



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

**Desenvolvimento experimental e simulação  
computacional de materiais poliméricos naturais  
para aplicações em Química Medicinal como  
“Drug Delivery Systems”**

**Jessica Soares Ferreira**

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

Orientador: Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto

**Covilhã, Outubro de 2016**



# Agradecimentos

Numa primeira instância, gostaria de expressar a minha gratidão à minha orientadora, Professora Joana Curto, pelo conhecimento e conselhos que colocou à disposição e, também, pela disponibilidade e acompanhamento incansáveis durante este ano de trabalho.

Agradeço 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, sem os quais não seria possível ter acesso aos laboratórios e equipamentos para a realização do trabalho experimental.

Agradeço à Doutora Ana Paula Gomes do Centro de Ótica por todo o tempo despendido e disponibilidade na utilização do Microscópio Eletrónico de Varrimento. Agradeço também ao Professor Armando Silvestre da Universidade de Aveiro a cedência da Celulose Bacteriana e às Professoras Ana Carreira, Lurdes Ciríaco e Maria José Pacheco pela disponibilização do Diclofenac.

Gostaria de deixar o meu agradecimento ao RAIZ - Forest, Paper and Pulp Research Center, ao Doutor Pascoal Neto, Eng. Mendes de Sousa, Eng. Paula Cristina Pinto e também aos restantes membros da equipa técnica que acompanharam a utilização do Homogeneizador de alta pressão, etapa crucial neste trabalho desenvolvido.

Um especial agradecimento meus colegas de trabalho Vasco Martins, Pedro Videira, Flávia Morais e Ana Rita Sousa pela sua boa disposição, espírito de equipa, companhia e ajuda em todos os momentos. Gostaria ainda de endereçar um agradecimento à Sónia Sousa, à Vera Costa e à Kátia Monteiro pela prontidão para esclarecer qualquer dúvida e pelo auxílio durante o desenvolvimento de todo o trabalho laboratorial.

Expresso a minha gratidão ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão, às minhas avós e ao meu padrinho por serem a estrutura que me permite ser resiliente e ambicionar fazer mais e melhor e, também, por materializarem um porto seguro pronto a me receber.

Aos meus amigos Filipa Mendonça, André Baptista, João Mateus, Catarina Mendonça, Suse Mary, Bruno Coelho, Catarina Aidos, Joana Nova, Flávio Gomes, Pedro Maleitas, Diogo Camilo, Diogo Adão, Pedro Rafael, Silvana Gomes, Daniela Pinote, Helena Pereira, Joel Alves, Hugo Luiz, Maria Gomes e Mariana Lucas: um sincero e enormíssimo obrigada por desculparem todas as ausências nos momentos de convívio, pelas palavras e gestos apaziguantes e encorajadores, por me demonstrarem todos os dias que não há tempo nem lugar que retenha a amizade e por me ajudarem a fazer acreditar que a conclusão desta etapa seria possível.

Agradeço aos meus amigos e colegas de curso, que vivenciaram comigo, nos mesmos moldes, esta etapa e que sempre demonstraram o seu apoio e compreensão.

A todos os outros meus amigos e colegas de trabalho do UBIQuímica e da Associação Nacional de Estudantes de Química, o meu agradecimento por nunca se terem poupado a demonstrar o seu apoio e compreensão nesta fase.

## Resumo

O desenvolvimento experimental e simulação computacional de materiais poliméricos naturais utilizados como sistemas de entrega de fármacos constitui um exemplo de investigação multidisciplinar na área de Química Medicinal. O objetivo é o desenvolvimento de novos materiais porosos provenientes de materiais naturais, tais como os obtidos a partir de vários materiais celulósicos. A utilização de ferramentas computacionais avançadas e métodos de análise de imagem têm como objetivo otimizar as propriedades do sistema de entrega de fármacos e adequar o mesmo às diversas aplicações terapêuticas. Foram produzidos, laboratório, vários materiais com fibras de celulose distintas e caracterizaram-se utilizando imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV), recorrendo a uma preparação das amostras que possibilitou a fixação da estrutura porosa e uma metodologia de tratamento de imagem sistemática e com critérios de validação bem definidos. Utilizaram-se ferramentas computacionais avançadas para produzir os mesmos materiais computacionalmente. A utilização de simulações computacionais validadas experimentalmente permite a otimização das propriedades estruturais 3D determinantes no transporte de medicamentos, tais como a porosidade, volume de penetração, espessura, entre outras. Sendo assim, podem projetar-se materiais porosos a partir de materiais poliméricos naturais provenientes de celulose. Esta será uma etapa determinante no processo de desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos que utilizem a celulose na escala nano, de forma a otimizar o transporte e a libertação controlada de fármacos. Os resultados incluem a obtenção de celulose nanofibrilada por desconstrução da vegetal e a sua utilização num sistema de entrega de fármacos, estudo comparativo da cinética de libertação da molécula terapêutica Diclofenac a partir dos sistemas de entrega de fármacos produzidos em laboratório e simulação computacional de estruturas 3D formadas e análise dos parâmetros que influenciam a porosidade da estrutura. Pode concluir-se que o fármaco Diclofenac, sendo uma molécula terapêutica disponível comercialmente, com efeitos adversos reconhecidos quando atinge concentrações elevadas ou existe suscetibilidade ao nível do estômago, uma vez inserido num sistema de entrega polimérico irá ter uma libertação controlada, tirando partido das vantagens de uma aplicação controlada e, portanto, menos agressiva.

## Palavras-chave

Celulose nanofibrilada, cinética de libertação controlada, estruturas poliméricas porosas 3D, nanocelulose, simulação computacional, sistemas de entrega de fármacos

## Abstract

The computer simulation and experimental development of natural polymeric materials used as "Drug Delivery Systems" are an example of multidisciplinary research in the field of Medicinal Chemistry. The main goal is the development of new porous materials derived from natural materials such as cellulosic-based materials. The use of advanced computational tools and image analysis methods aim to optimize drug delivery system properties and tailor the drug delivery system to the various therapeutic applications. Various materials from different fibers and pulps were produced in laboratory and characterized using a sample method preparation to obtain SEM images that allowed the porous structure settling and systematic image analysis methodology with well established validation criteria. The use of experimentally validated computer simulations allows optimization of the structural properties that determines the transport of therapeutic molecules, such as porosity, penetration volume, thickness, etc. Thus, porous materials can be produced from natural polymeric materials derived from cellulose. This is a major step in the development process of drug delivery system" using cellulose in the nano-scale in order to optimize the transport and controlled release of drugs. The results obtained include nanofibrillated cellulose by deconstructing method of plant and its use in a drug delivery system, release studies of Diclofenac kinetics from drug delivery systems produced in laboratory and computational simulation of 3D structures and analysis of the parameters that can influence the porosity of the structure. It can be concluded that Diclofenac drug, which is a commercially available therapeutic molecule with well-known recognized adverse effects when reachin high concentrations or in cases of stomach sensibility, can be inserted in a polymeric delivery system for controlled release, reducing the aggressive effects for human body.

## Keywords

3D porous polymeric structures, computational simulation, controlled release kinetics, drug delivery systems, nanocellulose, nanofibrillated cellulose

# Índice

I.	Introdução .....	1
1.1	Sistemas de entrega de fármacos .....	2
1.1.1	Diclofenac.....	4
1.2	Polímeros naturais.....	6
1.2.1	Alginato .....	6
1.2.2	Celulose .....	7
1.2.2.1	Carboximetilcelulose .....	9
1.2.2.2	Nanocelulose.....	9
1.2.2.2.1	Celulose Microfibrilada .....	11
1.2.2.2.2	Celulose Bacteriana .....	12
1.3	Obtenção de celulose nanofibrilada .....	14
1.3.1	Tratamento mecânico das fibras de celulose em meio alcalino .....	14
1.3.2	Tratamento químico: oxidação com radical TEMPO.....	15
1.3.3	Tratamento mecânico: homogeneizador de alta pressão .....	17
1.4	Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	19
1.5	Ângulo de Contacto .....	20
1.6	Cinética de libertação .....	21
1.7	Modelação 3D de redes de materiais poliméricos e simulação computacional.....	23
II.	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>26</b>
2.1.	Materiais .....	27
2.1.1.	Materiais celulósicos .....	27
2.1.2.	Outros reagentes .....	27
2.2.	Métodos .....	28
2.2.1.	Preparação das pastas .....	28
2.2.1.1.	TMS - Teor de Matéria Seca .....	28
2.2.1.2.	Tratamentos mecânicos: desintegração e refinação .....	29
2.2.2.	Tratamento químico: oxidação com radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoloxilo).....	29
2.2.3.	Quantificação dos grupos acídicos totais.....	30
2.2.4.	Tratamento mecânico: homogeneizador de alta pressão .....	30
2.2.5.	Obtenção de estruturas .....	31
2.2.5.1.	Obtenção de folhas de Celulose Nanofibrilada (CNF) .....	31
2.2.5.2.	Obtenção de Celulose Nanofibrilada (CNF) em gel .....	31
2.2.5.3.	Obtenção de folhas de Celulose Bacteriana (CB) .....	31
2.2.5.4.	Obtenção de Celulose Bacteriana (CB) em gel .....	32
2.2.6.	Análise por Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV) .....	32
2.2.7.	Preparação de “Drug Delivery Systems” .....	33

2.2.7.1.	Preparação de esferas de alginato-polímero: alginato-celulose nanofibrilada, alginato-celulose bacteriana e alginato-carboximetilcelulose .....	33
2.2.7.2.	Preparação de esferas de alginato-polímero com corante verde .....	33
2.2.7.3.	Preparação de esferas de alginato-polímero com Diclofenac.....	34
2.2.8.	Estudos cinéticos de libertação.....	34
2.2.8.1.	Cinética de libertação do corante alimentar verde .....	34
2.2.8.2.	Cinética de libertação do Diclofenac.....	35
2.2.9.	Ângulo de Contacto .....	35
2.2.10.	FTIR - ATR.....	35
2.2.11.	Tratamento de imagem .....	36
2.2.12.	Simulação computacional .....	36
<b>III.</b>	<b>Discussão de Resultados .....</b>	<b>37</b>
3.1	Caracterização dos materiais.....	38
3.1.1.	Nanocelulose Innventia.....	38
3.1.2.	Celulose Bacteriana (CB).....	41
3.1.3.	Celulose Nanofibrilada (CNF).....	44
3.1.3.1.	Celulose nanofibrilada em suspensão .....	44
3.1.3.2.	Celulose Nanofibrilada (CNF) em gel .....	46
3.1.4.	“Drug delivery system”: esfera de alginato-polímero .....	51
3.2	Tratamento e análise de imagem.....	56
3.3	Quantificação dos grupos ácidos totais.....	58
3.4	Ângulo de Contacto .....	59
3.5	FTIR-ATR .....	60
3.6	Estudos de cinética de libertação .....	61
3.7	Simulação computacional .....	62
<b>IV.</b>	<b>Conclusões e trabalho futuro .....</b>	<b>66</b>
<b>V.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>68</b>
<b>VI.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>73</b>
	ANEXO A - Publicações.....	74

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da visão geral do desenvolvimento dos sistemas de entrega de fármacos, desde a investigação inicial até posterior aplicação clínica. (IVIVC: correlação in vitro-in vivo) (adaptado de Park 2014).....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do Diclofenac (MarvinSketch versão 15.2.16.0). ....	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química de uma molécula de celulose (Gatenholm & Klemm 2010). ....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura hierárquica desde a fonte até às moléculas de celulose (Lavoine et al. 2012). ....	8
<b>Figura 5.</b> Representação 2D da unidade monomérica da carboximetilcelulose (ACD/ChemSketch, versão 11.02).....	9
<b>Figura 6.</b> Esquematização de uma cadeia de celulose (a) e a organização das microfibrilas com regiões cristalinas e amorfas (b) (adaptado de Moon et al. 2011). ....	12
<b>Figura 7.</b> Imagem de uma membrana de celulose bacteriana (Silva et al. 2014). ....	13
<b>Figura 8.</b> Oxidação regioselectiva dos hidroxilos primários C6 da celulose a grupos carboxilato C6 por TEMPO/NaBr/NaClO em água e a pH 10-11 (Isogai et al. 2011). ....	15
<b>Figura 9.</b> Oxidação de grupos hidroxilo primários mediada pelo TEMPO via aldeídos (Isogai et al. 2011). ....	16
<b>Figura 10.</b> Desintegração da fibra de celulose em microfibrilas por oxidação mediada pelo TEMPO (Moon et al. 2011). ....	16
<b>Figura 11.</b> Processos de tratamento mecânico mais comumente aplicados para a obtenção de celulose microfibrilada, sendo estes o homogeneizador de alta pressão, o microfluizador e o moinho de fricção (adaptado Lavoine et al. 2012). ....	17
<b>Figura 12.</b> Esquema do funcionamento de um homogeneizador de alta pressão que pressiona as fibras através de uma fenda entre a válvula traseira e a válvula do homogeneizador (Klemm et al. 2011).....	18
<b>Figura 13.</b> Esquematização do sistema de ângulo de contato pelo método da gota suspensa, sendo as tensões $\gamma_{sv}$ = sólido-vapor, $\gamma_{sl}$ = sólido-líquido e $\gamma_{lv}$ = líquido-vapor. (Kwok & Neumann 1999). ....	20
<b>Figura 14.</b> Imagem do modelo 3D de Niskanen (Niskanen & Alava 1994). ....	23
<b>Figura 15.</b> Esquematização do processo de deposição das fibras (Curto et al. 2011).....	24
<b>Figura 16.</b> Gráfico de validação do simulador computacional comparando as estrutura reais de fibras de celulose (experimental paper) e estruturas computacionais (virtual paper) (Curto et al. 2011). ....	25
<b>Figura 17.</b> Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia). ....	38
<b>Figura 18.</b> Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia), com tratamento e análise de imagem. ....	39
<b>Figura 19.</b> Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia), com medidas de diâmetros pelo programa de tratamento e análise de imagem.....	39

<b>Figura 20.</b> Histograma da área das partículas, pelo programa de tratamento e análise de imagem. ....	40
<b>Figura 21.</b> Diagrama ternário da área, comprimento e largura das partículas, pelo programa de tratamento e análise de imagem.....	41
<b>Figura 22.</b> Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana. ....	42
<b>Figura 23.</b> Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana, com medições de diâmetro de uma fibra. ....	43
<b>Figura 24.</b> Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana, com medições de diâmetros de fibras e poros, pelo programa de análise de imagem. ....	43
<b>Figura 25.</b> Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada. ....	44
<b>Figura 26.</b> Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada, com medidas de diâmetros de poros. ....	45
<b>Figura 27.</b> Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada, com medidas de diâmetros de poros e de fibras. ....	45
<b>Figura 28.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com medidas de diâmetros de poros e de fibras. ....	46
<b>Figura 29.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com medidas de diâmetros de poros e de fibras pelo programa de análise e tratamento de imagem. ....	47
<b>Figura 30.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com tratamento prévio de ultrassons. ....	48
<b>Figura 31.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com tratamento prévio de ultrassons. ....	49
<b>Figura 32.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel com tratamento prévio de ultrassons, com medições de diâmetros. ....	49
<b>Figura 33.</b> Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel com tratamento prévio de ultrassons, com medições de diâmetros de poros e fibras. ....	50
<b>Figura 34.</b> Imagem MEV de esfera de alginato. ....	51
<b>Figura 35.</b> Imagem MEV de esfera de alginato com medições de diâmetros. ....	52
<b>Figura 36.</b> Imagem MEV de esfera de alginato com medições de diâmetros e poros. ....	52
<b>Figura 37.</b> Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada. ....	53
<b>Figura 38.</b> Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, ....	54
<b>Figura 39.</b> Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, com medições pelo programa de tratamento e análise de imagem. ....	54
<b>Figura 40.</b> Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, com medições de diâmetros de poros e fibras. ....	55
<b>Figura 41.</b> Imagem MEV da amostra da suspensão S2 preparada por centrifugação. ....	56
<b>Figura 42.</b> Gráfico resultante da quantificação dos grupos carboxílicos. ....	58
<b>Figura 43.</b> Espectro de FTIR-ATR das estruturas em forma de folha de CB (verde) e CNF (vermelho). ....	60

<b>Figura 44.</b> Gráfico da cinética de liberação do diclofenac em diferentes sistemas de entrega, em meios com pH diferentes. ....	61
<b>Figura 45.</b> Simulação computacional 3D da CNF.....	63
<b>Figura 46.</b> Resultado da simulação computacional mostrando uma distribuição espacial uniformemente aleatória da CMC.....	63
<b>Figura 47.</b> Celulose bacteriana: imagens SEM da superfície (esquerda) e corte transversal (direita) (Almeida et al. 2014) .....	64
<b>Figura 48.</b> Simulação computacional de celulose bacteriana produzida a partir de <i>Gluconacetobacter sacchari</i> , obtida com o Simulador Computacional desenvolvido em MATLAB®. ....	64

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sumário das propriedades não favoráveis dos fármacos, as suas implicações terapêuticas e a utilidade dos sistemas de entrega de fármacos (adaptado Allen & Cullis 2004). .....	3
<b>Tabela 2.</b> Materiais que constituem a família da nanocelulose e as suas fontes. (adaptado Klemm et al. 2011). .....	11
<b>Tabela 3.</b> Materiais celulósicos utilizados no trabalho experimental. ....	27
<b>Tabela 4.</b> Preparação das pastas utilizadas com respetivas quantidades e características. ....	28
<b>Tabela 5.</b> Processos mecânicos e respetivas características aplicados a cada pasta. ....	29
<b>Tabela 6.</b> Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos. ....	42
<b>Tabela 7.</b> Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos. ....	44
<b>Tabela 8.</b> Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos. ....	47
<b>Tabela 9.</b> Valores dos ângulos de contacto medidos nas estruturas de CMF, CMF com CMC e CNF. ....	59

## Lista de Acrónimos

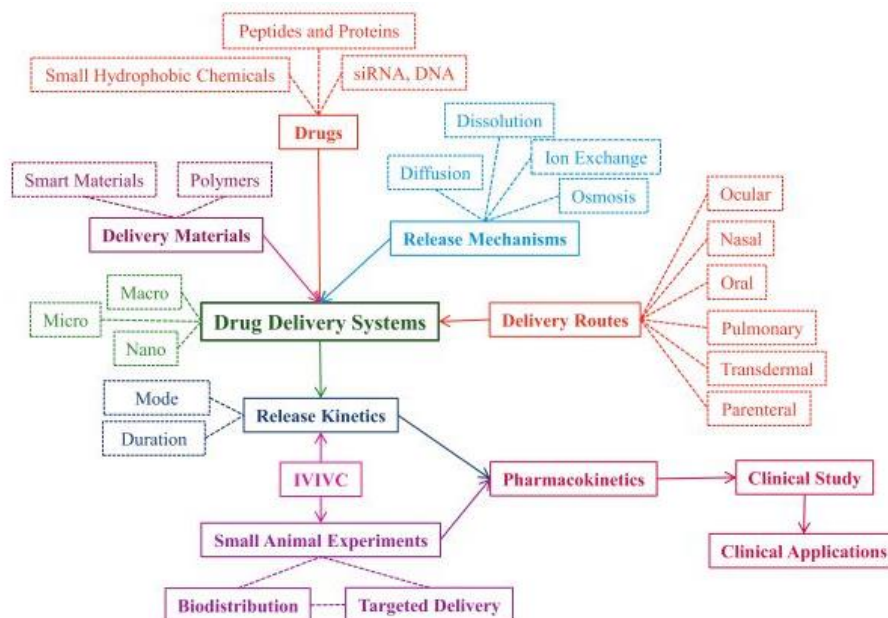
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
CB	Celulose bacteriana
CPD	Critical point dryer method
CNC	Celulose nanocristalina
CMF	Celulose microfibrilada
CNF	Celulose nanofibrilada
CMC	Carboximetilcelulose
MFC	Microfibrillated cellulose
NCC	Nanocrystalline cellulose
NFC	Nanofibrillated cellulose
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil
SEM	Scan electron microscopy

# I. Introdução

## 1.1 Sistemas de entrega de fármacos

Com o progresso da nanotecnologia, os materiais desenvolvidos à escala nano têm atraído uma atenção crescente nos campos da entrega de compostos terapêuticos (Wang et al. 2015).

A definição de Sistema de entrega de moléculas, do inglês “Drug Delivery System (DDS)”, assenta no processo ou método que permite a administração de um composto farmacêutico com o objetivo de alcançar um efeito terapêutico em humanos ou animais (Moulton & Wallace 2014). O esquema da Figura 1 ilustra a relação de todos os fatores com os sistemas de entrega de fármacos que é necessário ter em consideração, possibilitando uma visão geral do desenvolvimento destes.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da visão geral do desenvolvimento dos sistemas de entrega de fármacos, desde a investigação inicial até posterior aplicação clínica. (IVIVC: correlação *in vitro-in vivo*) (adaptado de Park 2014).

Baixa solubilidade, problemas farmacocinéticos, falta de direcionamento e seletividade para um alvo e fraca absorção são alguns dos problemas que os fármacos apresentam quando administrados. Na Tabela 1 encontram-se sumariados os principais problemas, implicações e como os sistemas de entrega de fármacos são úteis em cada caso. Estes sistemas podem permitir uma libertação predeterminada do fármaco, assegurando dessa forma uma distribuição e absorção ótimas, melhorando a segurança e eficácia do mesmo. Em última análise, estes benefícios traduzem-se em conveniência para o doente.

**Tabela 1.** Sumário das propriedades não favoráveis dos fármacos, as suas implicações terapêuticas e a utilidade dos sistemas de entrega de fármacos (adaptado Allen & Cullis 2004).

<b>Problema</b>	<b>Implicação</b>	<b>Efeito do sistema de entrega de fármacos</b>
<b>Fraca solubilidade</b>	Fármacos hidrofóbicos podem precipitar em meio aquoso. Toxicidade associada ao uso de certos excipientes para solubilizar os fármacos.	Micelas lipídicas ou lipossomos proporcionam ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos, melhorando a solubilidade do fármaco.
<b>Danos nos tecidos por extravasação</b>	Extravasação inadvertida de fármacos citotóxicos, levando a danos tecidulares	A libertação controlada do fármaco de um sistema de entrega pode reduzir os danos tecidulares e a extravasação.
<b>Metabolismo/decomposição rápida dos fármacos in vivo</b>	Perda de atividade do fármaco a seguir à sua administração.	Proteção do fármaco da degradação prematura, sendo necessárias doses mais baixas.
<b>Farmacocinética não favorável</b>	<i>Clearance</i> muito rápida pelo fígado, requerendo doses elevadas/contínuas.	Ao afetar o PK dos fármacos, a <i>clearance</i> é reduzida.
<b>Fraca biodistribuição</b>	Distribuição por todo o corpo pode afetar os tecidos normais, resultando em efeitos decorrentes da dose limite (ex.: toxicidade cardíaca da doxorubicina)	Diminuição do volume de distribuição e redução dos efeitos secundários em certos tecidos
<b>Falta de seletividade</b>	Atingindo tecidos normais, conduz a efeitos secundários, restringindo a dose que pode ser administrada. Baixas concentrações nos tecidos alvo levam a efeitos terapêuticos abaixo dos ideais.	Aumento da concentração de fármaco nos tecidos afetados, como os tumores, pelo efeito EPR. Ligação ao alvo mediada por um ligando.

Desde 1950 tem-se assistido a uma evolução na investigação no que respeita a esta área e a uma atualização dos objetivos que se pretendem alcançar. Atualmente, a investigação centra-se no desenvolvimento destes mesmos sistemas para que estes permitam uma entrega direcionada, o que fará com que o fármaco seja unicamente ativo no alvo terapêutico (Moulton & Wallace 2014) e ainda a libertação controlada.

O princípio da libertação controlada baseia-se na entrega do composto terapêutico, com um perfil de libertação controlado e predeterminado, durante um determinado período de tempo. Claramente, o objetivo será sempre a melhoria da eficácia das terapêuticas de administração (Salehi et al. 2013).

Recentemente, o desenvolvimento de novos e revolucionários sistemas de entrega de fármacos tem recebido crescente atenção no que concerne à melhoria da eficácia da quimioterapia e também da radioterapia. Em suma, a redução dos efeitos secundários tóxicos dos fármacos usados nas terapias oncológicas é o que se pretende alcançar, conseguindo assim a estabilidade e direcionamento do fármaco administrado (Salehi et al. 2013).

### 1.1.1 Diclofenac

O Diclofenac é um anti-inflamatório não esteróide (AINE), amplamente prescrito e tem um mecanismo de ação que promove a inibição da ciclooxigenase (COX), uma enzima que converte 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>2</sub>α e PGE<sub>2</sub>. Estes últimos atuam como mediadores inflamatórios (Kim et al. 2009).

O Diclofenac apresenta fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, sendo um inibidor não seletivo da COX. É um fármaco largamente prescrito para o alívio da dor, tratamento de estados inflamatórios e patologias relacionadas com a musculatura esquelética (artrites, tendinites, dor de costas). Possui ainda propriedades antipiréticas e analgésicas. É um ácido fraco, com pK<sub>a</sub> de sensivelmente 4,18 (a 25°C), e a sua solubilidade depende do pH do meio de dissolução (Manca et al. 2005). De uma forma geral, apresenta boa solubilidade num pH na faixa entre 7,0 e 8,0, sendo praticamente insolúvel em meio ácido.

A molécula de Diclofenac (Figura 2) é caracterizada pela presença de um grupo amino secundário (N-H) ligado a dois anéis aromáticos, representando a fonte de uma série de pontes de hidrogénio intramoleculares em direção a um átomo de cloro e a um grupo carboxílico do outro anel. Existem também outras pontes de H entre grupos carboxílicos de duas moléculas diferentes do fármaco, ocorrendo a formação de um dímero. (Fini et al. 2010).

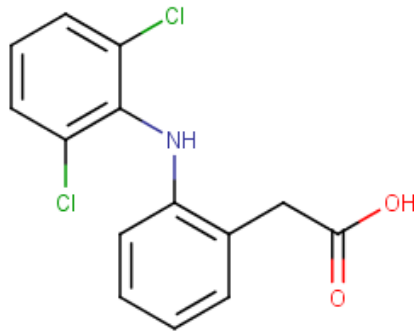


Figura 2. Estrutura química do Diclofenac (MarvinSketch versão 15.2.16.0).

Após administração oral, o Diclofenac sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, reduzindo a sua biodisponibilidade em 50-60% da dose administrada (Davies & Anderson 1997). À semelhança de outros anti-inflamatórios não esteroides, este fármaco não é estável no ambiente ácido do estômago, estando associado a efeitos gastrointestinais como ulcerações, hemorragias, entre outros (Philip & Philip 2010; Mehta et al. 2008; Yang & Fassihi 1997). Apesar de, em condições ácidas, se encontrar na forma não ionizada, este fármaco apresenta baixa solubilidade, o que, conseqüentemente, dificulta, a sua absorção (Yang & Fassihi 1997). A ciclização intramolecular deste é outra alteração possível de ocorrer, alterando a sua estrutura e levando à sua inativação (Davies & Anderson 1997) (Palomo et al. 1999). Deste modo, a formação de um sistema de entrega de fármacos contendo o Diclofenac será vantajosa.

## 1.2 Polímeros naturais

Ao passo que a investigação no campo biomédico avança, cresce e difunde-se o interesse pelo uso de polímeros naturais devido aos seus benefícios comparativamente aos relativos sintéticos. Alguns dos polímeros naturais que têm sido objeto de estudo nos últimos anos incluem colagénio, elastina, alginato, amido, quitosano e a celulose. Todos estes citados têm em comum a sua presença abundante em organismos naturais e constituem um alvo frequente de investigação no que concerne ao seu envolvimento e utilidade em variados campos (Petersen & Gatenholm 2011).

No que respeita à aplicação no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, estes não têm sido exceção e, por conseguinte, têm conseguido atrair um interesse crescente devido às suas propriedades já conhecidas, como a elevada área superficial e possibilidade de modificação.

Ao incorporar moléculas com atividade farmacológica em fibras poliméricas, consegue providenciar-se uma terapia sistémica e loco regional quando em comparação com outros sistemas de entrega (nanopartículas, nanocápsulas e sistemas micelares, por exemplo). Isto acontece porque estes últimos sistemas exibem uma fluidez intrínseca (Oliveira et al. 2015), o que compromete a sua permanência e localização numa área específica do corpo, dificultando consequentemente a terapia localizada.

Vantagens como baixa incidência de efeitos secundários, eficácia terapêutica (Oliveira et al. 2015) e biocompatibilidade (Kierys et al. 2015) asseguram a utilidade dos materiais poliméricos em sistemas de entrega de fármacos.

### 1.2.1 Alginato

O alginato é um polímero que ocorre naturalmente e é amplamente usado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Detém um grande potencial no que respeita ao seu uso na formulação de fármacos, dada a sua extensa utilização como aditivo alimentar, não tendo, portanto, risco de toxicidade associado (Xu et al. 2007; Tønnesen & Karlsen 2002).

Para além da sua utilização como excipiente, possui ainda características que o materializam como uma ferramenta útil no campo de entrega controlada de fármacos baseada em polímeros. Sendo um polissacarídeo, é isolado de algas castanhas (*Phaeophyceae*) e a extração é feita com uma solução alcalina que solubiliza o ácido algínico e este, por sua vez, pode ser convertido ao sal correspondente, sendo esta a forma mais comum (Tønnesen & Karlsen 2002). O ácido algínico consiste num polímero linear de resíduos de ácido D-manurónico e L-gulurónico que são rearranjados ao longo da cadeia polimérica em forma de blocos. Estes blocos homogéneos são intercalados aleatoriamente com unidades de ácido manurónico e gulurónico.

A proporção de blocos presente no alginato é variável consoante a fonte do mesmo. A hidratação do ácido algínico leva à formação de um gel ácido de elevada viscosidade, isto

devido à sua ligação intermolecular. As moléculas outrora fisicamente aprisionadas na matriz de alginato conseguem migrar para o meio envolvente, constituindo uma forma de encapsulação de grande importância (Tønnesen & Karlsen 2002).

Uma vez em contato com o alginato, iões divalentes e multivalentes formam géis e precipitados e os vários catiões apresentam diferente afinidade para o alginato. Os alginatos com grande quantidade de blocos de ácido gulurónico conferem maior resistência ao gel comparativamente aos que possuem maior quantidade de ácido manurónico. A justificação prende-se com a maior afinidade dos resíduos de ácido gulurónico com os iões divalentes. Infere-se assim que a transmitância, o “swelling” e a viscoelasticidade que caracterizam as membranas de alginato são fortemente afetadas e condicionadas pelo rácio entre ácido malurónico e ácido gulurónico (Tønnesen & Karlsen 2002).

Os géis de cálcio e alginato são os que se encontram mais extensivamente estudados. O facto do alginato poder formar dois tipos de géis, dependentes do pH (gel ácido e gel inotrópico), confere-lhe grandes potencialidades. Dependendo do gel formado, as propriedades físico-químicas do sistema poliméricos e o processo de *swelling* para ativar a libertação dos fármacos será diferente (Tønnesen & Karlsen 2002).

## 1.2.2 Celulose

Pela sua sustentabilidade, biodegradabilidade e biossegurança, a celulose, em particular, tem sido objeto de estudo. (Jorfi & Foster 2014)

A celulose é considerada o composto orgânico, proveniente de biomassa, mais abundante. A produção mundial estima-se que esteja acima das  $7,5 \times 10^{10}$  toneladas em cada ano (Jorfi & Foster 2014; Lavoine et al. 2012).

Para além da madeira, existem outras fontes de celulose, como as fibras das plantas (algodão, cânhamo, linho, etc), animais marinhos (tunicado), algas, fungos, invertebrados e bactérias.

Independentemente da fonte, a celulose apresenta-se como um homopolímero fibroso e linear de unidades de D-glucose anidras com ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas (Figura 3) (Jorfi & Foster 2014; Lavoine et al. 2012), com um grau de polimerização (DP) de, aproximadamente, 10,000.

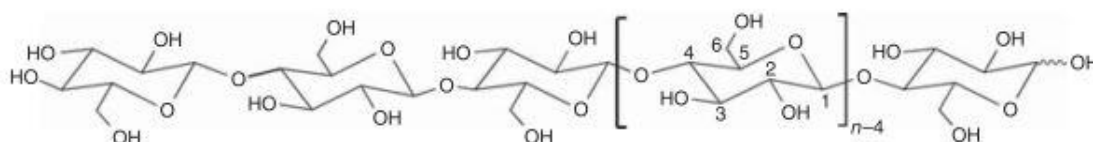


Figura 3. Estrutura química de uma molécula de celulose (Gatenholm & Klemm 2010).

A estrutura da celulose apresenta um dímero, de nome celobiose, que aparece como um segmento repetitivo. O monómero, de nome anidroglicose (AGU), suporta os três grupos hidroxilo. Estes grupos e a sua habilidade para formarem fortes pontes de hidrogénio são o que confere à celulose propriedades mais distintivas, como a sua tendência fortemente coesiva (Jorfi & Foster 2014; Lavoine et al. 2012).

A celulose apresenta uma organização hierárquica, com zonas cristalinas e amorfas, e uma estrutura multi-escala microfibrilada (Figura 4): desde a fonte, passando pelo tecido da planta, as fibras, a parede celular, os feixes de microfibrilas, as microfibrilas elementares até às cadeias lineares (Isogai et al. 2011). É importante referir que o corpo da planta compreende ainda outros materiais que não celulose, como hemicelulose e lenhina, que conferem ao mesmo reforço e estrutura.

Existem quatro polimorfos de celulose diferentes, são estes: a celulose I, II, III e IV. A celulose I é a considerada nativa, na forma que se encontra na natureza, e ocorre em dois alomorfos  $I_{\alpha}$  e  $I_{\beta}$ . A celulose II, também denominada celulose regenerada, surge após a recristalização e é a forma cristalina mais estável e distingue-se da celulose I por ter “packing” antiparalelo, enquanto esta última apresenta direção paralela. Por sua vez, as celuloses  $III_I$  e  $III_{II}$  são obtidas por tratamentos da celulose I e II, respetivamente. A modificação da celulose III leva à produção de celulose IV. (Lavoine et al. 2012)

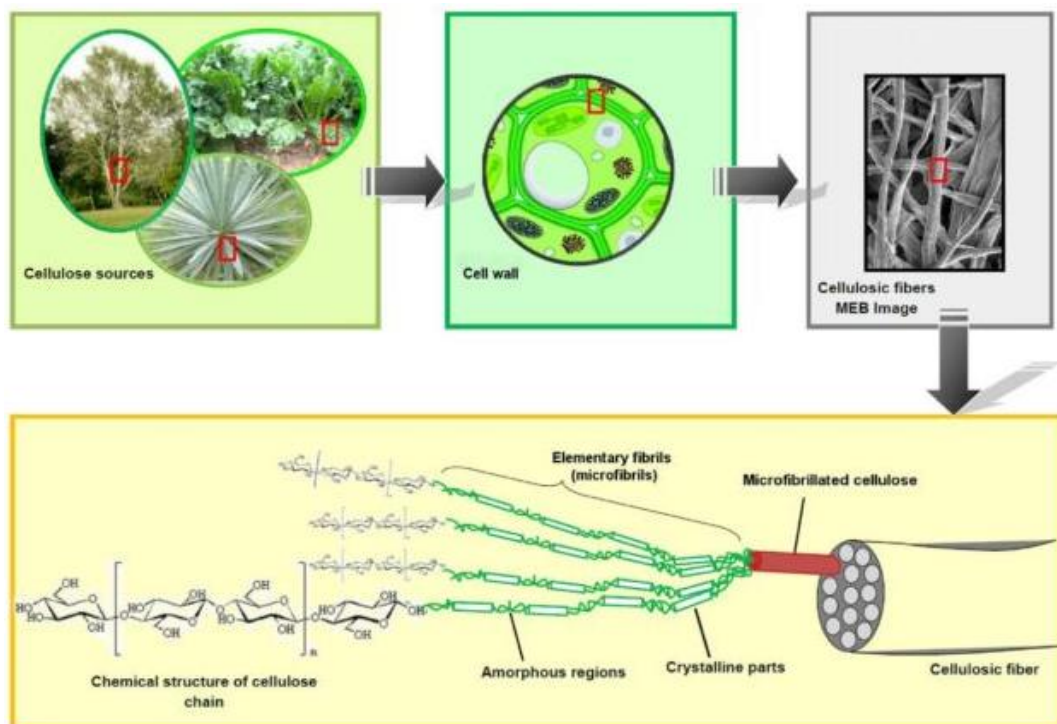


Figura 4. Estrutura hierárquica desde a fonte até às moléculas de celulose (Lavoine et al. 2012).

### 1.2.2.1 Carboximetilcelulose

No grupo dos derivados da celulose encontra-se a carboximetilcelulose (CMC) (

Figura 5), um polissacarídeo solúvel em água que apresenta grupos carboxilato e hidroxilo, o que permite que se estabeleçam fortes interações com partículas metálicas (Butun et al. 2011). A carboximetilcelulose é hidrofílica, biocompatível, biodegradável, não tóxica e apresenta boa solubilidade e estabilidade química (Butun et al. 2011) - propriedades extremamente importantes no que remete ao seu uso e aplicação no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos.

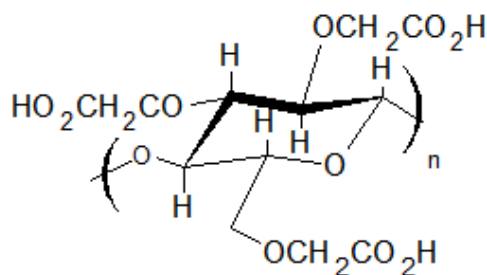


Figura 5. Representação 2D da unidade monomérica da carboximetilcelulose (ACD/ChemSketch, versão 11.02).

Considerando todas as propriedades vantajosas desta macromolécula, a carboximetilcelulose tem sido usada na obtenção de sistemas de entrega e libertação controlada de fármacos (Andrews et al. 2009; Roy et al. 2009). Butun, Ince, Erdugan e Sahiner, em 2011, desenvolveram um polímero mucoadesivo baseado em carboximetilcelulose com o propósito de obter libertação controlada. O fármaco modelo para os estudos de absorção e libertação foi o Aciclovir, um antiviral contra o herpes (Butun et al. 2011).

### 1.2.2.2 Nanocelulose

O interesse pela aplicação de novas formas de materiais celulósicos tem originado uma grande atividade em torno do isolamento e caracterização dos mesmos.

As fibrilas elementares são geradas através de processos biológicos complexos que envolvem os complexos da celulose sintetase na membrana plasmática, a exocitose da parede celular polimérica e os microtúbulos corticais. Acredita-se que as fibrilas elementares nas paredes celulares vasculares das plantas são compostas por 36 cadeias de B-1,4-glucanos (Chinga-Carrasco 2011), sintetizados pelas proteínas celulose sintetase no plasma celular. O agrupamento das fibrilas elementares em microfibrilas é causado por coalescência física, apresentando-se como um mecanismo que permite reduzir a energia livre à superfície (Chinga-Carrasco 2011).

Podem referir-se genericamente a estes materiais celulósicos, com dimensões situadas nos nanómetros e em que as partículas têm entre 1 a 100 nm de largura ou diâmetro, como materiais nanocelulósicos (Osong et al. 2016). Porém, é importante ter presente que existe ainda alguma confusão ao nível da terminologia e nomenclatura atribuída no decorrer da

literatura, fazendo com que não haja uma consistência na distinção dos níveis hierárquicos dos diferentes materiais nanocelulósicos. Não obstante, determinadas propriedades importantes da celulose, como a hidrofobicidade e possibilidade de mudança química (Klemm et al. 2011), e as características únicas dos materiais à escala nano apresentam-se combinadas nestes materiais, conferindo-lhes uma utilidade promissora.

A celulose I nativa é, claramente, a maior fonte de nanocelulose (Lavoine et al. 2012), apresentando-se como uma estrutura semicristalina fibrilada.

As moléculas individuais de celulose são combinadas em unidades maiores, também conhecidas por fibrilas elementares, as quais são organizadas noutras unidades ainda maiores, celulose microfibrilada. O diâmetro das fibrilas elementares é cerca de 5 nm, enquanto a da celulose microfibrilada apresenta diâmetros que vão desde 20 a 50 nm (Lavoine et al. 2012). As microfibrilas são formadas durante a biossíntese da celulose e apresentam alguns micrómetros de comprimento. Cada microfibrila pode ser considerada como um fio de cabelo com cristais de celulose ligados ao longo do eixo por regiões amorfas. As regiões ordenadas são cadeias de celulose organizadas que se encontram estabilizadas por uma rede complexa e forte de pontes de hidrogénio (Lavoine et al. 2012).

A nomenclatura mais recente apresentada pela TAPPI (TAPPI WI 3021) declara duas subcategorias entre os materiais nanocelulósicos, sendo estas nanofibras de celulose e materiais celulósicos nanoestruturados. A primeira categoria inclui a celulose nanocristalina (CNC) e a celulose nanofibrilada (CNF), enquanto a segunda, materiais celulósicos nanoestruturados, inclui a celulose microcristalina (CMC) e a celulose microfibrilada (CMF) (Osong et al. 2016)

A Tabela 2 resume os tipos de nanocelulose, consoante as suas fontes, organizadas em classes: Celulose Nanocristalina (NCC), Celulose Microfibrilada (MFC) ou Nanofibrilada (NFC) e Celulose Bacteriana (BC).

**Tabela 2.** Materiais que constituem a família da nanocelulose e as suas fontes. (adaptado Klemm et al. 2011).

Tipo de nanocelulose	Outros nomes	Fontes
Celulose microfibrilada (CMF) / Microfibrillated celulose (MFC)	Microfibrilas	Madeira, beterraba, tubérculo de batata, cânhamo e linho
Celulose nanocristalina (CNC) / Nanocrystalline celulose (NCC)	Nanocristais de celulose; microcristais de celulose	Madeira, algodão, cânhamo, linho, palha de trigo, casca de amora, algas e bactérias
Nanocelulose bacteriana (NCB) / Bacterial nanocellulose (BNC)	Celulose bacteriana, celulose microbiana, biocelulose	Açúcares de baixo peso molecular

#### 1.2.2.2.1 Celulose Microfibrilada

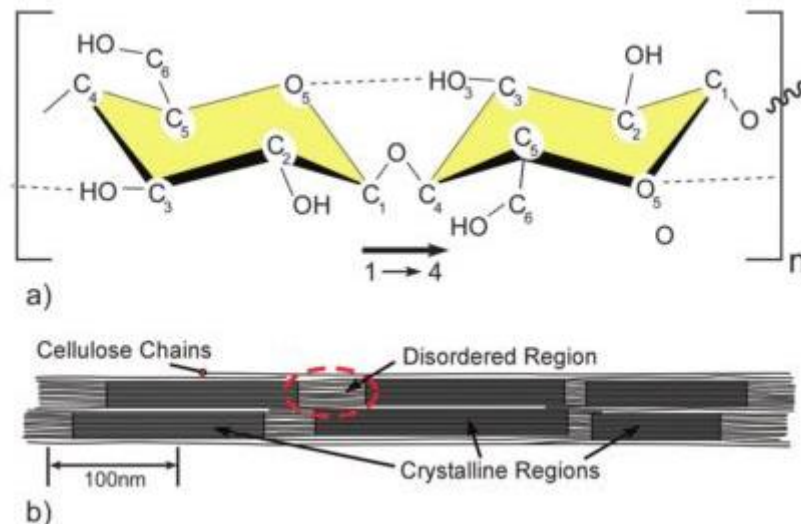
Assiste-se, no decorrer da literatura, a uma incoerência no que respeita à atribuição dos termos celulose nanofibrilada (CNF), do inglês “nanofibrillated cellulose” (NFC), e celulose microfibrilada (CMF), do inglês “microfibrillated cellulose” (CMF). Acontece ainda que ambos os termos sejam assumidos como sinónimos.

Olha-se para as estruturas de celulose microfibrilada e celulose nanofibrilada como se se tratassem de estruturas que se assemelham ao esparguete (Osong et al. 2016), apresentando uma estrutura em teia que confere uma estruturação rígida (Lavoine et al. 2012). São ambas constituídas tanto por partes cristalinas como amorfas (Figura 6) e têm elevado *aspect ratio*, diferindo assim da celulose nanocristalina (CNC) (Lavoine et al. 2012; Osong et al. 2016). Outras características comuns incluem a elevada área superficial e resistência, baixo peso molecular, o elevado “aspect ratio” e o facto de serem relativamente abundantes e biodegradáveis (Osong et al. 2016).

A primeira referência a celulose microfibrilada na literatura remete ao trabalho de Turbak (1983) e foi conseguida recorrendo à desintegração mecânica (Osong et al. 2016; Missoum et al. 2013; Qua et al. 2011; Österberg & Cranston 2014).

A celulose microfibrilada apresenta-se como um material celulósico, composto por celulose moderadamente agregada e com uma elevada área superficial.

A celulose microfibrilada exhibe partes amorfas e cristalinas e ainda uma estrutura em teia, permitindo formar uma rede estrutural rígida (Figura 6).



**Figura 6.** Esquematização de uma cadeia de celulose (a) e a organização das microfibrilas com regiões cristalinas e amorfas (b) (adaptado de Moon et al. 2011).

#### 1.2.2.2 Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (BC), também conhecida como biocelulose (Almeida et al. 2014) e outras vezes referida como celulose microbiana (MC) (Petersen & Gatenholm 2011), é um polissacárido produzido a nível extracelular por bactérias dos géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacter* e *Sarcina*, na interface entre o ar e o meio de cultura (Almeida et al. 2014). No caso do género *Gluconacetobacter*, estirpe *G. xylinus*, a bioformação dá-se num período de tempo que vai desde dias até duas semanas. Estas bactérias podem ser encontradas praticamente em todos os sítios onde acontece fermentação de açúcares e de hidratos de carbono (Gatenholm & Klemm 2010). Esta celulose apresenta-se na forma de uma membrana humedecida e intumescida (Figura 7), com um conteúdo de água superior a 90% (Silva et al. 2014).

A síntese da celulose bacteriana ocorre por via de um complexo sintetizador, começando com a glucose que é primeiramente bioquimicamente ativada. O complexo é associado com poros à superfície da célula bacteriana, os quais têm um diâmetro que ronda os 3 nm. (Gatenholm & Klemm 2010) É a celulose sintase que catalisa a adição de glucose ativada ao final da cadeia crescente de celulose, saindo da célula como fibrila elementar. Sabe-se que uma única célula pode converter cerca de 100 glucoses em celulose por hora (Gatenholm & Klemm 2010).

Sendo um polímero celulósico, a estrutura molecular da celulose bacteriana é constituída por unidades repetidas e ligadas de D-glucose, sendo esta o bloco estrutural.

A celulose bacteriana não apresenta grupos funcionais como carbonilos e carboxilos e também não tem polímeros como lenhina, hemicelulose e pectina, os quais são componentes comumente encontrados nos compósitos de celulose, como é exemplo a madeira. Para além disso, é caracterizada por cadeias polimerias bastante longas de 3000 a 9000 unidades repetidas e possui uma cristalinidade de 80-90%.



Figura 7. Imagem de uma membrana de celulose bacteriana (Silva et al. 2014).

Elevada pureza, elevada capacidade de absorção de água e peso molecular (Osong et al. 2016), estabilidade química, sem toxicidade (Mohd Amin et al. 2012), boa permeabilidade e resistência à degradação são algumas das propriedades da celulose bacteriana. Muitas destas mencionadas devem-se à rede tridimensional nanofibrilada distinta que apresenta (Almeida et al. 2014). Foi exatamente esta estrutura ramificada nano e microfibrilada, com uma organização tridimensional, que levou a que o interesse por este material começasse a emergir para possíveis aplicações biomédicas, fazendo com que esta área se desenvolvesse (Trovatti et al. 2012). A morfologia desta rede consegue mimetizar algumas das propriedades da matriz extracelular. Graças à sua natureza hidrofílica (Osong et al. 2016), a celulose bacteriana é capaz de se ligar fortemente à água durante e após a sua biossíntese, adquirindo um comportamento característico de um hidrogel (Mohd Amin et al. 2012; Petersen & Gatenholm 2011).

A celulose bacteriana, contrariamente aos polímeros sintéticos, apresenta-se biocompatível e ainda com capacidade de integração ao nível dos tecidos e de estabelecer fortes interações com outros polímeros, dada a sua estrutura nanofibrilar (Petersen & Gatenholm 2011).

A estrutura e propriedades deste material são dominadas pela arquitetura fibrosa e em rede à escala nano. Os diâmetros das fibrilas rondam os 30 nanómetros (Gatenholm & Klemm 2010). O efeito mais sonante consequente do tamanho nano das fibrilas é o aumento da área de superfície da rede da celulose bacteriana, o qual se reflete nas fortes interações com o que é circundante.

As nanofibrilas da rede de celulose bacteriana estão interconectadas, contrariamente ao que acontece com outros materiais que contêm nanopartículas. Trata-se de um material que consegue combinar os elementos estruturais e característicos da celulose com as propriedades ligadas aos materiais à escala nano (Gatenholm & Klemm 2010).

## 1.3 Obtenção de celulose nanofibrilada

O uso de fibras de celulose no seu estado primário para obtenção de diferentes produtos (papel, têxteis, materiais implementados em alta tecnologia e aditivos alimentares) é vasto e longo (Isogai et al. 2011), assim como a história do uso humano de celuloses química e mecanicamente modificadas.

Isolar de forma completamente individualizada as microfibrilas destas fibras tem se demonstrado um processo impossível (Saito et al. 2006; Saito & Isogai 2004; Isogai et al. 2011), revelando danos consideráveis no que respeita ao rendimento. Isto deve-se às numerosas pontes de hidrogénio presentes entre as microfibrilas nas fibras de celulose. Têm sido estudados e aplicados vários métodos, químicos e mecânicos, que possibilitem a obtenção de celulose nanofibrilada. (Lavoine et al. 2012).

### 1.3.1 Tratamento mecânico das fibras de celulose em meio alcalino

O processo mecânico de refinação pode ser usado como um pré-tratamento para as fibras de celulose, com o intuito de facilitar a obtenção de celulose nanofibrilada. Na literatura refere-se que facilita o tratamento mecânico efetuado pelo homogeneizador de alta pressão, tanto pela possibilidade de redução do número de ciclos necessários, e conseqüente gasto de energia, como por evitar a obstrução do orifício por onde se faz passar as suspensões (Abdul Khalil et al. 2014). O pré-tratamento no refinador aumenta a fibrilação interna e externa. A fibrilação interna ocorre como resultado da quebra das pontes de hidrogénio pelas forças mecânicas e, por sua vez, a fibrilação externa ocorre predominantemente à superfície da fibra por ação das forças de atrito (Abdul Khalil et al. 2014).

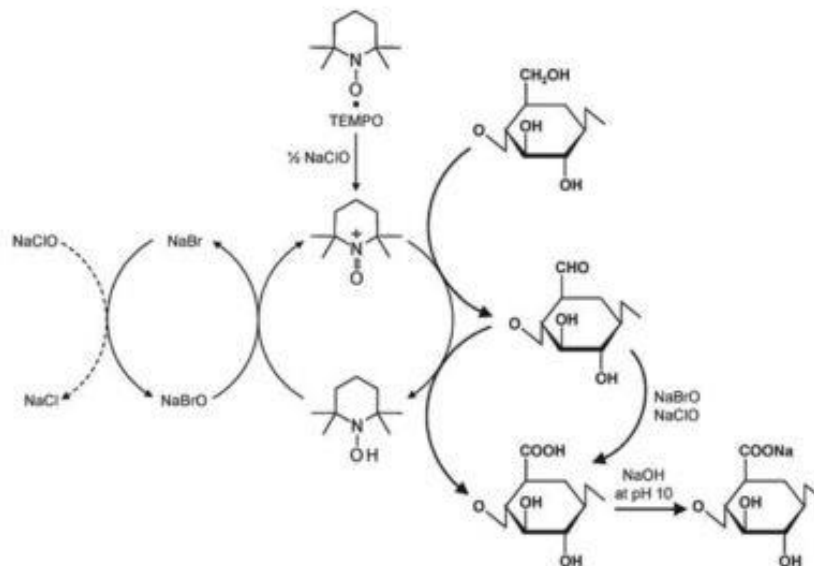
A realização deste tratamento num ambiente alcalino torna-se vantajosa uma vez que ajuda a promover o intumescimento da estrutura e promove a degradação da lenhina presente nas pastas, melhorando a individualização das fibrilas (Osong et al. 2016).

### 1.3.2 Tratamento químico: oxidação com radical TEMPO

A fibrilação quimicamente assistida de vários materiais como madeira, algodão e celuloses bacterianas, entre outros tem sido alvo de investigação a nível laboratorial. Na maior parte dos casos, são introduzidos grupos funcionais à superfície das microfibrilas (Isogai et al. 2011), os quais são carregados anionicamente, formando uma forte repulsão electrostática entre estas, quando em ambiente aquoso.

Radicais solúveis em água e radicais nítróxido estáveis, como é exemplo o 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil (TEMPO), têm sido extensivamente estudados no que remete à sua capacidade catalítica e oxidação seletiva de grupos hidroxilo primários de polissacáridos, em condições aquosas (Saito & Isogai 2004).

Primeiramente, a oxidação mediada pelo radical TEMPO foi unicamente aplicada a polissacáridos solúveis em água, como amido, extrato de batata e amilodextrina (Saito & Isogai 2004; Isogai et al. 2011). A mesma técnica foi aplicada a polissacáridos naturais solúveis em água, assim como derivados e ainda polissacáridos naturais insolúveis em água, como são exemplo a celulose e quitina (Saito & Isogai 2004). O hipoclorito de sódio (NaClO) foi usado como oxidante primário, a par de quantidades catalíticas de brometo de sódio (NaBr) e TEMPO, a um pH entre 10 e 11 (Figura 8). A oxidação seletiva dos C6 grupos hidroxilo primários a grupos carboxilo acontece pela via dos aldeídos (Figura 8) (Saito & Isogai 2004; Isogai et al. 2011).



**Figura 8.** Oxidação regioselectiva dos hidroxilos primários C6 da celulose a grupos carboxilato C6 por TEMPO/NaBr/NaClO em água e a pH 10-11 (Isogai et al. 2011).

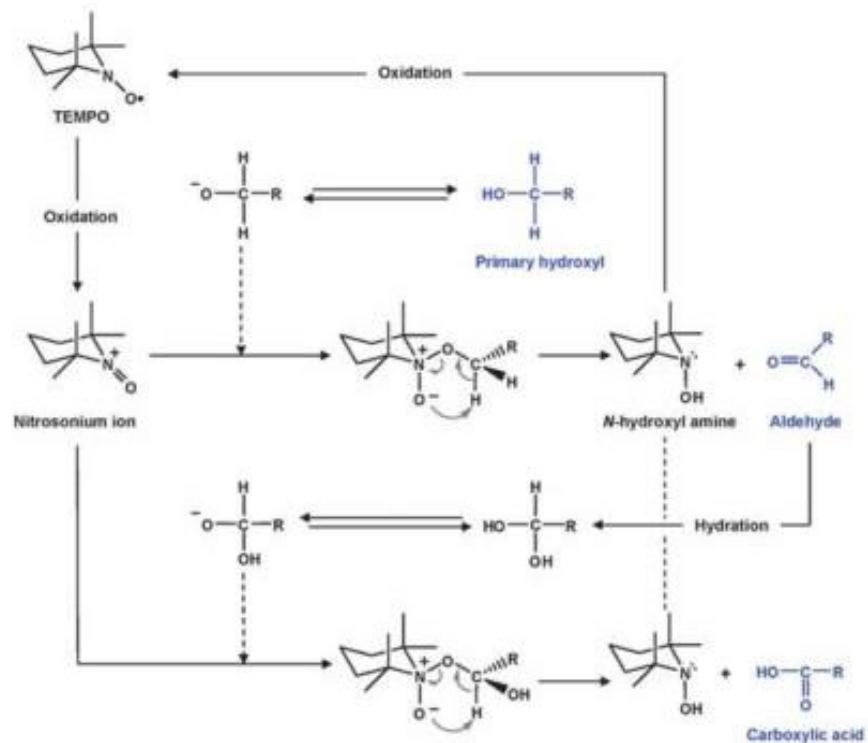


Figura 9. Oxidação de grupos hidroxilo primários mediada pelo TEMPO via aldeídos (Isogai et al. 2011).

O método de preparação, mediado pelo radical TEMPO, permite obter nanofibras de celulose completamente individualizadas, partindo de fibras de celulose de madeira (Figura 10) (Isogai et al. 2011).

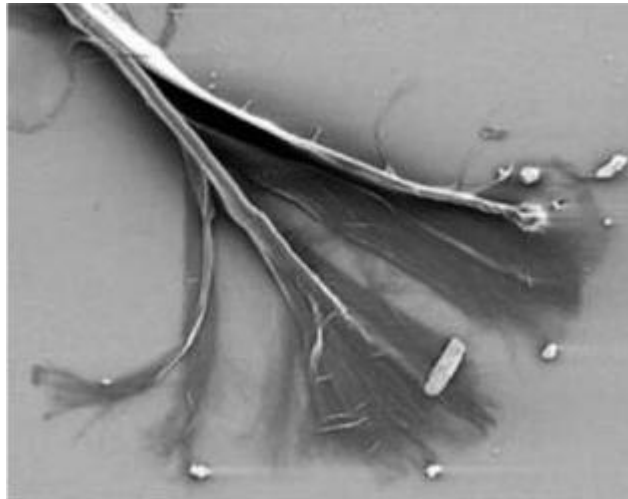
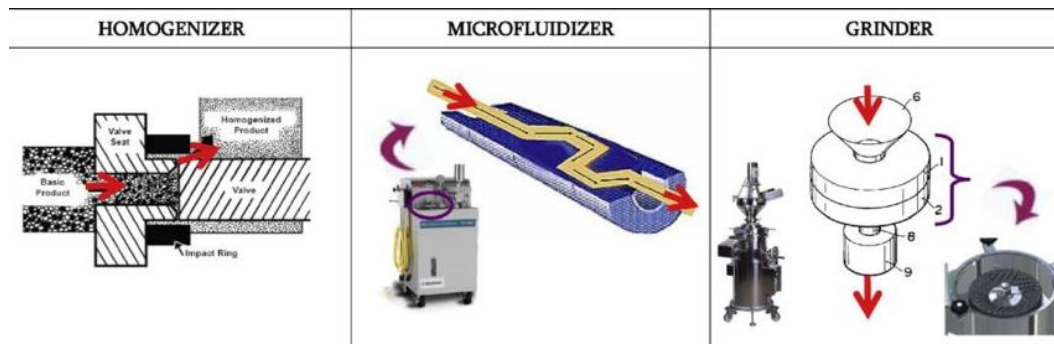


Figura 10. Desintegração da fibra de celulose em microfibrilas por oxidação mediada pelo TEMPO (Moon et al. 2011).

No que respeita à oxidação de celuloses na forma nativa, a resistência à oxidação observada por parte destas celuloses advém do seu elevado grau de cristalinidade o que, por sua vez, condiciona o acesso da estrutura aos reagentes em solução. Por outro lado, a oxidação destas celuloses com o radical TEMPO leva a um efeito à superfície em que grupos carboxilatos são introduzidos como grupos funcionais superficiais. (Saito & Isoyai 2004)

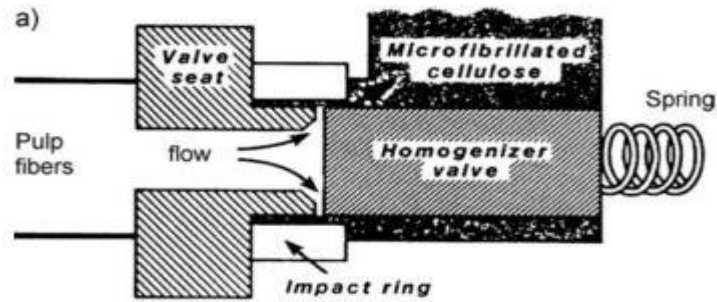
### 1.3.3 Tratamento mecânico: homogeneizador de alta pressão

Existem diferentes procedimentos de tratamento mecânico aos quais se pode recorrer de forma a obter celulose nanofibrilada (Figura 11), como por exemplo a moagem, o processamento por Microfluidizador®, da Microfluidics Corporation, e ainda o homogeneizador de alta pressão (Abdul Khalil et al. 2014; Dufresne 2013; Lavoine et al. 2012).



**Figura 11.** Processos de tratamento mecânico mais comumente aplicados para a obtenção de celulose microfibrilada, sendo estes o homogeneizador de alta pressão, o microfluizador e o moinho de fricção (adaptado Lavoine et al. 2012).

Foi Turbak (1983) e restante equipa quem aplicou o primeiro tratamento mecânico com o intuito de fibrilar a celulose, sendo este o homogeneizador de alta pressão (Gaulin). O processo, ainda hoje largamente aplicado, consiste na passagem repetitiva de uma suspensão fibrosa de madeira por uma abertura estreita sob elevada pressão, que culmina na formação de um gel (Lavoine et al. 2012). Os movimentos de abertura e fecho da válvula acontecem rápida e sucessivamente, o que faz com que as fibras sejam submetidas a uma grande queda de pressão sob forças de cisalhamento elevadas (Figura 12). Alcança-se assim uma combinação de forças que promove um elevado grau de fibrilação das fibras de celulose. (Lavoine et al. 2012)



**Figura 12.** Esquema do funcionamento de um homogeneizador de alta pressão que pressiona as fibras através de uma fenda entre a válvula traseira e a válvula do homogeneizador (Klemm et al. 2011)

Durante a homogeneização, a suspensão pode atingir localmente consistências elevadas e é necessário ter este aspeto em atenção, uma vez que poderá conduzir ao entupimento do orifício (Abdul Khalil et al. 2014), impedindo a movimentação ao longo do sistema e interrompendo o processo (Dufresne 2013).

As suspensões aquosas de celulose microfibrilada apresentam um comportamento semelhante a um gel, consistindo em nanofibrilas tanto na forma agregada, como livre (Dufresne 2013).

Segundo Lavoine e restante equipa (2012), a celulose fibrilada obtida com recurso a tratamento mecânico por um homogeneizador apresenta dimensões de 20 a 40 nm de largura e vários micrómetros de comprimento. No entanto, as dimensões apresentadas por Dufresne (2013) são mais abrangentes, considerando 3 a 100 nm de largura, uma vez que dependerá da extensão do processo e do pré-tratamento que for aplicado à celulose.

## 1.4 Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (MEV) apresenta-se como uma ferramenta que possibilita a aquisição de imagens com elevada resolução e também análises elementares e análises de cristalografia (Amelinckx et al. 1997) com uma resolução na ordem dos 10 nm. No que respeita à análise de fibras e microfibras, é possível observar qual o arranjo estrutural e a disposição espacial das mesmas.

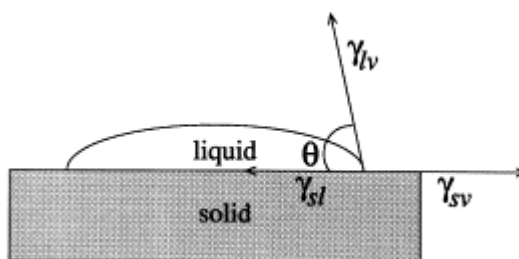
Para se poder analisar as amostras pelo microscópio eletrónico de varrimento, estas precisam de estar isentas de água. Quando isto não se verifica, tem que se recorrer a métodos de desidratação. No caso de amostras em que é importante manter a estrutura, faz-se a sua fixação com glutaraldeído e posteriormente desidratação com o método do ponto crítico do CO<sub>2</sub> (CDP - Critical Point Dryer method). Seguidamente, estas têm que ser revestidas a ouro para possibilitar que haja condução por toda a amostra e que, assim, os eletrões consigam percorrer e atravessar a mesma sem interferências (Amelinckx et al. 1997)

Os eletrões produzidos numa fonte no topo do microscópio são acelerados através de uma coluna de alta voltagem. As imagens são obtidas em duas dimensões (Amelinckx et al. 1997) e a taxa de varrimento pode ser determinada pelo operador.

## 1.5 Ângulo de Contacto

A medição do ângulo de contacto constitui um método de avaliação indireta da energia da superfície do papel (Moutinho et al. 2011). No sentido de caracterizar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade de uma superfície, é calculada a energia de superfície dos componentes, servindo, assim, para calcular a energia livre de interação entre o substrato e a água ( $\Delta G_{iwi}$ ). O resultado obtido é referente ao grau de hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da superfície e é apresentado em  $\text{mJm}^{-2}$ .

Compostos hidrofóbicos são, por definição, aqueles cuja  $\Delta G_{iwi} < 0$ , enquanto no que respeita a compostos hidrofílicos estes apresentam  $\Delta G_{iwi} > 0$ . As superfícies/compostos com  $\Delta G_{iwi} \leq -84$  podem ser classificadas como completamente hidrofóbicos (Harnett et al. 2007). Superfícies mais hidrofílicas apresentam menores ângulos de contacto.



**Figura 13.** Esquematização do sistema de ângulo de contacto pelo método da gota suspensa, sendo as tensões  $\gamma_{sv}$ = sólido-vapor,  $\gamma_{sl}$ = sólido-líquido e  $\gamma_{lv}$ = líquido-vapor. (Kwok & Neumann 1999).

## 1.6 Cinética de libertação

A libertação de um fármaco refere-se ao processo no qual um soluto migra da sua posição no sistema polimérico para a superfície em redor do polímero e, posteriormente, para o meio envolvente. São múltiplos os fatores, relacionadas com o material do sistema, que afetam o processo, sendo exemplo as características físico-químicas dos solutos, o meio de libertação e ainda a interação entre os diversos fatores. Regra geral, a difusão do soluto, o inchamento da matriz polimérica e a degradação do material polimérico são tidas como fatores importantes no que respeita ao transporte de solutos retidos em matrizes. (Yao & Weiyuan 2010).

O que acontece nos sistemas de entrega de fármacos de libertação controlada é que os fármacos se encontram dispersos homogeneamente numa matriz de polímero capaz de ser erodível ou então numa matriz polimérica hidrofílica e dilatável. No caso das matrizes erodíveis, a erosão do polímero a partir da superfície da matriz determina a libertação dos fármacos. Por sua vez, nas matrizes hidrofílicas, a formação da camada de gel e a sua dinâmica em função do tempo é o que determina a libertação do fármaco (Varma et al. 2004).

O comprimento do percurso que o fármaco percorre aquando da difusão é definido pela espessura da camada de gel, correspondendo, assim, à distância entre as frentes de difusão e de erosão. A camada de gel torna-se gradualmente mais espessa, o que acaba por resultar em taxas de libertação do fármaco progressivamente mais lentas. Não obstante, assiste-se à hidratação contínua, e desta forma a desarticulação do polímero ocorre a partir da superfície da matriz, resultando numa zona de depleção gradualmente decrescente e a um aumento da taxa de dissolução (Varma et al. 2004).

Os sistemas à base de hidrogéis pertencem ao grupo de sistemas de entrega de fármacos que respondem por aumento de volume. Aquando do contacto entre a rede polimérica e a solução aquosa, a compatibilidade termodinâmica entre as cadeias do polímero e da água fazem com que o polímero inche. Desta forma, a água penetra na rede, fazendo com que a temperatura de transição vítrea do polímero decresça. O fármaco armazenado dentro do hidrogel dissolve-se na água, que outrora penetrou, e começa assim a difusão para fora da rede. Para este fenómeno existem três forças motrizes importantes, sendo elas: o gradiente de concentração penetrante, o gradiente de “stress” do polímero e as forças osmóticas (Bierhalz et al. 2013).

No que respeita aos sistemas de libertação controlada que não são controlados por “swelling”, a taxa de relaxação do polímero é, comparativamente, muito mais lenta que o transporte da água dentro do hidrogel. Nesse sentido, o mecanismo de transporte neste tipo de sistemas segue a difusão seguindo a lei de Fick.

Os modelos de difusão têm por base a segunda lei da Difusão de Fick e são descritos pela seguinte equação (1):

$$\frac{M_t}{M_0} = 4\left(\frac{Dt}{\pi h^2}\right) \quad (1)$$

Em que  $M_t$  representa a quantidade de fármaco no tempo  $t$ ,  $M_0$  é a massa total do fármaco retido no sistema e  $D$  representa o coeficiente de difusão do fármaco relativamente à matriz. De forma a prever o perfil de libertação, deve-se conhecer o coeficiente de difusão do soluto relativo à matriz onde se encontra (Yao & Weiyuan 2010).

Se a relaxação da cadeia macromolecular for a força motriz dominante, é observável o transporte “Case II”. Porém, mesmo em sistemas de libertação controlada por “swelling”, acaba por ocorrer um mecanismo de transporte anómalo que é classificado como um intermediário entre a difusão de Fick e o transporte Case II (Bierhalz et al. 2013).

No caso dos sistemas de entrega de fármacos de libertação controlada baseados em alginato, estes sofrem uma imediata hidratação para criar uma espécie de camada hidrocoloidal de elevada viscosidade. Isto cria uma barreira de difusão, diminuindo a migração de moléculas mais pequenas, como é o caso dos fármacos, acabando a libertação do fármaco por ser controlada pela membrana polimérica que detém permeabilidade específica (Tønnesen & Karlsen 2002).

## 1.7 Modelação 3D de redes de materiais poliméricos e simulação computacional

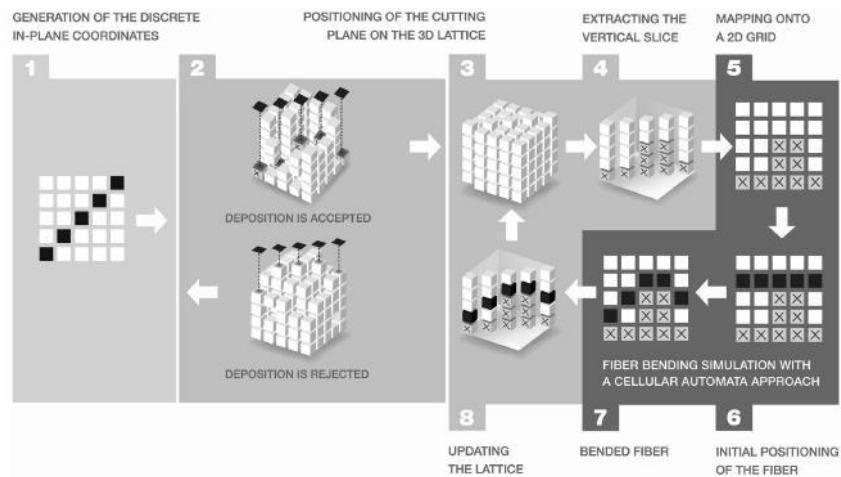
A relevância da otimização das propriedades estruturais, no desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de fármacos na área de Química Medicinal, para alcançar as funcionalidades pretendidas é crucial. Assim, a modelação computacional apresenta-se como uma ferramenta de elevado potencial para melhorar a eficácia dos sistemas de entrega de fármacos.

A modelação de materiais fibrosos remonta a 1962, pelo trabalho de Corte e Kallmes em que apresentavam um modelo que consistia em várias camadas 2D de fibras rígidas (Kallmes & Corte 1960). Como é expectável, este e outros modelos apenas consideravam a posição da fibra no plano, ignorando a sua disposição no espaço. Só em 1994 é que surge o 3D, por Niskanen e Alava, propondo o modelo KCL-PAKKA (Curto et al. 2011) em que se assiste à disposição aleatória das fibras (Figura 14). Para além da área da fibra no plano xy, também a flexibilidade de cada uma é tida em consideração, o que faz com que cada fibra ocupe igualmente a dimensão z, obtendo-se assim estruturas 3D. Nos anos decorrentes, o modelo sofreu melhorias e foi em 2003 que Provatás e Uesaka apresentaram a regra de deposição para as fibras (Provatás & Uesaka 2003).



**Figura 14.** Imagem do modelo 3D de Niskanen (Niskanen & Alava 1994).

Curto e coautores, em 2011, apresentaram um modelo 3D baseado no KCL-Pakka. Este novo modelo baseia-se num autómato celular, no qual existe uma divisão cartesiana das células, o que faz com que cada fibra seja representada como uma sequência de células/voxéis. Cada voxel ocupa um volume pré-estabelecido e que pode ser definido pelo utilizador. É com este parâmetro que se define o comprimento, largura e a espessura que vai dar origem à rede de fibras, permitindo ainda que se modifiquem outros parâmetros como a flexibilidade e a resolução. As fibras são depositadas uma a uma, ocupando cada fibra o seu espaço. Caso alguma destas sofra rejeição, o processo de deposição sofre repetição (Curto et al. 2011).

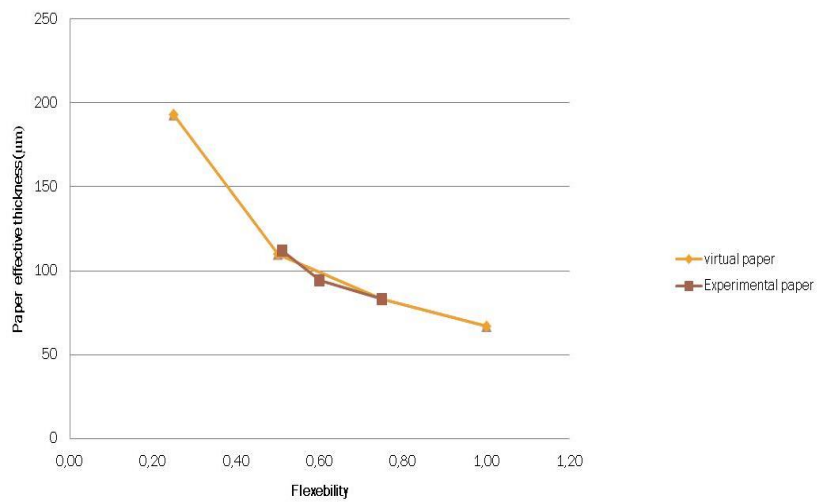


**Figura 15.** Esquematização do processo de deposição das fibras (Curto et al. 2011).

O simulador foi criado tendo por base a programação em Matlab®. A Figura 15 apresenta o esquema sequencial da deposição das fibras, podendo o mesmo ser descrito nos seguintes passos:

- Criação de uma fibra no plano XY;
- Teste da deposição: caso a fibra seja rejeitada, testa-se uma nova deposição;
- Extração do plano para a rede 3D onde ocorre a flexibilização;
- Deposição da fibra de acordo com a sua flexibilidade e conformação na superfície que lhe é adjacente;
- Atualização da rede 3D.

O gráfico da Figura 16 comprova a validação do simulador, recorrendo à comparação de estruturas reais de fibras de celulose e estruturas computacionais. O simulador foi validado inicialmente para papel e fibras celulósicas (Curto et al. 2011).



**Figura 16.** Gráfico de validação do simulador computacional comparando as estrutura reais de fibras de celulose (experimental paper) e estruturas computacionais (virtual paper) (Curto et al. 2011).

## **II. Materiais e Métodos**

## 2.1. Materiais

### 2.1.1. Materiais celulósicos

Na tabela 3 encontra-se uma listagem dos materiais celulósicos utilizados para a produção dos sistemas de entrega de fármacos.

Tabela 3. Materiais celulósicos utilizados no trabalho experimental.

Amostra	Descrição	Nome da amostra
1	Celulose microfibrilada	CMF
2	Celulose nanofibrilada	CNF
3	Celulose bacteriana	CB
4	Carboximetilcelulose	CMC
5	Celulose nanofibrilada proveniente da Innventia®	CNF-Innventia

Como ponto de partida, para a investigação realizada, utilizaram-se pastas Kraft branqueadas de *Eucalypto globulus* (fibra curta) de um lote selecionado. A CMF e a CNF foram obtidas a partir desta pasta, tal como se encontra descrito nos métodos abaixo. A CB foi produzida por uma bactéria da estirpe *Gluconacetobacter sacchari*, pelo CICECO e Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelo grupo de investigação do Professor Doutor Armando Silvestre (Almeida et al. 2014; Machado et al. 2014). A CMC é da Sigma-Aldrich, de pureza analítica. A CNF-Innventia foi adquirida a uma empresa de investigação e desenvolvimento, Innventia® (<http://www.innventia.com/>).

### 2.1.2. Outros reagentes

Os reagentes usados para a oxidação e quantificação dos grupos ácidos totais, radical TEMPO, brometo de sódio (NaBr), hipoclorito de sódio (NaClO), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos à Sigm-Aldrich e são de pureza analítica.

Para a preparação das esferas usou-se alginato de sódio ( $C_6H_9NaO_7$ ) e cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ), os quais foram adquiridos à BDH Chemicals Ltd, England e ainda carboximetilcelulose (CMC) da Sigma-Aldrich.

Nos estudos de libertação foi utilizado o corante alimentar verde, composto por corante amarelo de quinolina (E104), corante verde S (E142) e ácido acético (E260), vendido comercialmente, e como fármaco modelo o Diclofenac (Sigma-Aldrich).

No que respeita à preparação dos meios de libertação, utilizou-se fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ), fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) e ácido clorídrico (HCl), adquiridos à Sigma-Aldrich.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparação das pastas

Partiu-se de um lote selecionado de pasta Kraft branqueada de *Eucalipto globulus* e a partir desta procedeu-se às operações unitárias, descritas nos pontos seguintes, para obter celulose microfibrilada (CMF) e celulose nanofibrilada (CNF).

#### 2.2.1.1. TMS - Teor de Matéria Seca

Para saber o teor de matéria seca da pasta, colocou-se um pouco de amostra na balança de infravermelhos, durante 60 minutos, seguindo a norma ISO 638:1978.

Depois de obtido o valor, foram preparadas as seguintes pasta, colocando-as de molho em água desionizada a pH 12 durante 24h, de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4.** Preparação das pastas utilizadas com respetivas quantidades e características.

Nome	Quantidade (g)	pH	Tempo (h)
P0	30	12	24
P1	30 + 30	12	24
P2	30 +30	12	24
P3	30 + 30	12	24

No caso da obtenção das pastas P1, P2 e P3, foram colocadas 30g em dois recipientes, perfazendo um total de 60g para cada.

### 2.2.1.2. Tratamentos mecânicos: desintegração e refinação

O processo de desintegração foi feito seguindo a norma ISO 5263-1:2004, em 2L de água a pH 12 e, para tal, foi usado um desintegrador de acordo com a referida norma.

Após desintegração, retirou-se a água no formador dinâmico e ajustou-se na balança com o corresponde de água para obter 10% de consistência.

Com o desígnio de aumentar a fibrilação interna e externa, cada uma das pastas foi distribuída pelas paredes do refinador PFI e foi refinada segundo as regras da norma ISO 5264-2:2011.

Numa última etapa, as pastas foram sujeitas a um processo de desintegração final, seguindo a norma. A informação apresentada na Tabela 5 resume os processos mecânicos aplicados a cada pasta e as respetivas características.

Tabela 5. Processos mecânicos e respetivas características aplicados a cada pasta.

Nome	Desintegração inicial	Refinação	Desintegração final
P0	30 000 revoluções	9000 revoluções	10 000 revoluções
P1	30 000 revoluções	9000 revoluções	10 000 revoluções
P2	30 000 revoluções	9000 revoluções	10 000 revoluções
P3			10 000 revoluções

### 2.2.2. Tratamento químico: oxidação com radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinóxilo)

Partindo da informação presente no artigo de Saito e Isogai (2004), procedeu-se à oxidação com o radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinóxilo) da pasta de eucalipto, primeiramente à escala laboratorial (P0) e de seguida procedeu-se ao aumento de escala para um reator de 5L (P1, P2, P3).

Na etapa de oxidação, a celulose foi suspensa em água, contendo TEMPO (2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinóxilo) e Brometo de Sódio (NaBr). No passo seguinte, foi adicionada lentamente uma determinada quantidade de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) de 9%. O pH da solução foi, durante toda a reação, controlado e mantido a 10,5 à temperatura ambiente, recorrendo, para isso, à adição de pequenas quantidades de hidróxido de sódio (NaOH). Mantendo uma agitação contínua e depois de se verificar que o pH não sofria

alterações, adicionou-se uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5M para ajustar o pH a 7. Seguidamente, procedeu-se à lavagem com água, filtrando em placa porosa. As quantidades dos reagentes e condições operacionais do “scale-up” foram otimizadas.

Todas as pastas preparadas foram sujeitas a este tratamento químico, originando assim as respetivas suspensões: S0, S1, S2 e S3.

### 2.2.3. Quantificação dos grupos acídicos totais

Com o intuito de avaliar a quantidade de grupos acídicos totais presentes após oxidação, foi levado a cabo o processo de quantificação dos mesmos, como descrito no método da norma SCAN-test, Scandinavian Pulp, Paper rand Board (SCAN-CM 65:02, 2002).

A primeira etapa é a protonização, em que a pasta é suspensa em HCl 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  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Seguidamente, avalia-se a solução de NaOH. Para tal, adiciona-se água destilada, HCl e 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.

A titulação da pasta é a terceira etapa. A titulação decorre em duplicado e é colocada a mostra, num erlenmeyer, juntamente com água destilada e uma determinada quantidade de uma solução de NaCl (0,05 mol/L). Proceda-se à titulação da suspensão, adicionando com uma bureta NaOH. 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.

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.

### 2.2.4. Tratamento mecânico: homogeneizador de alta pressão

As suspensões S1 e S2, resultantes do pré-tratamento químico com radical TEMPO foram sujeitas a um tratamento mecânico. Para tal, recorreu-se a um sistema de homogeneização de alta pressão com o objetivo de fibrilar a pasta na escala nano. O equipamento utilizado foi um Homogeneizador de Alta Pressão (GEA, 50L7h @ 1500 bar) do RAIZ - Forest and Papel Research Institute. Nesta etapa utilizaram-se as seguintes condições de operação: sem recirculação, pressão de 500 bar e um caudal de água de arrefecimento constante. Controlou-se a temperatura de operação, que se manteve entre os 20°C e os 39°C, para evitar o sobreaquecimento e possível degradação dos produtos.

## 2.2.5. Obtenção de estruturas

### 2.2.5.1. Obtenção de folhas de Celulose Nanofibrilada (CNF)

Para obter estruturas de celulose nanofibrilada em folha, filtrou-se a trompa de água, num funil de Büchner, 200mL de suspensão durante 40 minutos.

As estruturas obtidas dispostas em discos de 98mm de área passaram, primeiramente, pela prensa, onde se retirou parte da água, de acordo com a norma ISO de prensagem (ISO 5269/1), com adaptações relativas ao tamanho dos discos usados. De seguida, foram secas sob tensão, num laboratório com temperatura e humidade controlados, segundo a norma ISO 5269/1.

### 2.2.5.2. Obtenção de Celulose Nanofibrilada (CNF) em gel

Nesta etapa o objetivo prendia-se com a obtenção de estruturas em gel. Para tal, filtrou-se 200 mL de suspensão num funil de Büchner com filtro, com recurso a bomba de água e procedeu-se à lavagem do filtrado (2x200mL). Fez-se variar o tempo de filtração, recolhendo estruturas em gel após 19 minutos, 21 minutos, 23 minutos e 30 minutos.

Para avaliar o efeito do tratamento por ultrassons no tempo de drenagem e na disposição da rede polimérica, 100 mL de suspensão de celulose nanofibrilada (S1 e S2) foram sujeitos a tratamento por ultrassons (Vibra Cell Sonics Materials, 20 kHz) durante 5 minutos, com as seguintes condições: 50% “Duty cycle” e 5 “Output”. Filtrou-se a suspensão com tratamento de ultrassons num funil de Büchner com filtro, recorrendo a bomba de água e com lavagem do filtrado (2x100mL).

As estruturas em gel foram recolhidas para uma placa de petri, assim como os papéis de filtro, e foram reservados no frigorífico para posterior análise estrutural.

### 2.2.5.3. Obtenção de folhas de Celulose Bacteriana (CB)

A primeira etapa remete à desintegração da membrana de celulose bacteriana a 30000 revoluções, por duas vezes (2x15000 revoluções). Seguidamente, procedeu-se à filtração, usando para tal um funil de Büchner e papel de filtro, com recurso a bomba de água, lavando o filtrado (2x1L). Cessou-se a filtração após 45 minutos. A estrutura obtida, disposta num disco de 98mm de área, passou primeiramente pela prensa, retirando o excesso de água, segundo a norma. A secagem ocorreu por tensão, seguindo um processo idêntico ao referido no ponto 2.2.5.1.

#### 2.2.5.4. Obtenção de Celulose Bacteriana (CB) em gel

Para obter celulose bacteriana em gel, repetiu-se a etapa de desconstrução da membrana, desintegrando a mesma a 30000 revoluções por duas vezes (2x15000 revoluções). A etapa seguinte remete à filtração, usando para tal um funil de Büchner e papel de filtro, com recurso a bomba de água e lavando o filtrado (2x1L). A filtração decorreu durante 23 minutos. Após esse tempo, recolheu-se o filtrado para uma placa de petri, tal como o papel de filtro, reservando no frigorífico.

#### 2.2.6. Análise por Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV)

Para avaliar a morfologia e diâmetros das amostras em estudo recorreu-se ao MEV - Microscópio Eletrónico de Varrimento.

Primeiramente, algumas amostras foram desidratadas utilizando dois ciclos de centrifugação a 11500 r.p.m. durante 150 segundos e secas na estufa a 105°C.

Numa segunda instância, adotou-se para todas as amostras o método de fixação. Foi preparada uma solução de glutaraldeído (25% E.M. Grade,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ ) a 2,5%, na qual as amostras, devidamente dispostas num porta-amostras, foram deixadas *overnight*. Após esta etapa, foram emersas em soluções de concentração alcoólica crescente (20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%), permanecendo em cada uma durante 10 minutos. Terminado o processo de troca de solvente, as amostras foram desidratadas pelo método do ponto crítico do  $\text{CO}_2$  (CDP - Critical Point Dryer method). Neste método as amostras são colocadas na câmara, a qual está pré-arrefecida e é imediatamente preenchida com  $\text{CO}_2$ , que tem o seu ponto crítico a 31°C e a uma pressão de 1072 psi. Seguidamente, as amostras são aquecidas acima da temperatura crítica, atingindo, conseqüentemente, a pressão crítica. As condições de operação são 1500 psi e 35°C.

Uma vez isentas de água, as amostras foram dispostas no porta-amostras utilizando uma fita adesiva de lado duplo. Seguidamente foram revestidas com ouro, usando para tal o equipamento Sputter Quorum Q15 OR ES (Quorum Technologies, Reino Unido) e foram analisadas pelo microscópio eletrónico de varrimento, modelo Hitachi S-3400N com um detetor Bruker.

## 2.2.7. Preparação de “Drug Delivery Systems”

### 2.2.7.1. Preparação de esferas de alginato-polímero: alginato-celulose nanofibrilada, alginato-celulose bacteriana e alginato-carboximetilcelulose

Numa primeira etapa, foi preparada uma solução de alginato a 2% (m/v), homogeneizada a 700 r.p.m., e uma solução de cloreto de sódio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 0,2M. As esferas de alginato-celulose nanofibrilada foram preparadas numa proporção de 2:1, adicionando para isso num gobelé 20 mL da suspensão de celulose nanofibrilada e 40 mL da solução de alginato. Com o auxílio de uma bureta fez-se gotejar um volume de 8-10 mL da mistura preparada anteriormente sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ , formando assim 100-110 esferas de alginato-celulose nanofibrilada.

A obtenção das esferas de alginato-celulose bacteriana seguiu os moldes previamente descritos. Como tal, a 40 mL da solução de alginato foi adicionado cerca de 19g de celulose bacteriana em gel e ainda 45 mL de água. A celulose bacteriana em gel foi obtida por desconstrução de uma membrana, como indicado no ponto 2.2.5.4. Recorrendo a uma bureta, fez-se gotejar um volume de 8-10 mL da mistura preparada sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ , formando assim 100-110 esferas de alginato-celulose bacteriana.

No que respeita à preparação de esferas de alginato-carboximetilcelulose, foi preparada uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,02 mg/mL, homogeneizada a a 1000 r.p.m. As esferas foram preparadas numa proporção de 2:1, adicionando 40 mL solução de alginato a 20 mL da solução de CMC num gobelé. Seguidamente, com o auxílio de uma bureta, obtiveram-se 100-110 esferas, num volume de 8-10 mL, quando pipetadas sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ .

### 2.2.7.2. Preparação de esferas de alginato-polímero com corante verde

De forma a encapsular o corante verde alimentar no sistema alginato-celulose nanofibrilada, a 40mL da solução de alginato adicionou-se 20mL de suspensão de celulose nanofibrilada e 1mL corante.

No caso do sistema alginato-celulose bacteriana, a 40mL da solução de alginato foi adicionado 19g de celulose bacteriana em gel, 45mL de água desionizada e 1mL corante verde. Com o auxílio de uma bureta, fez-se gotejar cada uma das misturas, num volume de 8-10 mL de cada, sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ , obtendo-se 100-110 esferas de alginato-celulose nanofibrilada e de alginato-celulose bacteriana.

As esferas de alginato-carboximetilcelulose com corante verde foram preparadas adicionando 40 mL solução de alginato, 20 mL da solução de CMC e 1 mL de corante verde num gobelé. Seguidamente, com o auxílio de uma bureta, obtiveram-se 100-110 esferas, num volume de 8-10 mL, quando pipetadas sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ .

### 2.2.7.3. Preparação de esferas de alginato-polímero com Diclofenac

Relativamente à incorporação do fármaco nos sistemas, primeiramente preparou-se uma solução de 200mL de Diclofenac a 1% (m/v).

As esferas do sistema alginato-celulose nanofibrilada e Diclofenac foram preparadas numa proporção 2:1:2. Para tal, adicionou-se 40mL da solução de alginato, 20mL de suspensão de celulose nanofibrilada e 40mL da solução de Diclofenac num gobelé.

No que respeita ao sistema alginato-celulose bacteriana com Diclofenac, adicionou-se 40mL da solução de alginato, 13g de celulose bacteriana em gel, obtida como descrito no ponto 2.2.5.4, e 40mL da solução de diclofenac num gobelé.

O sistema alginato-carboximetilcelulose com Diclofenac foi preparado numa proporção 2:1:2 por adição de 40 mL solução de alginato, 20 mL da solução de CMC e 40 mL de solução de Diclofenac num gobelé.

Seguidamente, com o auxílio de uma bureta, obtiveram-se 100-110 esferas de cada sistema pipetadas sobre 40 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ .

## 2.2.8. Estudos cinéticos de libertação

### 2.2.8.1. Cinética de libertação do corante alimentar verde

As esferas de alginato-celulose nanofibrilada e alginato-celulose bacteriana, com o corante alimentar verde encapsulado e sem incorporação do fármaco, foram filtradas e colocadas em 500 mL de água desionizada. Posteriormente, recolheram-se amostras de 5 mL nos seguintes tempos: 0; 1; 2; 3; 4; 8; 12; 14; 16; 20; 24; 28; 38; 48; 60, 75 minutos e *overnight*. Após cada recolha, repôs-se o volume com 5mL de solução nova para manter sempre as mesmas condições de libertação.

De seguida, as amostras foram analisadas num espectrofotómetro Ultravioleta-Visível (Helios Omega Uv-Vis), a um comprimento de onda de 413nm, utilizando uma cuvete de quartzo com um percurso ótico de 1 cm. Assumiu-se como zero a água desionizada que servia como meio de libertação.

### 2.2.8.2. Cinética de libertação do Diclofenac

No que respeita ao estudo cinético de libertação do fármaco escolhido, o Diclofenac, nos sistemas de transporte e entrega em estudo, estes foram realizados em triplicado, durante 6h, em três meios de pH diferentes a, aproximadamente, 37°C. Para o efeito, foram preparados 2L de cada solução: HCl a pH 2 (0,01M), tampão fosfato a pH 6,6 (0,01M) e a pH 7,4 (0,01M).

Os diferentes sistemas foram colocados, no primeiro ensaio, em 250 mL de solução tampão de HCl a pH 1,2 durante 2H. Seguidamente, foram colocados em 250 mL de tampão fosfato a pH 6,6 nas duas horas seguintes e, por fim, nas últimas 2 h, em 250 mL de tampão fosfato a pH 7,4.

Durante o total de 6h de ensaio foram retiradas alíquotas de 5mL nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 minutos, em cada meio de libertação. Após cada recolha, repôs-se o volume com 5mL de solução nova para manter sempre as condições de libertação. As amostras foram seguidamente analisadas num espectrofotómetro Ultravioleta-visível (Helios Omega Uv-Vis), a 276nm, utilizando uma cuvete de quartzo com um percurso ótico de 1 cm e assumindo como zero a solução que servia como meio de libertação em cada um dos ensaios.

### 2.2.9. Ângulo de Contacto

Com o propósito de avaliar as propriedades referentes à superfície dos materiais foi medido o ângulo de contacto de algumas amostras recorrendo a um equipamento de medição de ângulo de contacto (OCAH200, Dataphysics).

Recortou-se uma pequena porção do material a ser analisado e a mesma foi colocada no suporte, ajustando para que ficasse a superfície completamente esticada. O método usado foi o da gota suspensa e as condições de operação foram as seguintes: distância de 0,52 cm, um “feed” de 0,5 µL/s, um volume da gota de 5 µL e o líquido usado foi água.

### 2.2.10. FTIR - ATR

A espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi executada usando a técnica de ATR, isto é, Reflexão Total Atenuada, que se designa FTIR-ATR. Este método permite a análise direta da superfície das amostras. Obtiveram-se os espectros referentes a cada amostra e, posteriormente, foi feita a sua comparação.

## 2.2.11. Tratamento de imagem

As imagens obtidas pelo MEV foram ainda sujeitas a uma análise de imagem, recorrendo a uma metodologia sistemática e com critérios definidos usando um programa de tratamento de imagem, o ESPRIT da Bruker. O módulo usado para tal foi o “Feature”. Primeiramente, de entre um conjunto de opções, é escolhido um filtro que antecede a etapa de binarização da imagem, permitindo ainda configurar e ajustar as propriedades do filtro. Entre as opções, encontra-se filtros para corrigir o gradiente de sombras de uma amostra e para reduzir o ruído e nível de detalhe da imagem, para melhorar as arestas criando maior contraste entre zonas claras e escuras.

A etapa seguinte é referente à binarização da imagem, seguindo-se a escolha de filtros morfológicos. A necessidade deste último passo prende-se com a medição correta das partículas. Seguem-se o passo “Analysis” em que é possível inserir o tamanho mínimo em píxeis da partícula e o programa devolve o valor correspondente em termos de área, assim como a fração de área correspondente às partículas com esse tamanho. No que respeita ao passo seguinte, o “Accept/Reject”, podem ser escolhidos filtros referentes às propriedades das partículas, fazendo com que só sejam aceites partículas que coincidirem com os limites definidos pelos filtros, apresentando ainda o número de partículas da imagem aceites. Por fim, tem-se a opção “Display” no menu, em que se pode definir como é que as partículas aparecem coloridas e o nível de transparência.

O programa permite ainda fazer medições na imagem e dispor os resultados de variadas formas, relacionando diferentes propriedades.

## 2.2.12. Simulação computacional

Foi utilizado um simulador computacional, desenvolvido em MATLAB® e validado para simular computacionalmente materiais poliméricos porosos (Conceição et al. 2010).

### **III. Discussão de Resultados**

## 3.1 Caracterização dos materiais

### 3.1.1. Nanocelulose Innventia

A nanocelulose designada por nanocelulose Innventia teve como propósito servir de referência e permitir a comparação com a nanocelulose de origem vegetal, obtida durante o trabalho experimental e que foi destruturada até à escala nano.

A nanocelulose Innventia é de origem vegetal, proveniente das fibras de madeira. Trata-se de um material com uma grande capacidade de retenção de água, com um aspeto que se assemelha a um gel semitransparente.

A Figura 17 e Figura 19 são referentes às imagens obtidas com recurso ao Microscópio Eletrónico de Varrimento. A preparação da amostra para visualização e obtenção de imagens foi feita de acordo com o método descrito anteriormente com fixação com glutaraldeído.

A Figura 18 é o resultado do tratamento da imagem da Figura 17 pelo programa ESPRIT, da Bruker, usando o módulo “Feature”. A imagem original foi primeiramente binarizada e seguidamente foram aplicados os filtros disponíveis, obtendo-se a figura apresentada. Esta demonstra a disposição de cada partícula com uma cor diferente, uma vez que se seleccionou a opção “Individual”. A listagem das propriedades das partículas contempla a área, o perímetro, comprimento, largura e diâmetro médio. Os resultados indicam uma área de fração de 20,7%, num total de 130 partículas.

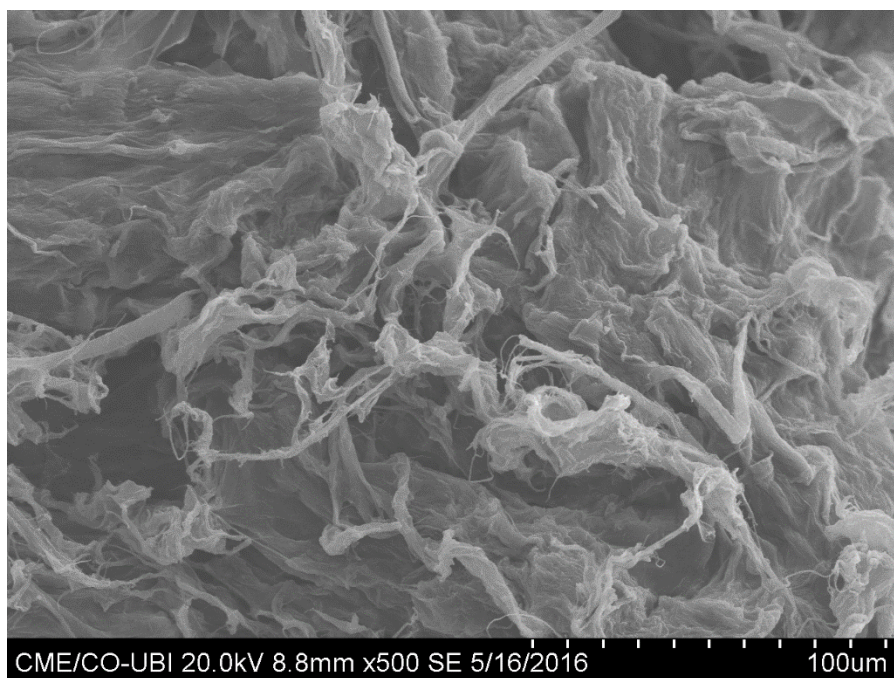


Figura 17. Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia).

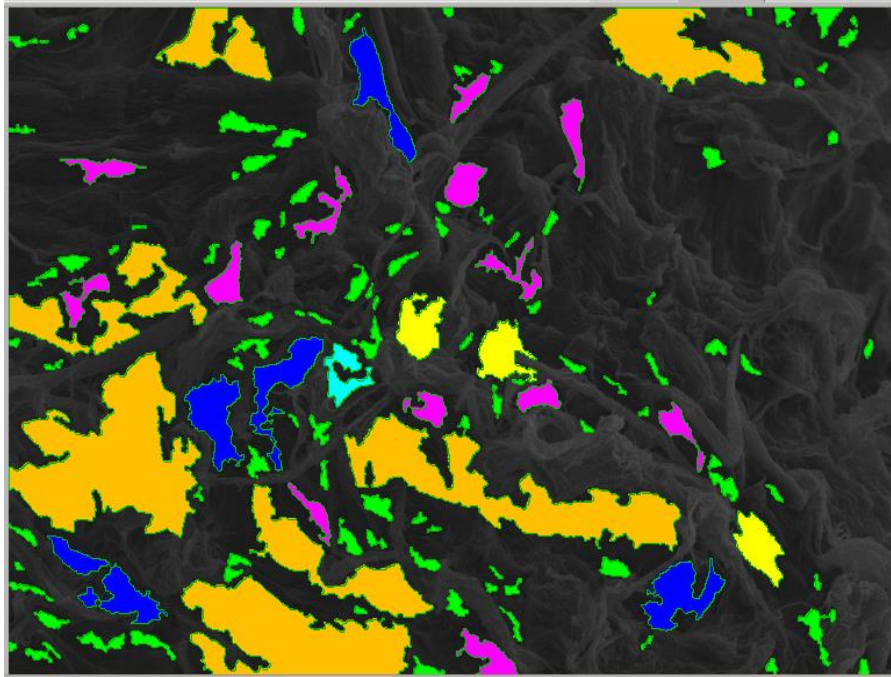


Figura 18. Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia), com tratamento e análise de imagem.

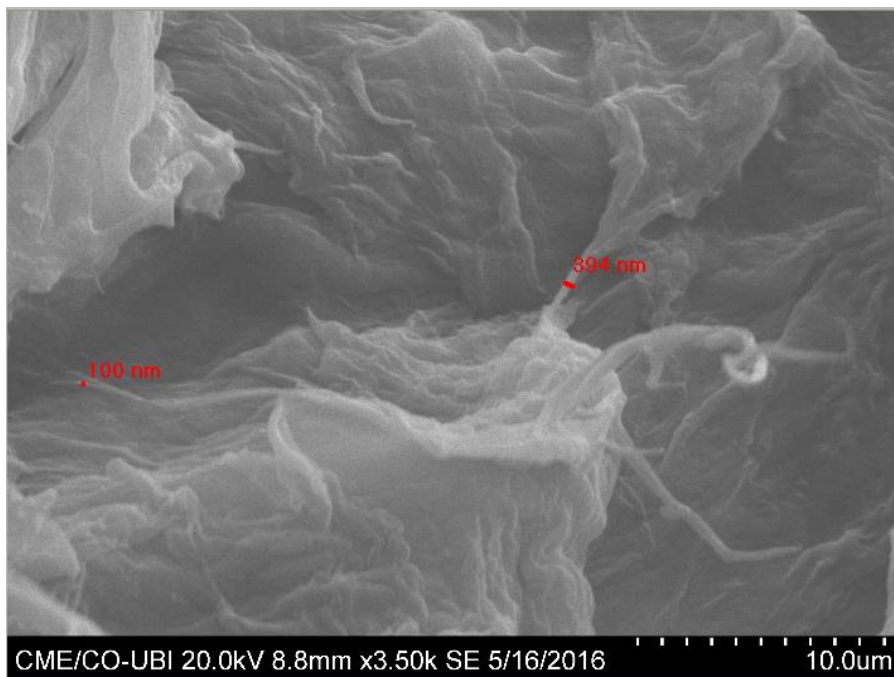
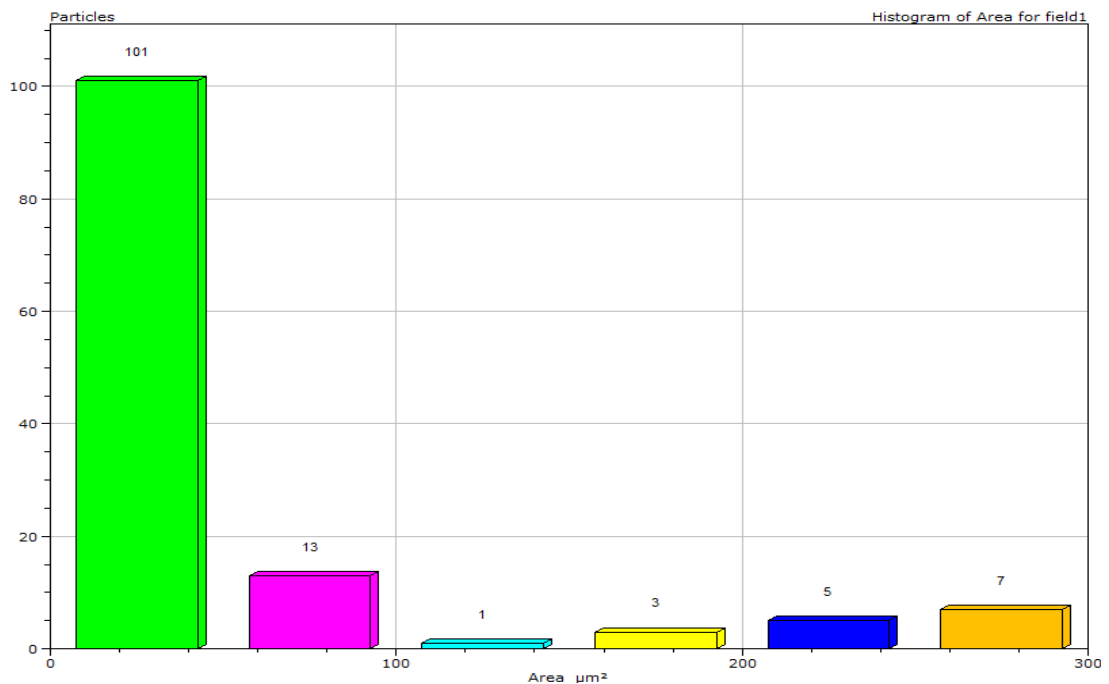


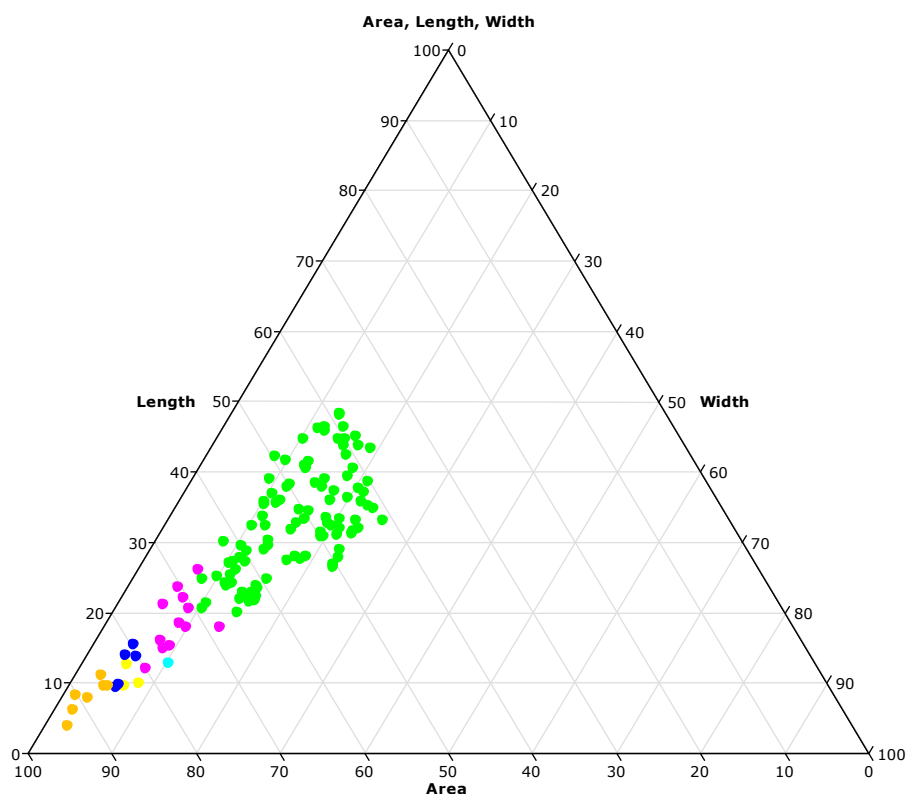
Figura 19. Imagem MEV de nanocelulose de referência (Innventia), com medidas de diâmetros pelo programa de tratamento e análise de imagem.

A Figura 20 é referente ao histograma em que existe agrupamento das partículas por classe, sendo o critério a área das mesmas. Observa-se que as classes que apresentam maior número de partículas são aquelas cujas áreas é inferior a  $100 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 20.** Histograma da área das partículas, pelo programa de tratamento e análise de imagem.

O diagrama ternário apresentado (Figura 21) relaciona três das propriedades das partículas, sendo estas a área, o comprimento e a largura. Por observação, infere-se que a distribuição do maior número de partículas ocorre em áreas compreendidas entre  $40$  e  $70 \mu\text{m}^2$ , valores de comprimento entre  $30$  e  $60 \mu\text{m}$  e de largura compreendidos entre  $50$  e  $80 \mu\text{m}$ .



**Figura 21.** Diagrama ternário da área, comprimento e largura das partículas, pelo programa de tratamento e análise de imagem.

### 3.1.2. Celulose Bacteriana (CB)

A celulose de origem bacteriana é produzida num meio de cultura, em interface com o ar, originando uma estrutura em membrana, em que uma elevada quantidade de água se encontra aprisionada na estrutura 3D obtida.

A imagem da Figura 22 demonstra um corte da membrana de celulose bacteriana no eixo dos z, possibilitando assim observar a sua organização estrutural em profundidade. O corte da membrana de Celulose Bacteriana permite observar uma rede que, embora também seja 3D, não se apresenta tão orientada.

É possível determinar valores de porosidade e de diâmetros a diferentes níveis (Tabela 6) e visualizar a coexistência de diferentes níveis estruturais à escala micro e nano. Esta combinação de escalas tem um efeito benéfico, pois é uma forma de conferir maior estabilidade à estrutura.

Nas figuras 23 e 34 podem observar-se diferentes medições de unidades estruturais, sendo uma delas obtida pelo método de vetores manual e a outra por tratamento de imagem pelo programa ESPRIT.

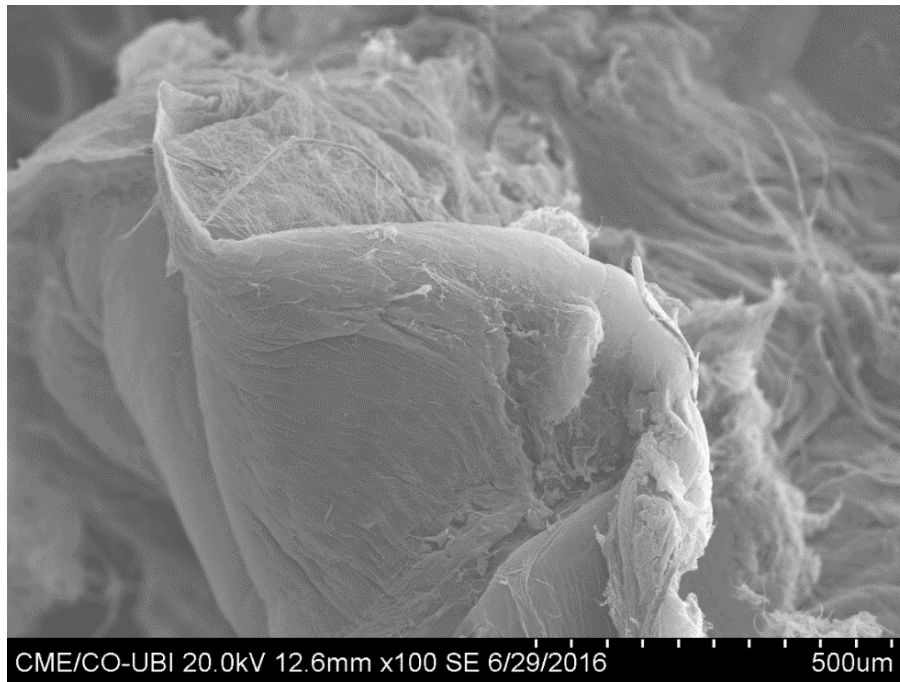


Figura 22. Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana.

Tabela 6. Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos.

Extremos de valores de poro	Extremos de valores de diâmetro
Maior: 758 nm	Maior: 7,15 $\mu$ m
Menor: 139 nm	Menor: 30,7 nm

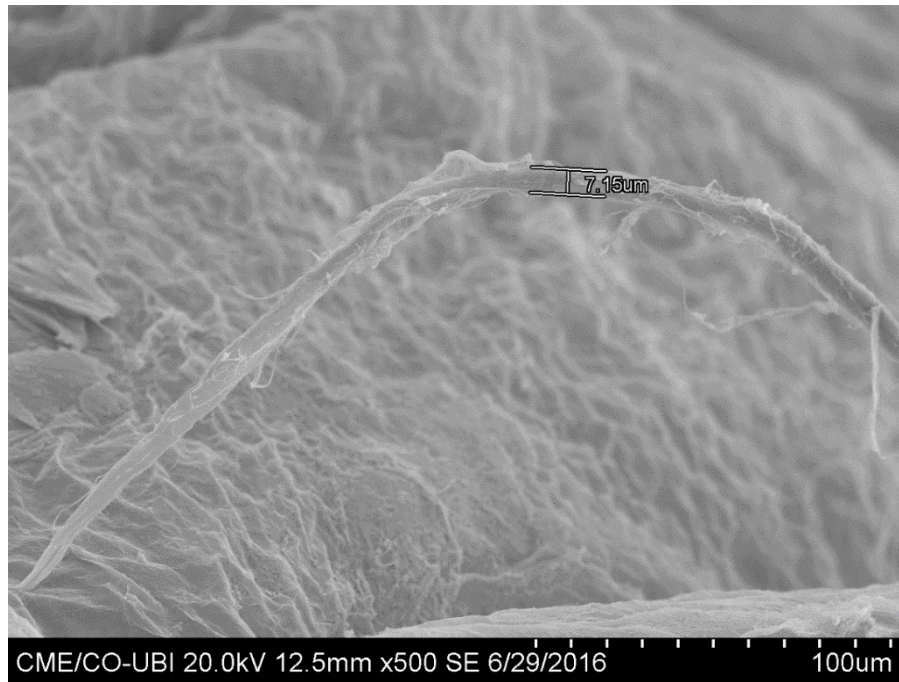


Figura 23. Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana, com medições de diâmetro de uma fibra.

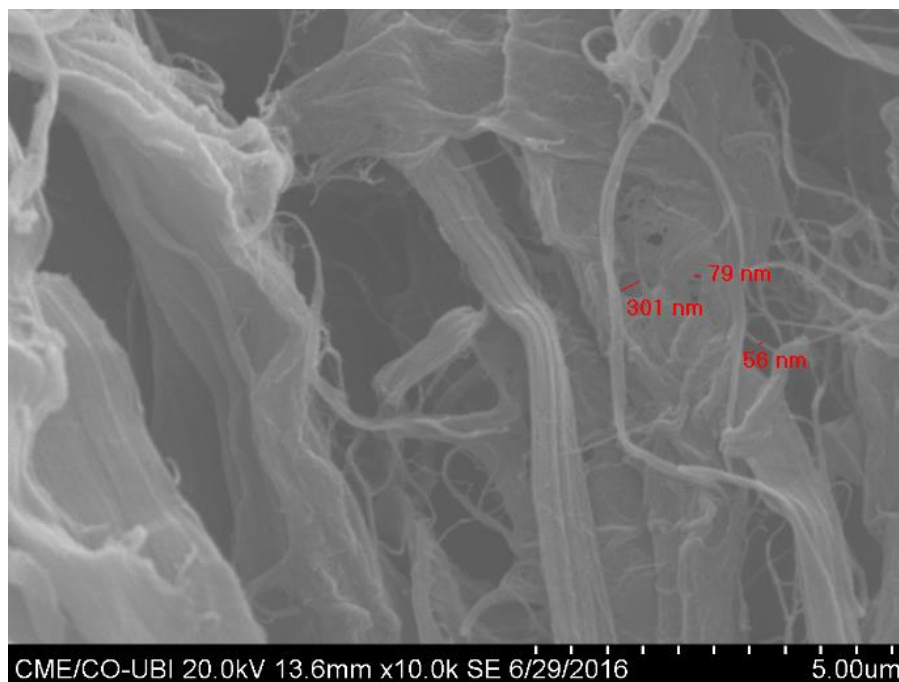


Figura 24. Imagem MEV de um corte de membrana de celulose bacteriana, com medições de diâmetros de fibras e poros, pelo programa de análise de imagem.

### 3.1.3. Celulose Nanofibrilada (CNF)

A celulose nanofibrilada, de origem vegetal, obteve-se após destruturação das fibras de celulose em pasta, após tratamento mecânico (refinação), tratamento químico (oxidação com radical TEMPO) e tratamento mecânico final com homogeneizador de alta pressão.

#### 3.1.3.1. Celulose nanofibrilada em suspensão

Os resultados obtidos para a celulose nanofibrilada em suspensão encontram-se sumariados na tabela 7. As imagens 25, 26 e 27 são ilustrativas da estrutura porosa obtida.

Tabela 7. Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos.

Extremos de valores de poros	Extremos de valores de diâmetros
Maior: 24,2 $\mu\text{m}$ Menor: 624 nm	Maior: 345 nm Menor: 179 nm

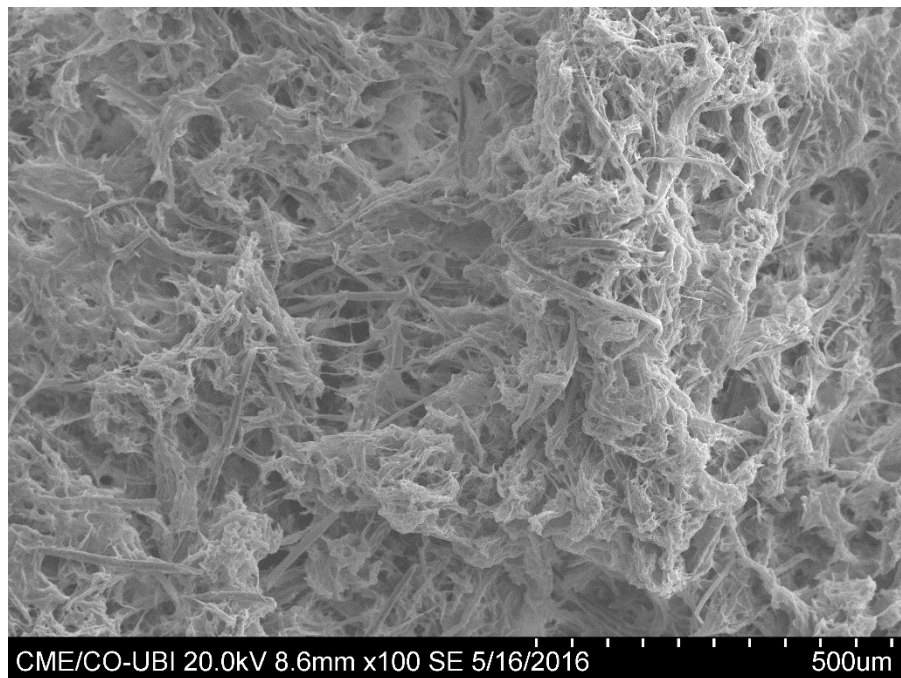


Figura 25. Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada.

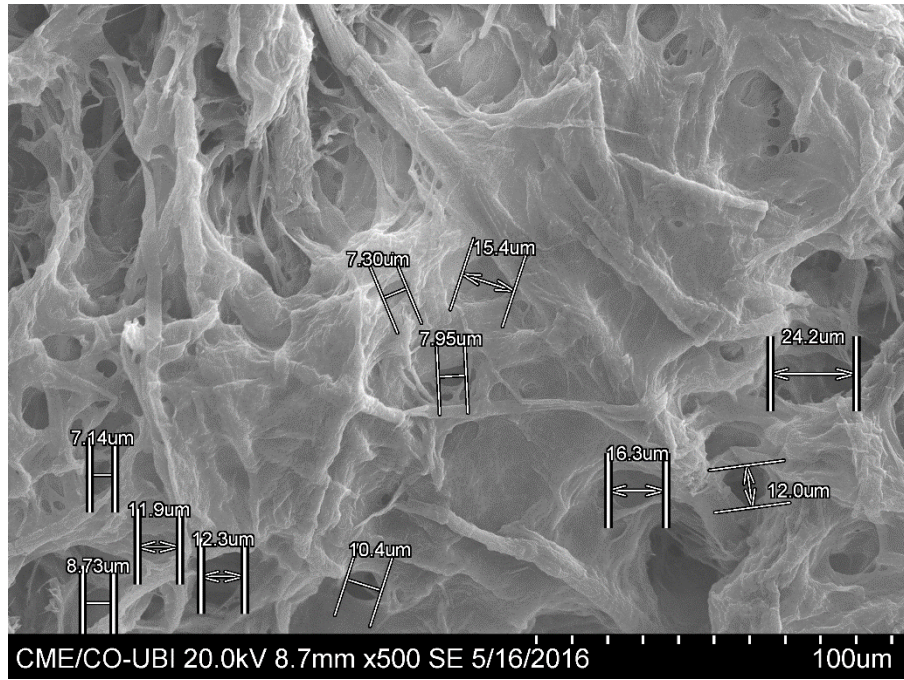


Figura 26. Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada, com medidas de diâmetros de poros.

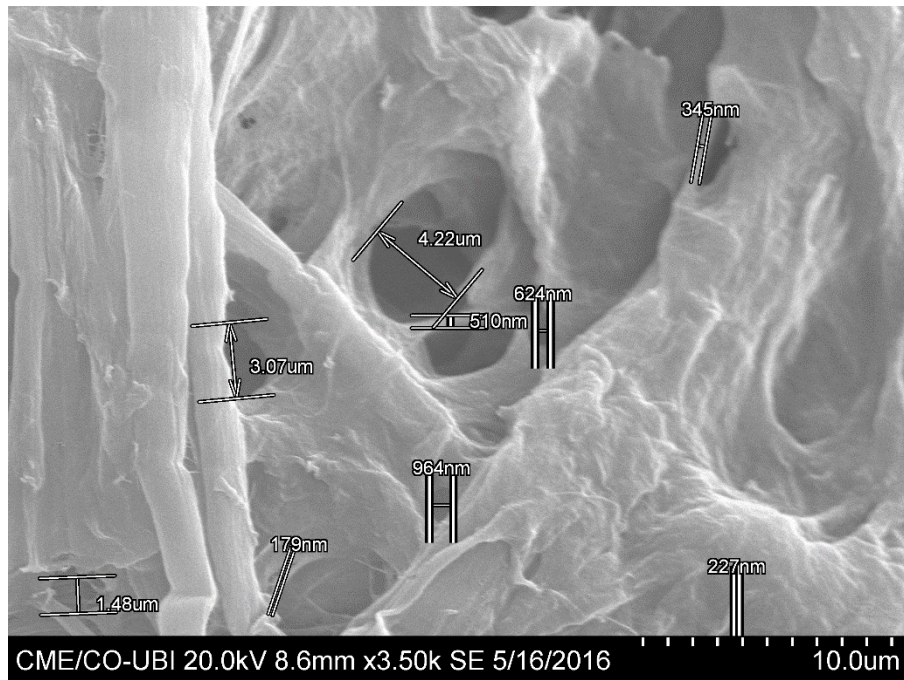
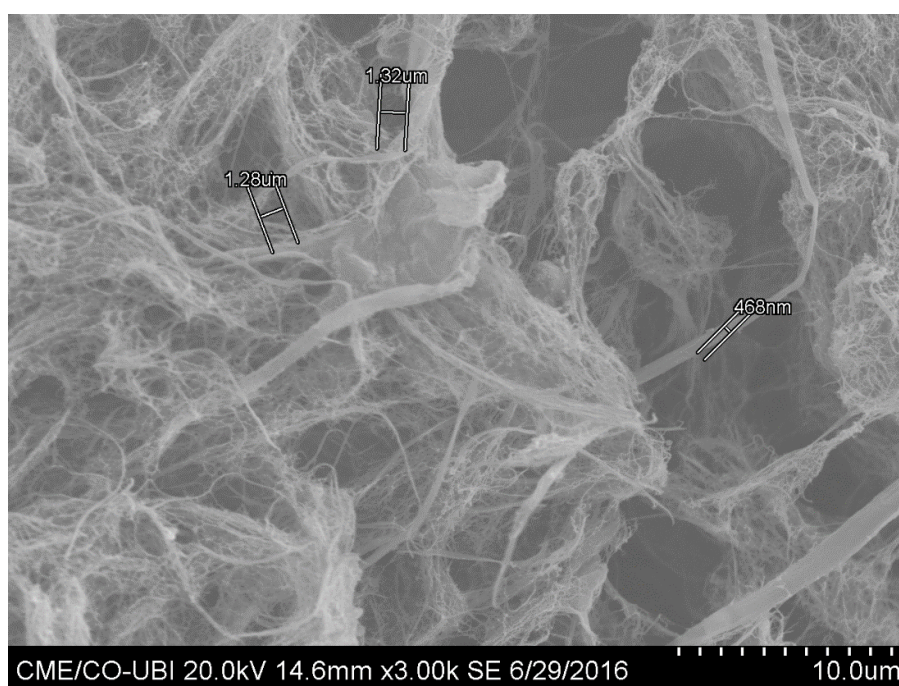


Figura 27. Imagem MEV de uma mostra de suspensão de celulose nanofibrilada, com medidas de diâmetros de poros e de fibras.

### 3.1.3.2. Celulose Nanofibrilada (CNF) em gel

A Figura 28 e Figura 29 permitem visualizar a estrutura em gel nanofibrilada obtida por filtração da suspensão S1 e com um tempo de drenagem de 21 minutos. Esta estrutura apresenta poros com dimensões à escala micro e diâmetros de fibras na escala nano e micro (tabela 8). Apresenta-se como um material polimérico com uma rede 3D porosa e aleatória.



**Figura 28.** Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com medidas de diâmetros de poros e de fibras.

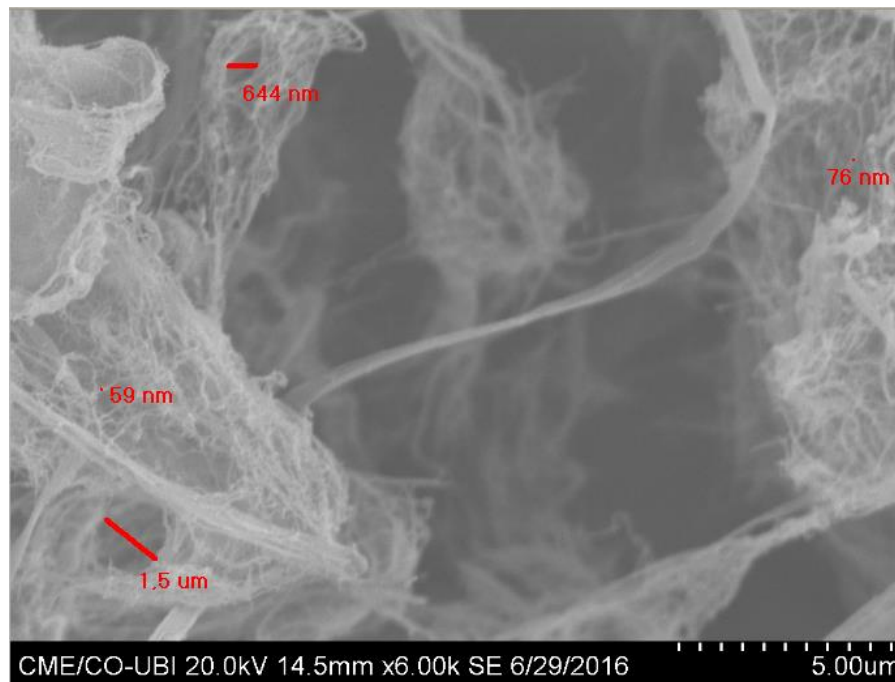
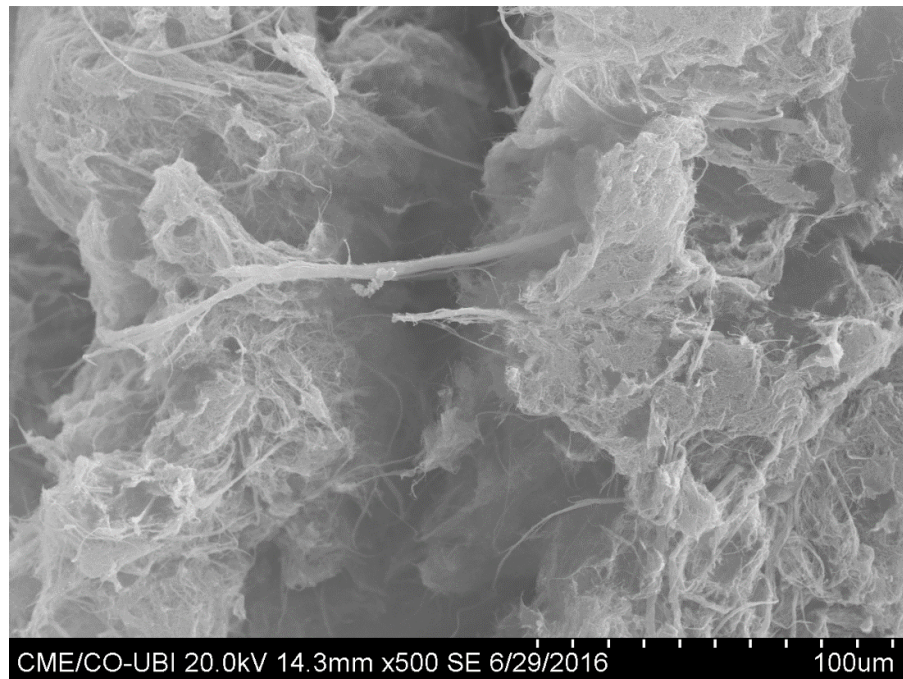


Figura 29. Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com medidas de diâmetros de poros e de fibras pelo programa de análise e tratamento de imagem.

Tabela 8. Extremos dos valores de poro e diâmetro medidos.

Extremos de valores de poros	Extremos de valores de diâmetros
Maior: 1,5 $\mu\text{m}$ Menor: 644 nm	Maior: 468 nm Menor: 59 nm

A Figura 30 apresenta uma imagem MEV de uma estrutura em gel de celulose nanofibrilada, a uma ampliação de x500, em que é possível observar um exemplo do efeito de ligação, ou “binding”, entre as fibras. Esta amostra de celulose nanofibrilada foi obtida após tratamento por ultrassons e filtração da suspensão S1, com um tempo de drenagem 23 minutos



**Figura 30.** Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com tratamento prévio de ultrassons.

A Figura 31, a Figura 32 e a Figura 33 são referentes às imagens MEV da estrutura em gel de celulose nanofibrilada, com tratamento prévio de ultrassons. Utilizou-se a suspensão S2 para obter esta estrutura e verificou-se que, embora se tenham mantido as mesmas condições de operação, o tempo de drenagem sofreu uma alteração considerável, sendo de 1h30m comparativamente ao da S1 de 23 minutos.

Esta estrutura apresenta ser um material polimérico relativamente ordenado, com diâmetros de fibras num intervalo que vai desde os de 26,5nm (Figura 33) até 240nm (Figura 31). Relativamente aos poros os valores medidos figuram-se também superiores, como os apresentados na Figura 33, com os valores de 332 nm e 212 nm.

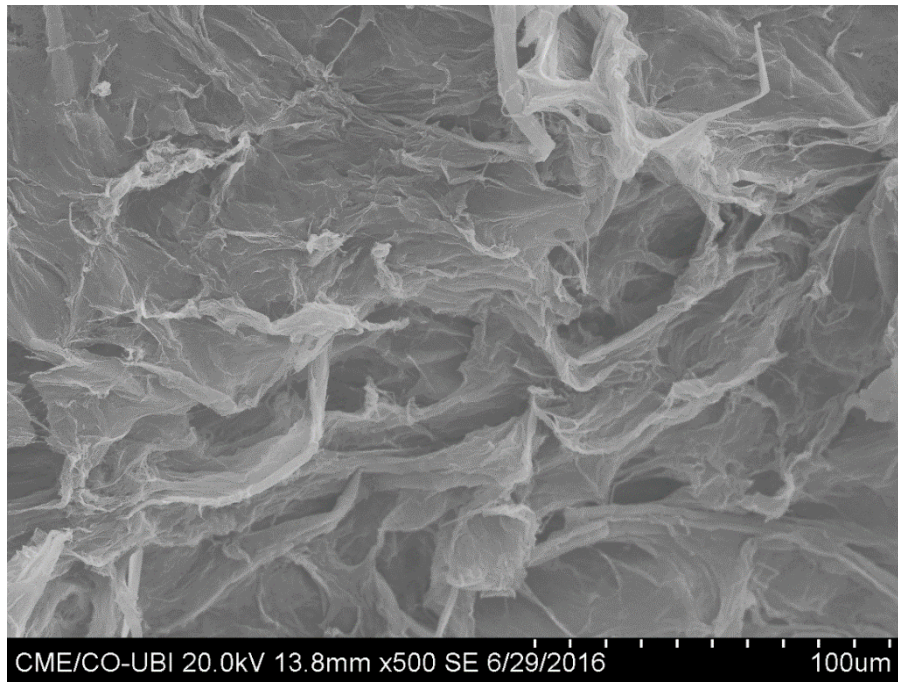


Figura 31. Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel, com tratamento prévio de ultrassons.

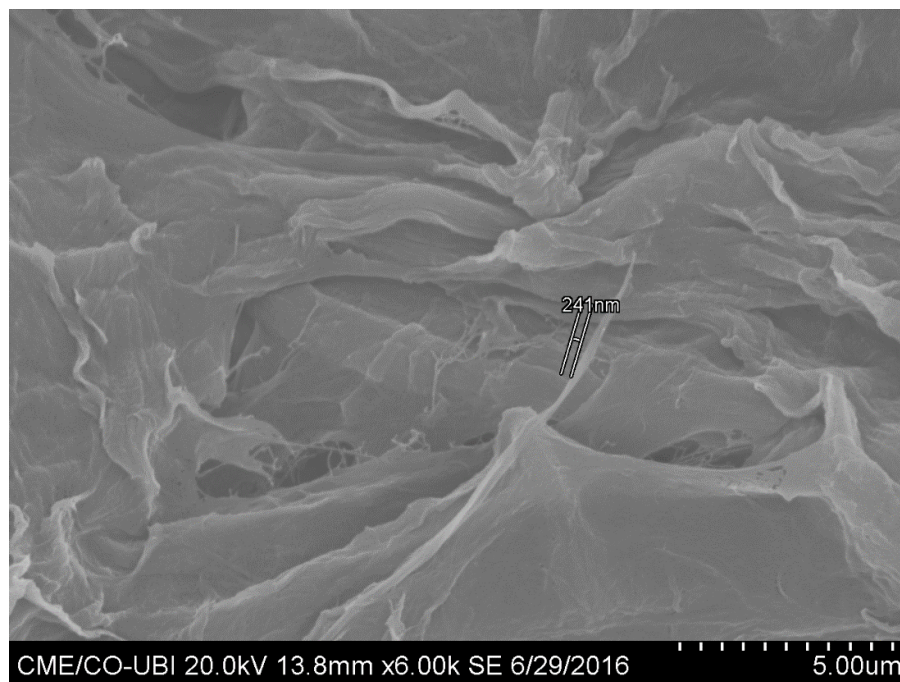


Figura 32. Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel com tratamento prévio de ultrassons, com medições de diâmetros.

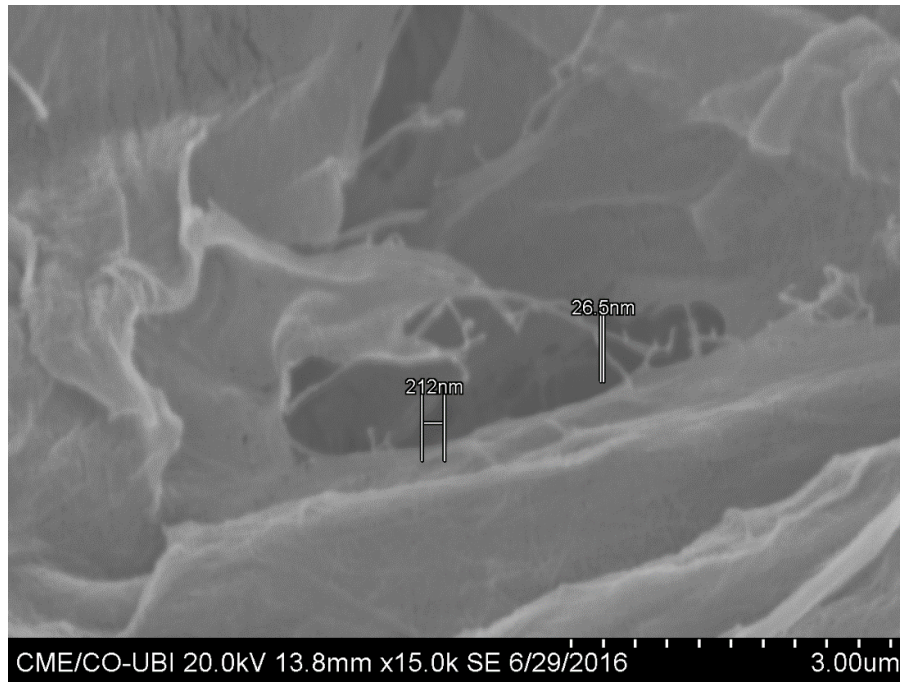


Figura 33. Imagem MEV de uma mostra de celulose nanofibrilada em gel com tratamento prévio de ultrassons, com medições de diâmetros de poros e fibras.

### 3.1.4. “Drug delivery system”: esfera de alginato-polímero

A Figura 34 é uma imagem MEV de uma esfera de alginato. Em imagens obtidas com ampliações superiores, mediu-se diâmetro mínimo de 80 nm (Figura 35) e máximo de 260 nm. No que respeita às dimensões dos poros, mediram-se na imagem 36 valores mínimos de diâmetro de 72 nm e máximo de 360 nm.

O sistema apresentado é constituído por uma rede 3D aleatória, possuindo elementos estruturais e porosidade tanto na escala micro, como na na escala nano.



Figura 34. Imagem MEV de esfera de alginato.

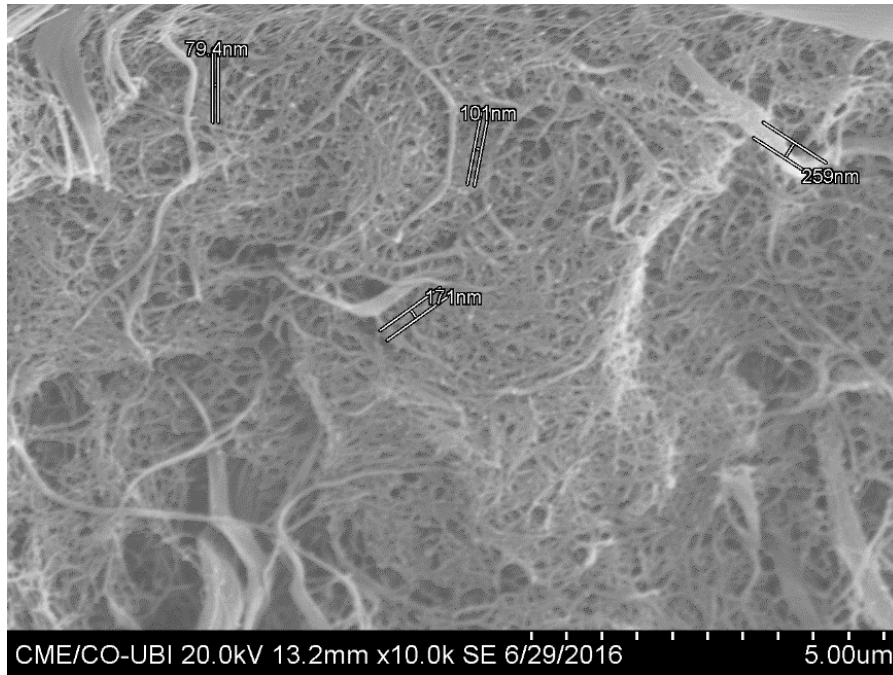


Figura 35. Imagem MEV de esfera de alginato com medições de diâmetros.

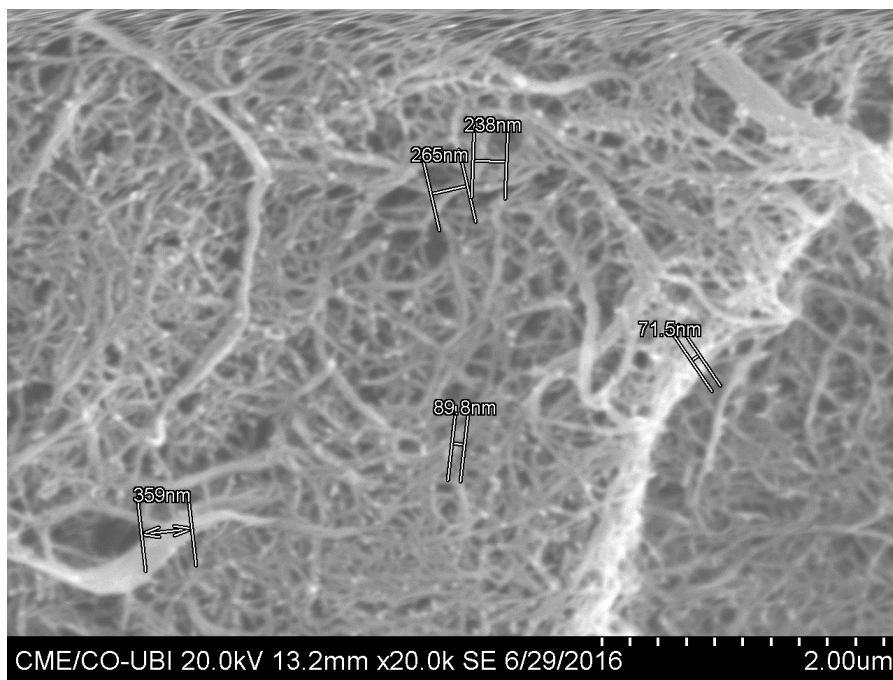


Figura 36. Imagem MEV de esfera de alginato com medições de diâmetros e poros.

A Figura 37 é uma imagem MEV de uma esfera de alginato-celulose nanofibrilada, obtida a uma ampliação de x32.

Na Figura 38, a uma ampliação de x6000, é possível observar que a estrutura possui fibras com diâmetros à escala micro. Verifica-se que uma imagem da mesma estrutura obtida com uma ampliação de x10000 (Figura 39), quando analisada com a metodologia associada ao programa de tratamento de imagem ESPRIT, apresenta valores de diâmetro de 36 nm, 50 nm e 63 nm, sendo que o menor diâmetro que foi possível medir tem um valor de 28 nm. Os valores dos poros estão compreendidos entre 129nm e 406nm (Figura 40).

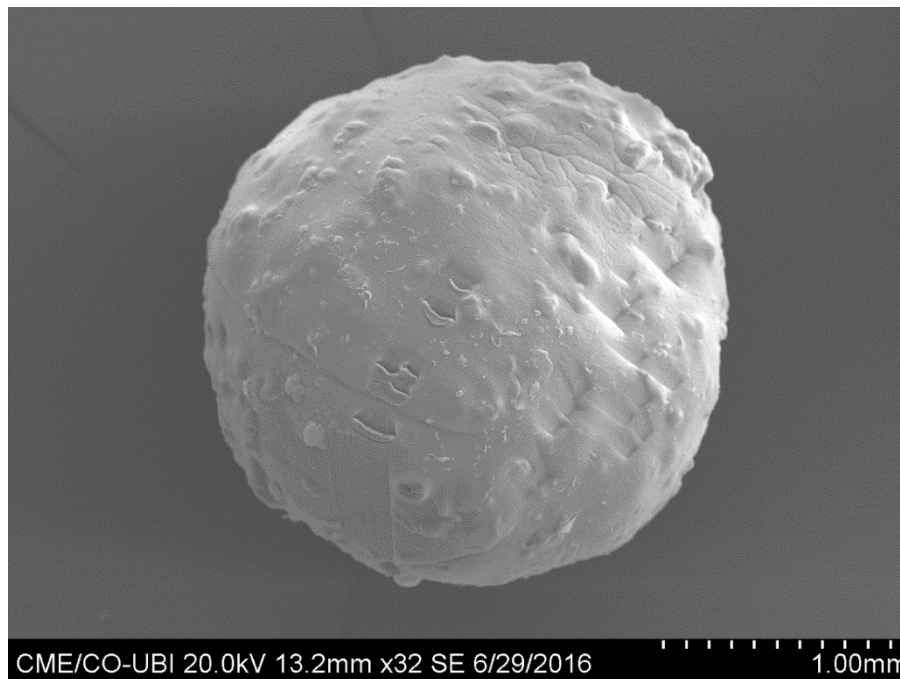


Figura 37. Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada.

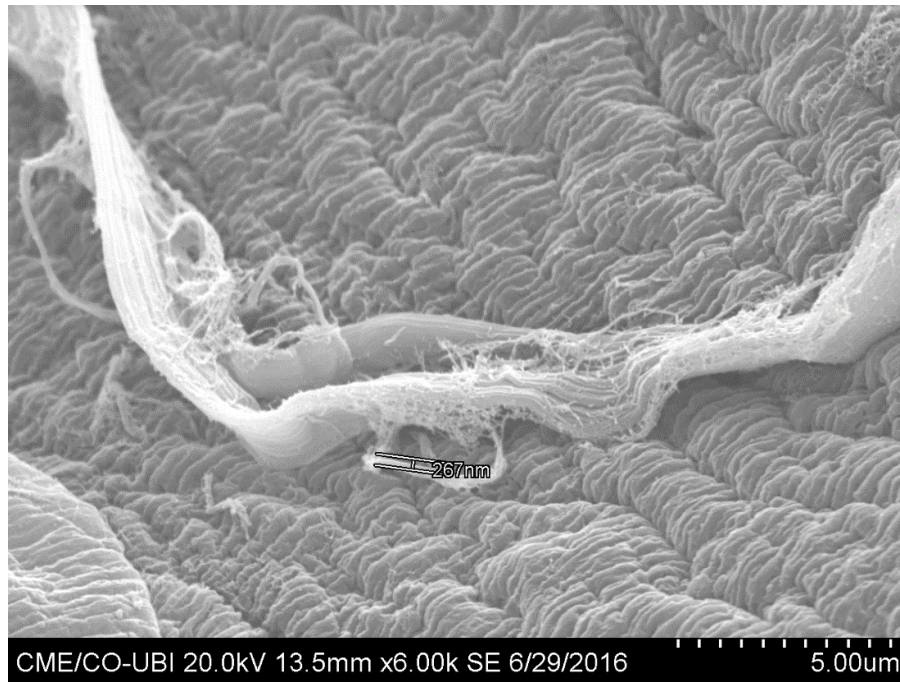


Figura 38. Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, com medições de diâmetros.

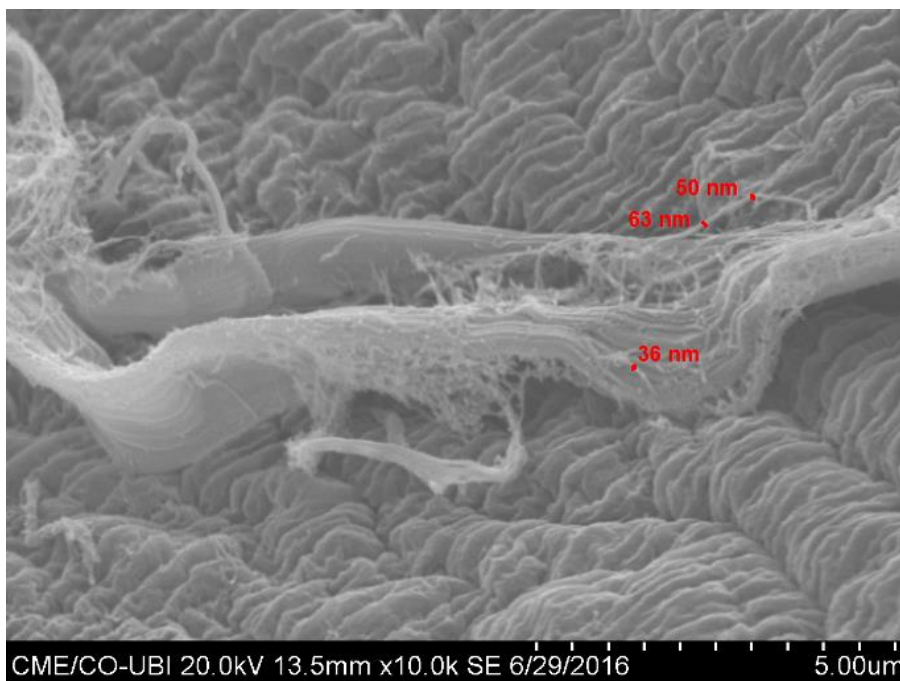


Figura 39. Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, com medições pelo programa de tratamento e análise de imagem.

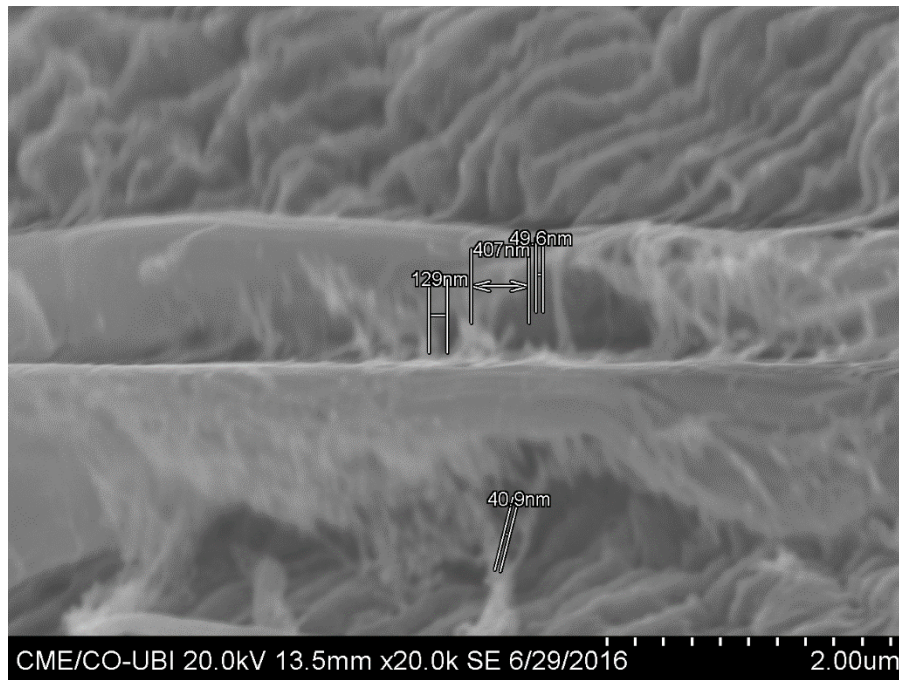


Figura 40. Imagem MEV de esfera de alginato e celulose nanofibrilada, com medições de diâmetros de poros e fibras.

## 3.2 Tratamento e análise de imagem

É necessário definir uma metodologia de preparação das amostras para visualização no Microscópio Eletrônico de Varrimento, que mantenha a estrutura porosa e que não comprometa os passos seguintes referentes ao tratamento e análise de imagens.

A preparação de amostras por secagem na estufa e centrifugação resulta em imagens no MEV com a rede 3D muito mais agrupada e colapsada, o que impossibilita a visualização da estrutura na sua plenitude e diferença hierárquica ao nível organizacional, assim como a medição de diâmetros (Figura 41). Adicionalmente, torna-se impossível fazer o tratamento da mesma imagem pelo programa de análise de imagem.

A utilização do programa de tratamento e análise de imagem implicou a definição de uma metodologia que utiliza uma abordagem sistemática na escolha crescente e fixa de ampliações a usar, na qual é importante a escolha adequada dos filtros, utilização de parâmetros de análise de imagens otimizados e critérios de validação bem definidos.

Procedeu-se a uma validação da metodologia de análise de imagem desenvolvida, comparando os valores obtidos para as dimensões das fibras e dos poros pelo programa de análise de imagem ESPRIT com os valores obtidos manualmente, com o método de colocação de vetores.

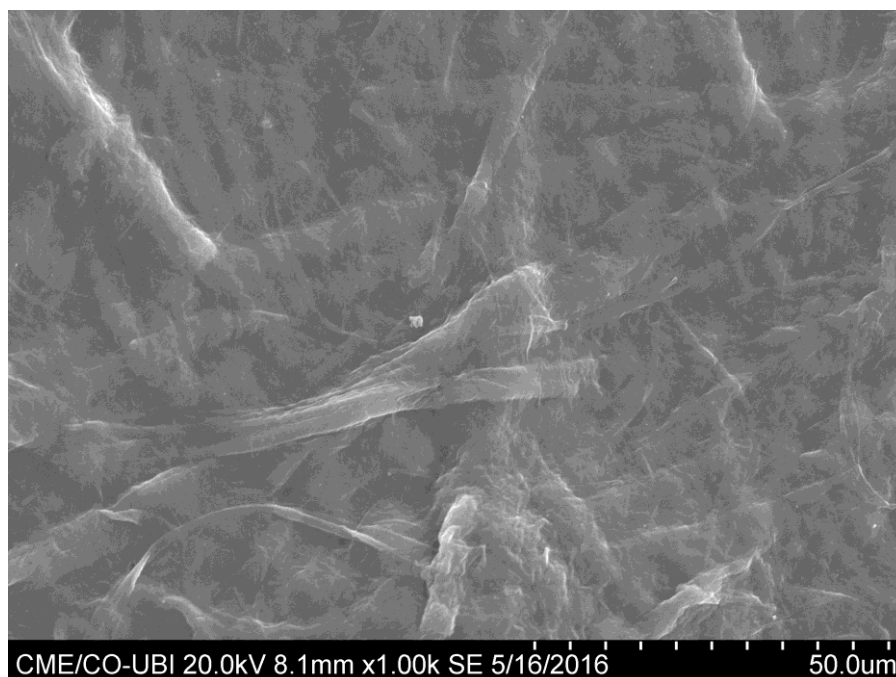


Figura 41. Imagem MEV da amostra da suspensão S2 preparada por centrifugação.

Utilizando um método de preparação de amostras recorrendo à fixação com glutaraldeído, troca de solventes e ao método de secagem do ponto crítico do CO<sub>2</sub> (CPD), provou-se que as amostras mantinham a sua estrutura porosa. Conclui-se que este método é indispensável na preparação das amostras quando se pretende visualizar e medir dimensões de poros e de fibras. Não o fazer em sistemas de entrega de fármacos implica não ter uma

representação correta dos mesmos. A obtenção dos valores das dimensões das fibras permite a sua posterior utilização, como dados de entrada, nas simulações computacionais. Tanto quanto é do nosso conhecimento, estas não se encontram ainda determinadas na literatura consultada.

### 3.3 Quantificação dos grupos acídicos totais

O gráfico apresentado (Figura 42) é referente à quantificação de grupos ácidos presentes na suspensão após o tratamento químico com radical TEMPO.

A azul encontra-se identificada a fase 1, a qual é característica dos grupos acídicos fortes, onde a condutividade apresenta um decréscimo pela neutralização que ocorre dos grupos acídicos com o hidróxido de sódio (NaOH). A fase 2, a laranja, é referente aos grupos acídicos mais fracos e ilustra a neutralização dos grupos carboxílicos enquanto a condutividade não se altera. A terceira fase está representada a cinzento e o aumento de condutividade é referente ao hidróxido de sódio (NaOH) em excesso que acaba por se acumular. O ponto de interseção entre as retas referentes à fase 2 e 3 dá o total de grupos carboxílicos. O valor resultante é de 1082,3315  $\mu\text{mol/g}$ .

Na literatura (Abdul Khalil et al. 2014), os valores descritos para pastas tratadas com TEMPO, mas que não foram sujeitos aos mesmos tratamentos químicos (pH e “scale-up” otimizado no tratamento com o TEMPO) e físicos (microfibrilação e homogeneização por alta pressão), situam-se entre os 300 e 500  $\mu\text{mol/g}$ .

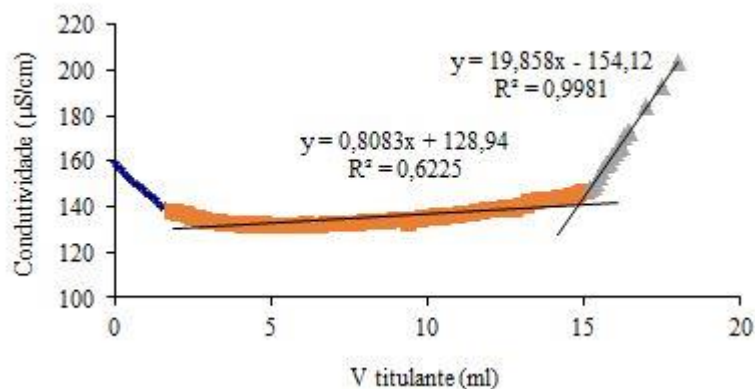


Figura 42. Gráfico resultante da quantificação dos grupos carboxílicos.

### 3.4 Ângulo de Contacto

A hidrofiliçidade das estruturas é uma propriedade de extrema importância no que respeita à seleção da molécula terapêutica que se tem como objetivo incorporar no material. Determinou-se o ângulo de contacto de uma estrutura de celulose microfibrilada (CMF), microfibrilada com carboximetilcelulose (CMF e CMC) e nanofibrilada (CNF), encontrando-se os valores obtidos na tabela 9.

**Tabela 9.** Valores dos ângulos de contacto medidos nas estruturas de CMF, CMF com CMC e CNF.

Material	Valor do ângulo de conta
Estrutura de CMF	50,82° ± 4,68
Estrutura de CMF com adição de CMC	47,31° ± 3,26
Estrutura de CNF	65,28° ± 3,36

Verifica-se uma diferença entre os valores obtidos, sendo a mais hidrofóbica a estrutura obtida a partir de celulose nanofibrilada, o que é indicativo de uma estrutura em rede mais fechada e em que os grupos OH estão envolvidos em ligações. No caso das estruturas com CMC, o facto de esta ser mais hidrofílica indica que apresenta mais grupos OH disponíveis para interação com a água. Nestas amostras de celulose com diferentes escalas e graus de fibrilação, a interação com água depende de diversos fatores, tais como a área superficial dos elementos estruturais e a estrutura formada, que contribuem de forma diferente para a quantidade total de grupos OH disponíveis à superfície.

O ângulo de contacto permite obter, de uma forma prática, resultados experimentais que indicam a relação das estruturas com o líquido escolhido, neste caso a água. Em algumas das estruturas porosas obtidas, o tamanho dos poros implica que ocorra penetração da gota de líquido na estrutura porosa antes de se obter uma imagem para a determinação do ângulo de contacto. Neste caso, será útil proceder à determinação do tempo de penetração da gota de líquido e da área de espalhamento, pois estes fornecem informação complementar importante para a incorporação das moléculas terapêuticas. O ângulo de contacto e a tensão superficial podem ser estudados juntamente com a penetração, utilizando um protótipo desenvolvido na UBI em que a deposição da gota é acompanhada em 3D (Curto et al. 2015)

### 3.5 FTIR-ATR

Na comparação dos espectros (Figura 43) de celulose bacteriana (a verde) com o de celulose nanofibrilada (a vermelho), é notório que a banda de estiramento correspondente às vibrações do grupo -OH dos ácidos carboxílicos e carboxilatos (entre 2500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ ) é superior no caso da celulose nanofibrilada.



Figura 43. Espectro de FTIR-ATR das estruturas em forma de folha de CB (verde) e CNF (vermelho).

### 3.6 Estudos de cinética de libertação

A Figura 44 é referente ao gráfico que ilustra a cinética de libertação do diclofenac dos diferentes sistemas (alginato-carboximetilcelulose, alginato-celulose nanofibrilada, alginato-celulose bacteriana), em meios de libertação com pH variáveis (2, 6,6 e 7,4).

No primeiro meio, a pH 2, observa-se que o perfil de libertação é semelhante entre os três sistemas, ainda que o sistema alginato-carboximetilcelulose atinja valores mais elevados de concentração de diclofenac.

O perfil de libertação continua a ser semelhante para os sistemas de alginato-carboximetilcelulose e alginato-celulose bacteriana a pH 6,6 até aos 200 minutos decorridos desde o início do ensaio, em que o sistema alginato-celulose bacteriana apresenta valores mais elevados de concentração do fármaco. No que respeita à libertação do diclofenac do sistema alginato-celulose nanofibrilada, o comportamento apresentado no gráfico descreve uma libertação abrupta a partir dos 170 minutos de ensaio, coincidindo com a aparência do meio turvo que se observou experimentalmente.

A pH 7,4, é notável uma maior libertação e também mais controlada pelos três sistemas. O sistema alginato-celulose bacteriana é o que apresenta uma maior libertação e também mais controlada, estabilizando a partir dos 340 minutos de ensaio. No caso dos sistemas alginato-celulose nanofibrilada e alginato-carboximetilcelulose, ambos apresentam um perfil de libertação semelhante e não muito definido. Denota-se uma estabilização relativa da libertação do sistema alginato-celulose nanofibrilada a partir dos 300 minutos e dos 320 minutos do sistema alginato-carboximetilcelulose

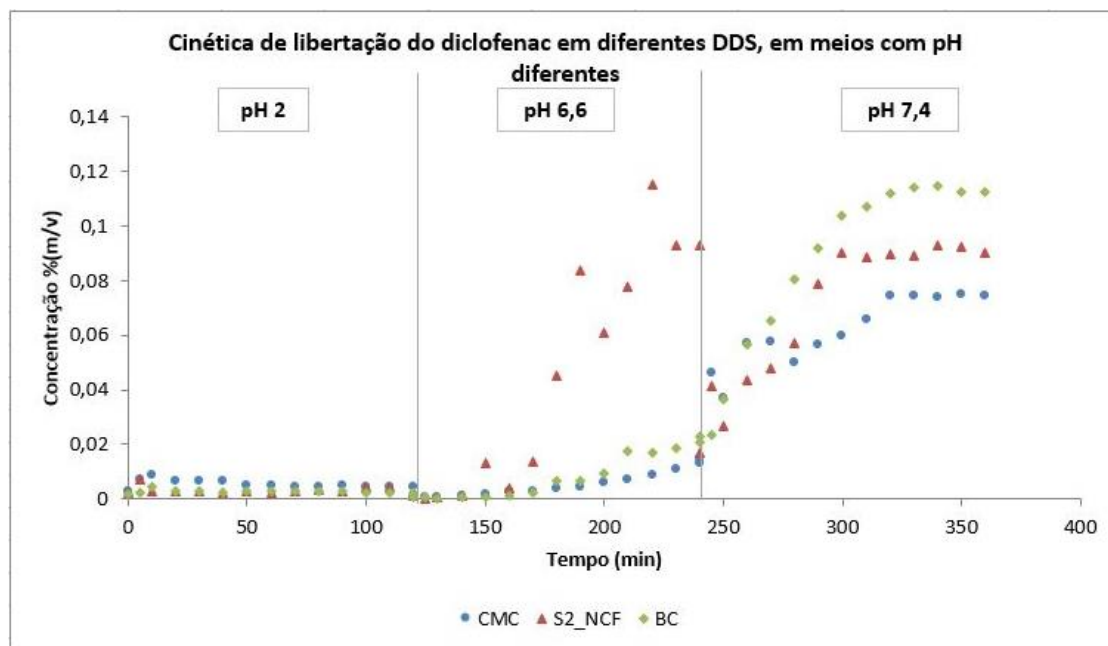
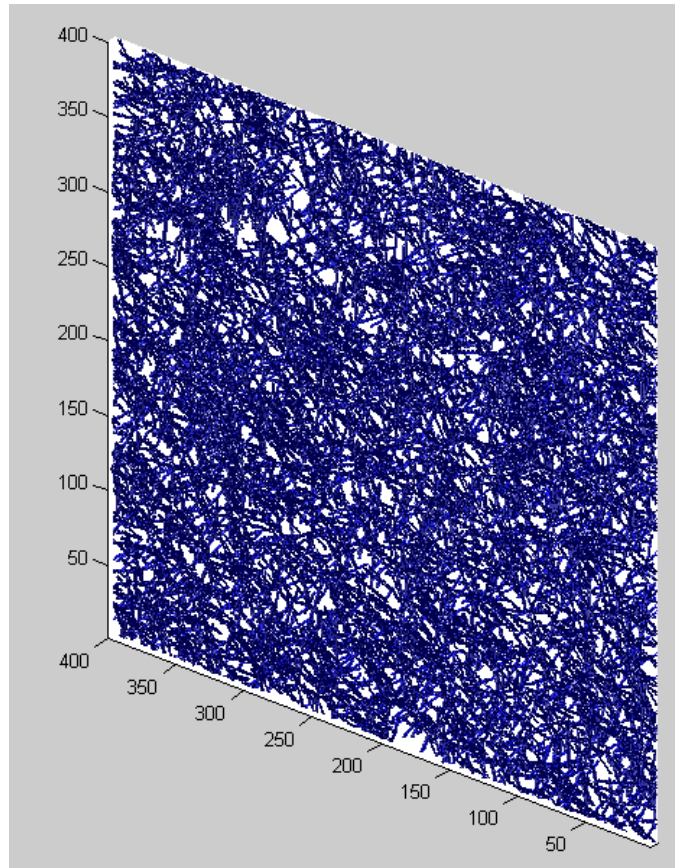


Figura 44. Gráfico da cinética de libertação do diclofenac em diferentes sistemas de entrega, em meios com pH diferentes.

### 3.7 Simulação computacional

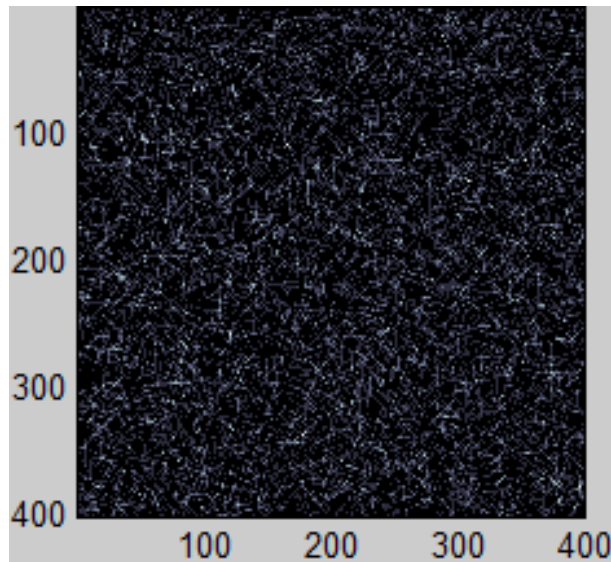
A utilização de modelos 3D demonstrou ser importante no desenvolvimento de DDS. A estrutura 3D e porosidade de um sistema poroso polimérico são determinantes para otimizar a função de transporte e libertação dos sistemas de distribuição. Para se obter um modelo realista é muito importante escolher os passos determinantes do processo. Neste trabalho utiliza-se um modelo tridimensional de materiais fibrosos implementado usando MATLAB® em que as fibras são modeladas de acordo com as suas dimensões e flexibilidade (Curto et al. 2011). Os parâmetros de entrada são as dimensões das fibras, na forma de relação comprimento/largura ou separadas, e a flexibilidade da fibra. Os valores de comprimento podem ser médios ou distribuições. O espaço é descrito como uma rede uniforme cartesiana das vóxeis de modo que cada fibra no modelo seja representada por uma sequência de vóxeis.

A Figura 45 representa a simulação computacional da CNF, com uma razão comprimento largura (“aspect ratio”) de 200 (para valores de comprimento de fibra entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  e largura entre 50 e 100nm), sendo que os resultados obtidos mostram que a estrutura porosa criada usando o simulador computacional desenvolvido em MATLAB® apresenta o mesmo tipo de porosidade que as estruturas obtidas no laboratório.



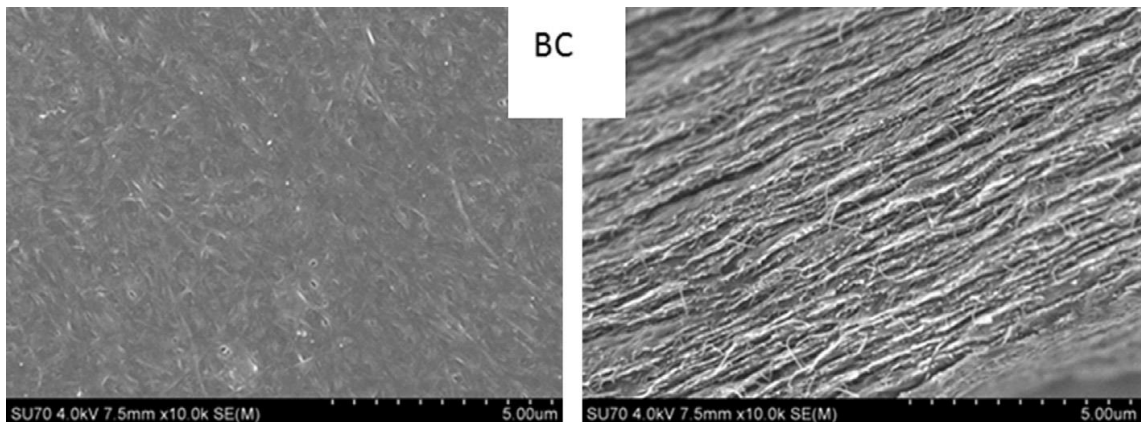
**Figura 45.** Simulação computacional 3D da CNF.

Os resultados obtidos para a carboximetilcelulose (CMC) são apresentados na Figura 46.

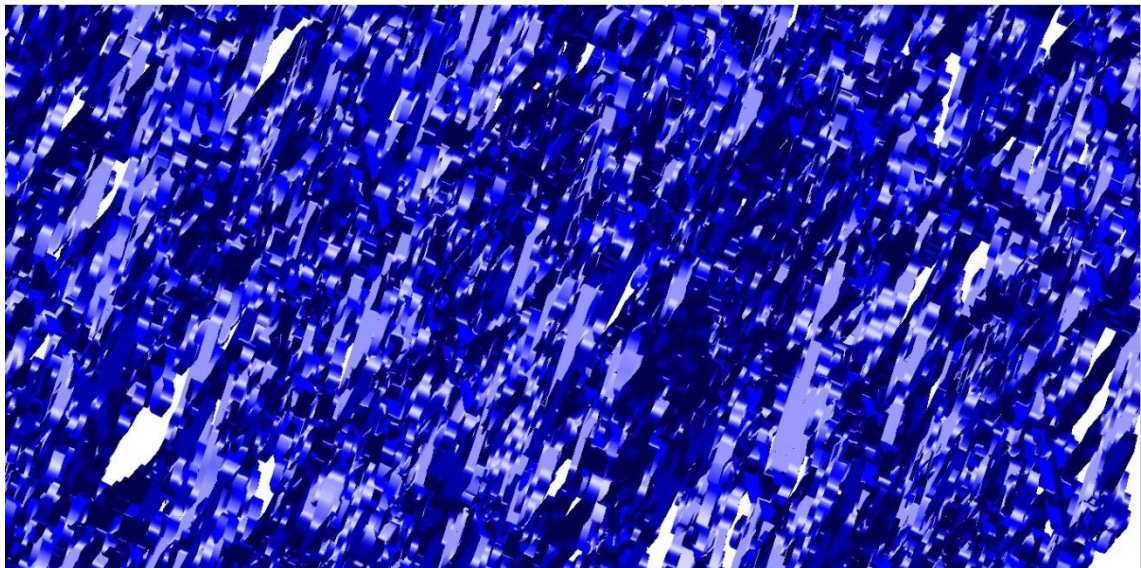


**Figura 46.** Resultado da simulação computacional mostrando uma distribuição espacial uniformemente aleatória da CMC.

Na Figura 47 apresentam-se imagens de MEV da celulose bacteriana (Almeida, I.F., et al, 2014) e na Figura 48 imagens obtidas por simulação computacional obtidas para a mesma estrutura de celulose bacteriana, podendo constatar-se a semelhança entre as duas.



**Figura 47.** Celulose bacteriana: imagens SEM da superfície (esquerda) e corte transversal (direita) (Almeida et al. 2014)



**Figura 48.** Simulação computacional de celulose bacteriana produzida a partir de *Gluconacetobacter sacchari*, obtida com o Simulador Computacional desenvolvido em MATLAB®.

As estruturas computacionais obtidas em Matlab® são usadas para obter informações 3D da estrutura, tais como a porosidade 3D, espessura e área relativa de ligação, entre outras (Curto et al. 2011).

A utilização de simulações computacionais validadas tem diversas vantagens, como por exemplo economizar tempo e recursos. Com a obtenção de informações 3D das estruturas, especialmente a porosidade e distribuição de poros, bem como os estudos experimentais da cinética de libertação, pode efetuar-se o planeamento dos materiais a incluir nos DDS para o transporte e libertação de fármacos de acordo com as diferentes aplicações terapêuticas.

Assim, a modelação computacional é uma ferramenta fulcral nos estudos avançados de sistemas de entrega de fármacos.

No presente trabalho, procedeu-se à comparação dos resultados da simulação computacional com as estruturas experimentais de celulose nanofibrilada (CNF), celulose bacteriana (CB) e CMC podendo concluir-se que a simulação computacional é uma ferramenta útil para obter representações 3D de estruturas obtidas a partir da celulose utilizadas no desenvolvimento de DDS baseados em materiais poliméricos porosos naturais.

## **IV. Conclusões e trabalho futuro**

Executou-se um planeamento experimental com materiais derivados da celulose e unidades estruturais em diferentes escalas. A celulose de origem vegetal proveniente de pasta de *Eucalyptus globulus* branqueada modificou-se de forma a obter-se na forma microfibrilada (CMF) e nanofibrilada (CNF). A obtenção de celulose nanofibrilada a partir de celulose de origem vegetal é um processo recente e que apresenta vários desafios. Conseguiu-se obter com sucesso, utilizando uma combinação otimizada de várias operações unitárias físicas e químicas. Para caracterização das estruturas obtidas, recorreu-se a um procedimento de preparação e fixação das amostras que permitiu manter a estrutura porosa obtida e identificar as unidades estruturais na escala nano, bem como quantificar as suas dimensões. Os materiais poliméricos obtidos caracterizaram-se utilizando microscopia eletrónica de varrimento, de uma forma sistemática e utilizando uma metodologia de tratamento de imagem com critérios de validação bem definidos.

Produziram-se sistemas de entrega de fármacos contendo CMC, CNF e CB e estudou-se a cinética de libertação do fármaco Diclofenac, podendo concluir-se que sistemas de entrega com unidades estruturais diferentes apresentam cinéticas diferentes.

Utilizaram-se ferramentas computacionais avançadas, tais como a simulação computacional das estruturas, e metodologias de análise e tratamento de imagem, com o objetivo otimizar as propriedades do sistema de entrega de fármacos. Os resultados obtidos após o tratamento das imagens em 2D, provenientes do MEV, utilizando um método validado, permitiram formar computacionalmente as estruturas 3D correspondentes, e pela primeira vez para estruturas 3D com celulose nanofibrilada. As imagens das simulações computacionais obtidas compararam-se com as imagens das estruturas reais, utilizando o mesmo método de análise de imagem, podendo concluir-se que apresentam o mesmo tipo de estrutura porosa e valores da porosidade de superfície.

A obtenção das simulações computacionais 3D validadas dos sistemas de entrega de fármacos contendo nanomateriais celulósicos permitirão, em trabalhos futuros, realizar estudos de simulação mais completos e dispor de uma forma de adequar as propriedades dos sistemas de entrega a diferentes aplicações terapêuticas. No desenvolvimento de DDS inovadores baseados em materiais celulósicos vegetais à escala nano, os resultados e metodologias desenvolvidos irão possibilitar uma abordagem mais sistemática para conseguir alcançar de uma forma mais eficiente as propriedades desejadas destes sistemas de entrega.

## **V. Bibliografia**

Abdul Khalil, H.P.S., Davoudpour, Y., Nazrul Islam, Md., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R. & Jawaid, M., 2014. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*, 99, pp.649-665.

Allen, T.M. & Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5665), pp.1818-22.

Almeida, I.F., Pereira T., Silva, N.H.C.S., Gomes, F.P., Silvestre, A.J.D., Freire, C.S.R., Sousa Lobo, J.M. & Costa, P.C., 2014. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 86(3), pp.332-6.

Amelinckx, S., van Dick, D., van Landuyt, J. & van Tendeloo, G, 1997. *Electron Microscopy - Principles and Fundamentals* P. Gregory & J. Ritterbusch, eds., Weinheim: VCH, pp.305-427.

Andrews, G.P., Laverty, T.P. & Jones, D.S., 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), pp.505-18.

Bierhalz, A.C.K., de Silva, M.A., de Sousa, H.C., Braga, M.E.M. & Kieckbush, T.G., 2013. Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. *Journal of Supercritical Fluids*, 76, pp.74-82.

Butun, S., Ince, F.G., Erdugan, H. & Sahiner, N., 2011. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), pp.636-643.

Chinga-Carrasco, G., 2011. Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale research letters*, 6(1), p.417.

Conceição, E.L., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S & Portugal, A.T.G., 2010. Coding a Simulation Model of the 3D Structure of Paper. In R. P. Barneva et al., eds. *Computational Modeling of Objects Represented in Images: Second International Symposium, ComplIMAGE 2010, Buffalo, NY, USA, May 5-7, 2010. Proceedings*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 299-310.

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. & Silva, M.J.S., 2015. Development of and Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets. In A. Öchsner, ed. *Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design*. Springer International Publishing, pp. 301-321.

Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões & R.M.S., 2011. Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 42(5), pp.370-374.

Davies, N.M. & Anderson, K.E., 1997. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clinical pharmacokinetics*, 33(3), pp.184-213.

Dufresne, A., 2013. Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6),

pp.220-227.

Fini, A., Cavallari, C. & Ospitali, F., 2010. Diclofenac salts. V. examples of polymorphism among diclofenac Salts with Alkyl-hydroxy Amines Studied by DSC and HSM. *Pharmaceutics*, 2(2), pp.136-158.

Gatenholm, P. & Klemm, D., 2010. Bacterial Nanocellulose as a Renewable Material for Biomedical Applications. *MRS Bulletin*, 35(3), pp.208-213.

Harnett, E.M., Alderman, J. & Wood, T., 2007. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(1), pp.90-97.

Isogai, A., Saito, T. & Fukuzumi, H., 2011. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*, 3(1), pp.71-85.

Jorfi, M. & Foster, E.J., 2014. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 41719.

Kierys, A., Grochowicz, M. & Kosik, P., 2015. The release of ibuprofen sodium salt from permanently porous poly(hydroxyethyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) resins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 217, pp.133-140.

Kim, K., Brar, P., Jakubowski, J., Kaltman, S. & Lopez, E., 2009. The use of corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: A review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 107(5), pp.630-640.

Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D. & Dorris, A., 2011. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(24), pp.5438-5466.

Kwok, D.Y. & Neumann, A. W., 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 81, pp.167-249

Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A. & Bras, J., 2012. Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. *Carbohydrate polymers*, 90(2), pp.735-64.

Machado, B.A.S., Reis, J.H.O., da Silva, J.B., Cruz, L.S., Nunces, I.L., Pereira, F.V. & Druzian, J.I., 2014. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. *Quimica Nova*, 37(8), p.1631.

Manca, M.L., Zaru, M., Guido, E., Valenti, D., Sinico, C., Loy, G. & Fadda, A.M., 2005. Diclofenac-beta-cyclodextrin binary systems: physicochemical characterization and in vitro dissolution and diffusion studies. *AAPS PharmSciTech*, 6(3), pp.E464-E472.

Mehta, S.K., Bhasin, K.K. & Dham, S., 2008. Energetically favorable interactions between diclofenac sodium and cyclodextrin molecules in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326(2), pp.374-381.

Mohd Amin, M.C.I., Ahmad, N., Halib, N. & Ahmad, I., 2012. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), pp.465-473.

Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J. & Youngblodd J., 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.*, 40, pp3941-3994.

Moulton, S.E. & Wallace, G.G., 2014. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 193, pp.27-34.

Moutinho, I.M.T., Ferreira, P.J.T. & F, M.L.F., 2011. Paper surface chemistry as a tool to improve inkjet printing quality. *BioResources*, 6(4), pp.4259-4270.

Niskanen, K.J. & Alava, M.J., 1994. Planar Random Networks with Flexible Fibers. *Physical Review Letters*, 73(25), pp.3475-3478.

Oliveira, M.F., Suarez, D., Rocha, J.C.B., Teixeira, A.V.N.C., Cortés, M.E., de Sousa, F.B. & Sinisterra, R.D., 2015. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 54, pp.252-61.

Osong, S.H., Norgren, S. & Engstrand, P., 2016. Processing of wood-based microfibrillated cellulose and nanofibrillated cellulose, and applications relating to papermaking: a review. *Cellulose*, 23(1), pp.93-123.

Palomo, M.E., Ballesteros, M.P. & Frutos, P., 1999. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(1), pp.83-94.

Park, K., 2014. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190, pp.3-8.

Petersen, N. & Gatenholm, P., 2011. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(5), pp.1277-86.

Philip, A.K. & Philip, B., 2010. Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *Oman Med J*, 25(2), pp.79-87.

Provatas, N. & Uesaka, T., 2003. Modelling paper structure and paper-press interactions. *Journal of pulp and paper science*, 29(10), pp.332-340.

Roy, S., Pal, K., Anis, A., Pramanik, K. & Prabhakar, B., 2009. Polymers in Mucoadhesive Drug-Delivery Systems: A Brief Note. *Designed Monomers & Polymers*, 12(6), pp.483-495.

Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Vignon, M. & Isogai, A., 2006. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 7(6), pp.1687-1691.

Saito, T. & Isogai, A., 2004. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules*, 5(5), pp.1983-1989.

Salehi, R., Mohammad, I., Rashidi, M.-R., Aroujalian, A., Raisi, A., Eskandani, M., Haririan, I. & Davaran, S., 2013. Stimuli-responsive nanofibers prepared from poly(N-isopropylacrylamide-acrylamide-vinylpyrrolidone) by electrospinning as an anticancer drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*, 16(6), pp.515-527.

Silva, N.H.C.S., Rodrigues, A.F., Almeida, I.F., Costa, P.C., Rosado, C., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D. & Freire, C.S.R., 2014. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), pp.264-269.

Tønnesen, H.H. & Karlsen, J., 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), pp.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., 2012. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: in vitro diffusion studies. *International journal of pharmaceutics*, 435(1), pp.83-7.

Turbak, A.F., Snyder, F.W. & Sandberg, K.R., 1983. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. *Journal of applied polymer sci-ences. Applied polymer, symposium (United States), ITT Rayonier Inc., Shelton, WA*.

Varma, M.V.S., Kaushal, A.M., Garg, A. & Garg, S., 2004. Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems. *Am. J. Drug Deliv.*, 2(1), pp.43-57.

Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Jiang, T. & wang, S., 2015. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), pp.313-327.

Xu, Y., Zhan, C, Fan, L, Wang, L. & Zheng, H., 2007. Preparation of dual crosslinked alginate-chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2), pp.329-337.

Yang, L. & Fassihi, R., 1997. Modulation of diclofenac release from a totally soluble controlled release drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 44(2-3), pp.135-140.

Yao, F. & Weiyuan, J.K., 2010. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opinion Drug Delivery*, 7(4), pp.429-444.

## **VI. Anexos**

## ANEXO A - Publicações

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., Santos Silva, M.J., 2016, The importance of optimizing the 3D structure when developing cellulosic materials for medical applications: the case of drug delivery systems (DDS), *Conference: XXIII TECNICELPA - International Conference of Forest, Paper and Wood*, October 12th to 14th of 2016, TECNICELPA, Porto, Portugal

Curto, J.M.R., Martins, N.V.D.F., Ferreira, J. S., Videira, P.E.M., Conceição, E.L.T. Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Santos Silva, M. J., 2016. The challenge of using 3D Computational Simulation to develop 3D Drug Delivery Systems made from nano Polymeric Porous Materials, *Proceedings of Nanoscience and Nanotechnology International Conference: NanoPT 2016 International Conference*, February 16th to 19th of 2016, International Nanotechnology Laboratory, Braga, Portugal.

Ferreira, J.S., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S., Santos Silva, M.J., 2016, 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDS) made from carboxymethyl cellulose (CMC), *Conference: I Symposium FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies*, January 28<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> of 2016, Universidade da Beira Interior.

**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 10:5:1. After obtaining the polymeric beads with drug incorporation, these were filtered and placed in 500 ml distilled water or saline solution, which had a pH for simulating human conditions, obtained using a hydrogenophosphate buffer. 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.

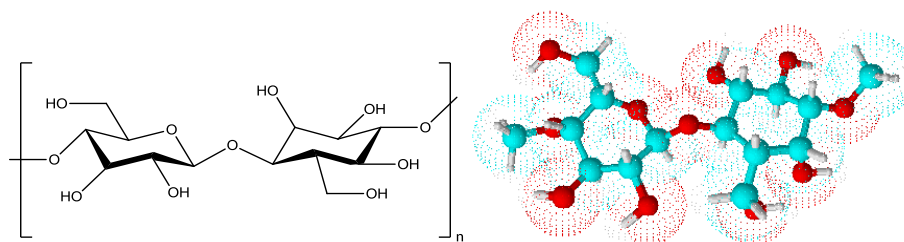
**Table 1. Cellulose based DDS.**

DDS	Cellulose
DDS_NFC_1	NFC
DDS_BC_2	BC
DDS_CMC_3	CMC

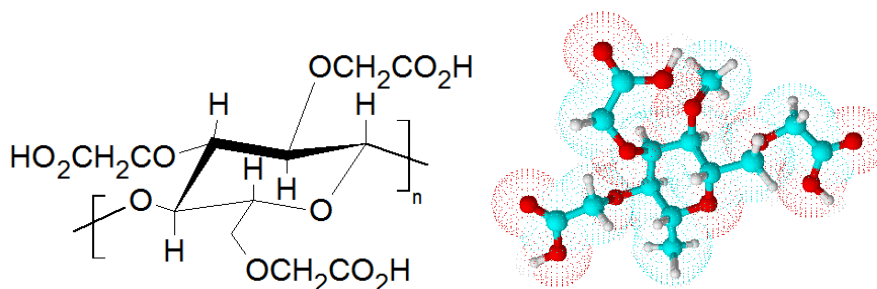


**Figure 1.** a) SEM image of DDS made from NFC (30X). b) SEM image of NFC structure inside the DDS (15000X)

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 carboxymetil cellulose (CMC) illustrating the presence of different functional groups for cellulose and CMC.



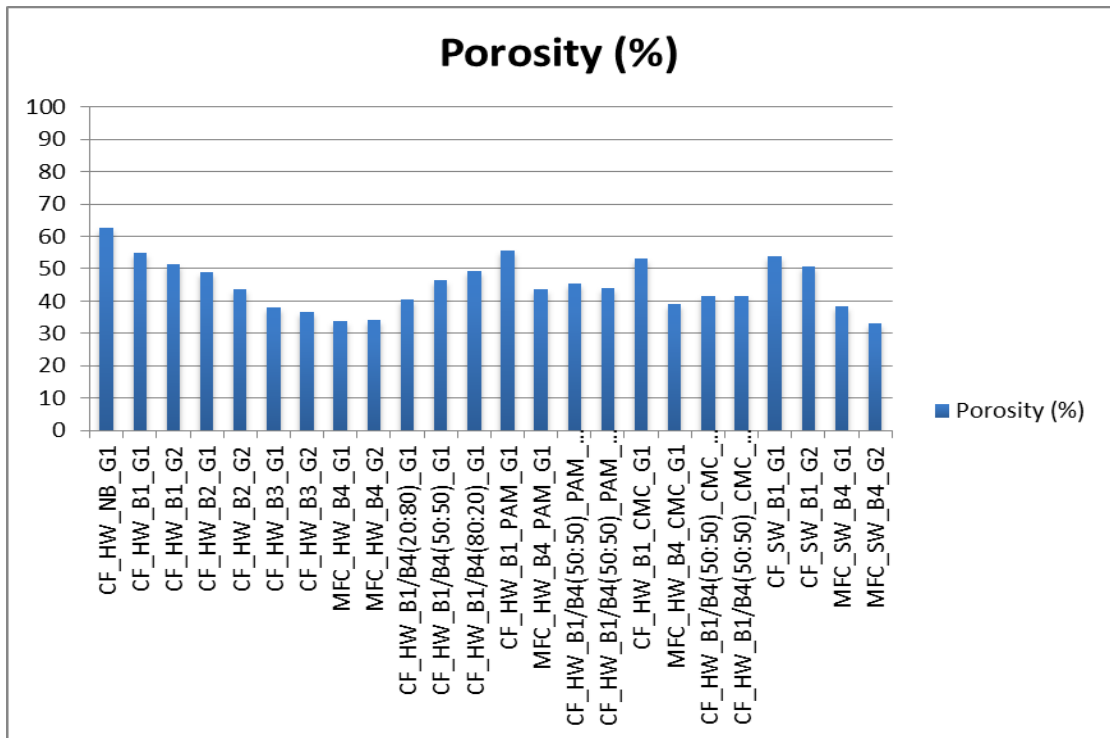
**Figure 2.** 2D and 3D Cellulose polymer molecules made with ChemSketch from ACD/Labs.



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

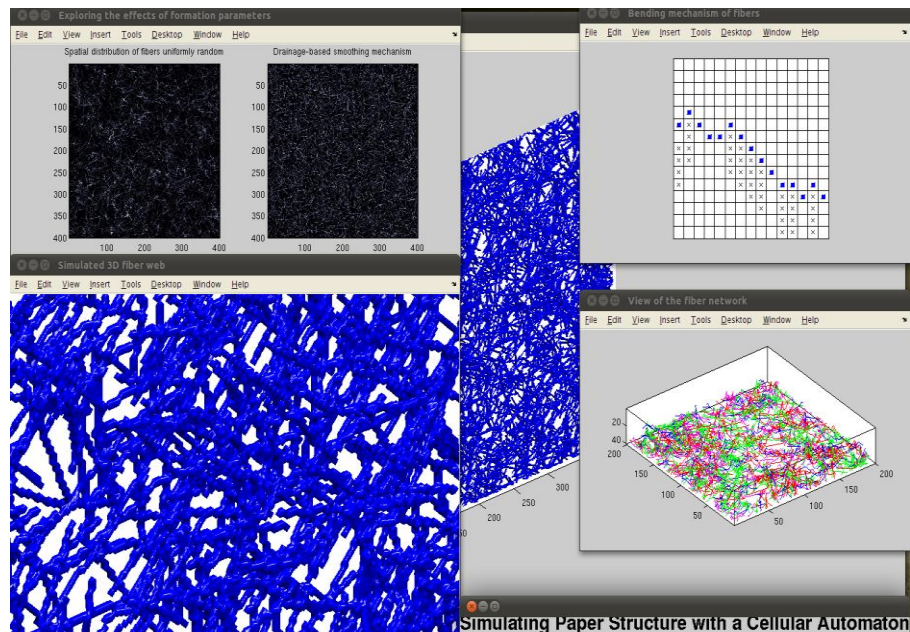
SEM images were analyzed using state of the art Image analysis softwares such as Esprit 1.9, from Bruker, and Diameter J, to measure the fibre and porous dimensions.

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



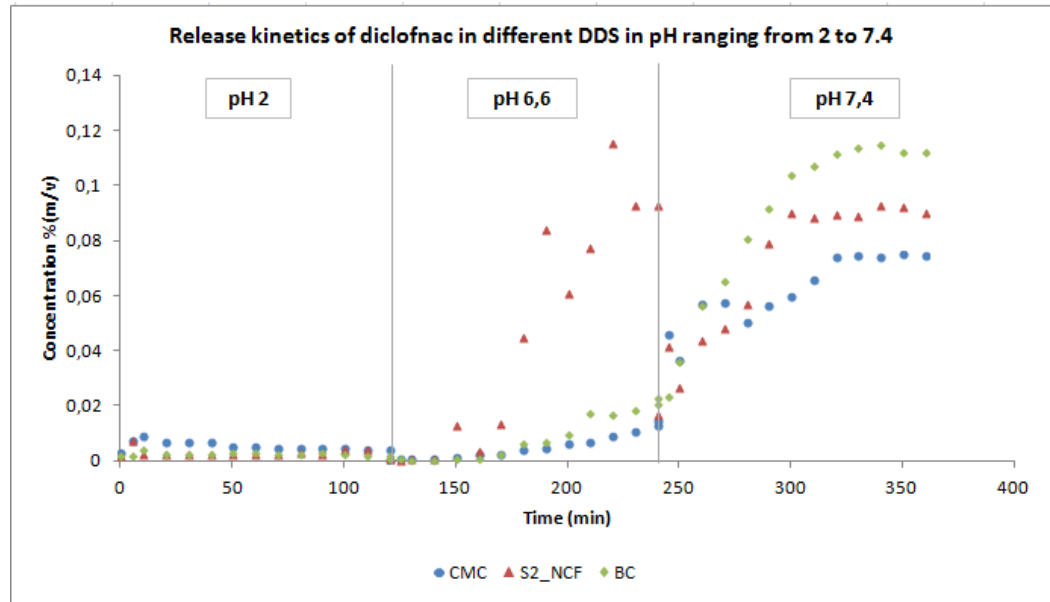
**Figure 4.** Porosity of cellulose structures made from different fibers with mechanical and chemical modifications

Results obtained for porosity of different 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>o</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 Accession 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 Imaginenano: 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.

## The challenge of using 3D Computational Simulation to develop 3D Drug Delivery Systems made from nano Polymeric Porous Materials

Joana M.R. Curto<sup>1 \*</sup>, N.V.D.F. Martins<sup>1</sup>, J. S. Ferreira<sup>1</sup>, P.E.M. Videira<sup>1</sup>, E.L.T.

Conceição<sup>2,3</sup>, A.T.G. Portugal<sup>3</sup>, R. M.S. Simões<sup>1</sup>, M. J. Santos Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FibEnTec, Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior

<sup>2</sup>SABIC Technology Center, Riyadh, Saudi Arabia,

<sup>3</sup>Research Center for Chemical Process Engineering and Forest Products, Chemistry Engineering, Department, University of Coimbra, Portugal.

\*Dep. Química, Av. Marquês d'Ávila e Bolâma n.º 54, 6200-001, Covilhã, Portugal.

[jmrc@ubi.pt](mailto:jmrc@ubi.pt)

**Abstract** The development of effective drug delivery systems (DDS) is a long process where every stage of the development is important. We propose the use of a 3D computational simulator to develop 3D nano structures where porosity and thickness are characterized in three dimensions [1]. The use of 3D is increasingly important to the development of new nano systems [2]. This is particularly important for the development of properties that are only fully accessed with the 3D structure of the material, like for example to study the interaction of the porous structures with liquid droplets [3], for applications where the therapeutic molecule is a liquid. In the development of DDS, the 3D porosity is also relevant to optimize the therapeutic molecule retention, transport and release. The 3D characterization it's a challenge for the scientific community since scanning electron microscope (SEM) images are two dimensional. To solve this difficulty, we present an innovative methodology that uses our own computational simulator to produce 3D structures departing from 2D SEM data. The 3D computational simulator, that has been programmed using Matlab®, has been validated for nano and micro structures [4]. Several porous structures of Polyvinyl Alcohol (PVA) and Polyamide have been produced by electrospinning and characterized using SEM. The structures were analysed using 2D images of the xy cut, and 2D images of the thickness, in the z or out of plane direction. The 2D pore dimensions were quantified using SEM images both manually, with the vector placement method, and using an image analysis software, Esprit 1.9 from Bruker®. Using the 2D SEM data from both cuts as Inputs, the 3D computational simulator was

used to obtain the 3D structure, and 3D porosity was calculated and saved for each voxel in a Matlab® matrix file. To optimize the DDS porosity and thickness, one thousand structures have been simulated changing input parameters. This design of computer experiments was done using a space filling design, the Latin hypercube sampling design [5]. The computational simulation data has been organized using regression/decision trees with one thousand simulated structures where input parameters, like fiber width and fiber flexibility, were changed according to the computational plan of experiments. The regression/decision trees obtained proved that the fiber flexibility is the property that most influences both the porosity and the thickness of the 3D structures. The 3D computational simulator proved to be a very useful tool to predict 3D structures and relevant properties, saving time and resources in the development of improved drug delivery systems.

# 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDS) made from carboxymethyl cellulose (CMC)

J. S. Ferreira<sup>1,2</sup>, J. M.R. Curto<sup>1</sup>, R. M.S. Simões<sup>1</sup>, M. J. Santos Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FibEnTec, Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior

<sup>2</sup> Medicinal Chemistry Master Science Student, Chemistry Dep., UBI

## Abstract

The work present in this paper aimed to create a computational simulations of a three dimensional drug delivery system (DDS) using carboxymethyl cellulose (CMC).

The 3D molecular modeling was conducted for the polymeric porous material, the CMC, and the therapeutic molecule, the Aciclovir, using experimental data from bibliography.

Using the experimental values a computer simulation of the CMC structure was performed in a simulator produced in Matlab<sup>®</sup>. This simulator has been validated for polymeric porous structures, and was able to create 3D CMC structures.

The use of 3D modeling has proved to be important in the development of drug delivery systems made from CMC. The 3D structure of the polymeric CMC porous system was simulated for different conditions and the 3D porosity was calculated, giving valuable information to predict and optimize the retention, transport and release capacity of the CMC drug delivery systems.

## Introduction

In recent decades, technologies associated with the development of drug delivery systems (DDSs) have increased significantly. Drug delivery is defined by the process that consists in administering a pharmaceutical compound aiming to achieve a therapeutic effect in humans or animals. Drug delivery systems (DDSs) can provide predetermined drug release profiles with optimal. Controlled drug release techniques have advantages when comparing with the conventional forms of dosage, improving efficacy and safety [1-2].

The principle of controlled release drug therapy involves the delivery of a predetermined amount of drug, over a specified period, in a predictable behavior. The aim of all controlled-release systems is to develop the effectiveness of drug therapy [3].

Polymers are widely used as DDS, being its advantages the therapeutic efficacy and low side effects. Among polymers, polymer fibers have attracted great interest due to their large surface area-to-volume ratio and the possibility of surface modifications [4].

At the core of all of these progresses is the electrospinning method, playing an important role in the production of nanoscale fiber [3].

The use of natural polymers have been relevant for various uses in biomedical and pharmaceutical applications and have economic and environmental advantages over synthetic polymers[2]. Natural polymers can be identified in nature with properties to meet the specific needs of living organisms. These natural polymers include alginate, chitosan, gelatin, collagen, elastin, starch and cellulose.

Cellulose, in particularly, has been the subject of extensive research mainly because of its advantageous proprieties, such as sustainability, biodegradability and biosafety [5].

Cellulose is the most abundant natural polymer on Earth, widely distributed over a variety of sources including marine animals, plants and bacterial sources. Cellulose is a fibrous, tough, linear, syndiotactic homopolymer composed of D-anhydroglucopyranose units connected by  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glycosidic bonds [5]. This natural polymer can also be crosslinked into hydrogels because of its affinity toward water. It's important to mention, additionally, that cellulose and other cellulose derivatives pass through the human body safely and some of the derivatives can be broken down by digestive enzymes, resulting in natural metabolites in the gastrointestinal tract [5]. Another attractive cellulose material in the drug-delivery field is Carboxymethylcellulose (CMC) [5]. Carboxymethyl cellulose is a cellulosic ether, a water-soluble polysaccharide with both carboxylate and hydroxyl groups that allows strong interactions with metal particles. These derivatives have important properties like good solubility and high chemical stability and they are also safe, non-toxic, hydrophilic, biocompatible and biodegradable [2]. Carboxymethyl cellulose is a biocompatible macromolecule that has been used for drug delivery systems with the purpose of controlling drug release, for example muco adhesive polymer for nasal and buccal drug delivery systems [2].

Butun, Ince, Erdugan & Sahiner, in 2011, synthesized carboxymethyl cellulose (CMC) and magnetic carboxymethyl cellulose (m-CMC). The encapsulation of metal nanoparticles (ferrite particles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)) inside crosslinked CMC resulted in magnetic responsive behaviors (m-CMC). Further, it was introduced

new functional groups in the CMC networks. Aciclovir is a drug with low toxicity, effective when used against herpes viruses preventing viral DNA synthesis. It is widely used in antiviral therapy and it was chosen as the model for the absorption and release studies from CMC particles, playing the role of drug delivery system (Butun et al. 2011).

Aciclovir is a drug with low toxicity, effective when used against herpes viruses preventing viral DNA synthesis. It is widely used in antiviral therapy and it was chosen as the model for the absorption and release studies from CMC particles, used as drug delivery system [2].

The use of 3D modeling has proved to be important in the development of drug delivery systems. The 3D structure and porosity of the polymeric porous system are determinant to optimize the transport and release function of the CMC drug delivery systems. Therapeutic molecules can adopt more than one low-energy conformation and the function of a biological macromolecule is related to its 3D structure, so three-dimensional representations helps to understand the biological processes at the atomic level. The possibility of study the interactions between the drug delivery system and other molecules, like proteins, designed for specific inhibitors/activators drug candidates are other advantages.

The work present in this paper aimed to create computational simulations of carboxymethyl cellulose polymeric system, allowing to study and understand its proprieties in order to optimize its parameters to make an efficient drug delivery system.

### Materials and Methods

Carboxymethyl cellulose (CMC) and magnetic carboxymethyl cellulose (m-CMC) particles were synthesized by microemulsion polymerization in sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate. (AOT) was used as surfactant and divinylsulfone (DVS) was used as crosslinker.

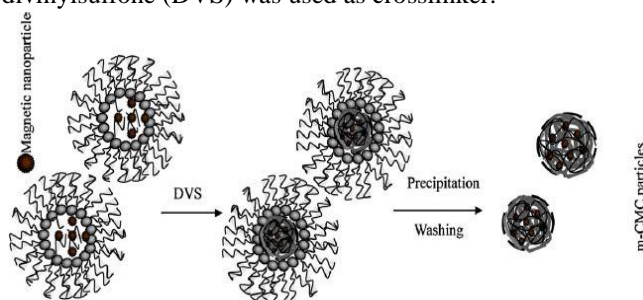


Figure 1. Schematic illustration of magnetic Carboxymethyl Cellulose (m-CMC) in AOT reverse micelles [2].

The encapsulation of metal nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) inside the crosslinked CMC resulted in magnetic responsive m-CMC. Further chemical modification of the particle system was carried out to introduce new functional groups in the CMC networks. The resulting structural characteristics of the particles were examined by different methods. The synthesized particles have wide size distribution ranging from 100 to 10,000 nm [2].

The drug used was Aciclovir witch is a drug with low toxicity, effective when used against herpes viruses preventing viral DNA synthesis. It is widely used in antiviral therapy and it was chosen as the model for the absorption and release studies from CMC particles, playing the role of drug delivery system [2].

The release characteristics were investigated via UV–Vis spectrometer [2].

To obtain 3D molecules we have used the program ACD/ChemSketch, option 2D and 3D, from ACD/Labs Release: 11:00, version 11.02.

The computational simulation was done using a validated Computational simulator [9]. The steps used have been programmed in Matlab and can be summarized as:

- Definition of the space using a Cartesian uniform grid of cells;
- Successive deposition of structural units in the plan direction. Fiber segment deposition occurs with a single fiber segment at a time;
- Testing fiber segment deposition rule. If successful, the fiber segment is accepted and the generation trial is repeated;
- Extraction of the out-of-plane slice from the 3D voxel structure, where the bending procedure occurs;
- Fiber segment deposition according to fiber flexibility and conformation to the underlying structure;

- The structural unit occupies the empty voxels in the 3D voxel grid;
- Updating of the 3D network.

## Results and Discussion

To obtain 3D molecules we have used the ACD/ChemSketch software.

Figures 2 and 3 are 2D and 3D representations of the polymer used in the DDS and figure 4 is the therapeutic molecule.

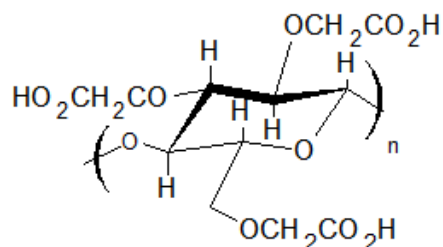


Figure 2. 2D representation of the carboxymethyl cellulose monomeric unit.

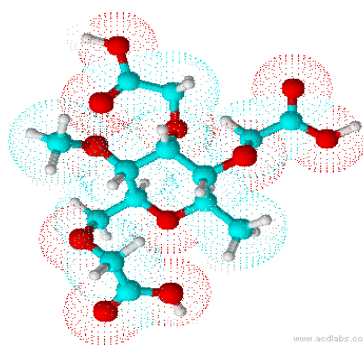


Figure 3. 3D representation of carboxymethyl cellulose monomeric unit.

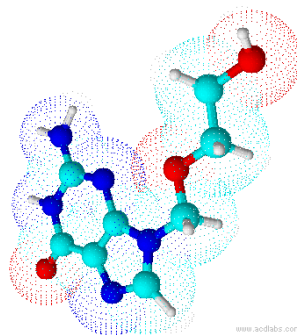


Figure 4. 3D molecule of Aciclovir drug.

Table 1 presents the input parameters used to obtain the computational simulation [7, 8]

Table 1. Carboxymethyl cellulose properties and input parameters.

Description of parameter	Input parameter
Polymer mixed with Carboxymethyl cellulose	Poly(ethylene oxide) (PEO), 1:1
Caliber of metal needle	18
Distance between needle and collector	20 cm

Voltage	35 kV
Fibers in each sample	20

The way fibers segments are distributed in space may vary originating different spatial distributions. Figures 5 and 6 are examples of CMC computational simulation structures with different distribution in space (in plane cut).

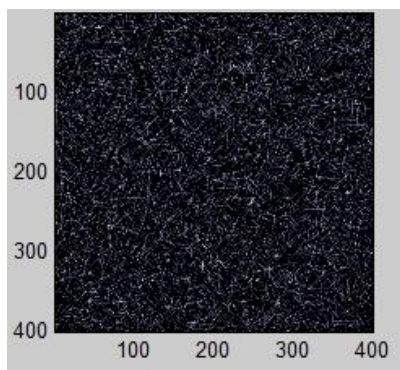


Figure 5. Computational simulation results showing an uniform random polymer distribution in space.

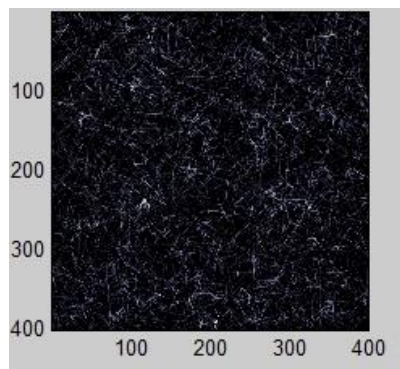


Figure 6. Computational simulation results showing an aggregated distribution in space

Figure 7 presents the computational simulations of CMC drug delivery system. The results obtained present a global porosity of 40%. The 3D local porosity is saved in a Matlab Matrix file.

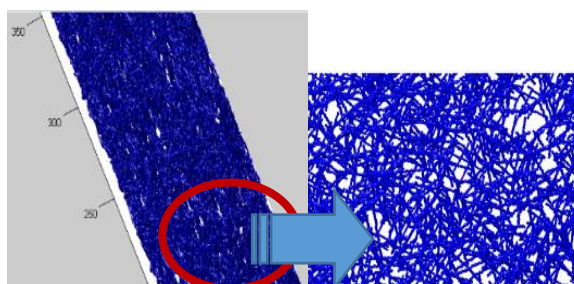


Figura7. 3D CMC computational simulation including a detail with magnification of the structure.

## Conclusions

The 3D molecular modeling of therapeutic molecules is important to predict the occupied volume, the possible conformations and also possible interactions between the molecular structures.

The 3D computational simulator was able to create computational simulations of different carboxymethyl cellulose polymeric systems, allowing to study and understand its 3D proprieties, in order to optimize its porosity and make an efficient drug delivery system.

## Acknowledgements

The authors would like to thank to FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, for financial support for the Research Unit Fiber Materials and Environmental Technologies FibEnTec (Ref<sup>o</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. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.005.
- [2] S. Butun, F.G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, Onestep fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 636–643. doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.001.
- [3] R. Salehi, M. Irani, M.-R. Rashidi, A. Aroujalian, A. Raisi, M. Eskandani, et al., Stimuli-responsive nanofibers prepared from poly(Nisopropylacrylamide-acrylamidevinylpyrrolidone) by electrospinning as an anticancer drug delivery, *Des. Monomers Polym.* 16 (2013) 515–527. doi:10.1080/15685551.2013.771303.
- [4] M.F. Oliveira, D. Suarez, J.C.B. Rocha, A.V.N. de Carvalho Teixeira, M.E. Cortés, F.B. De Sousa, et al., Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 54 (2015) 252–61. doi:10.1016/j.msec.2015.04.042.
- [5] M. Jorfi, E.J. Foster, Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 41719 (2014). doi:10.1002/app.41719.
- [6] K. a Fitzgerald, M. Malhotra, C.M. Curtin, F.J. O’ Brien, C.M. O’ Driscoll, Life in 3D is Never Flat: 3D Models to Optimise Drug Delivery., *J. Control. Release.* 215 (2015) 39–54. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- [7] A. Frenot, M.W. Henriksson, P. Walkenstro, Electrospinning of Cellulose-Based Nanofibers, (2006). doi:10.1002/app.
- [8] M.W. Frey, Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives, *Polym. Rev.* 48 (2008) 378– 391. doi:10.1080/15583720802022281.
- [9] 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, *Materwiss. Werksttech.* 42 (2011) 370–374. doi:10.1002/mawe.201100790.