., Liu, G., Chen, J., Zhang, X., Zhang, R., Jiang, M., Qiu, M., Advances of Blood Cell-Based Drug Delivery Systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* 96 (2017) 115-128.
- Syverud, K., Chinga-Carrasco, G., Toledo, J., Toledo, P.G., A Comparative Study of Eucalyptus and Pinus Radiata Pulp Fibres as Raw Materials for Production of Cellulose Nanofibrils, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 1033-1038.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.K., Drug Delivery Systems: An Updated Review, *Int. J. Pharm. Investig.* 2 (2012) 2-11.
- Tønnesen, H.H., Karlsen, J., Alginate in Drug Delivery Systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 621-630.
- Trovatti, E., Freire, C.S.R., Pinto, P.C., Almeida, I.F., Costa, P., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P.,

- Rosado, C., Bacterial Cellulose Membranes Applied in Topical and Transdermal Delivery of Lidocaine Hydrochloride and Ibuprofen: In Vitro Diffusion Studies, *Int. J. Pharm.* 435 (2012) 83-87.
- Ullah, H., Badshah, M., Mäkilä, E., Salonen, J., Shahbazi, M.A., Santos, H.A., Khan, T., Fabrication, Characterization and Evaluation of Bacterial Cellulose-Based Capsule Shells for Oral Drug Delivery, *Cellulose* 24 (2017) 1445-1454.
- Ullah, H., Santos, H.A., Khan, T., Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery, *Cellulose* 23 (2016) 2291-2314.
- Varma, M., Kaushal, A., Garg, A., Garg, S. Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems, *Am. J. Drug Deliv.* 2 (2004) 43-57.
- Varshney, V.K., Naithani, S., Chemical Functionalization of Cellulose Derived from Nonconventional Source, in: Kalia, S., Kaith, B.S., Kaur, I. (Eds.), *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, pp. 43-60.
- Videira, P.E.M., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., Optimization of Polymeric Nanomaterials for Biomedical Applications Using Computational Simulation, in: 1st Symposium of the FibEnTech-Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2016, pp. 99-102.
- Vijayalakshmi, K., Gomathi, T., Sudha, P.N., Preparation and Characterization of Nanochitosan/sodium Alginate/microcrystalline Cellulose Beads, *Der Pharmacia Lettre* 6 (2014) 65-77.
- Villanova, J.C.O., Oréfice, R.L., Cunha, A.S., Aplicações Farmacêuticas de Polímeros, *Polímeros* 20 (2010) 51-64.
- Xu, Y., Zhan, C., Fan, L., Wang, L., Zheng, H., Preparation of Dual Crosslinked Alginate-Chitosan Blend Gel Beads and in Vitro Controlled Release in Oral Site-Specific Drug Delivery System, *Int. J. Pharm.* 336 (2007) 329-337.
- Yang, L., Fassihi R., Modulation of Diclofenac Release from a Totally Soluble Controlled Release Drug Delivery System, *J. Control. Release* 44 (1997) 135-140.
- Yang, X., Tong, J., Guo, L., Qian, Z., Chen, Q., Qi, R., Qiu, Y., Bundling Potent Natural Toxin Cantharidin within Platinum (IV) Prodrugs for Liposome Drug Delivery and Effective Malignant Neuroblastoma Treatment, *Nanomedicine* 13 (2016) 287-296.
- Yao, F., Weiyuan, J.K., Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non- Degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems, *Expert Opin. Drug Del.* 7 (2010): 429-444.
- Yokoyama, M., Drug Targeting with Nano-Sized Carrier Systems, *J. Artif. Organs* 8 (2005) 77-84.
- Zarzycki, R., Modrzejewska, Z., Nawrotek, K., Lek, U. Drug Release From Hydrogel Matrices, *Ecol. Chem. Eng. S* 17 (2010) 117-136.
- Zelikin, A.N., Ehrhardt, C., Healy, A.M., Materials and Methods for Delivery of Biological Drugs, *Nat. Chem.* 8 (2016) 997-1007.
- Zhang, Y., Chan, H.F., Leong, K.W., Advanced Materials and Processing for Drug Delivery: The Past and the Future, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 65 (2013) 104-120.
- Zhang, Y., Chan, J.W., Moretti, A., Uhrich, K.E., Designing Polymers with Sugar-Based Advantages for Bioactive Delivery Applications, *J. Control. Release* 219 (2015) 355-368.
- Zimmermann, T., Pöhler, E., Geiger, T., Cellulose Fibrils for Polymer Reinforcement, *Adv. Eng. Mater.* 6 (2004) 754-761.





# Anexos



## **Anexo A. Lista de Publicações**

### **Artigos completos em livros de atas/ conferências/ simpósio com revisão científica por pares e publicação com ISBN:**

Morais, F.P., Curto, J.M.R., Porosity optimization of nano cellulose drug delivery systems to control the release kinetics, in: Proceedings of the Second Symposium of FibEnTech-Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, September 21-22, 2017.

Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa, V.L.D., Martins, N.V., Videira, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Silva, M.J.S., The Importance of Optimizing the 3D Structure When Developing Cellulosic Materials for Medical Applications: The Case of Drug Delivery Systems (DDS), in: Proceedings of the XXIII TECNICELPA International Florest, Pulp and Paper Conference, Porto, Portugal, October 12-14, 2016.

### **Comunicações em livros de atas com revisão científica por pares e publicação com ISBN:**

Curto, J.M.R., Morais, F.P., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., Design of nanomaterials for biomedical applications using 3D computational simulation, in: Proceedings of the Second Symposium of FibEnTech-Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, September 21-22, 2017.

### **Comunicações Orais:**

Morais, F.P., Curto, J.M.R., Design of nano cellulose Drug Delivery Systems (DDS) using 3D Computational Simulation to solve anti-inflammatory “Diclofenac” stomach side effects, in: XII ANNUAL CICS-UBI SYMPOSIUM, Faculty of Health Sciences (FCS), University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, July 6-7, 2017. (Oral presentation and Abstract in conference book).

### **Comunicações em Poster:**

Morais, F.P., Curto, J.M.R., Computational 3D Nano cellulose Drug Delivery Systems for Medical Chemistry Innovative Pharmaceuticals, in: V Jornadas de Química e Bioquímica, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, May 3-4, 2017. (Poster presentation and Abstract in conference book).

Morais, F.P., Curto, J.M.R., Design of nano cellulose Drug Delivery Systems (DDS) using 3D Computational Simulation, in: Encontro Ciência 2017, Lisboa, Portugal, July 3-5, 2017.



## **Porosity optimization of nano cellulose drug delivery systems to control the release kinetics**

F.P. Morais<sup>1,2</sup>, J.M.R. Curto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Medicinal Chemistry Master Science Student, Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> FibEnTech, Fiber Materials and Environmental Technologies, Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> CIEPQPF - Chemical Process Engineering and Forest Products Research Centre, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

### **Abstract**

Highly porous polymeric materials, which are produced from cellulosic sources, represent an important delivery system for various medicinal applications. This study focuses on developing highly porous promising drug delivery systems containing the drug Diclofenac in order to avoid the gastric side effects induced by this active substance. In this study three porous cellulosic sources were used, namely, nanofibrillated cellulose, bacterial cellulose and carboxymethylcellulose. Therapeutic molecule release kinetics was evaluated through an in vitro gastrointestinal model to understand the release mechanism from each of the delivery systems developed. A DDS structural characterization was also performed using the SEM technique and image analysis. Through these studies it was possible to conclude that DDS presented fibers width dimensions in the order of nanoscale. In addition, a porosity and pore dimensions structural consolidation of 3D porous structures was performed using a validated computational simulation model implemented using MATLAB®. Through these computational studies it was possible to conclude that it was possible to obtain DDS obtained from NFC with different pore dimension and pore distribution. The structural consolidation of the 3D NFC matrix was obtained using filtration process variables modification. The SEM measurements of the pore distribution indicates that the 3D NFC matrix presented a more uniform pore distribution. The DDS release kinetics also was more uniform. The delivery systems produced also prevented the diclofenac drug from being released at the stomach acidic pH, avoiding the stomach mucous attack side effects. Finally, the porous structure that took the most benefit from 3D optimization through computational simulation was nanofibrillated cellulose, obtaining a 3D network with more uniform pore size and consequently more controlled release kinetics.

### **Introduction**

Porous polymeric materials because of the possibility to optimize porosity and pore dimensions to transport drugs can be used as drug delivery systems (DDS) in various therapeutic applications [1]. DDS are developed for delivering drugs at predetermined rates and predefined time periods or to be targeting drugs to a desirable cells group [2,3]. The goal of this targeted delivery is to transport appropriate drugs amounts to desirable targets while

minimizing unwanted drugs side effects on other tissues [2]. An example of a drug advantageous to be incorporated into a DDS is Diclofenac as it is associated with side effects mainly on the gastrointestinal tract, including irritation, bleeding, ulceration and possibly perforation in the gastric wall because. Like other non-steroidal anti-inflammatory drugs, it is not stable in the acidic environment of the stomach [4].

Natural polymers, such as cellulose, are used in the medicinal chemistry field due to the low incidence of side effects, therapeutic efficacy [5] and biocompatibility [6]. Cellulose is a linear, resistant and fibrous polymer composed of glucose units, interconnected by  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) glycosidic bonds and presenting reactive functional hydroxyl groups [7,8]. With the possibility of using cellulose at the nanoscale, as a building block, the development of nanocellulose based materials is being taken into consideration to obtain advanced materials. Cellulosic nanofibrils in the form of nano cellulose can be extracted from the lignocellulosic bioresources by using appropriate chemical, mechanical, enzymatic or the combination of more than one method [9]. Nano cellulose exhibits several excellent properties such as its high aspect ratio, low density of 1.6 g/cm<sup>3</sup>, very low thermal expansion coefficient, and high tensile strength about 500MPa [10], which has resulted in numerous applications including drug delivery. Within the nano cellulose family are included nanofibrillated cellulose (NFC) and bacterial cellulose (BC). NFC is first obtained through a chemical treatment, TEMPO mediated oxidation, with subsequent mechanical treatment, high pressure homogenization [11]. On the other hand, BC is obtained in culture with abundant glucose medium, aerobic and temperature controlled conditions, through gram-negative bacteria (*Gluconacetobacter sacchari*) [12]. Another attractive cellulose material in drug delivery field is carboxymethylcellulose (CMC) produced by Williamson reaction, which have good solubility, high chemical stability, are safe, non-toxic, hydrophilic, biocompatible, and biodegradable [13-15].

3D molecular modeling and computational simulations are important tools in DDS development. The 3D structure and porosity of porous nano cellulosic systems are determinant to optimize the transport and release function of these systems [16]. This optimization is performed using a computer simulator validated and implemented in MATLAB® [17]. The use of experimentally validated computer simulations allows optimization of the structural properties that are determinant to the transport of therapeutic molecules. Hence, porous materials can be produced using nano cellulose building blocks and functionalized cellulose, all derived from cellulose. The ability to control pore dimensions is a major step in the DDS development process. The use of cellulose in the nano-scaleas to form a 3D matrix, and cellulose derivates to modify water interaction, is innovative in order to obtain the desired drug release kinetics.

The main goal of this study was to develop and characterize structurally nano cellulosic DDS, using a porous NFC, BC and CMC 3D matrix. The computational study was also carried out to

optimize the porosity and pore dimensions of the DDS produced and to obtain a more uniform Diclofenac release kinetics.

## **Materials and Methods**

**Materials:** CMC sodium salt (NaCMC), high viscosity (1500-3000)cP in 1% H<sub>2</sub>O (25°C) and Diclofenac sodium salt (NaDCF) (>99%) were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Alginate sodium salt (NaAlg), high viscosity acquired by BDH Chemicals Ltd (England). All other chemicals and reagents used in the study were analytical grade. NFC gel was obtained in the FibEnTech Research Unit of Chemistry Department of University of Beira Interior and BC membrane was obtained in the CICECO - Aveiro Institute of Materials of the Chemistry Department, University of Aveiro.

**Polymeric DDS production:** Spherical polymeric DDS are produced by mixing NaAlg solution, as natural crosslinking polymer, NFC gel, BC gel and NaCMC solution, separately, as an internal 3D network, and NaDCF solution, as therapeutic molecule, in a 2:1:2 ratio. This mixture was homogenized for about 30 minutes. After this process, mixture was added dropwise to a 0.2M CaCl<sub>2</sub> solution. The resulting beads were left in this solution for 24 h for their hardening [18]. Finally, the beads were filtered, rinsed and washed with distilled water, with subsequent drying.

**SEM Analysis:** To maintain the porous structure for SEM analysis samples were immersed in a solution of glutaraldehyde 2.5% (w/w) overnight. Later, these were treated with ethanol solutions of graded concentrations, during 10 minutes, in order to replace water with ethanol. Subsequently, the samples are dried by CO<sub>2</sub> Critical Point Drying method, using EMS K850 Critical Point Drier equipped with thermo-electronic heating, adiabatic cooling and temperature control of +5°C in cooling and +35°C during heating [19]. After this treatment, the samples were placed on an aluminum support using a double-sided adhesive tape. Then the samples were coated with gold using a Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, United Kingdom) in order to become better conductors. Finally, after this coating, samples were analyzed by SEM S-2700 Hitachi (Tokyo, Japan), operating at 20 kV and at different magnifications.

**Image analysis:** With SEM images, fibers and pores dimensions were obtained using ImageJ and Diameter, with defined proceedings and criteria.

**Drug release in vitro studies:** Kinetic studies were performed in triplicate for 6 hours using an in vitro gastrointestinal model with controlled temperature ((37±0.5)°C) and homogenization (100 rpm). In the first 2h, a buffer solution HCl pH 2 was used. Within the following 2 hours, a phosphate buffer solution pH 6.6 was used. In last 2h, a phosphate buffer solution pH 7.4 was also used [20]. Throughout the assay several samples were withdrawn over time (volume restored with the same amount of liquid as was removed) and analyzed by UV-Vis spectroscopy method (276 nm) using a Helios Omega UV-Vis spectrophotometer and a quartz

cell with an optical path of 1 cm.

**Computational Simulation:** The computational simulator validated and implemented in MATLAB® [17] was used for the formation of the 3D matrix nanocellulose computational simulation study.

## Results and Discussion

SEM technique was used to structurally characterize the porous cellulosic materials used in DDS (Fig. 1) in the xy plane. NFC forms a 3D polymer matrix with random pores and fibres in the nanoscale. BC is presented as a layered structure with some separation degree, as well as horizontal fibrils between the layers. The 3D network of this nanocellulose is very open, allowing the active substance to be released more easily, in a prolonged and controlled way, so achieving the desired therapeutic effects quickly and safely. Finally, CMC forms an interlaced, uniform and open 3D network, i.e. there are several layers in 3D structure.

This type of structure has the ability to trap large amounts of water as well as therapeutic molecules because of its high porosity. This is an advantage because it makes it possible to releases them in a controlled way.

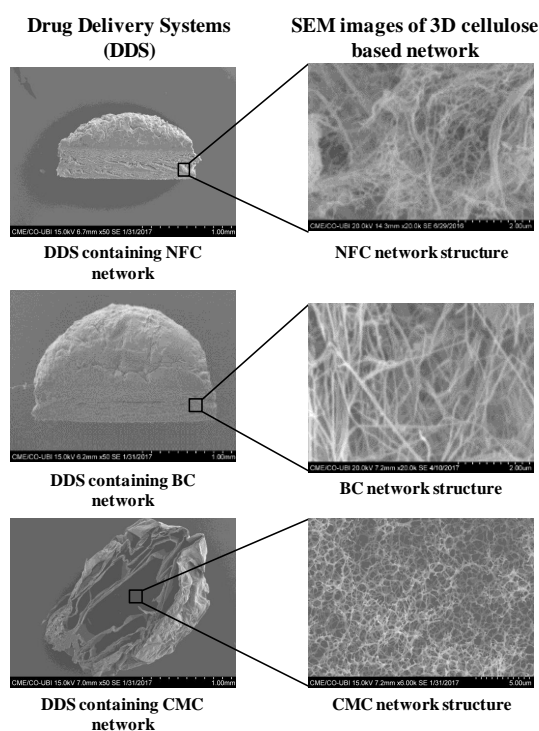


Fig. 1. SEM images of NFC, BC and CMC 3D polymer network.

In addition to structural differences in 3D network, a difference in fibers and pores dimensions is also visible (Table 1 and 2).

NFC had a nanofibers average width and length of  $(68.5 \pm 0.0339)$  nm and  $(174 \pm 0.140)$  nm, respectively. However, BC and CMC presented higher values. From the results obtained, NFC presents values more similar to the BC values because it has a width of  $(77.2 \pm 0.0389)$  nm



and a length of  $(177 \pm 0.146)$  nm, while CMC has a width of  $(99.6 \pm 0.0472)$  nm and a length of  $(243 \pm 0.179)$ . The average NFC diameters are distributed between 10.9 nm and 423.9 nm. Comparatively, BC presented a similar diameters distribution (between 9.8 nm and 482.3 nm) while CMC presented a larger diameter distribution (between 16.3 nm and 440.5 nm).

**Table 1.** Nanocellulosic fibers characterization.

<b>Fibers Characterization</b>	<b>NFC</b>	<b>BC</b>	<b>CMC</b>
Count	356	1366	4993
Average width (nm)	$68.5 \pm 0.0339$	$77.2 \pm 0.0389$	$99.6 \pm 0.0472$
Average length (nm)	$174 \pm 0.140$	$177 \pm 0.146$	$243 \pm 0.179$
Diameter min. (nm)	10.9	9.8	16.3
Diameter max. (nm)	423.9	482.3	440.5

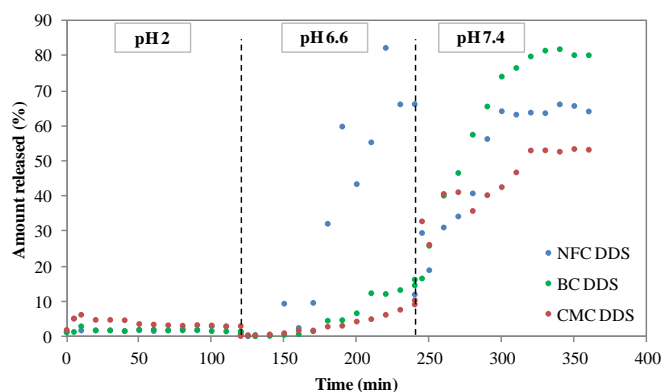
The pores found in 3D NFC network had a average diameter of  $(132 \pm 15.6)$  nm, with a porosity of 35%. Comparatively, the BC pores had an average diameter of  $(212 \pm 23.9)$  nm, with a porosity of 48%. Finally, CMC pores presented  $(273 \pm 27.0)$  nm of average diameter, with a porosity of 51%.

**Table 2.** Nanocellulosic fibers characterization.

<b>Pores Characterization</b>	<b>NFC</b>	<b>BC</b>	<b>CMC</b>
Count	74	236	1037
Average Diameter min. (nm)	$86.5 \pm 8.74$	$129 \pm 15.5$	$200 \pm 20.6$
Average Diameter max. (nm)	$176 \pm 22.4$	$296 \pm 32.2$	$345 \pm 33.4$
Average Diameter (nm)	$132 \pm 15.6$	$212 \pm 23.9$	$273 \pm 27.0$

Porosity is a property of great importance in DDS because of its influence on therapeutic agent kinetics release, such as Diclofenac.

Diclofenac in vitro release studies from the different polymeric DDS (Fig. 2) showed that the release kinetics did not show a continuous and regular release profile over the 6h assay. At pH 2 it is observed that release profile is similar between in three systems, with almost zero release concentrations, although the CMC DDS reaches DCF concentration released higher values. At pH 6.6 a completely abrupt release profile is found for NFC DDS, while in other systems are more regular. However, at pH 7.4 a greater release is noticeable and also more controlled by the three systems. BC DDS is the one that presents a greater and more controlled released (80%), while NFC presented 64% release and CMC presented 53%. Hence, nanocellulosic DDS produced are innovative because they prevent the Diclofenac release into the stomach (pH 2) and release it from the gastrointestinal tract (pH 6.6) preventing the stomach mucous attack side effects.



**Fig. 2.** Diclofenac release in vitro studies from polymeric DDS at different pH medium.

Since a DDS is intended to release controlled drugs, an NFC 3D network properties optimization, through computational simulations, is necessary to improve its release kinetics. The average values of the NFC 3D network fiber properties are used in the computational simulator [17] to subsequently create the porous structures virtually. This analysis allows develop a 3D polymer matrix structure with porosities similar to real ones. Subsequently this porosity and pore dimensions can be optimized in a desired way to obtain a more regular and uniform 3D network to produce a more efficient delivery system.

The use of 3D models has proven to be important in the delivery systems development. Initially a computational network of NFC 3D network was obtained (Fig. 3a) and through its analysis it is possible to validate this study, whose pore properties results are described in Table 3. NFC computational 3D network (n=156) has a porosity of 42%. As experimentally we obtained values of 35%, the results obtained for the computational images can be validated experimentally. In addition to this parameter, all other results of this computational porous structure have similarities with the results obtained for the structures developed in the laboratory.

With all the results obtained previously, it is possible to experimentally validate this computational method. In this way, this innovative methodology can be used to optimize porous nanomaterials structural properties, in order to extrapolate these computational results to the laboratory, saving time and resources. Previously a computational image was obtained with an NFC 3D network more open and with irregular pore sizes. Through a computational optimization of this structure (Fig. 3b) it is possible to obtain a more closed and regular 3D NFC network with uniformized pore dimensions (Table 3).

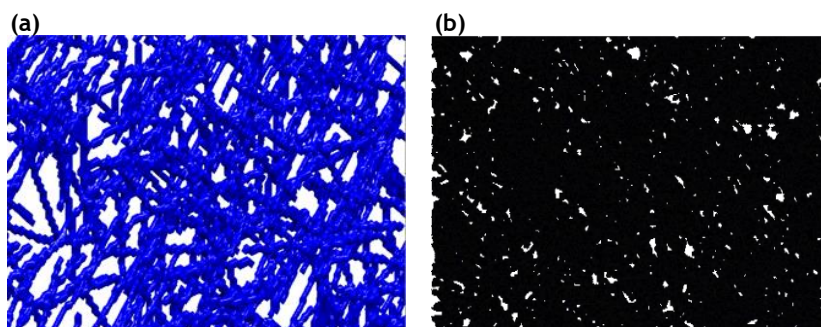


Fig. 3. NFC 3D network computational images before (a) and after (b) a porosity and pore dimensions optimization.

Through NFC 3D network computational optimization (n=192), an identical porosity was obtained (40%), however, with smaller pore dimensions results. With this 3D information it is possible, through structural consolidation, to obtain an NFC structure with similar porosity and pore distribution experimentally, obtaining more controlled drug release kinetics since this therapeutic molecule has to go a path larger to be released, unlike what happened in a more open structure since the 3D network dimensions are larger.

Table 3. Computational NFC pores properties.

3D Pores Characterization	NFC	Optimized NFC
Count	156	192
Average Diameter min. (nm)	63.6±40.6	32.5±18.4
Average Diameter max. (nm)	150±96.1	141±9.63
Average Diameter (nm)	104±68.4	86.8±14.1

Through structural consolidation it was possible to produce new and improved systems obtaining more controlled Diclofenac release kinetics for DDS with NFC (Fig. 4), in order to achieve the desired therapeutic effect.

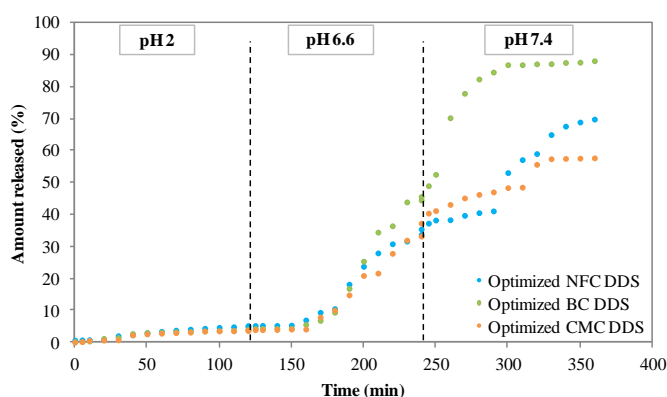


Fig. 4. Diclofenac release *in vitro* studies from optimized polymeric DDS at different pH medium.

By comparing the studies before and after the computational simulations, it can be seen that DDS containing NFC presented great benefits of structural consolidation at kinetic level. The release profile was no longer abrupt at pH 6.6 and began to be more controlled.

And at pH 7.4 the release profile is more regular for the optimized system. DDS with BC and CMC release kinetics presented a release profile similar to the first *in vitro* study, mainly at pH 7.4. For three polymeric systems, the final Diclofenac release amount is higher than the first *in vitro* studies, with no significant drug amount retained in the system remaining. There was an Diclofenac amount released 70%, 88% and 58% in the DDS with NFC, BC and CMC, respectively.

In this way, a DDS optimization allows better results, with computational simulations aid.

## **Conclusions**

3D porous materials modelling and simulation has been used as a tool to obtain 3D DDS structures. Pore size distribution has been modified and has an impact on the therapeutic molecule release kinetics. The incorporation of nanocellulose and functionalized cellulose, like CMC, have been used to control OH bonding and water affinity. Optimization of 3D porosity, pore dimension and distribution in DDS is determinant to drug transport and release. Biocompatible DDS have been developed to avoid Diclofenac release in the stomach (pH 2) and prevent the stomach mucous attack side effects. And, finally, nano cellulosic DDS applications, using a porous biocompatible materials combination constitute a promising medicinal chemistry research field to improve drug delivery systems.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank to FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, for financial support for the Research Unit Fibre Materials and Environmental Technologies FibEnTec (Ref<sup>a</sup> UID/Multi/00195/2013).

## **References**

- [1] S.E. Moulton, G.G. Wallace, 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems., *J. Control. Release* 193 (2014) 27-34.
- [2] J. Safari and Z. Zarnegar, Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design: A review, *J. Saudi Chem. Soc.* 18 (2014) 85-99.
- [3] A. N. Zelikin, C. Ehrhardt, A. M. Healy, Materials and methods for delivery of biological drugs, *Nat. Chem.* 8 (2016) 997-1007.
- [4] A. Philip, B. Philip, Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches, *Oman Medical Journal* 25 (2010) 70-78.
- [5] M. F. Oliveira, D. Suarez, J. C. B. Rocha, A. V. N. C. Teixeira, M. E. Cortés. F. B. de Sousa, R. D. Sinisterra, Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system, *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 54 (2015) 252-261.
- [6] A. Kierys, M. Grochowicz, P. Kosik, The release of ibuprofen sodium salt from permanently porous poly(hydroxyethyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) resins, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 217 (2015) 133-140.

- [7] M. H. Mousa, Y. Dong, I. J. Davies, Recent advances in bionanocomposites: Preparation, properties, and applications, *Int. J. Polym. Mater. Po.*, 65 (2016) 225-254.
- [8] M. Jorfi, E. J. Foster, Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.*, 132 (2015) 41719.
- [9] S. Mondal, Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials, *Carbohydr. Polym.* 163 (2017) 301-316.
- [10] M. H. Mousa, Y. Dong, I. J. Davies, Recent advances in bionanocomposites: Preparation, properties, and applications, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 65 (2016) 225-254.
- [11] J. H. Kim, B. S. Shim, H. S. Kim, Y. J. Lee, S. K. Min, D. Jang, Z. Abas, J. Kim, Review of nanocellulose for sustainable future materials, *Int. J. Precis. Eng. Manuf. - Green Technol.* 2 (2015) 197-213.
- [12] I. Sulaeva, U. Henniges, T. Rosenau, A. Potthast, Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1547-1571.
- [13] S. Butun, F. G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.*, 86 (2011) 636-643.
- [14] A. Dafe, H. Etemadi, H. Zarredar, G. R. Mahdavinia, Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 299-307.
- [15] J. S. Ferreira, J. M. R. Curto, R. M. S. Simões, M. J. S. Silva, 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDS) made from carboxymethyl cellulose (CMC), 1st Symp. FibEnTech Res. Unit (2016) 89-92.
- [16] J.M.R. Curto, A. O. Mendes, E. L. T. Conceição, A. T. G. Portugal, P. T. Fiadeiro, A. M. M. Ramos, R. M. S. Simões, M. J. S. Silva, Development of an Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets, in: A. Öchsner, H. Altenbach, (Eds.), *Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design - Advanced Structured Materials*, Springer International Publishing, 2015, pp. 301-321.
- [17] J. M. R. Curto, E. L. T. Conceição, A. T. G. Portugal, R. M. S. Simões, Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation, *Materialwiss. Werkst.*, 42 (2011) 370-374.
- [18] K. Vijayalakshmi, T. Gomathi, P. N. Sudha, Preparation and characterization of nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads, *Der Pharm. Lett.* 6 (2014) 65-77.
- [19] M.H.G. Junior, E.V. Sterzo, M. Macari, I.C. Boleli, Use of Scanning Electron Microscopy for the Evaluation of Intestinal Epithelium Integrity, *R. Bras. Zootec.* 33 (2004) 1500-1505.
- [20] M. L. González-Rodríguez, M. A. Holgado, C. Sánchez-Lafuente, A. M. Rabasco, A. Fini, Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 225-234.

## **The importance of optimizing the 3D structure when developing cellulosic materials for medical applications: the case of drug delivery systems (DDS)**

**J.M.R. Curto<sup>1,2,4\*</sup>, A.P. Costa<sup>1,2</sup>, M.E. Amaral<sup>1,2</sup>, J.S. Ferreira<sup>2</sup>, V.L.D. Costa<sup>1</sup>, N.V. Martins<sup>2</sup>, P.E.M Videira<sup>2</sup>, F.P. Morais<sup>1,2</sup>, A.R.L. Sousa<sup>1,2</sup>, E.L.T. Conceição<sup>3</sup>, A.T.G. Portugal<sup>4</sup>, R.M.S. Simões<sup>1,2</sup>, M.J. Santos Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> FibEnTech, University of Beira Interior, Portugal

<sup>2</sup> Dep. Química, UBI, Av. Marques d'Ávila e Bolama, 6200-01 Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> SABIC Technology Center, Riyadh, Saudi Arabia

<sup>4</sup>CIEPQPF, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Corresponding author: Joana Curto; [joana.curto@ubi.pt](mailto:joana.curto@ubi.pt); +351966485662

### **Summary**

An innovative 3D approach is used to develop and optimize structures when porosity is the key property, as it is the case of porous materials used as carriers for therapeutic molecules, also designated as drug delivery systems (DDS). The goal is to create materials with optimized 3D porosity, departing from cellulosic based materials. The optimization of the 3D structure of a porous material, such as cellulose based materials, is a fundamental process underlying many practical applications. Some examples include the optimization of traditional materials such as printing or tissue paper, but also the development of materials for novel applications with medicinal purposes.

The structures were produced departing from cellulose Kraft pulps, physically and chemically modified, to obtain cellulose based building blocks, with different sizes and functionalities. The experimental plan design comprises the obtention of micro fibrillated cellulose (MFC), nano fibrillated cellulose (NFC) and also cellulose with chemical modifications, as it is the case of carboxymethyl cellulose (CMC). For the design of innovative materials used in DDS we propose a combination of cellulose based 3D structures where the porosity and pore distribution are controlled to obtain the desired drug release kinetics. The structure characterization was done using ISO standards, Scanning Electron Microscopy (SEM) and image analysis methods. Structures with global porosity between 0.3 and 0.5 were characterized experimentally, simulated using our computational simulator, and optimized according to the desired porosity and drug delivery kinetics. We concluded that the internal pore size distribution can be modified and has impact in the kinetics of release for the designed drug delivery systems. New drug delivery systems, made from a combination of cellulosic based materials, with optimized 3D structures, have been obtained and characterized regarding their porosity, porous dimensions and kinetics of drug release.

**Keywords:** cellulose based materials, nanofibrillated cellulose (NFC), drug delivery systems, 3D computational simulation, optimization of porous materials.

## **Introduction**

The development of polymeric porous materials, in which it is possible to optimize porosity and pore dimensions, is decisive for the development of materials for biomedical applications such as drug delivery systems (DDS), scaffolds, sensors, etc. [1-2]. Polymeric porous materials are attractive for medical purposes due to their unique characteristics, such as controllable porosity, large surface to mass ratio, capacity of being functionalized, and their ability to carry molecules [3]. The use of drug carriers may reduce the toxicity of the incorporated drug and provide a reduction in therapeutic dosages, reducing the adverse effects associated [4]. The design of drug delivery systems must take into account the specificity of the drug target and the toxicity reduction while keeping the therapeutic effects, enhanced biocompatibility, biodegradability and safety [4]. Polymeric and cellulose based DDS have many advantages when comparing with the conventional forms of dosage, improving effectiveness and safety [5]. The DDS ability to retain molecules inside them, their transport and ability to overcome difficult barriers, like the blood-brain barriers, or the transport to tumorous cells is being developed [4-6] but usually, without using computational tools. Our goal is to manipulate the polymeric materials and determine the best way to change properties such as porosity, and have a relevant impact on the kinetics of drug release, using both experimental and computational plan design approaches [7-9]. To obtain cellulose fibres with different sizes and functionalities we have experimented with micro fibrillated cellulose (MFC), nano fibrillated cellulose (NFC), bacterial cellulose (BC) and also cellulose with chemical modifications (CMC). To obtain cellulose polymeric materials down to nanoscale several techniques can be used: chemical and mechanical deconstruction of vegetal cellulose fibres; bacterial production, electrospinning; electrospraying, layer-by-layer deposition, etc. The electrospinning technique can be used with a wide range of different polymers, including cellulose. By controlling input parameters like voltage or flowrate we have produced fibres with different diameters and distributions and materials with different resistances and porosities. To develop DDS containing cellulose fibres down to nanoscale several techniques can be used. DDS can be produced using MFC, NFC, BC and CMC, and a combination of the above, in order to obtain materials capable to retain and release therapeutic molecules. At this size, scanning electron microscopy (SEM) and image analysis tools are used to characterize these structures.

In order to potentiate the screening of new DDS a computational optimization approach has been developed and tested [7,8]. The 3D DDS structures are also obtained by computational simulation using our own validated 3D computational simulator [7]. To achieve the 3D pore optimization that gives the maximum available volume, with enough structural strength, the use of this computational tool proved to be very helpful when doing a large number of experiments [7,8]. The controlled release drug therapy involves the delivery of a predetermined amount of the drug, over a specified period, in a predictable behaviour. The kinetics of the cellulose based DDS can be controlled by designing a DDS with multi structured polymeric materials, with optimized properties, obtained by the combination of different

sizes and functionalities, using micro and nano fibrillated cellulose, modified celluloses and additives [10-25].

## **Experimental**

### ***Materials***

The micro fibrillated cellulose (MFC) and nano fibrillated cellulose (NFC) used for this study were produced departing from selected *Eucalyptus globulus* and *Picea abies* Kraft pulps. The Bacterial Cellulose (BC) was manipulated departing from the gel structure. The carboxymethyl cellulose (CMC), sodium alginate, diclofenac and calcium chloride of analytical grade were obtained from Sigma-Aldrich and BDH Chemicals.

### ***Methods***

Cellulose fibers and MFC were obtained from *Eucalyptus globulus* and *Picea abies* bleached Kraft pulp and paper structure were produced and pressed according to the ISO 5269/1 standard. The hardwood and softwood pulp were disintegrated following ISO 5263-1:2004, at 30000 rev, and beaten at 1000, 3000, 6000 and 9000 revolutions, using a PFI mill with temperature control. The raw material used for the production of NFC came from the same batch of *Eucalyptus globulus* bleached Kraft pulp. Pulps were hydrated over night at pH 12 and disintegrate with a standard laboratory disintegrator following ISO 5263-1:2004 (30 000 rev). In order to promote internal and external fibrillation of cellulosic fibres the pulps were refined using a standard PFI mill according to ISO 5264-2:2011, at 9000 rev. The pulps were beaten in two steps, with temperature control, using deionized water at pH 12. The next step was a chemical treatment using TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical)-mediated oxidation in a 4dm<sup>3</sup> reactor with pH control. This treatment consists in cellulose fibres oxidation with addition of NaClO solution to cellulose suspension, in the presence of catalytic amounts of TEMPO and NaBr dissolved at pH 10-11 and room temperature. The primary hydroxyl groups C6 are efficiently and selectively converted to carboxylate groups, via aldehydes groups C6 [12-13].

The final mechanical treatment of fibres was accomplished with a High Pressure Homogenizer at 500 bars and temperature ranging from 20°C to 39°C. Nano fibrillated cellulose (NFC), Carboxymethyl cellulose (CMC) and Bacterial Cellulose (BC) gels were prepared and encapsulated in alginate. The polymeric beads were prepared and characterized with and without drug incorporation. The alginate solution and cellulose used had a 2:1 ratio and 100-120 beads from a volume of 8-10 ml were pipetted into 60 mL of a CaCl<sub>2</sub> solution. Regarding the incorporation of diclofenac, the beads were obtained with the same experimental conditions with a ratio of 2:1:2. After obtaining the polymeric beads with drug incorporation, kinetic studies were carried out in triplicate for 6 hours at 37°C, approximately. In the first 2 hours, it was used to pH 2 HCl buffer solution to mimic the gastrointestinal tract. Then increased to pH 6.6 with phosphate buffer and maintained at this value for a further 2h assay. Finally, the last 2h, a little higher pH (7.4, phosphate buffer) was used to complete the



assays. Thereafter various samples were taken over time, and analysed by spectroscopy method of Ultraviolet-Visible (UV-Vis), using a spectrophotometer Helios Omega UV-Vis and a quartz cell having an optical path of 1 cm. During the study, 5 ml aliquots were withdrawn over time (the volume was restored with the same amount of liquid that was removed) and diclofenac concentration was accessed by spectroscopy UV-Vis at 276 nm (maximum absorbance for diclofenac). As the diclofenac has a maximum absorbance at 276 nm, approximately, in aqueous solution, the kinetics results were obtained for this fixed wavelength. Physical essays were performed in order to characterize the cellulosic fibrous structures using ISO 536 and 534. The structures were produced according to ISO standard. Structures were produced with 40, 60 and 120 g/m<sup>2</sup> grammage. Structural and physical analysis and morphological characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S-2700, operated at 20 kV). The samples were gold covered by cathodic spraying. The structures were characterized in the form of films and also as gels. To maintain the porous structure for SEM analysis samples were immersed in a solution of glutaraldehyde 2,5% (w/w) overnight, treated with ethanol solutions of increasing concentration, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% and 100% (v/v), during 10 minutes, in order to replace water with ethanol. Finally, the samples are dried by CO<sub>2</sub> Critical Point Drying method, using EMS K850 Critical Point Drier equipped with thermo-electronic heating and adiabatic cooling and temperature control of +5°C cooling and +35°C during heating. The samples are placed in the pressure chamber. This chamber is pre-cooled and is immediately filled with liquid CO<sub>2</sub> from gas cylinder, witch as a critical point at 31°C and 1072 psi. It is heated to just above the critical temperature, reaching the critical pressure, at work conditions around 1500 psi and 35°C. Films with were obtained from homogenized suspensions of NFC and BC with a basis weight of around 40 g/m<sup>2</sup> using vacuum filtration and a filter paper, from FiltresRS. After the water had been drained, the upper side of the film was placed in metallic discs with the diameter of 98mm. Thereafter, a stacking of disc, film, filter paper and blotting paper, was prepared and pressed at 1.45 MPa for 5 minutes, using a procedure similar to paper production (SCAN-CM 64:00). The filter papers were carefully removed and the cellulose films were dried overnight, adhering to the metallic discs, using perforated metallic rings to obtain tension, applied at the edge of the sheets in order to prevent the films from shrinking. According to ISO 187:1990, the structures were dried under tension in conditioned atmosphere of 23°C and 50 % of relative humidity. Statistical analysis of the data, the calculation of porosity and density of the structures was done using the spreadsheet Excel. The contact angle of the cellulose based structures was determined using Scan 20. For each analysed sample water droplets were positioned on different locations of the surface. The contact angles, droplet volumes and droplet base diameters were obtained using the average of three measurements. The morphology of the fiber networks and the corresponding diameters of the fibers and pores were investigated using scanning electron microscope images. Image analysis was done using the vector placement method, Image J, Diameter J and Espirit 1.9, from Bruker. The computer simulation of the 3D

materials was done using a computational model developed and implemented in Matlab®. The results were organized using decision/regression trees using the tree function from R®, with the settings and computational experient plan presented in the previous publications [14-17].

## Results and Discussion

Table 1 identifies the DDS made from NFC, CB and CMC and in Figure 1 presents a SEM image of the DDS made from NFC coated with alginate (a) and the 3D NFC network made from cellulose nanofibrils b) in the right side image.

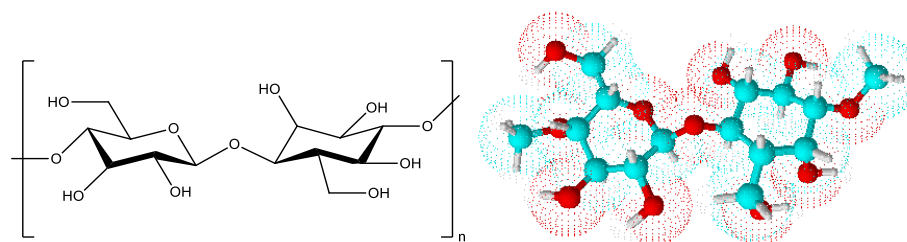
**Table 1.** Cellulose based DDS.

DDS	Cellulose
DDS_NFC_1	NFC
DDS_BC_2	BC
DDS_CMC_3	CMC

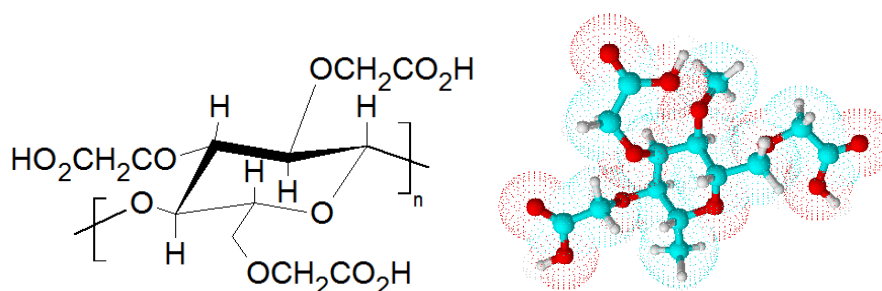


**Figure 1.** a) SEM image of DDS made from NFC (30X). b) SEM image of NFC structure inside the DDS (15000X)

Nanofibrilated cellulose characterization was done using SEM images and the nanofibrils had average diameters below 100 nm. Figure 2 are 2D and 3D representation of cellulose monomer and polymer molecules and figure 3 is a representation of carboxylmetil cellulose (CMC) illustrating the presence of different functional groups for cellulose and CMC.



**Figure 2.** 2D and 3D Cellulose polymer molecules made with ChemSketch from ACD/Labs.



**Figure 3.** 2D and 3D carboxymethylcellulose (CMC) made with ChemSketch from ACD/Labs.

SEM images were analyzed using state of the art Image analysis softwares such as Esprit 1.9, from Bruker, and Diameter J, to measure the fibre and porous dimensions.

The same images were analyzed using different methods and the different results were compared. We could verify that the measurements are very dependent of the operators' choices and that it is very important to acquire the dimensions using the same criteria and have a systematic approach. The results indicate that the measurements of pore dimensions using the vector placement method were in agreement with the results obtained using the image analysis software. The software presents different pores dimension, based on different pores dimension definitions. For this work we have measured the pore length, pore width, average diameter, area equivalent diameter (defined as the diameter considering that the pore is a circumference), the x and the y projection diameter. Comparing the results obtained by the vector method with the other methods it was noticed that the average diameter value is similar to the x projection and the y projection, with a coefficient of variation around 5%. The image analysis software was used to obtain the distribution of the pores and the relationship between pore length and width. The results were obtained from the analysis of more than 400 pores using Esprit 1.9. These results demonstrate that the pores are not circumferences but have three important dimensions to be considered. After the SEM 2D fiber dimension characterization, the same 3D structures were simulated using our own 3D computational simulator. The computational simulation was performed using input data collected from the laboratory made structures, and output properties, such as porosity and porous dimensions, were compared to validate the method, in a similar way as presented in our previous publication [7]. Figure 7 shows an example of a Matlab image obtained with the simulator during the simulation of the 3D porous structure, where it can be visualized the xy plane of the porous structure, and an example of a fibre deposition. The computational

structures were characterized in term of xy porosity, global porosity and thickness, and the results showed that the 3D simulated structures are identical to the experimental structures.

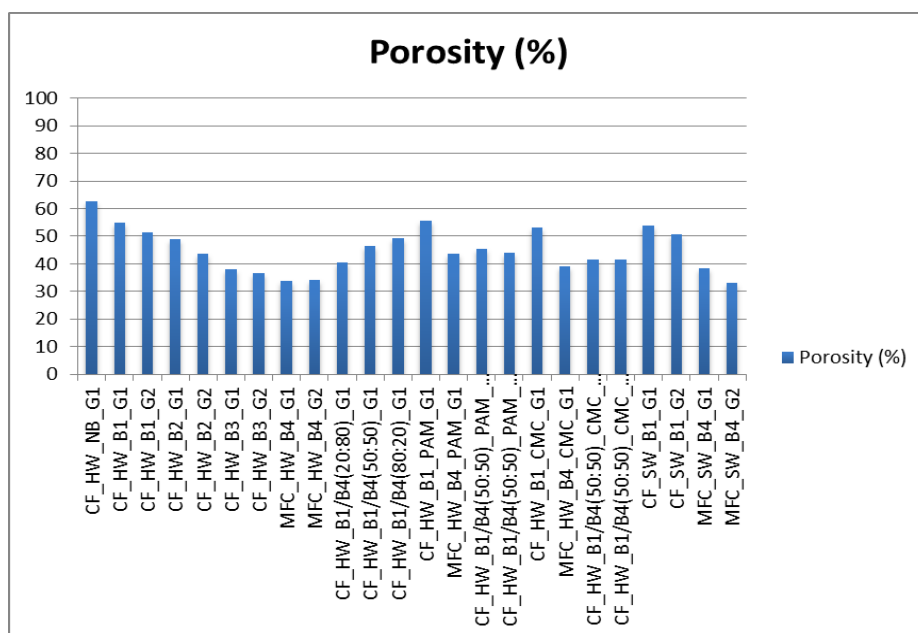


Figure 4. Porosity of cellulose structures made from different fibers with mechanical and chemical modifications

Results obtained for porosity of difereent cellulose structures are presented in figure 4 and indicate the possibility of changing the porosity using different fibre dimensions, mechanical treatment and chemical additives. More information about can be found in previous publications [22-26]. The simulated computational structures made in 3D have been saved using Matlab matricial structured files and have been used to obtain 3D information about porosity, pore distribution, relative bonded area, coverage, etc. Identical porosity and porous dimension were obtained for simulated structures.

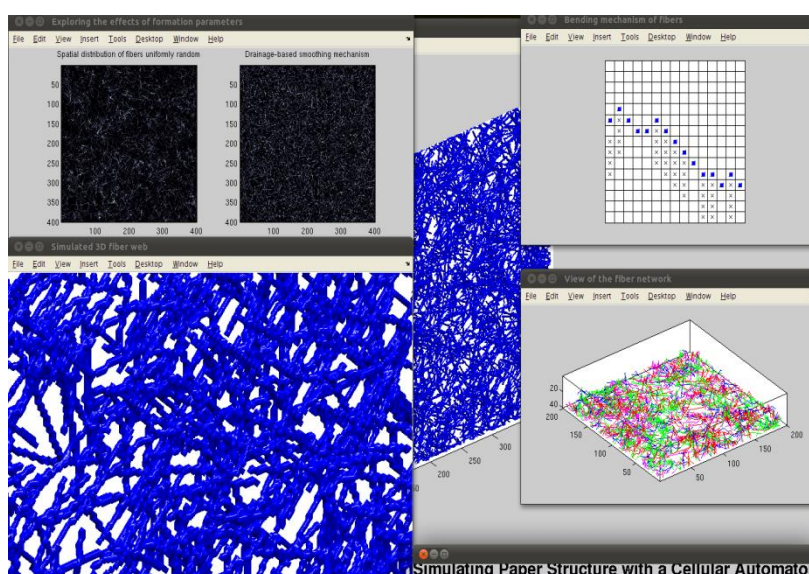
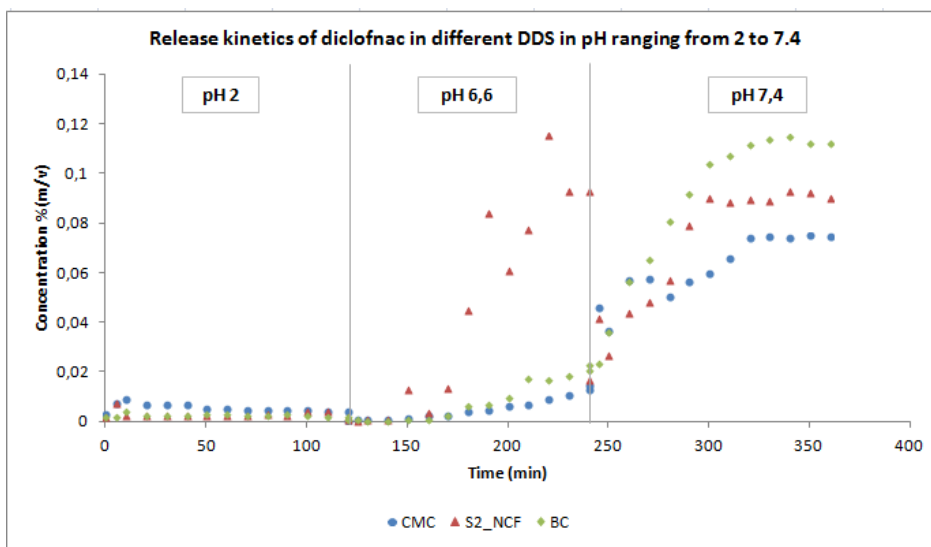


Figure 5. Computational simulation of a porous cellulose structure

The DDS structures were characterized experimentally and simulated using our own

computational simulator. The input parameters can be optimized according to the desired porosity and drug delivery kinetics. An example of the drug release kinetics, at different pH, for the DDS made from NFC, CB and CMC is presented in figure 6.



**Figure 6.** Kinetics of diclofenac release from different DDS made with a combination of polymers containing NFC, BC and CMC.

Contact angle measurements (table 3), and 3D experimental determination of liquid droplet penetration and spreading, obtained using a prototype equipment developed at UBI [27] have been incorporated as input parameters in decision/ regression tree and successfully used for the design of innovative DDS based on Cellulose materials (results to be presented in future publications).

**Table 3.** Contact Angle.

MFC Samples	Contact Angle
MFC_HW_B4_G1	43,90 ± 6,92
MFC_HW_B4_PAM_G1	54,78 ± 4,30
MFC_HW_B4_CMC_G1	41,35 ± 7,72

## Conclusions

In this work we have analyzed different DDS made from cellulose based materials and using SEM to quantify the fiber and pores dimensions, in the xy plane and out of the plane. We have also used a computational simulator to create the structures in 3D, using voxels, and we have compared the values obtained for pore dimensions in the plane for both, concluding that they are similar with an error of 5%. A systematic image analysis strategy for pore measuring is presented. The results indicate that the pores are not well defined using only one dimension; instead both the length, width and depth diameters need to be considered to have complete information. By comparing the results from the computational simulation and the experimental structures we are able to conclude that the computational simulation is a good tool to obtain 3D representations for the polymeric porous DDS.

We concluded that the internal pore size distribution can be modified and has an impact on the therapeutic molecule release kinetics. New drug delivery systems made from cellulosic based materials can be optimized regarding their porosity, porous dimension distribution and kinetics of drug release.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank the FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, for financial support for the Research Unit Fiber Materials and Environmental Technologies FibEnTec (Ref<sup>a</sup> UID/Multi/00195/2013) and RAIZ.

## **References**

- [1] S.E. Moulton, G.G. Wallace, 2014. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems., *J. Control. Release* 193:27-34. Doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.005.
- [2] S. Butun, F.G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, 2011. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 86:636-643. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.001.
- [3] R. Salehi, M. Irani, M.-R. Rashidi, A. Aroujalian, A. Raisi, M. Eskandani, 2013. Stimuli-responsive nanofibers prepared from poly(N-isopropylacrylamide-acrylamide-vinylpyrrolidone) by electrospinning as an anticancer drug delivery, *Des. Monomers Polym.* 16:515-527. Doi:10.1080/15685551.2013.771303.
- [4] W.H. de Jong WH and P.J. Borm, 2008. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 3(2):133-149. Doi:10.2147/IJN.S596.
- [5] M. Jorfi, E.J. Foster, 2014, Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 41719. Doi:10.1002/app.41719.
- [6] K. a Fitzgerald, M. Malhotra, C.M. Curtin, F.J. O' Brien, C.M. O' Driscoll, 2015. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery., *J. Control. Release.* 215:39-54. Doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- [7] J.M.R Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal and R.M.S Simões, 2011. Three dimensional modeling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, Wiley-vch 42(5): 370-374. ISSN: 0933-5137. ISI Accesion Number: CCC: 000290455700006.
- [8] J.M.R. Curto, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2015. Optimization of polymeric nanomaterials for biomedical applications using computational simulation. In *Proceedings of the 3rd Imagenano: Nanospain BioMed*, Bilbao, Spain.
- [9] J.M.R. Curto, N.V.D.F. Martins, J. S. Ferreira, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. "The challenge of using 3D Computational Simulation to develop 3D Drug Delivery Systems made from nano Polymeric Porous Materials", in *Proceedings of Nanoscience and Nanotechnology International Conference: NanoPt 2016 International Conference*, 16 to 19 of February 2016, International Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal.
- [10] M. Jorfi and E.J. Foster, 2014. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 41719.
- [11] Kamel, S., 2008. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *express Polymer Letters* 11(2):758-778.
- [12] S. Butun, F.G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, 2011. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 86:636-643.

- [13] T. Saito and A. Isogai, 2004. TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions *Biomacromolecules* 2004, 5, 1983-1989.
- [14] A. Isogai, T. Saito and H. Fukuzumi, 2011. TEMPO TEMPO-oxidized cellulose nanofibers *Nanoscale*, 3, 71. Doi: 10.1039/c0nr00583e.
- [15] J. S. Ferreira, J. M.R. Curto, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDSs) made from carboxymethyl cellulose (CMC). *Proceedings of the FibEnTech Symposium, UBI, Covilhã, ISBN 978-989-654-296-2, 89-92*.
- [16] I.F. Almeida, T. Pereira, N.H.C.S. Silva, F.P. Gomes, A.J.D. Silvestre, C.S.R. Freire, J.M.S. Lobo, P.C. Costa, 2014. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* 86(3):332-336.
- [17] J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, 2010. The fibre properties influence on a three dimensional paper model. In *Proceedings of the XXI TECNICELPA Conference and Exhibition / VI CIADICYP*.
- [18] Bhatnagar, A., & Sain, M. (2005). Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 24(12), 1259-1268.
- [19] Chakraborty, A., Sain, M., & Kortschot, M. (2005). Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforschung*, 59(1), 102-107.
- [20] G. Chinga-Carrasco, A. Miettinen, C.L.L. Hendriks, E.K. Gamstedt, M. Kataja, M., 2011. Structural Characterisation of Kraft Pulp Fibres and Their Nanofibrillated Materials for Biodegradable Composite Applications. *Nanocomposites and Polymers with Analytical Methods*, 243-260.
- [21] C. Moser, M.E. Lindstrom and G. Henriksson, G., 2015. Toward industrially feasible methods for following the process of manufacturing cellulose nanofibers. *BioResources*, 10(2), 2360-2375.
- [22] J.M.R. Curto, 2012. 3D Computational Simulation and Experimental Characterization of polymeric stochastic network materials: Case studies in reinforced Eucalyptus office paper and nanofibrous materials. Ph.D. Thesis, Paper engineering, Universidade da Beira Interior, Portugal.
- [23] J.M.R. Curto, A.H. Hekmati, J.Y. Drean, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2011. Three dimensional polyamide-6 nanowebs modelling and simulation. In *Proceedings of the 11th World Textile Conference, Autex2011, Mulhouse, France, June, (2):639-643*.
- [24] J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, 2011. The Influence of Eucalyptus's and Reinforcement's Fibers Flexibility on Paper properties: experimental and 3D Paper Model evaluation. In *Proceedings of the 5th ICEP - International Colloquium on Eucalyptus Pulp held in May 9-12, Porto Seguro, Brazil*.
- [25] J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, 2011. The fiber properties influence on a three dimensional web model: reinforced office paper and cellulose nanowebs case studies. In *Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Computational Engineering and Experimenting, ACE-X2011, Algarve, Portugal (2011). Best Paper Award, Springer*.
- [26] E.L.T. Conceição, J.M.R. Curto, R.M.S. Simões, A.T.G. Portugal, 2010. Coding a simulation model of the 3D structure of paper. In *Proceedings of the 2th international symposium on computational modeling of objects represented in images, Comp Image 2010, USA. Springer-Berlin, Lecture Notes in Computer Science, vol.60 no.20: pp. 299-310. ISBN: 978-3-642-12711-3. ISI Document Delivery No.: BPJ99*.
- [27] J.M.R. Curto, A.O. Mendes, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, P.T. Fiadeiro, A.M.M. Ramos, R.M.S. Simões, M.J.S. Silva, 2015. Development of an Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets, in *Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design. Volume 70. Springer International Publishing, pp. 301-321. ISBN 978-3-319-19442-4*.

## **Design of nanomaterials for Biomedical applications using 3D Computational Simulation**

**J.M.R. Curto<sup>1,2</sup>, F.P. Morais<sup>1,3</sup>, R.M.S. Simões<sup>1</sup>, M.J. Santos Silva<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> FibEnTech, Fiber Materials and Environmental Technologies, Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> CIEPQPF - Chemical Process Engineering and Forest Products Research Centre, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Medicinal Chemistry Master Science Student, Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>4</sup> FibEnTech, Fiber Materials and Environmental Technologies, Department of Textile Science and Technology, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### **Abstract**

The development of polymeric porous materials in which it is possible to optimize porosity and pore distribution is very important for the development of materials for biomedical applications such as drug delivery systems and scaffolds. An innovative approach is used to develop nano polymeric fibrous materials with optimized porosity and thickness by using a materials computational model simulator to design a new material with optimized properties for biomedical applications. The material structure optimization is fundamental for obtaining functionalities like the transport of molecules or support for cell growing. The validated computational simulator is used to obtain the 3D structure and perform simulation studies to obtain the desired pore dimension and pore distribution. In this study structures made from nanofibers obtained from cellulose and from polyamide-6 and polyvinyl alcohol were produced. The nano cellulose structures were made using filtration and copolymer reticulation and the other polymeric structures were obtained by electrospinning, which is a technique that allows the creation of fibers with diameters down to nanoscale. Scanning electron microscopy was used to measure fiber dimensions, porosity and thickness of the structure (z dimension). A computational simulator was used to create 3D structures and build several scenarios where the fiber dimension and fiber flexibility were changed. The use of this computational simulation was used to have information about a large number of structures. From the one thousand computational experiments that were done it was possible to obtain structures with different porosities and pore distributions and select the ones to be made in the laboratory. The computational simulator has proven to be an efficient tool to help design porous structures, allowing the creation of optimized systems, capable to transport therapeutic molecules, or be used in regenerative tissue biomedicine.



## **Design of nano cellulose Drug Delivery Systems (DDS) using 3D Computational Simulation to solve anti-inflammatory “Diclofenac” stomach side effects**

F.P. Morais<sup>1,2</sup>, J.M.R. Curto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Master's Degree student in Medical Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> FibEnTech, Chemistry Dep., University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> CIEPQPF, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

### **Abstract**

The aim is to develop drug delivery systems (DDS) containing biocompatible nano scale polymers, such as nano cellulose, using an innovative 3D computational simulation approach to obtain the desired release kinetics. Drug Delivery Systems made from 3D nano structures containing nanofibrillated cellulose, bacterial cellulose and carboxymethylcellulose have been produced, characterized, simulated and optimized. The characterization of each structure was performed using ISO standards, scanning electron microscopy (SEM) and image analysis methods. In addition, all porous cellulosic materials were simulated using a validated computational simulator and optimized according to desired porosity and drug release profile. The porosity and distribution of pore size has an impact on the Drug Delivery release kinetics. Hence, the development of an experimentally validated computational simulator allowed the design of Drug Delivery Systems containing 3D nanocellulose matrices, with different Diclofenac release kinetics. After experimental validation, simulation studies were carried out, in order to study the influence of the input parameters, like fiber dimensions, on the most important output parameters, like porosity, pore size and pore distribution. In conclusion we were able to produce innovative Drug Delivery Systems that avoid the Diclofenac release in the stomach (pH 2) and release this anti-inflammatory in the gastrointestinal tract (pH 6.6) preventing the stomach mucous attack side effects.

**Keywords:** Bacterial Cellulose, Carboxylmethylcellulose, Diclofenac Controlled Release Kinetics, Drug Delivery Systems, Nanofibrillated Cellulose

## **Computational 3D nano cellulose Drug Delivery Systems for Medicinal Chemistry Innovative Pharmaceutics**

F.P. Morais<sup>1,2</sup>, J.M.R. Curto<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> FibEnTech, University of Beira Interior, Portugal

<sup>2</sup> Dep. Química, UBI, Av. Marques d'Ávila e Bolama, 6200-01 Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> CIEPQPF, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

### **Abstract**

The use of Drug Delivery Systems has become very important for the pharmaceutical industry because of the numerous advantages such as the possibility of reducing the frequency of administrations, improving the stability of some drugs, reducing adverse effects, decrease properties of membrane crossing and barriers in the body, among others. The main goal of this work is the development of new porous materials from natural biocompatible materials, such as cellulose, using advanced computational tools to optimize the 3D porosity and control the release kinetics of the therapeutic molecule. In Medicinal Chemistry, the optimization of the structural properties of these DDS is determinant to reach the desired functionalities. So, the identification of the properties of the micro- and nano-cellulose fibers, and of the structures formed by them, which most influence the properties of the porous system is determinant in applications such as transport and controlled release of therapeutic molecules. In this way, the computational models proved to be tools of great potential to improve the efficiency of DDS, because they were able to predict the structure of these systems without the need for extensive laboratory experiments. The development of an experimentally validated computational simulator allowed us to design new optimized materials with 3D nano cellulose matrixes, with different release kinetics. In conclusion, it is possible to obtain from natural biocompatible polymeric materials, such as nano cellulose, a versatile class of materials used in the development of innovative Drug Delivery Systems.

**Keywords:** Drug Delivery Systems; Nano cellulose; Computational 3D Simulation; Controlled Release Kinetics



# Computational 3D Nano cellulose Drug Delivery Systems for Medicinal Chemistry Innovative Pharmaceuticals

Flávia P. Morais<sup>1</sup>, Joana M.R. Curto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies, Departamento de Química, Universidade da Beira Interior

## Abstract ...

The use of Drug Delivery Systems has become very important for the pharmaceutical industry because of the numerous advantages such as the possibility of reducing the frequency of administrations, improving the stability of some drugs, reducing adverse effects, decrease properties of membrane crossing and barriers in the body, among others. The main goal of this work is the development of new porous materials from natural biocompatible materials, such as cellulose, using advanced computational tools to optimize the 3D porosity and control the release kinetics of the therapeutic molecule. In Medicinal Chemistry, the optimization of the structural properties of these DDS is determinant to reach the desired functionalities. So, the identification of the properties of the micro- and nano-cellulose fibers, and of the structures formed by them, which most influence the properties of the porous system is determinant in applications such as transport and controlled release of therapeutic molecules. In this way, the computational models proved to be tools of great potential to improve the efficiency of DDS, because they were able to predict the structure of these systems without the need for extensive laboratory experiments. The development of an experimentally validated computational simulator allowed us to design new optimized materials with 3D nano cellulose matrixes, with different release kinetics. In conclusion, it is possible to obtain from natural biocompatible polymeric materials, such as nano cellulose, a versatile class of materials used in the development of innovative Drug Delivery Systems.

## Materials and Methods ...

Table 1 - Materials used for the study.

Materials	2D structure	3D structure
NFC		
BC		
CMC		
Alginate		
Diclofenac		

## Drug Delivery Systems ...

Formulation or device which allows the introduction of a therapeutic substance in the body, improving their safety and efficacy through rate control, time and place of release of the drug on body.

**Alginate:** undergoes hydration to create a kind of high viscosity hydrocolloid layer. This creates a diffusion barrier, reducing the migration of smaller molecules, ending the drug release kinetics to be controlled by the polymer membrane which has a specific permeability.

**Diclofenac:** a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), is widely prescribed and is not stable in the acidic environment of the stomach, being associated with gastrointestinal effects such as ulcerations and bleeding.

✓ The importance of optimization of the structural properties in the development of DDS to achieve the desired functionality is crucial. The 3D structure and porosity of a polymer system are critical to optimize the transport function and the release of distribution systems, so the 3D DDS structures can be obtained by computational simulation.

**Nanocellulosic materials:** such as carboxymethylcellulose (CMC), nanofibrillated cellulose (NFC) and bacterial cellulose (BC), have been rapidly developed in recent years as promising biomedical materials because of their excellent physical and biological properties, namely their biocompatibility, biodegradability and low cytotoxicity.

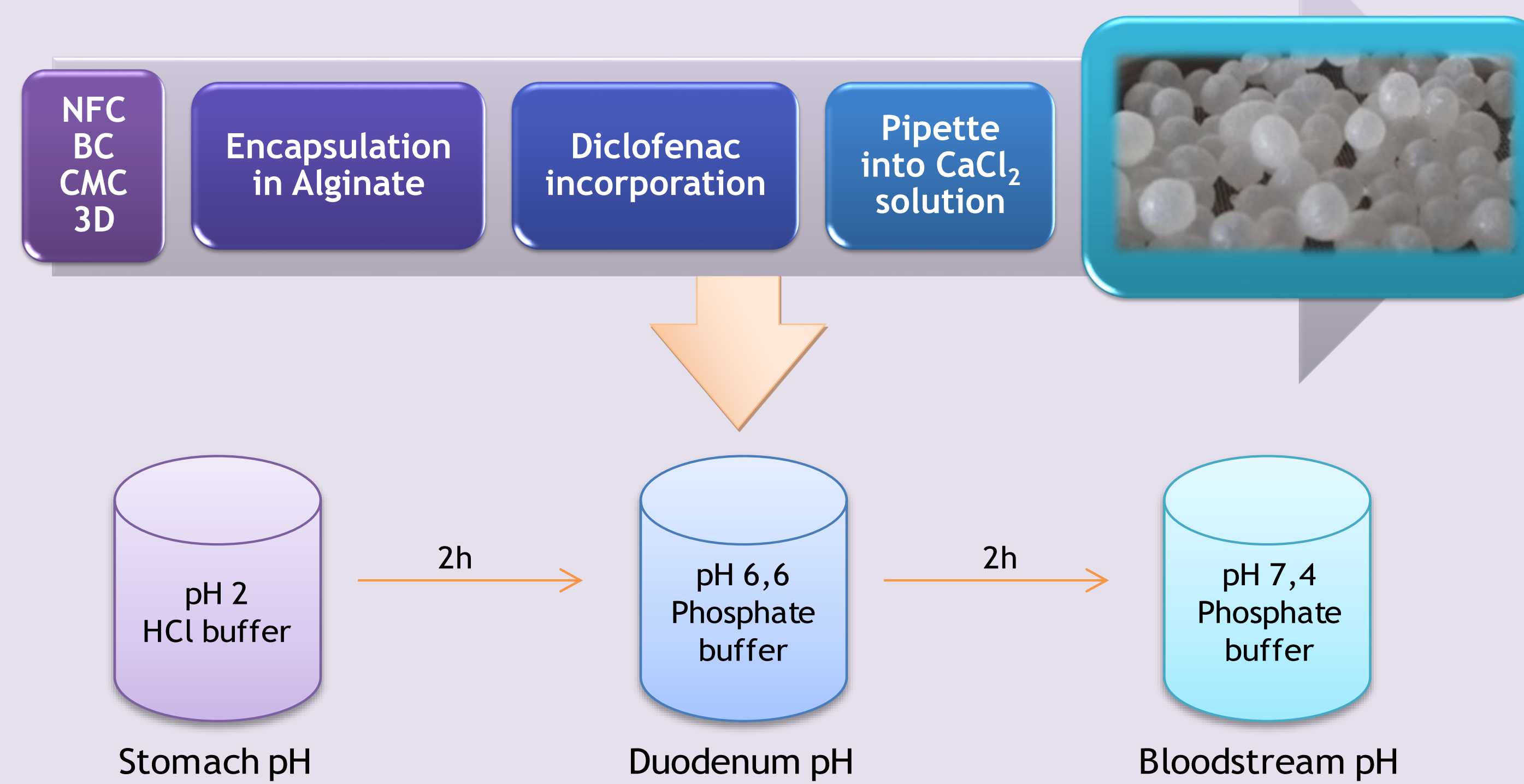


Figure 1 - Experimental scheme of the production of DDS and the kinetic studies of controlled release Diclofenac.

✓ To obtain the 2D and 3D structures the ChemDraw Ultra 12.0 program was used.

✓ Characterization of the structures by SEM and computational simulation using a simulator validated through MATLAB® software version 7.9 (R 2009b) (Curto et al. 2011).

## Results ...

### Structural characterization

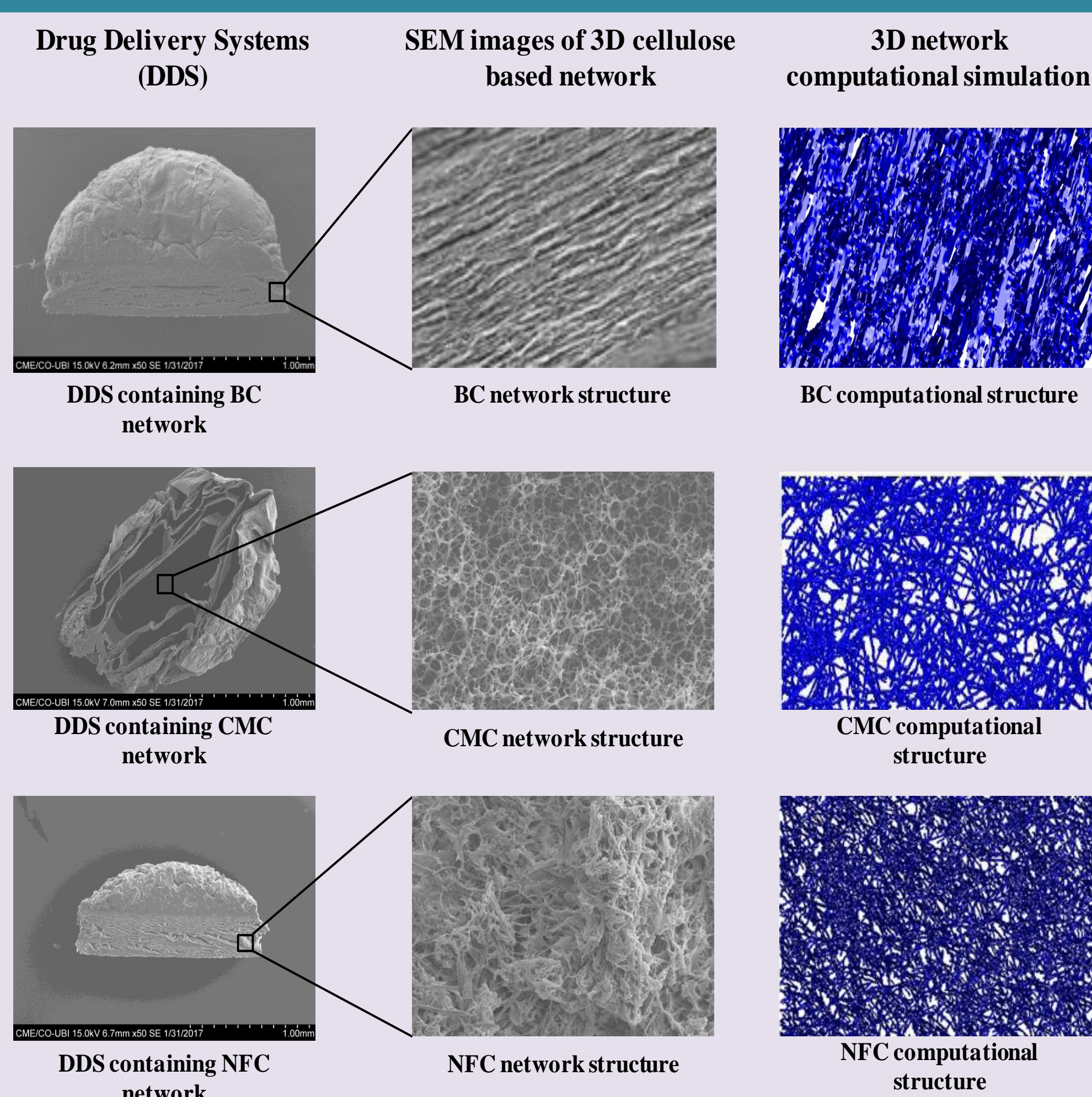


Figure 2 - Comparison of SEM 2D and Computational 3D Simulation results for the different cellulose derivatives (Curto et al. 2016).

### Diclofenac Kinetic Release Studies

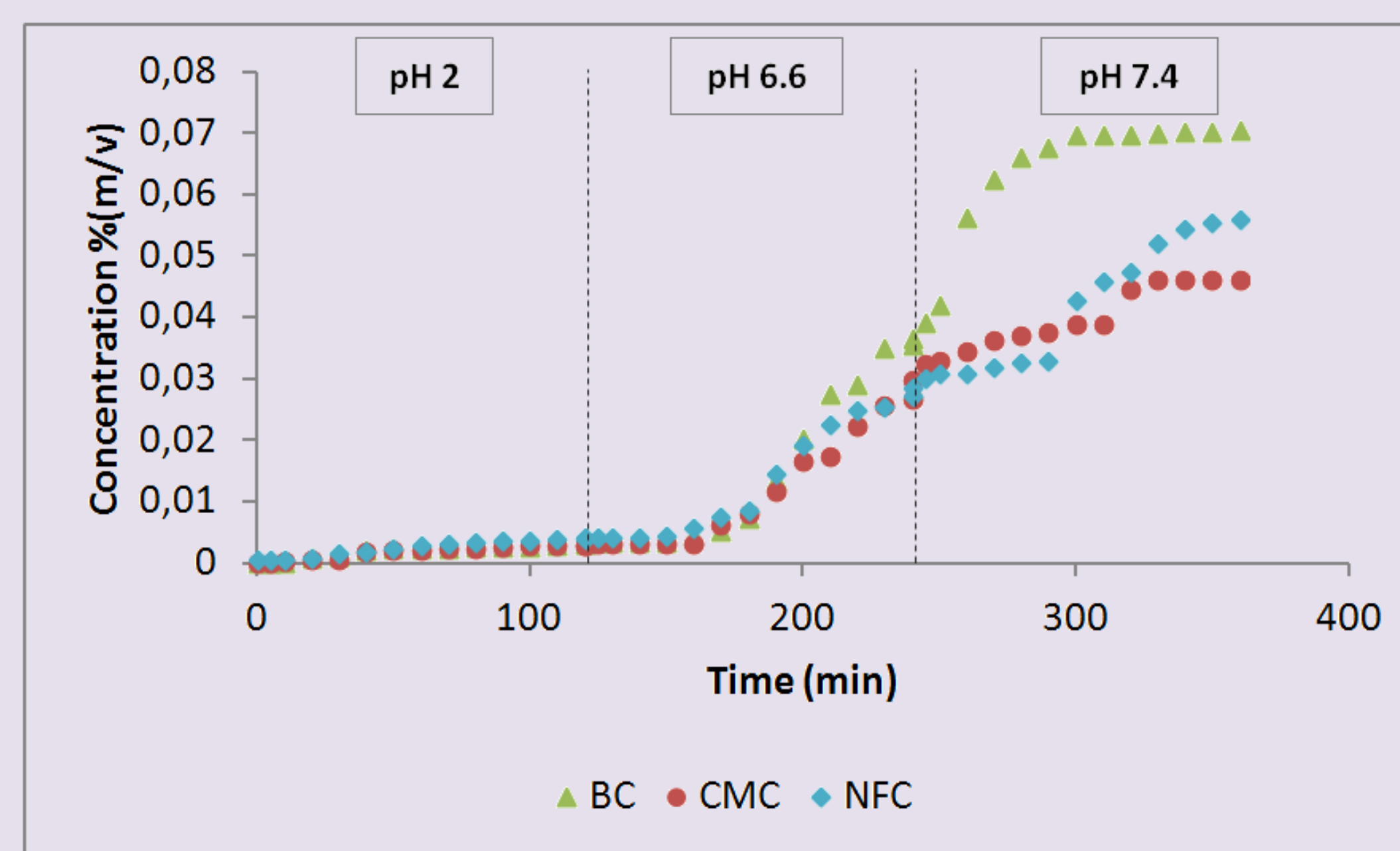


Figure 3 - Kinetics of Diclofenac release from different DDS made with a combination of polymers containing NFC, BC and CMC.



Figure 4 - DDS before (left) and after (right) the kinetic studies of Diclofenac release, resulting from the swelling of the 3D cellulose based polymeric matrix.

Table 2 - Results obtained from the weights of the DDS produced, before and after the kinetic studies, as well as the swelling index for each type of DDS used in the studies.

DDS	Weights (g)		Swelling index (%)
	Before studies	After studies	
BC	6,4200	9,3206	45,18
CMC	5,7000	8,3579	46,63
NFC	7,8400	8,8163	12,45

## Conclusions ...

- ✓ Validation was done using 3D simulations images and 2D SEM images (different surfaces).
- ✓ The simulation 3D structures have the same type of porous structure and values of surface porosity founded on experimental DDS.
- ✓ The computational simulations studied proved to be efficient for the production of new optimized porous structures, allowing the improvement of DDS.
- ✓ DDS containing different structural units (NFC, BC and CMC) have different release kinetics.
- ✓ Diclofenac when inserted into a polymeric DDS with nano cellulose 3D matrix is released controlled at pH above stomach, i.e. pH of duodenum and bloodstream.

## References ...

- Owen A, Rannard S, Bawa R, Feng S-S. Interdisciplinary nanomedicine publications through interdisciplinary peer-review. *J Interdiscip Nanomedicine*. 2015;1(1):4-8. doi:10.1002/jin2.1.
- Jorfi M, Foster EJ. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *J Appl Polym Sci*. 2015;132(14):1-19. doi:10.1002/app.41719.
- Klerys A, Grochowicz M, Kosik P. Microporous and Mesoporous Materials The release of ibuprofen sodium salt from permanently porous poly ( hydroxyethyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate ) resins. *Microporous Mesoporous Mater*. 2015;217:133-140. doi:10.1016/j.micromeso.2015.06.009.
- Moulton SE, Wallace GG. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems. *J Control Release*. 2014;193:27-34. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.005.
- Kamel S, Ali N, Jahangir K, Shah SM, El-Gendy AA. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polym Lett*. 2008;2(11):758-778. doi:10.3144/expresspolymlett.2008.90.
- Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur Polym J*. 2014;59:302-325. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025.
- Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O'Brien FJ, O'Driscoll CM. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release*. 2015;215:39-54. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- Curto JMR, Conceição ET, Portugal a. TG, Simões RMS. Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. *Materwiss Werkstsch*. 2011;42(5):370-374. doi:10.1002/mawe.201100790.
- Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa V.L.D., Martins, N.V., Videria, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. & Silva, M.J.S., 2016. The importance of optimizing the 3D structure when developing cellulosic materials for medical applications: the case of drug delivery systems (DDS). XXIII Technicelpa - International Forest, Pulp and Paper Conference, 12-14 of October, Porto, Portugal.



## **Design of nano cellulose Drug Delivery Systems (DDS) using 3D Computational Simulation**

F.P. Morais<sup>1,2</sup>, J.M.R. Curto<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> FibEnTech, University of Beira Interior, Portugal

<sup>2</sup> Dep. Química, UBI, Av. Marques d'Ávila e Bolama, 6200-01 Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> CIEPQPF, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

### **Abstract**

An innovative 3D approach is used to develop and optimize structures when porosity is the relevant property, as is the case of porous materials used as drug delivery systems (DDS). The use of Drug Delivery Systems has become very important for the pharmaceutical industry because of the numerous advantages such as the possibility of reducing the frequency of administrations, improving the stability of some drugs, reducing adverse effects, among others. Starting from natural biocompatible cellulose based materials, the main goal is to develop new materials with optimized 3D porosity through computational tools since this is a fundamental process underlying many medicinal and biomedical applications and to control the release kinetics of the therapeutic molecule incorporated in the optimized systems.

For the design of innovative materials used in DDS, we propose a combination of 3D structures based on cellulose (nanofibrillated cellulose, bacterial cellulose and carboxymethylcellulose), where the porosity and pore distribution are controlled to obtain the desired kinetics of drug release. The characterization of each structure was performed using ISO standards, scanning electron microscopy (SEM) and image analysis methods. In addition, all porous cellulosic materials were simulated using our computational simulator and optimized according to desired porosity and drug release profile. We conclude that the internal distribution of pore size can be modified and has an impact on the release kinetics for the projected DDS. Hence, the development of an experimentally validated computational simulator allowed the design of new optimized materials with 3D nanocellulose matrices, with different release kinetics.

**Keywords:** Cellulose-based materials, 3D Computational Simulation, Drug Delivery Systems, Optimization of porous materials, Drug Release Kinetics





# Design of nano cellulose Drug Delivery Systems (DDS) using 3D Computational Simulation

Flávia P. Morais<sup>1,2</sup>, Joana. M.R. Curto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Master's Degree student in Medical Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies, Chemistry Dep., University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> Research Centre for Chemical Processes Engineering and Forest Products, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

## Abstract

The aim is to develop drug delivery systems (DDS) containing biocompatible nano scale polymers, such as nano cellulose, using an innovative 3D computational simulation approach to obtain the desired release kinetics. Drug Delivery Systems made from 3D nano structures containing nanofibrillated cellulose, bacterial cellulose and carboxymethylcellulose have been produced, characterized, simulated and optimized. The characterization of each structure was performed using ISO standards, scanning electron microscopy (SEM) and image analysis methods. In addition, all porous cellulosic materials were simulated using a validated computational simulator and optimized according to desired porosity and drug release profile. The porosity and distribution of pore size has an impact on the Drug Delivery release kinetics. Hence, the development of an experimentally validated computational simulator allowed the design of Drug Delivery Systems containing 3D nanocellulose matrices, with different Diclofenac release kinetics. After experimental validation, simulation studies were carried out, in order to study the influence of the input parameters, like fiber dimensions, on the most important output parameters, like porosity, pore size and pore distribution. In conclusion we were able to produce innovative Drug Delivery Systems that avoid the Diclofenac release in the stomach (pH 2) and release this anti-inflammatory in the gastrointestinal tract (pH 6.6) preventing the stomach mucous attack side effects.

Crosslinking agent (Alginate)

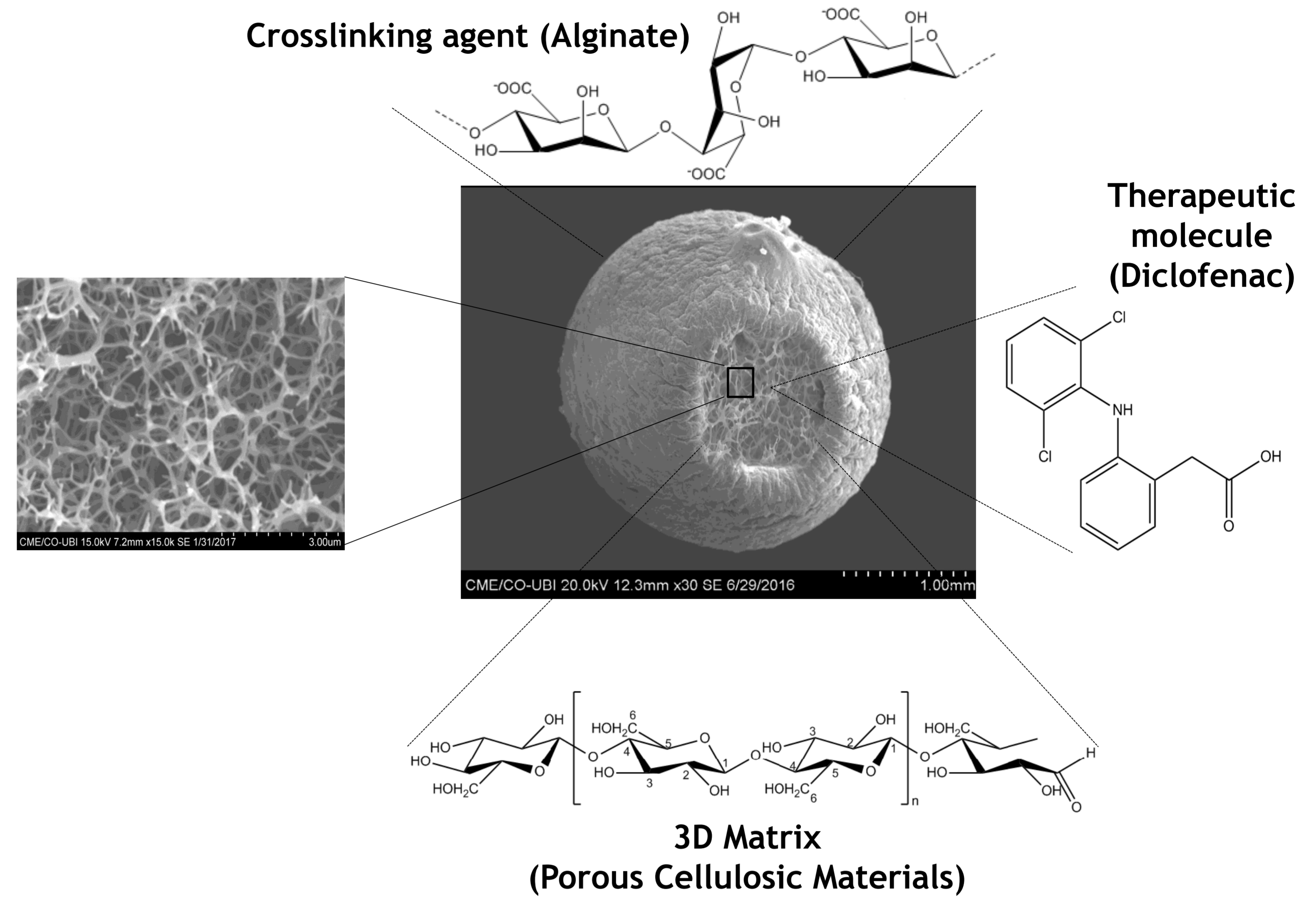
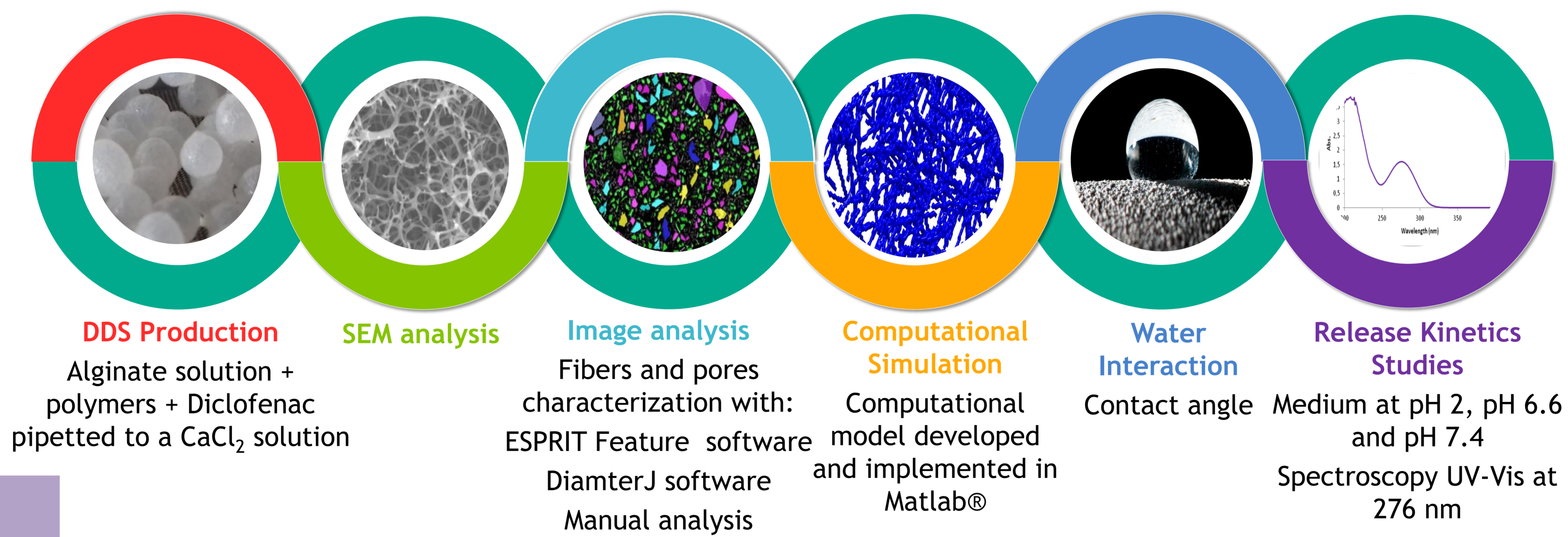


Figure 1. DDS produced consists of therapeutic molecule Diclofenac that induces adverse side effects in the stomach, a biocompatible polymer obtained from algae used as a crosslinking agent (Alginate) and porous cellulosic materials namely nanofibrillated cellulose (NFC) obtained by deconstruction of vegetable cellulose. Other porous cellulosic materials are also used, namely a nancellulose obtained from bacteria (BC) for comparison with NFC and a cellulose derivative (carboxymethylcellulose - CMC) used to increase the affinity for water.

## Materials and Methods



## Results

### Structural characterization

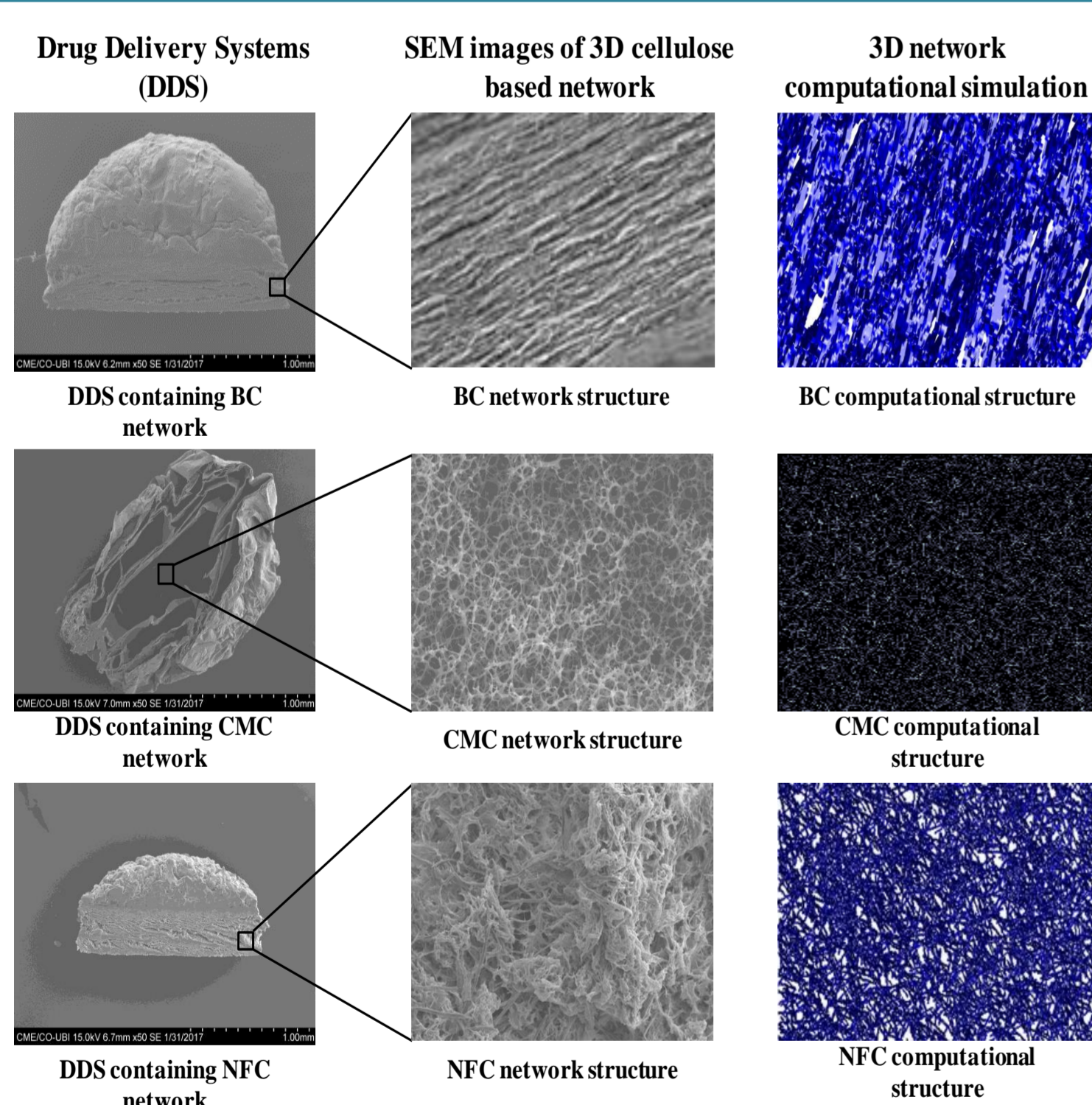


Figure 2. Comparison of SEM 2D and Computational 3D Simulation results for the different cellulose derivatives (Curto et al. 2016).

### Water Interaction

Table 1. Contact angles values measured in various polymeric structures (Curto et al. 2016).

DDS	Contact angle (°)
MFC DDS	50,82° ± 4,68
MFC DDS with CMC addition	47,31° ± 3,26
NFC DDS	65,28° ± 3,36

**NFC is more hydrophobic and CMC more hydrophilic.**

Cellulose samples with different scales and degrees of fibrillation, the interaction with water depends on several factors, which contribute differently to the total amount of -OH groups available on the surface.

### Diclofenac controlled release kinetics

#### Design of innovative DDS with optimization of the 3D NFC porous structure

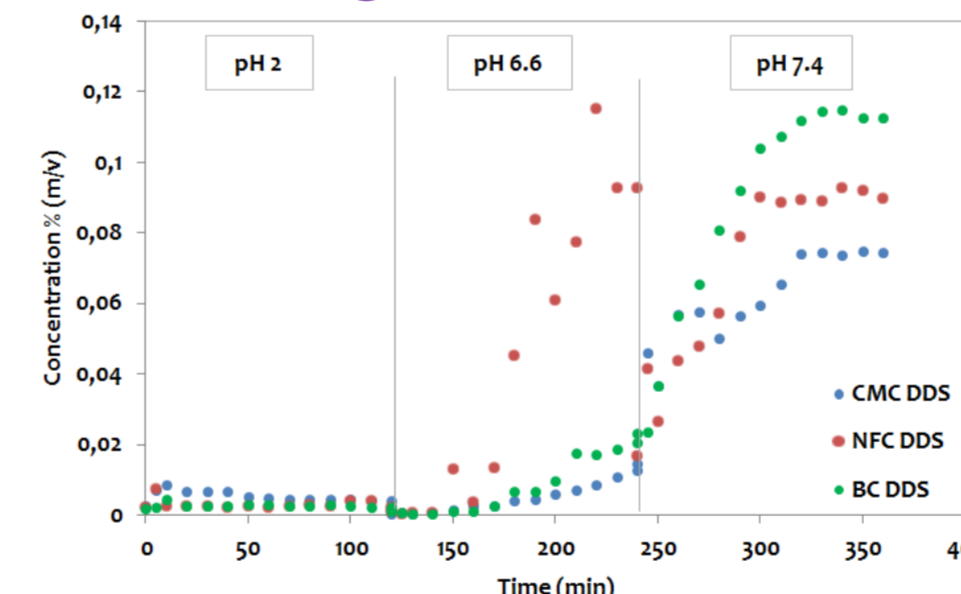


Figure 3. Kinetics of Diclofenac release from different DDS made with a combination of polymers containing NFC, BC and CMC (Curto et al. 2016).

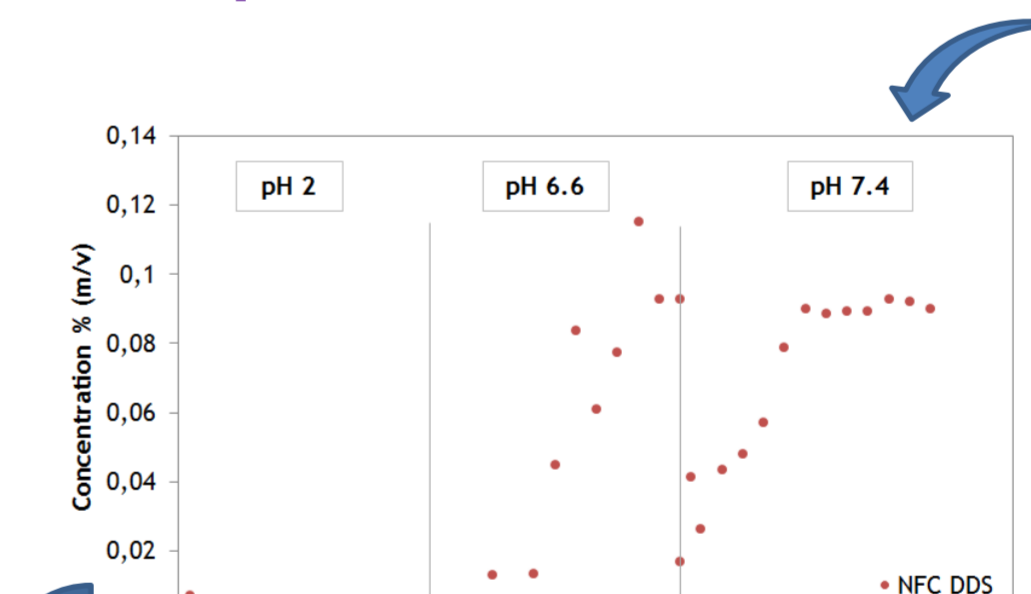


Figure 5. Kinetics of Diclofenac release from NFC DDS.

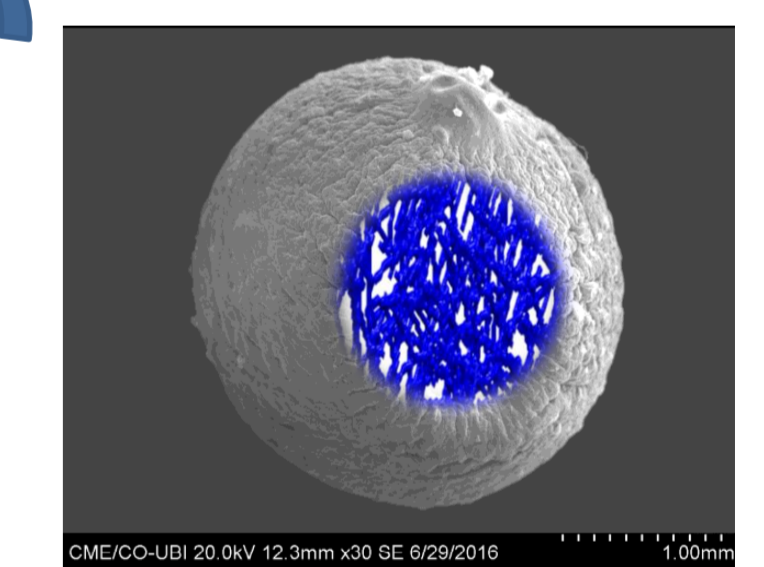


Figure 7. DDS with 3D NFC porous structure computationally simulated.

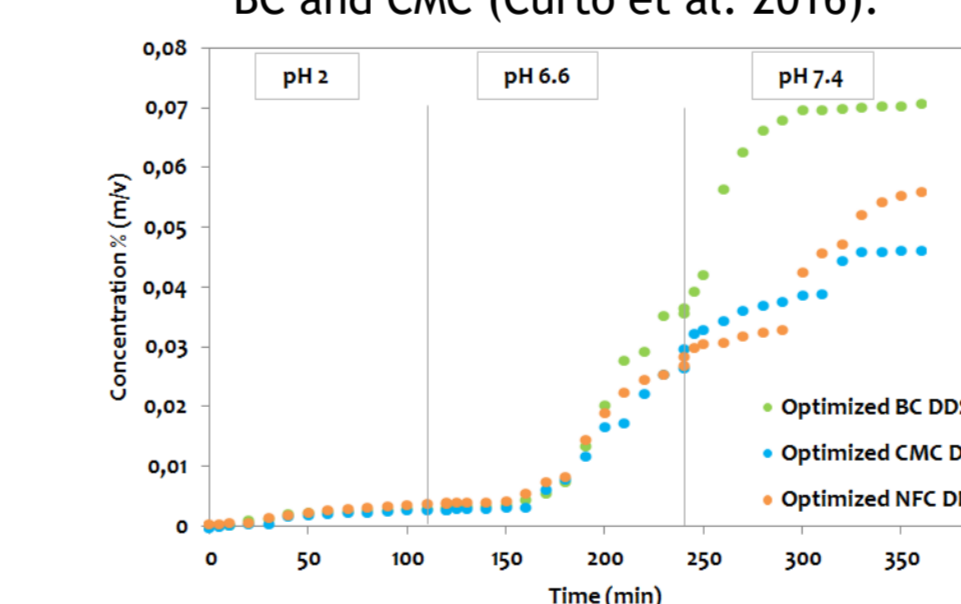


Figure 4. Kinetics of optimization Diclofenac release from different DDS made with a combination of polymers containing NFC, BC and CMC.

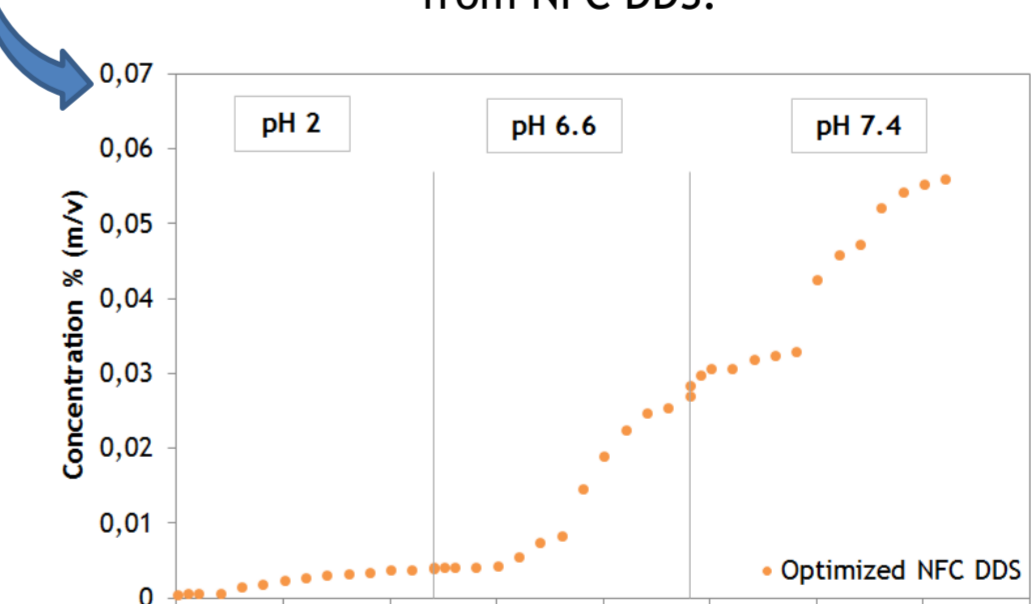


Figure 6. Kinetics of optimization Diclofenac release from NFC DDS with controlled water removal.

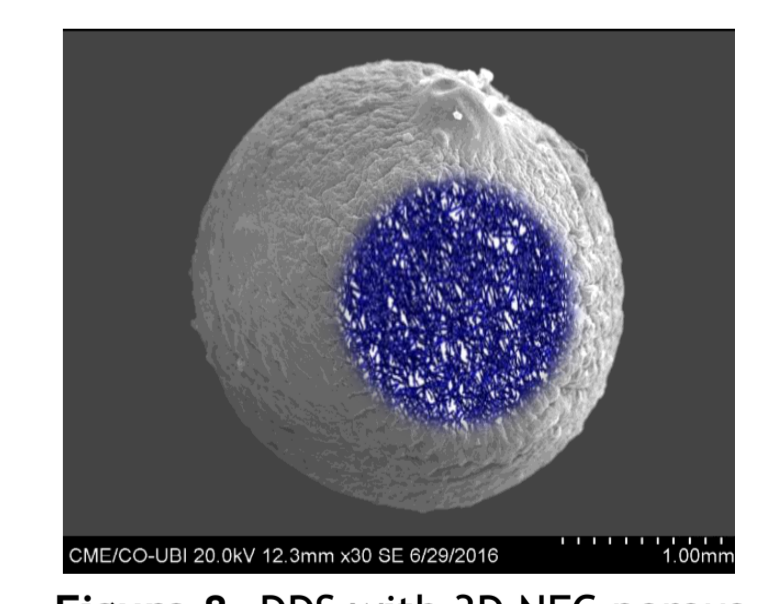


Figure 8. DDS with 3D NFC porous structure optimization.

## Conclusions

- ✓ 3D porous materials modelling and simulation has been used as a tool to obtain 3D DDS structures.
- ✓ Pore size distribution has been modified and has an impact on the therapeutic molecule release kinetics.
- ✓ Optimization of 3D porosity, pore dimension and distribution in DDS is determinant to drug transport and release.
- ✓ Biocompatible DDS have been developed to avoid Diclofenac release in the stomach (pH 2) and prevent the stomach mucous attack side effects.
- ✓ The incorporation of nanocellulose and functionalized cellulose, like CMC, have been used to control OH bonding and water affinity.
- ✓ Application of nano cellulose DDS for transdermal and oral applications, using a combination of porous biocompatible materials constitutes a promising medicinal chemistry research field to improve drug delivery.

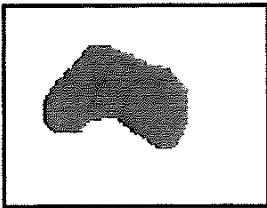
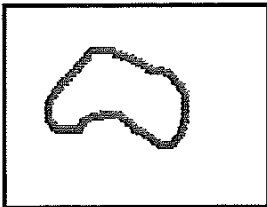
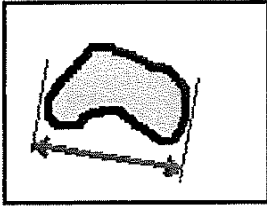
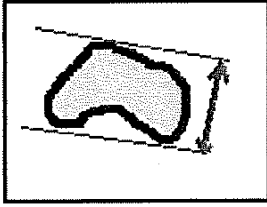
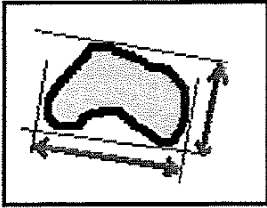
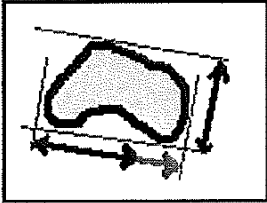
## References

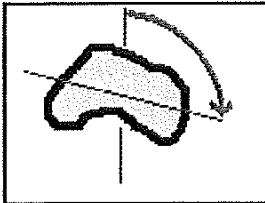
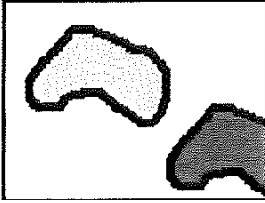
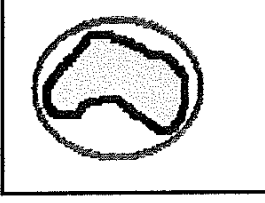
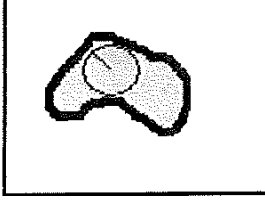
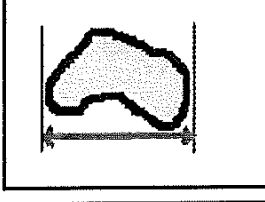
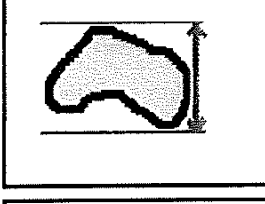
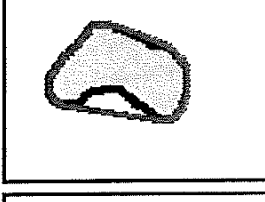
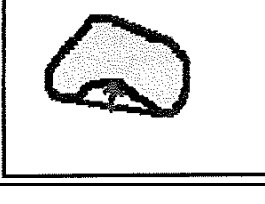
- D.T. Makhija, R. R. Somani. 2010. Improvement of GI Tolerance of NSAIDs Using Oral Prodrug Approach. *Der Pharmacia Lettre* 2 (2): 208-20. doi:http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html.
- F.P. Morais, J.M.R. Curto, 2017. Computational 3D Nano cellulose Drug Delivery Systems for Medical Chemistry Innovative Pharmaceutics. *V Jornadas de Química e Bioquímica 2016/2017*, 3 e 4 de Maio, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- J.M.R. Curto, A.O. Mendes, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, P.T. Fiadeiro, A.M.M. Ramos, R.M.S. Simões, M.J.S. Silva, 2015. Development of an Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets. in *Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design*. Volume 70. Springer International Publishing, pp. 301-321. ISBN 978-3-319-19442-4.
- J.M.R. Curto, A.P. Costa, M.E. Amaral, J.S. Ferreira, V.L.D. Costa, N.V. Martins, P.E.M. Videira, F.P. Morais, A.R.L. Sousa, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, M.J.S. Silva, 2016. The Importance of Optimizing the 3D Structure When Developing Cellulosic Materials for Medical Applications: The Case of Drug Delivery Systems (DDS). In *XXIII TECNICEPA - Conferência Internacional Da Floresta, Pasta E Papel*. Porto, Portugal.
- J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, 2011. The Influence of Eucalyptus's and Reinforcement's Fibers Flexibility on Paper properties: experimental and 3D Paper Model evaluation. In *Proceedings of the 5th ICEP - International Colloquium on Eucalyptus Pulp held in May 9-12, Porto Seguro, Brazil*.
- J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R.M.S. Simões, 2011. The fiber properties influence on a three dimensional web model: reinforced office paper and cellulose nanowebbs case studies. In *5th International Conference on Advanced Computational Engineering and Experimenting, ACE-X2011, Algarve, Portugal*. Best Paper Award, Springer.
- J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal and R.M.S. Simões, 2011. Three dimensional modeling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, Wiley-vch 42(5): 370-374. ISSN: 0933-5137. ISI Accession Number: CCC: 00029045700006.
- J.M.R. Curto, N.V.D.F. Martins, J. S. Ferreira, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. The challenge of using 3D Computational Simulation to develop 3D Drug Delivery Systems made from nano Polymeric Porous Materials. In *Proceedings of Nanoscience and Nanotechnology International Conference: NanoPt 2016 International Conference*, 16 to 19 of February 2016, International Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal.
- J.M.R. Curto, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2015. Optimization of polymeric nanomaterials for biomedical applications using computational simulation. In *Proceedings of the 3rd Imaginiano: Nanospain BioMed*, Bilbao, Spain.
- J. S. Ferreira, J. M.R. Curto, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDS) made from carboxymethyl cellulose (CMC). *Proceedings of the FibEnTech Symposium*, UBI, Covilhã, ISBN 978-989-654-296-2, 89-92.
- S.E. Moulton, G.G. Wallace, 2014. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems. *J Control Release*. 193:27-34. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.005.



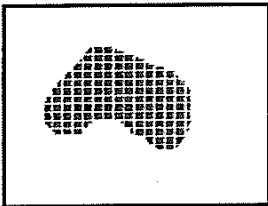
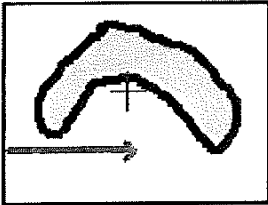
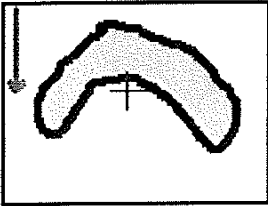
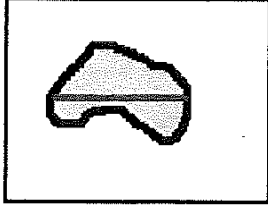
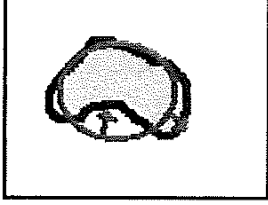
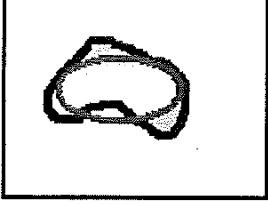
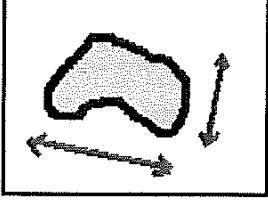
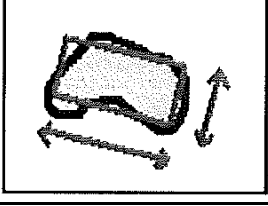
## Anexo B. Análise dos Poros

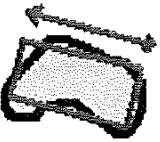



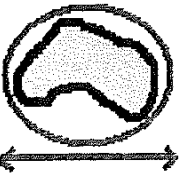

Tabela B.1 - Propriedades das nanopartículas em relação aos seus poros.

Propriedade	Poros	Descrição
Área		Área em micrómetros quadrados
Perímetro		Comprimento do perímetro em micrómetros
Comprimento		Maior dimensão (projeção) em micrómetros
Largura		Dimensão mais estreita (projeção) em micrómetros
Diâmetro médio		Diâmetro médio em micrómetros
Diâmetro de Feret		Variação do diâmetro em torno da partícula em micrómetros

Orientação		Ângulo de orientação do eixo: 0 a 180 graus, ou -1 se não estiver disponível
Na fronteira		1: na fronteira 0: no interior
Forma		Medida da forma: 1: partículas redondas <1: partículas irregulares
Raio máximo do círculo		Raio do círculo máximo inscrito, em pixels
Projeção X		Comprimento da projeção no eixo X, em micrómetros
Projeção Y		Altura da projeção no eixo Y, em micrómetros
Perímetro convexo		Perímetro diminuído pelo corte através de recortes, em micrómetros
Convexidade		Medida dos recortes em contorno: 1: partículas lisas <1: se houver indentações



Área em pixéis		Área numa contagem de pixéis
Centro X		Eixo X coordenada o centro de gravidade, em pixéis. Se a partícula for irregular, o centro pode ficar fora desta
Centro Y		Eixo Y coordenada o centro de gravidade, em pixéis. Se a partícula for irregular, o centro pode ficar fora desta
“Corda” horizontal		“Corda” horizontal mais longa, em pixéis
Circularidade		Medida adimensional de circularidade: 1: partículas redondas >1: partículas irregulares
Rugosidade		Medida adimensional de irregularidade em contorno: 1: partículas lisas >1: partículas rugosas
Relação de proporção		Relação adimensional do comprimento em relação à largura: 1: Partícula redonda >1: Partícula alongada
Relação de alongamento		Relação adimensional da largura da fibra em relação ao comprimento: 1: Partícula redonda <1: Partícula alongada 0: indisponível

Comprimento da fibra		Comprimento da fibra, em micrómetros. Caso a partícula possa ser tratada como fibra
Largura da fibra		Largura da fibra, em micrómetros. Caso a partícula possa ser tratada como fibra
Volume da esfera		Volume da partícula, em micrómetros cúbicos, tratada como uma esfera
Volume de esferoide		Volume da partícula, em micrómetros cúbicos, tratada como um esferoide (forma de um grão de arroz)
Área equivalente ao diâmetro		Diâmetro, em micrómetros, assumindo uma partícula circular
Enrolamento		Medida adimensional do enrolamento ou curvatura: 1: Partícula reta <1: Partícula enrolada

## **Anexo C. Normas ISO**

### **C1. Norma ISO 5269/1**

Após a produção das folhas segundo esta norma, utilizando um formador de folhas, estas têm de se submeter a um processo de prensagem. Este processo consiste em empilhar papel mata-borrão com as folhas produzidas numa placa de secagem repetida várias vezes. Após isto, estas placas juntamente com as folhas anexas do papel mata-borrão são separadas e colocadas de forma adequada num laboratório condicionado, para que as folhas permaneçam em contacto com as suas placas de secagem durante todo o período de secagem. Este laboratório condicionado apresenta uma circulação de ar adequada, capaz de manter as mesmas condições atmosféricas de temperatura (22°C) e humidade (50%).

### **C2. Norma ISO 5263/1**

As pastas com um teor em fibras absolutamente secas ou superior a 20% (m/m) devem ser embebidas em 1 ou 1,5 litros de água destilada a  $20\pm 5$  °C durante um tempo tabelado. Após isto, as pastas são colocadas num desintegrador apropriado com 2 litros de água a revoluções propriamente tabeladas, dependendo do tipo de pasta utilizada.

### **C3. Norma ISO 638**

Corta-se ou rasga-se a amostra da pasta em dimensões convenientes, tendo em conta o fim a que o ensaio se destina. Devem tomar-se precauções especiais na manipulação da pasta para evitar alterações de humidade. As amostras que foram conservadas em recipientes estanques ao vapor de água devem ser cortadas e pesadas rapidamente, a fim de reduzir ao mínimo qualquer variação de humidade.

Efetuem-se todas as pesagens com a precisão de 0,001g. Pesam-se cerca de 10g de pasta no pesa-filtros fechado, previamente seco e tarado. Após a pesagem abre-se o recipiente, coloca-se com a amostra e a tampa na estufa e aquece-se a  $105\pm 2$ °C durante um período suficientemente longo, até massa constante. Considera-se que a massa constante é obtida quando duas pesagens consecutivas não diferem entre si mais do que 0,1% da massa inicial do provete no estado húmido. O tempo de secagem entre duas pesagens consecutivas deve ser, pelo menos, igual a metade do tempo mínimo de secagem inicial. Depois da secagem, cobre-se o recipiente com a tampa e deixa-se arrefecer a amostra no exsiccador durante 45 min. Após o arrefecimento, igualizam-se as pressões de ar no interior e no exterior do pesa-filtros, entreabrindo e fechando a tampa rapidamente. Pesa-se o pesa-filtros e o seu conteúdo.

Devem-se efetuar duas ou mais determinações como se especifica no método de ensaio para os quais o teor de matéria seca é determinado.

O teor de massa seca,  $X$ , é dado em percentagem, pela fórmula:

$$X = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (C1)$$

em que:

$m_1$  é a massa, em gramas, da amostra antes da secagem;

$m_2$  é a massa, em gramas, da amostra após secagem;

Expressa-se o teor de matéria seca, como o valor médio de todas as determinações efetuadas em paralelo.

## **C4. Norma SCAN-CM 65:02**

Protonização: A pasta é suspensa em HCl (0,1 mol/L) a 1% durante 15 minutos. Seguidamente, a suspensão é filtrada num funil de Büchner, lavando continuamente com água desionizada e reciclando o filtrado, para tirar o excesso de ácido, até o filtrado atingir uma condutividade inferior a 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Condições do método de titulação: A titulação deve ser efetuada a temperatura ambiente. A variação da temperatura da titulação não deve exceder  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Agitar a amostra de pasta com um agitador magnético.

Avaliação da solução de NaOH: Adiciona-se 485 mL de água destilada, 5 mL de HCl (0,01 mol/L) e 10 mL de NaCl (0,05 mol/L) a um erlenmeyer e titula-se com NaOH (0,05 mol/L), determinando, assim, a concentração exata da solução de NaOH,  $C_1$ , a partir da forma-V do gráfico.

Titulação da pasta: A titulação decorre em duplicado e é colocada a amostra, num erlenmeyer, juntamente com 490 mL de água destilada e 10 mL da solução de NaCl (0,05 mol/L). Procede-se à titulação da suspensão, adicionando com uma bureta NaOH (0,05 mol/L). O volume adicionado é de 0,1 mL e o tempo entre adições é de 10 segundos a 30 segundos, anotando a condutividade após cada adição. A titulação encontra-se completa quando a suspensão atinge, normalmente, um pH de valor 10,5. A partir da curva de titulação, lê-se o volume,  $V_2$ , da solução de hidróxido de sódio consumida no 2º ponto de interseção. Por fim, decorre a filtração da suspensão, usando para tal um funil de Büchner com papel de filtro, o qual é primeiramente enxaguado com água destilada. O filtrado é seco segundo a norma EN 20638 e depois colocado, ainda com o papel de filtro, no exsiccador.

O teor de grupos acídicos totais é calculado a partir da seguinte fórmula:

$$X = \frac{C_1 \times V_2}{m} \times 100 \quad (C2)$$

Onde:

X é o teor de grupos acídicos totais, em  $\mu\text{mol/g}$ ;

$C_1$  é a concentração da solução de NaOH, em  $\mu\text{mol/L}$ ;

$V_2$  é o volume da solução de NaOH consumido no 2º ponto de interseção, em litros;

m é a massa seca da amostra, em gramas.

## Anexo D. Quantificação dos Grupos Acídicos Totais

### D1. Concentração Exata da Solução de NaOH

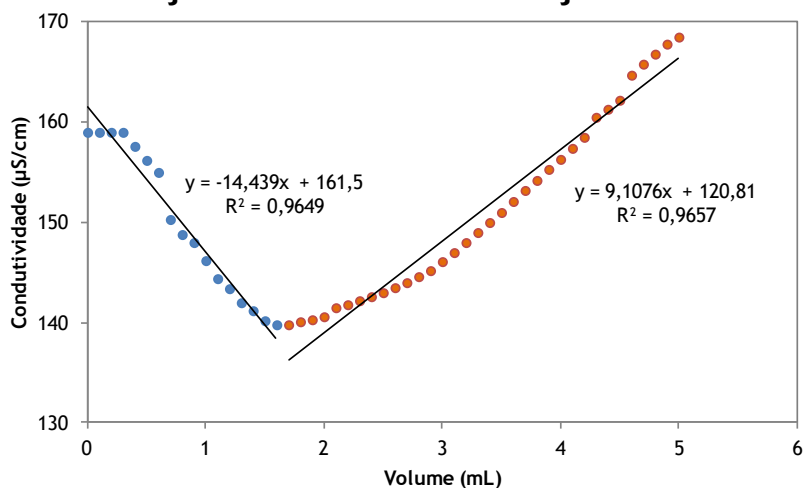


Figura D.1 - Gráfico resultante do 1º ensaio da determinação da concentração exata da solução de NaOH.

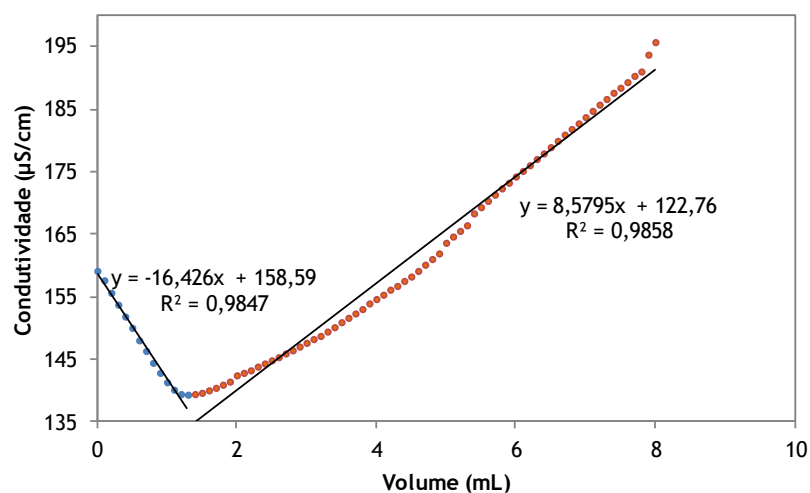


Figura D.2 - Gráfico resultante do 2º ensaio da determinação da concentração exata da solução de NaOH.

Tabela D.1 - Resultados obtidos para a determinação da concentração exata da solução de NaOH

Titulante	Ensaio	Concentração (mol/L)	Média	Desvio Padrão
NaOH	1	0,0289	0,0319	0,00421
	2	0,0349		

## D2. Celulose Kraft branqueada de *Eucalipto globulus*

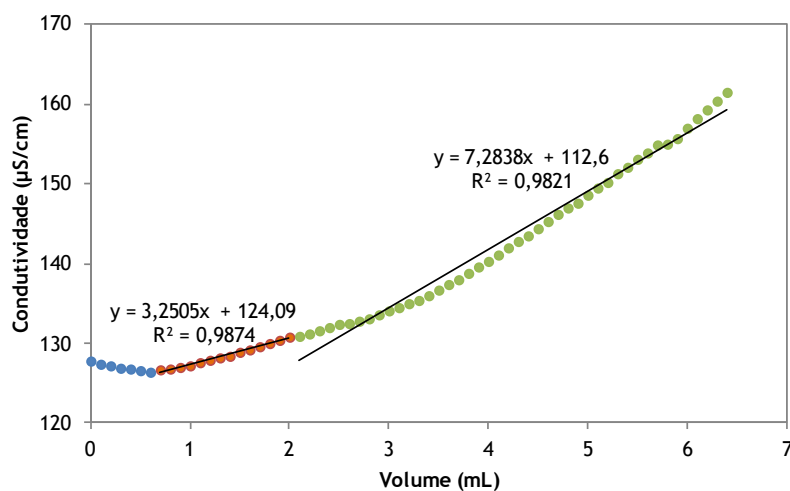


Figura D.3 - Gráfico resultante do 1º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a celulose Kraft branqueada de *Eucalipto globulus*.

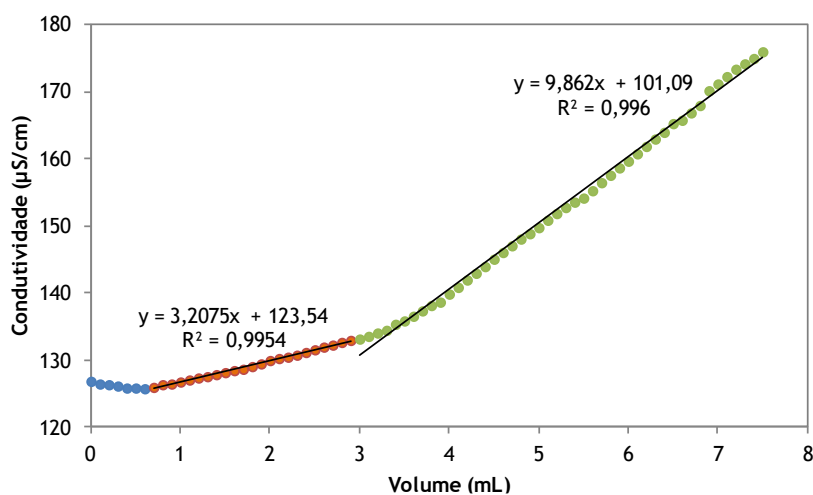


Figura D.4 - Gráfico resultante do 2º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a celulose Kraft branqueada de *Eucalipto globulus*.

Tabela D.2 - Resultados obtidos para a determinação do teor de grupos COOH para a celulose Kraft branqueada de *Eucalipto globulus*.

Pasta	Ensaio	Teor de grupos COOH (µmol/g)	Média	Desvio Padrão
Celulose Kraft branqueada de <i>Eucalipto globulus</i>	1	90,9	100	13,3
	2	110		

### D3. Otimização da norma SCAN-CM 65:02 para a Celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*

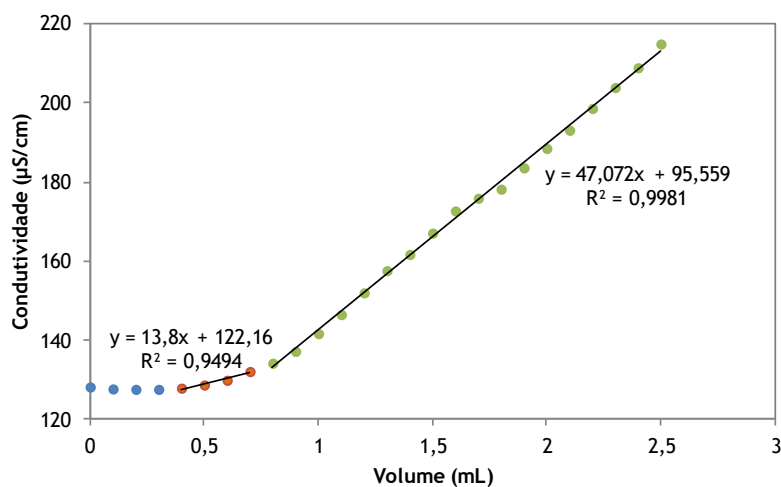


Figura D.5 - Gráfico resultante do 1º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*, com uma otimização da norma SCAN-CM 65:02.

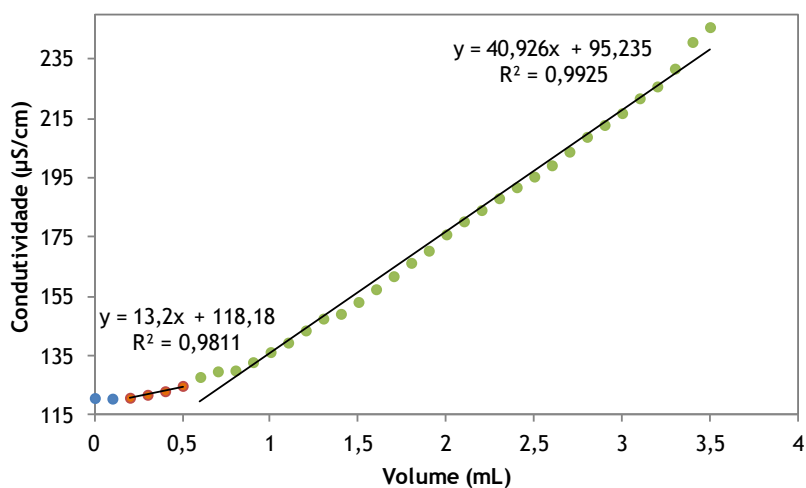


Figura D.6 - Gráfico resultante do 2º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*, com uma otimização da norma SCAN-CM 65:02.

Tabela D.3 - Resultados obtidos para a determinação do teor de grupos COOH para a celulose *Kraft* branqueada de *Eucalipto globulus*, com uma otimização da norma SCAN-CM 65:02

Pasta	Ensaio	Teor de grupos COOH (µmol/g)	Média	Desvio Padrão
Celulose <i>Kraft</i> branqueada de <i>Eucalipto globulus</i>	1	128	130	3,17
	2	132		



## D4. Celulose Nanofibrilada

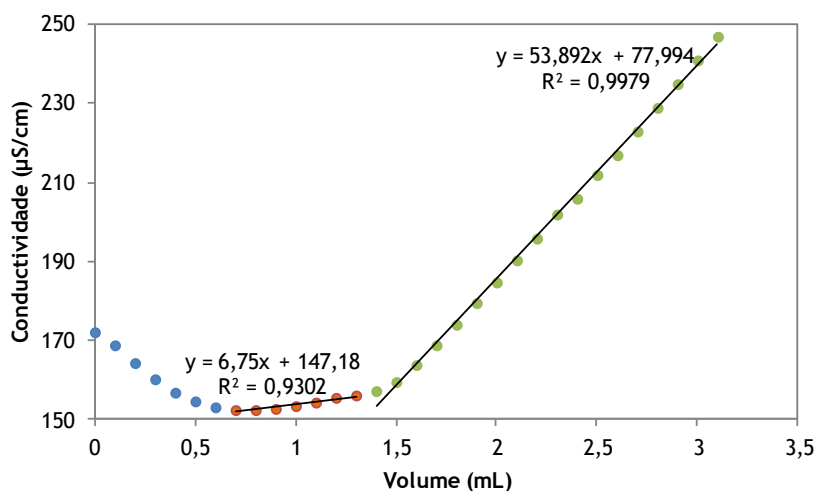


Figura D.7 - Gráfico resultante do 1º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a CNF.

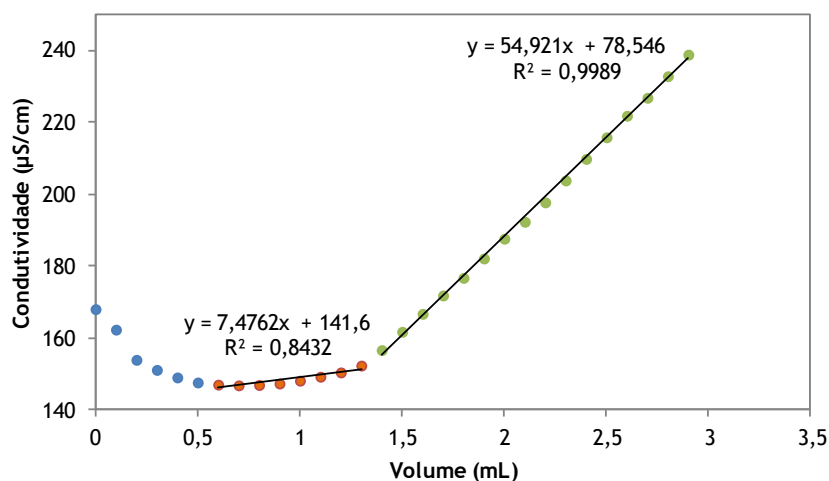


Figura D.8 - Gráfico resultante do 2º ensaio da determinação do teor de grupos COOH para a CNF.

Tabela D.4 - Resultados obtidos para a determinação do teor de grupos COOH para a CNF.

Pasta	Ensaio	Teor de grupos COOH (µmol/g)	Média	Desvio Padrão
Celulose nanofibrilada	1	377	328	68,9
	2	279		

## D5. Celulose Bacteriana

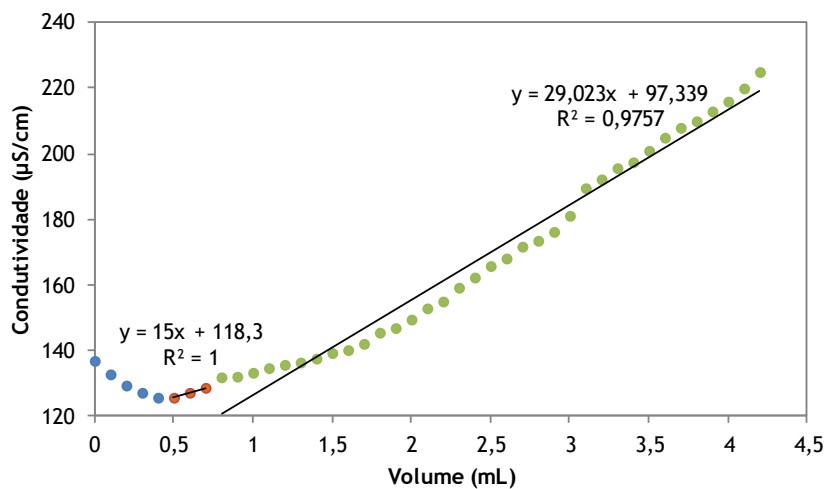


Figura D.9 - Gráfico resultante da determinação do teor de grupos COOH para a BC.

Tabela D.5 - Resultados obtidos para a determinação do teor de grupos COOH para a CB.

Pasta	Teor de grupos COOH ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )
Celulose bacteriana	175

## Anexo E. FTIR-ATR

### E1. Celulose *Kraft* branqueada de *Eucalypto globulus*

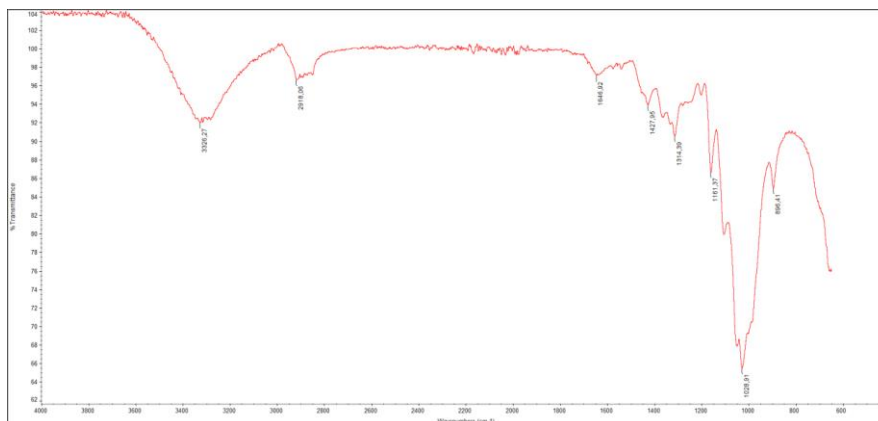


Figura E.1 - Espetro FTIR da celulose *kraft* branqueada de *Eucalypto globulus*.

### E2. Celulose Nanofibrilada

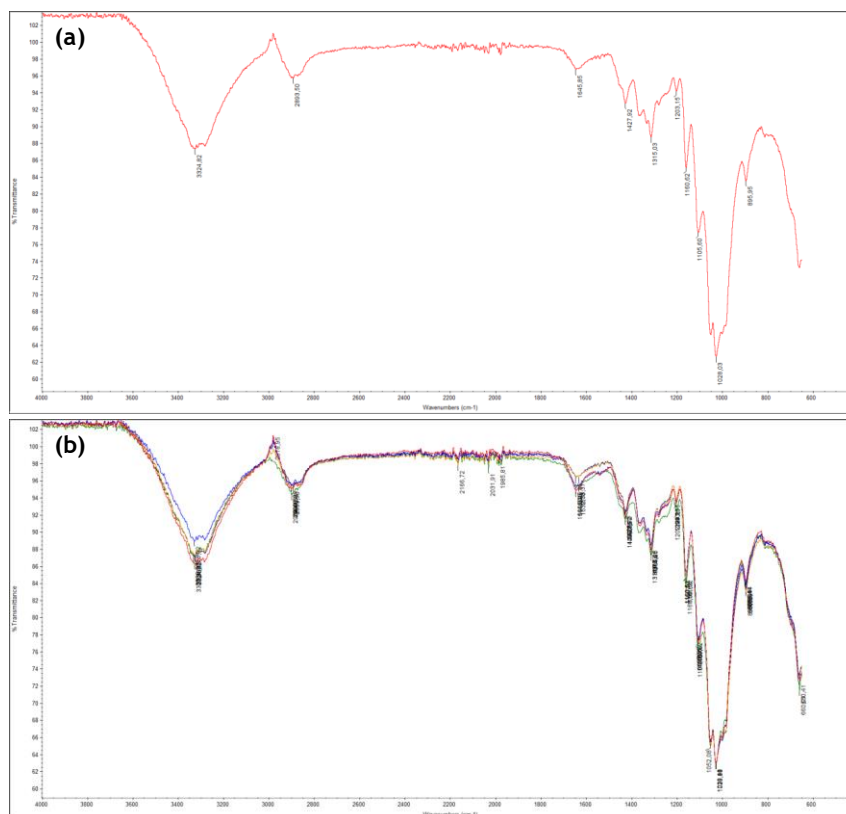


Figura E.2 - Espetro FTIR do filme de CNF (a) e vários espectros FTIR sobrepostos das replicas obtidas dos vários pontos analisados do filme de CNF (b).

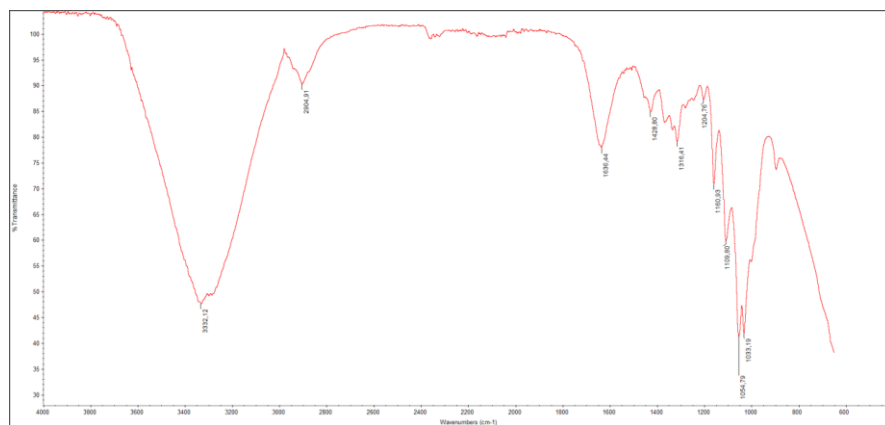


Figura E.3 - Espectro FTIR do gel de CNF.

### E3. Celulose Bacteriana

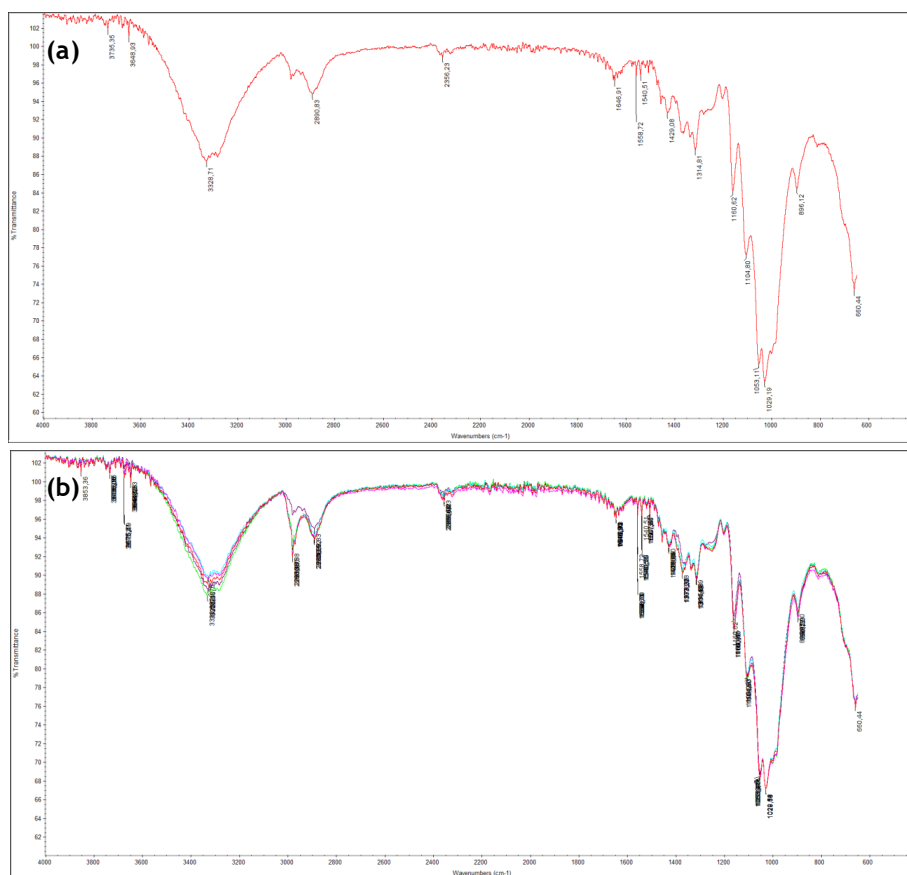


Figura E.4 - Espectro FTIR do filme de BC (a) e vários espectros FTIR sobrepostos das réplicas obtidas dos vários pontos analisados do filme de CB (b).

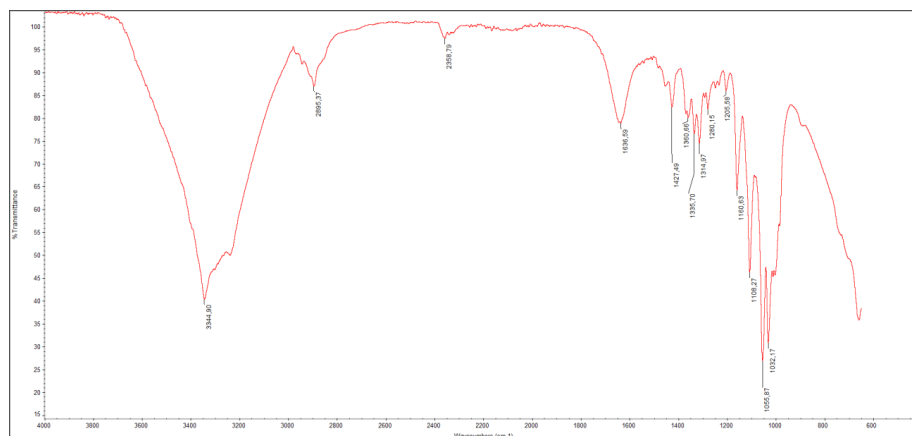


Figura E.5 - Espectro FTIR da membrana de CB.

## E4. Carboximetilcelulose

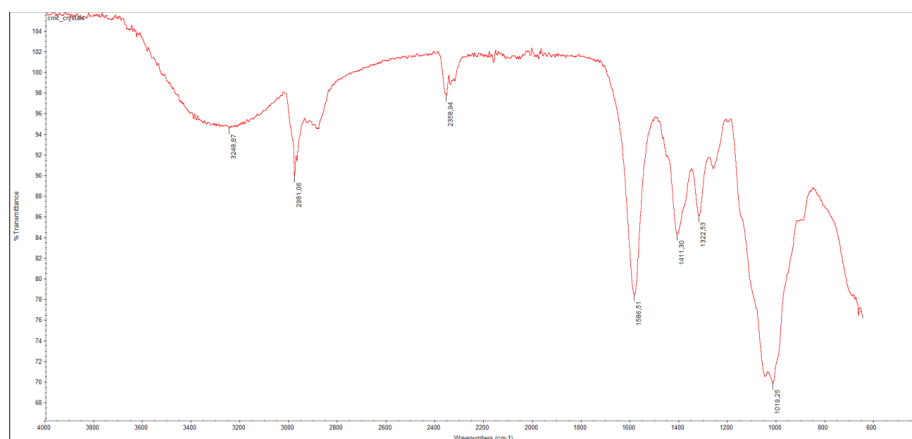


Figura E.6 - Espectro FTIR dos cristais de CMC.

## E5. Diclofenac

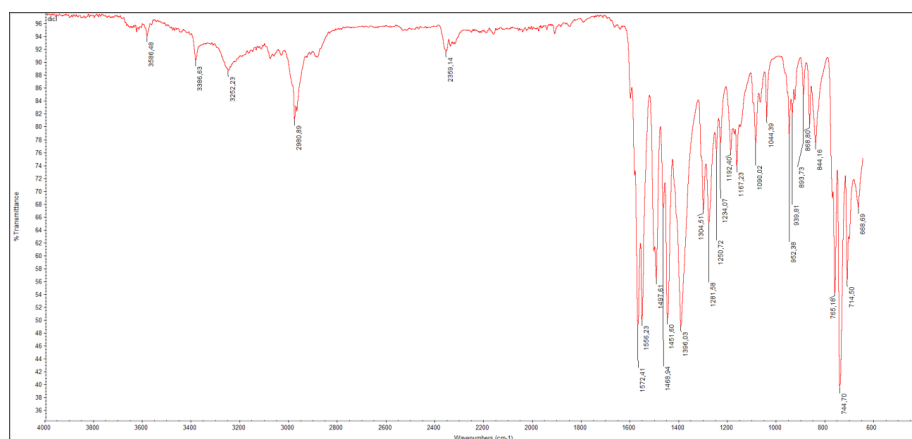


Figura E.7 - Espectro FTIR do fármaco Diclofenac.

## E6. DDS de Alginato Sem Materiais Celulósicos Incorporados

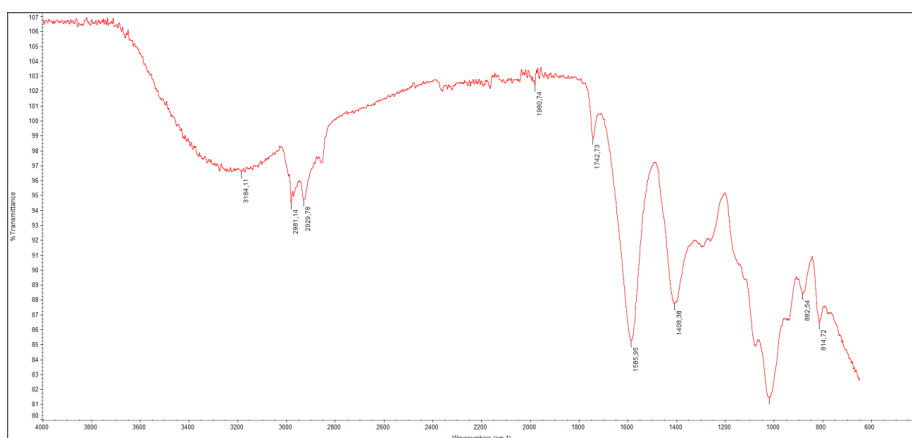


Figura E.8 - Espectro FTIR do DDS de Alginato sem materiais celulósicos incorporados.

## E7. DDS de Alginato com o fármaco Diclofenac Incorporado

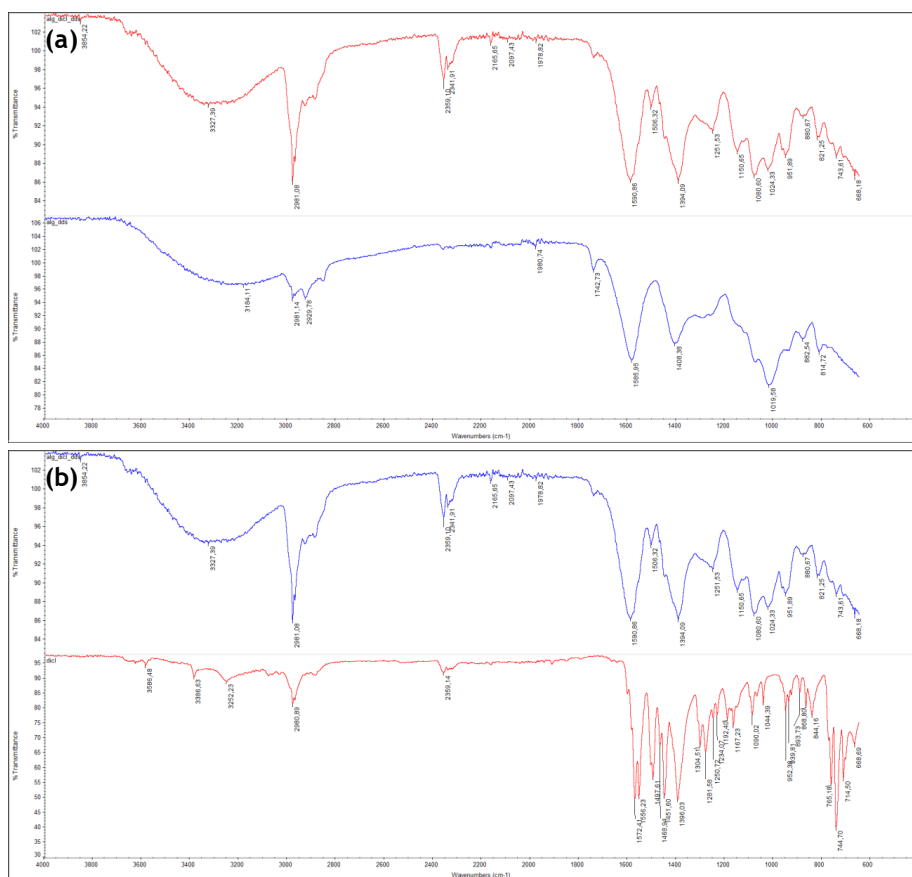


Figura E.9 - Comparação do espectro FTIR do DDS de Alginato com o fármaco Diclofenac incorporado (vermelho (a)/ azul (b)) com o espectro FTIR do DDS de Alginato sem materiais celulósicos incorporados (azul) (a) e com o espectro FTIR do Diclofenac (vermelho) (b).

## E8. DDS com CNF Incorporada

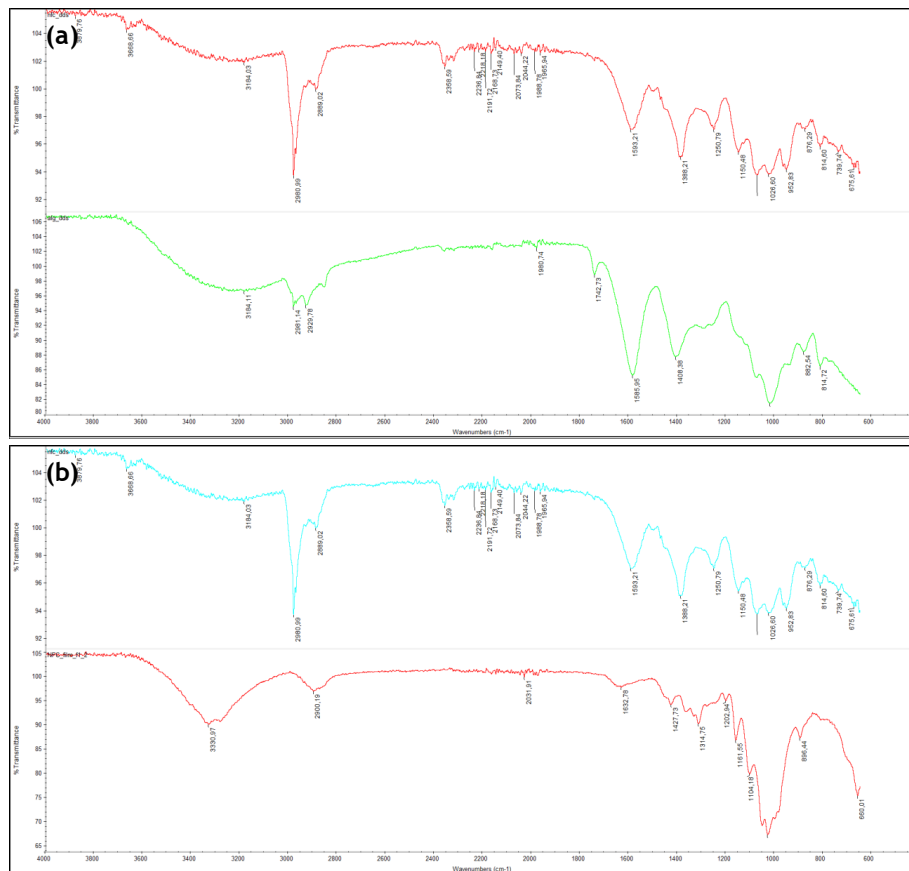


Figura E.10 - Comparação do espectro FTIR do DDS com CNF incorporada (vermelho (a)/ azul (b)) com o espectro FTIR do DDS de Alginato sem materiais celulósicos incorporados (verde) (a) e com o espectro FTIR do filme de CNF (vermelho) (b).

## E9. DDS com CB Incorporada

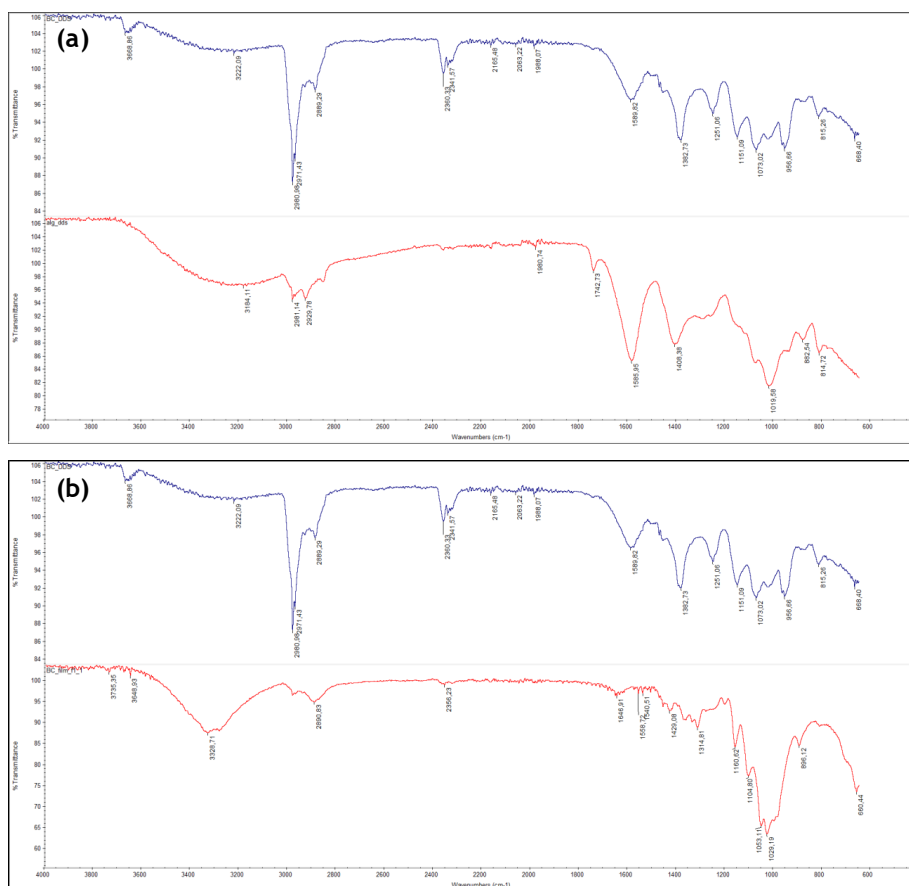


Figura E.11 - Comparação do espectro FTIR do DDS com CB incorporada (azul) com o espectro FTIR do DDS de Alginato sem materiais celulósicos incorporados (vermelho) (a) e com o espectro FTIR do filme de CB (vermelho) (b).



## E10. DDS com CMC Incorporada

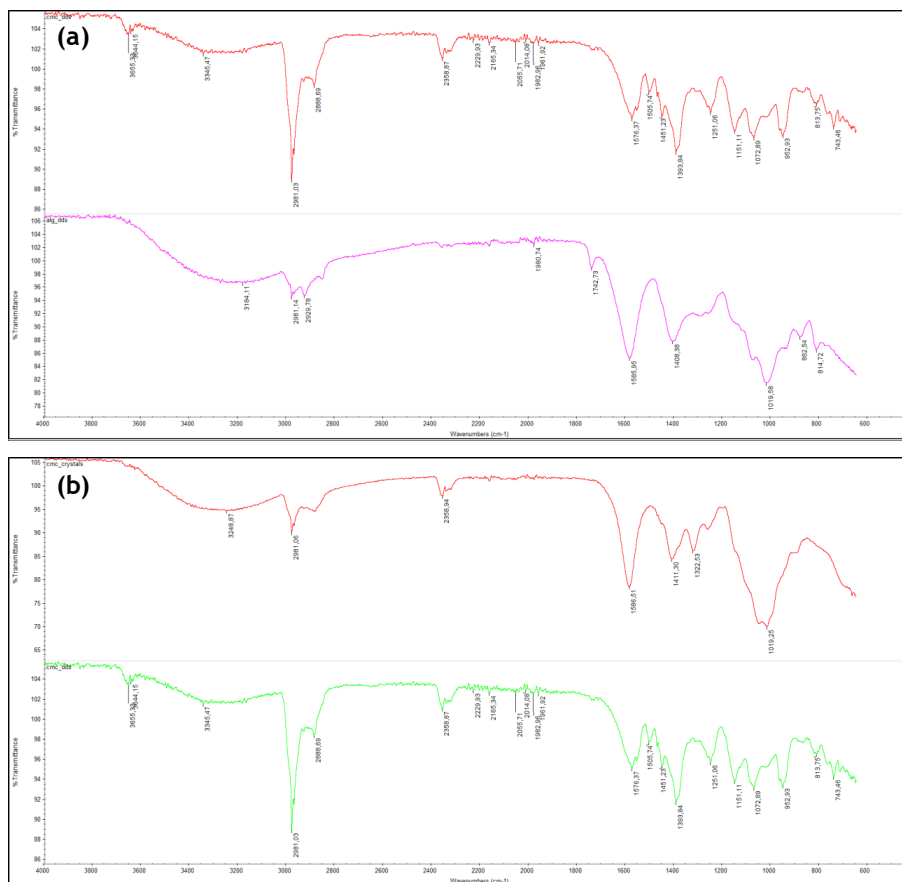


Figura E. 12 - Comparação do espectro FTIR do DDS com CMC incorporada (vermelho (a) / verde (b)) com o espectro FTIR do DDS de Alginato sem materiais celulósicos incorporados (rosa) (a) e com o espectro FTIR dos cristais de CMC (vermelho) (b).

## Anexo F. Listagem de Documentos

Todos os resultados obtidos das imagens SEM e do tratamento e análise de imagem foram realizados em replicado. Estes resultados estão devidamente identificados e organizados em pastas, numa Pen Drive USB, que podem ser consultados com a autora ou orientadora da tese. De seguida encontra-se uma listagem destas pastas:

- SEM
  - BC (membrana)
  - CMC (cristais)
  - DDS Alginato
  - DDS Alginato + Diclofenac
  - DDS BC
  - DDS CMC
  - DDS NFC
  - NFC (folha)
  - NFC (gel)
  - NFC + CMC
  - NFC + CMC\_10
  - NFC + CMC\_100
  
- Tratamento e Análise de Imagem
  - Colocação do Vetor
    - BC
    - CMC
    - NFC
  - DiameterJ\_ImageJ
    - BC
    - CMC
    - NFC
    - NFC\_Simulação Computacional
      - ✓ Rede 3D aberta
      - ✓ Rede 3D otimizada
  - Esprit Feature 1.9
    - BC
    - CMC
    - NFC
    - NFC + CMC