



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Aplicação em Química Medicinal da Simulação Computacional 3D de Nanomateriais Poliméricos para o desenvolvimento de “Drug Delivery Systems”

Nélson Vasco Dias Ferreira Martins

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

Dedicatória

Para os meus pais e irmã.

Para os meus avós, especialmente aos que já partiram.

Agradecimentos

Por detrás deste trabalho encontra-se um ano de intenso esforço que me fez crescer não só no conhecimento, mas também como homem e investigador. Ao longo deste caminho pude contar com algumas pessoas, a quem gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha gratidão à minha orientadora Professora Doutora Joana Curto pela sua orientação, motivação, paciência e apoio durante esta dissertação de mestrado. Gostaria também de agradecer-lhe todas as condições e conhecimento prestados nesta área.

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 Interior, 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 pelo tempo gasto na aquisição de imagens do microscópio eletrónico de varrimento.

Um agradecimento especial ao meu grupo de trabalho, Jéssica Ferreira, Pedro Videira, Sónia Sousa, Vera Costa, Kátia Monteiro, Flávia Morais e Ana Rita Sousa pelo ambiente de trabalho saudável, e por me oferecer apoio e carinho nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao INL (International Iberian Nanotechnology Laboratory), especialmente ao Doutor Professor Lorenzo Pastrana, ao Doutor Miguel Cerqueira e ao Doutor Dmitri Petrovykh pelo apoio, conhecimento e orientação durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado.

Agradeço profundamente aos meus amigos por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, e por toda a coragem e apoio transmitidos ao longo do ano.

Por último mas não menos importante, agradeço aos meus pais e à minha irmã por me incentivarem durante todos estes anos a fazer mais e melhor. Pelo vossa compreensão, conselhos, orientação e amor incondicional, agradeço-vos do fundo do meu coração.

Resumo

O desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos é uma das áreas de Química Medicinal com as aplicações mais promissoras e que beneficia de uma abordagem multidisciplinar incluindo nanotecnologia, modelação computacional e análise de imagem. O planeamento experimental permitiu obter sistemas de entrega inovadores e com cinéticas de libertação diferentes, a partir da combinação de diferentes unidades estruturais poliméricas. Produziram-se e caracterizaram-se estruturas obtidas a partir da celulose, com fibrilações na escala micro (CMF) e nano (CNF), e estruturas álcool polivinílico (PVA) obtidas por “electrospinning”. Desenvolveu-se uma metodologia de tratamento de imagem que se aplicou às imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (MEV), permitindo identificar as características chave e os critérios de análise de imagem para obtenção das dimensões das fibras e dos poros das estruturas, nas diferentes escalas. As propriedades morfológicas na escala micro, em suspensão fibrosa, foram também determinadas utilizando um equipamento designado por “Morfi”, sendo que o diâmetro médio das fibras de CMF em suspensão foi de 20 μm . Além da caracterização estrutural, incluindo a espessura e a porosidade das estruturas, determinou-se a sua hidrofobicidade das estruturas de CMF através do ângulo de contacto, com valores que variam entre 47° e 56°. Os resultados provenientes dos métodos de análise de imagem 2D para as dimensões das fibras utilizaram-se como dados de entrada para formar a estrutura 3D no simulador computacional. A validação foi feita comparando os valores de porosidade das estruturas obtidas por simulação computacional com as estruturas reais, utilizando o mesmo procedimento para o seu tratamento e análise. O estudo da cinética da libertação do fármaco Diclofenac provou que sistemas de entrega de fármacos com porosidades diferentes têm cinéticas de libertação diferentes. Conclui-se que se pode utilizar a metodologia de análise de imagem apresentada neste trabalho, juntamente com a simulação computacional, para otimizar a porosidade de nanomateriais porosos, de forma a otimizar o transporte de moléculas terapêuticas.

Palavras-chave

Celulose microfibrilada, celulose nanofibrilada, estruturas poliméricas porosas 3D, nanomateriais, simulação computacional, sistemas de entrega de fármacos.

Abstract

The development of drug delivery systems is one of the medicinal chemistry areas with the most promising applications and benefits of a multidisciplinary approach including nanotechnology, computational modelling and image analysis. The work plan yielded innovative drug delivery systems with different release kinetics, based on the combination of different polymeric structural units. Structures obtained from cellulose, with micro (MFC) and nano fibrillation (CNF) have been produced and characterized, and structures made from polyvinyl alcohol (PVA) have been obtained by electrospinning. A method for image processing that is applied to images obtained by electron microscopy scanning (SEM) was developed, allowing the identification of key features and image analysis criteria, in order to obtain the fiber and pore dimensions in different scales. The micro-scale morphological properties, in fiber suspension, were also determined using a device designated as "Morfi", wherein the average fiber diameter of the MFC in suspension was 20 μm . Besides structural characterization, including the thickness and porosity of the structures, it was determined the hydrophobicity of MFC structures by contact angle, with values ranging between 47° and 56° . The results of fiber dimensions from the 2D image analysis techniques were used as input data to form the 3D structure of the computer simulation. Validation was done by comparing the porosity values of the structures obtained by computer simulation with real structures, using the same procedure for treatment and analysis. The release kinetic study of Diclofenac proved that drug delivery systems with different porosities have different kinetics of release. In conclusion, the image analysis method presented here can be used along with the simulation to optimize the porosity of porous nanomaterials, in order to optimize the delivery of therapeutic molecules.

Keywords

3D polymeric porous structures, computer simulation, drug delivery systems, microfibrillated cellulose, nanofibrillated cellulose, nanomaterials.

Índice

Capítulo I:

1. Introdução	2
1.1 Nanomedicina.....	2
1.2 Sistemas de entrega de fármacos.....	5
1.3 Nanomateriais poliméricos.....	6
1.3.1 Celulose	7
1.3.2 Álcool polivinílico	13
1.4 Métodos de produção de nanofibras.....	15
1.4.1 “Electrospinning”	15
1.5 Microscopia eletrónica de varrimento.....	18
1.6 Tratamento e análise de imagens	19
1.7 Área elementar representativa	22
1.8 Simulação computacional	23
1.9 Objetivos	26

Capítulo II:

2. Materiais e Métodos	28
2.1 Materiais.....	28
2.2 Métodos.....	29
2.2.2 Produção de estruturas fibrosas	29
2.2.2.1 Produção Global	29
2.2.2.2 Tratamento mecânico	29
2.2.2.3 Adição de agentes modificadores da pasta de celulose.....	29
2.2.2.3 Formação de estruturas porosas com mistura de fibras	30
2.2.3 Caracterização das estruturas fibrosas	30
2.2.3.1 Determinação da espessura	30
2.2.3.2 Determinação do ângulo de contacto	30
2.2.3.3 Morfologia das fibras.....	30
2.2.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	30
2.2.3.5 Análise de imagem	31
2.2.4 Simulação computacional.....	31
2.2.5 Análise estatística	31

Capítulo III:

3. Resultados e Discussão.....	33
3.1 Caracterização de estruturas fibrosas.....	33
3.1.1 Porosidade, espessura e densidade das estruturas fibrosas de celulose ...	33
3.1.2 Desenvolvimento da metodologia de análise de imagem	36
3.1.2.1 Utilização de estruturas de PVA.....	36
3.1.2.2 Utilização de estruturas de celulose.....	42
3.1.3 Morfologia das fibras: Morfi	56
3.1.4 Determinação do ângulo de contacto de celulose microfibrilada tratada.	57
3.2 Proposta de metodologia.....	59
3.3 Integração com a simulação computacional	60

Capítulo IV:

4. Conclusão e perspectivas futuras.....	66
--	----

Capítulo V:

5. Bibliografia	69
-----------------------	----

Capítulo VI:

6. Anexos.....	81
----------------	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Aplicações da nanotecnologia.....	3
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química e das ligações de hidrogénio intra- e inter-moleculares da celulose cristalina.	7
Figura 3 - Estrutura hierárquica da celulose.	9
Figura 4 - Estrutura química do álcool polivinílico obtido através da hidrólise alcalina do acetato polivinílico.	13
Figura 5 - Esquema de “electrospinning”.....	16
Figura 6 - Microscópio eletrónico de varrimento (HITACHI, S-3400N).	18
Figura 7 - Diagrama do algoritmo de análise de fibras.	21
Figura 8 - Deposição das fibras por simulação computacional.....	24
Figura 9 - Gráfico da porosidade das estruturas fibrosas de celulose com diferentes gramagens.	33
Figura 10 - Imagens MEV.	37
Figura 11 - Comparação entre a imagem original e as imagens segmentadas obtidas pelo DiameterJ de uma estrutura porosa de PVA.	38
Figura 12 - Montagem de imagens de análise produzidas pelo DiameterJ.....	39
Figura 13 - Histograma do diâmetro das fibras obtido a partir do DiameterJ.....	41
Figura 14 - Imagens MEV.	43
Figura 15 - Imagens do MEV.	44
Figura 16 - Imagens do MEV.	44
Figura 17 - Fração elementar representativa da imagem segmentada da amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa).	45
Figura 18 - Gráfico dos diâmetros médios das fibras com respetivo desvio padrão, obtidos através do DiameterJ e do método manual.	47
Figura 19 - Histograma do diâmetro das fibras e seu respetivo ajuste Gaussiano, obtido a partir do DiameterJ relativamente à amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa)..	47
Figura 20 - Poros analisados (a azul) da amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa) através do DiameterJ.	48
Figura 21 - Gráfico dos diâmetros médios dos poros com respetivo desvio padrão, obtidos através do DiameterJ e do método manual.	50
Figura 22 - Imagens MEV.	51
Figura 23 - Representação esquemática da segmentação de uma imagem do MEV da amostra MFC_HW_B4_G1 (plano Z) através do DiameterJ.	51

Figura 24 - Representação da segmentação manual de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), realizada através do programam Esprit.	52
Figura 25 - Representação dos poros analisados de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), através do programam Esprit.	53
Figura 26 - Gráficos binário e ternário de dimensões dos poros de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), realizada através do programam Esprit.	54
Figura 27 - Diâmetro médio dos poros para diferentes metodologias.	55
Figura 28 - Resultados das dimensões morfológicas das fibras de CMF obtidos através da análise do programa Morfi.	56
Figura 29 - Fluxograma da metodologia proposta de análise de imagens para aplicação na simulação computacional.	59
Figura 30 - Imagens obtidas computacionalmente.	60
Figura 31 - Imagens radiográficas da densidade dos poros obtida computacionalmente.	61
Figura 32 - Imagem 3D da matriz obtida através do simulador computacional.	61
Figura 33 - Esquema do tratamento efetuado numa imagem 3D obtida através do simulador computacional.	62
Figura 34 - Fração elementar representativa da imagem 3D obtida através do simulador computacional.	63
Figura 35 - Representação esquemática da segmentação de uma imagem do simulador computacional através do DiameterJ.	63
Figura 36 - Cinética de libertação do fármaco Diclofenac para diferentes “drug delivery systems” produzidos a partir de CNF, CB e CMC.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sistemas de transporte e entrega de fármacos com base em nanomateriais de celulose.....	11
Tabela 2 - Parâmetros do “electrospinning” e os seus efeitos na morfologia das fibras.	17
Tabela 3 - Representação 2D e 3D do monómero dos materiais poliméricos.	28
Tabela 4 - Caracterização física de estruturas fibrosas de celulose.	34
Tabela 5 - Comparação entre os valores do diâmetro médio das fibras de PVA obtidos através da análise pelo método manual e pelo DiameterJ.	40
Tabela 6 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo DiameterJ.....	41
Tabela 7 - Diâmetro médio, desvio padrão, erros associados e nº de medições das fibras das estruturas de celulose com tratamento mecânico e com aditivos químicos, obtidos através do DiameterJ.....	46
Tabela 8 - Diâmetro médio, desvio padrão e erros associados das fibras das estruturas de celulose com tratamento mecânico e com aditivos químicos, obtidos através do método manual.	46
Tabela 9 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo DiameterJ.....	49
Tabela 10 - Diâmetro médio dos poros, desvio padrão e erros associados das estruturas fibrosas de celulose com tratamento mecânico e/ou com aditivos químicos, obtidos através do método manual.	49
Tabela 11 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo Esprit.	53
Tabela 12 - Comparação entre os valores do diâmetro médio dos poros de celulose microfibrilada (plano Z) obtidos através da análise pelo DiameterJ, Esprit e método manual.	55
Tabela 13 - Ângulo de contacto.	57

Lista de Acrónimos

2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
AER	Área elementar representativa
CB	Celulose bacteriana
CMC	Carboximetilcelulose
CMF	Celulose microfibrilada
CNF	Celulose nanofibrilada
MEV	Microscópio eletrônico de varrimento
MFC	Microfibrillated cellulose
NCC	Nanocristais de celulose
NFC	Nanofibrilas de celulose
PAM	Poliacrilamida
PVA	Álcool polivinílico
SEM	Scanning eletron microscope
Tiff	Tagged image file format

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

1.1 Nanomedicina

Atualmente a nossa saúde está ameaçada por vários problemas relacionados com o estilo de vida e alimentação, sendo que o envelhecimento geral da população é um dos principais fatores a ter em conta. Este crescimento acentuado do envelhecimento da população exige tecidos organotípicos funcionais idealizados para a reparação, substituição e rejuvenescimento. Primeiramente, a descoberta de moléculas terapêuticas era baseada na aproximação fenotípica (Sams-Dodd, 2013). Os químicos medicinais normalmente desenvolviam novos compostos com as estruturas que se assemelham às de medicamentos conhecidos, produtos naturais bioativos ou mediadores biológicos. No entanto, ao longo dos últimos anos a prática da descoberta de fármacos passou por uma mudança de paradigma. Dado que alvos moleculares (receptores, enzimas e canais iónicos) foram identificados, os químicos medicinais focaram-se em encontrar entidades químicas com ação biológica direta e boa seletividade. Assim, como estruturas de alvos biológicos tornaram-se disponíveis, nasceu a aproximação com base no alvo na descoberta de novos fármacos (Sams-Dodd, 2013; Gund *et al.*, 1980).

É de realçar que a ciência e as inovações tecnológicas caminham juntas, formando fortes laços de correlação, levando a novas utilizações práticas. Assim surgiu a nanotecnologia, que consiste na habilidade de manipular a matéria em nanómetros para criar estruturas com uma organização molecular diferenciada. Modifica-se o arranjo de átomos e moléculas tendo em vista um produto final mais resistente, mais barato, mais leve, mais preciso, mais puro e mais adequado (Pina *et al.*, 2006). Neste contexto, a nanotecnologia pode revolucionar a forma com que se imagina, trata e manuseia a formação de materiais, levando a diversas aplicações (Figura 1).

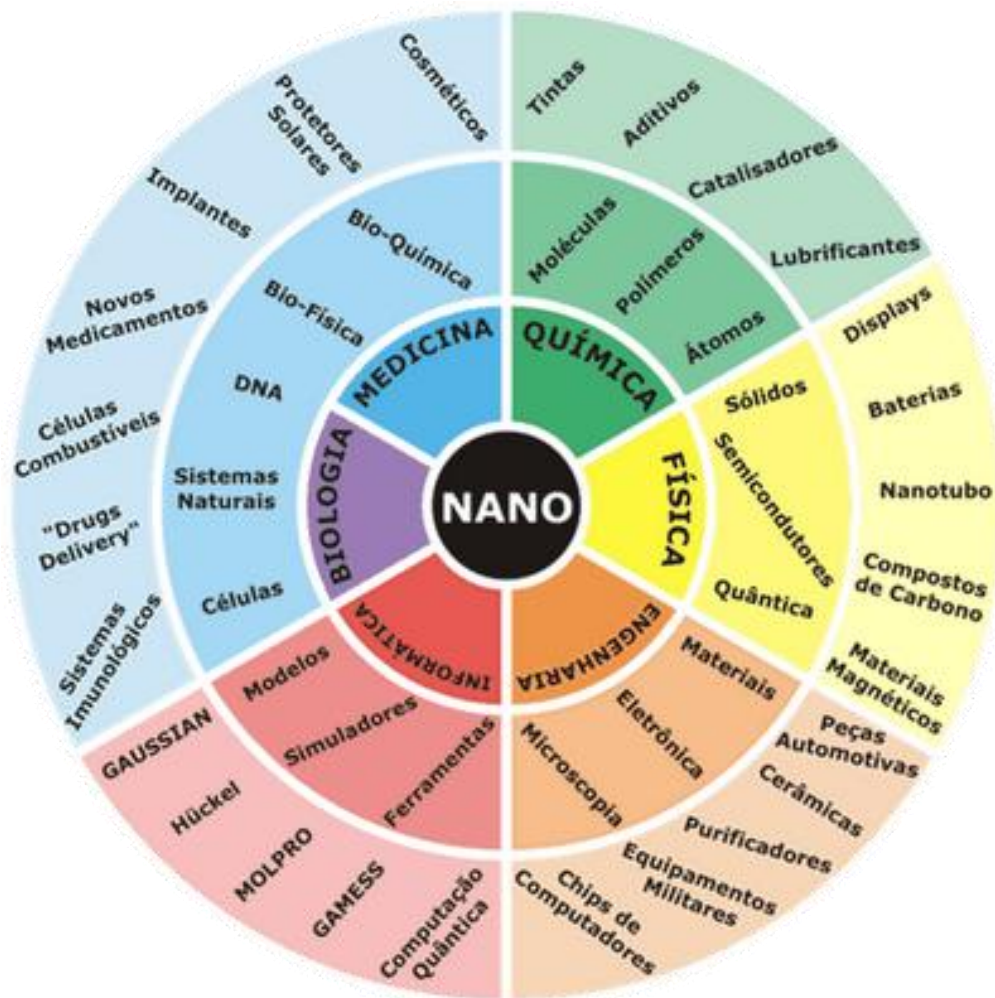


Figura 1 - Aplicações da nanotecnologia. <http://nanotecnologiananotecnologia.blogspot.pt/>. Acedido em maio de 2016.

Das aplicações da nanotecnologia referidas, as que mais nos interessam são aquelas relacionadas com a nanomedicina/naobioteecnologia. O termo nanomedicina refere-se à interface entre a nanotecnologia com a biologia, tendo por objetivo a criação de novos materiais, o desenvolvimento de novos produtos e processos baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna de visualizar e manipular átomos/moléculas (Fortunato, 2005). Dentro desta área os nanomateriais podem desempenhar variadas funções entre as quais: revestimentos de dispositivos biomédicos (Blaiszik *et al.*, 2009), biorreações (Städler *et al.*, 2009), biossensores (Sukhorukov *et al.*, 2007), preparação de “scaffolds” para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (Liu *et al.*, 2012; Aliuos *et al.*, 2008), cirurgia clínica (Azzopardi *et al.*, 2016), e para transporte e libertação controlada de moléculas terapêuticas (Cerqueira *et al.*, 2013; Allen & Cullis, 2004). Estas aplicações surgem da necessidade de conferir certas propriedades a moléculas terapêuticas que por si

só não conseguem desempenhar a ação desejada. Trata-se, portanto, de uma área de conhecimento com grande potencial de geração de inovações, que vem estimulando interesses económicos e comerciais, ao mesmo tempo que levantam debates em torno de questões éticas e ambientais (Pina *et al.*, 2006; Fortunato, 2005).

Para além da possibilidade de miniaturização de dispositivos, os investigadores encontraram um “fabuloso mundo novo” em materiais com dimensões intermédias entre as das moléculas e as das partículas submicrométricas: os nanomateriais poliméricos.

1.2 Sistemas de entrega de fármacos

Geralmente os fármacos são limitados por fraca estabilidade, baixa eficácia, elevada toxicidade, baixo nível de controlabilidade, pequenos tempos de meia vida, tendência de agregação, ou então, o seu transporte é prejudicado por biobarreras (Hubbell & Chilkoti, 2012). Surge, assim, a necessidade de conferir certas propriedades a estas moléculas terapêuticas que por si só não conseguem desempenhar a ação desejada.

Um sistema de transporte e entrega de fármacos consiste numa formulação que permite a introdução de um agente terapêutico no organismo e aumenta a sua eficácia e segurança por meio do controle da taxa, tempo e local de libertação dentro do corpo. Este sistema tem como objetivo produzir e manter uma quantidade suficiente de fármaco durante um período de tempo adequado, e espera-se também que evite a degradação do fármaco não libertado dentro do corpo. Como resultado, os efeitos adversos associados às flutuações indesejáveis nas concentrações do fármaco ou a ineficácia das moléculas terapêuticas danificadas podem ser contornadas. Durante as últimas décadas, nanoestruturas poliméricas ganharam enorme interesse como sistemas de transporte e libertação de medicamentos (Fitzgerald *et al.*, 2015). Este sistema de entrega utilizando estas estruturas, baseia-se no princípio de que um aumento da área de superfície do transportador do fármaco aumenta a taxa de dissolução de moléculas terapêuticas (Zamani *et al.*, 2013).

A aplicação dos sistemas de transporte/libertação de fármacos pode ser realizada por diversos materiais desde nanopartículas lipídicas, conjugados de polímero-fármaco (Allen & Cullis, 2007), nanohidrogéis (Thoniyot *et al.*, 2015) e por micro/nanocápsulas (Martins *et al.*, 2016; Richardson *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2014; Musyanovych & Landfester, 2014; Xu *et al.*, 2012).

1.3 Nanomateriais poliméricos

Os nanomateriais apresentam propriedades distintas das propriedades das moléculas e dos sólidos cristalinos típicos, devido a efeitos de tamanho e de superfície que se tornam especialmente evidentes para dimensões tipicamente entre 1-100 nm. Como consequência da diminuição do tamanho médio de partícula dos materiais, verifica-se um aumento da área superficial por volume (Martins e Trindade, 2012). De maneira direta, podemos apoiar a nanotecnologia sobre um grande alicerce: o fato de que as propriedades dos materiais, da maneira pela qual as conhecemos, são fortemente dependentes do tamanho das partículas deste material. Por outras palavras, todas as propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc), da forma pela qual as conhecemos, manifestam-se a partir de um determinado tamanho chamado crítico. Quando as partículas deste material estão abaixo deste tamanho crítico, esta propriedade se torna diferenciada. Para um mesmo material, frequentemente o tamanho crítico é diferente para cada uma das suas propriedades. Por exemplo, o tamanho crítico para propriedades ópticas de um determinado nanomaterial pode ser 20 nm, enquanto que para as propriedades magnéticas pode ser 80 nm. Para uma mesma propriedade, o tamanho crítico também é diferente para diferentes materiais. Além disso, quando abaixo do tamanho crítico, as propriedades do material dependem também da forma das partículas, ou seja, nanopartículas esféricas com diâmetro de 5 nm têm propriedades diferentes daquelas encontradas para o mesmo material, mas na forma de bastão com 5 nm de comprimento. Estas considerações transportam-nos para uma realidade extremamente excitante: novos materiais, com novas propriedades e possibilidades de utilização, podendo ser preparados através do controle do tamanho e da forma das partículas de materiais já conhecidos (Zarbin, 2007).

As nanofibras poliméricas podem ser preparadas por diversos materiais, desde células imobilizadas como esferas biológicas a vários polímeros (Liechty *et al.*, 2010), tais como por exemplo a celulose (Håkansson *et al.*, 2014; Butun *et al.*, 2011), a poliamida-6 (Curto *et al.*, 2011b; Mit-uppatham *et al.*, 2004), álcool polivinílico (PVA) (Curto *et al.*, 2012), entre outros (Liu *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006). Os nanomateriais, dependendo da ação, podem ainda ser preparados para serem sensíveis ao pH (Liu *et al.*, 2014; He *et al.*, 2012), sensíveis a estímulos (Salehi *et al.*, 2013; Hu & Liu, 2015), sensíveis a reações redox ou biodegradáveis (Zeng *et al.*, 2003).

1.3.1 Celulose

Os polímeros naturais estão presentes em uma ampla variedade de organismos naturais com propriedades capazes de satisfazer as necessidades específicas dos organismos vivos. Deste modo, a investigação tem-se centrado sobre a utilização de polímeros naturais numa variedade de sistemas e dispositivos biomédicos, incluindo pensos para feridas, implantes médicos, entrega de fármacos, enxertos vasculares, e para engenharia de tecidos (Babu *et al.*, 2013).

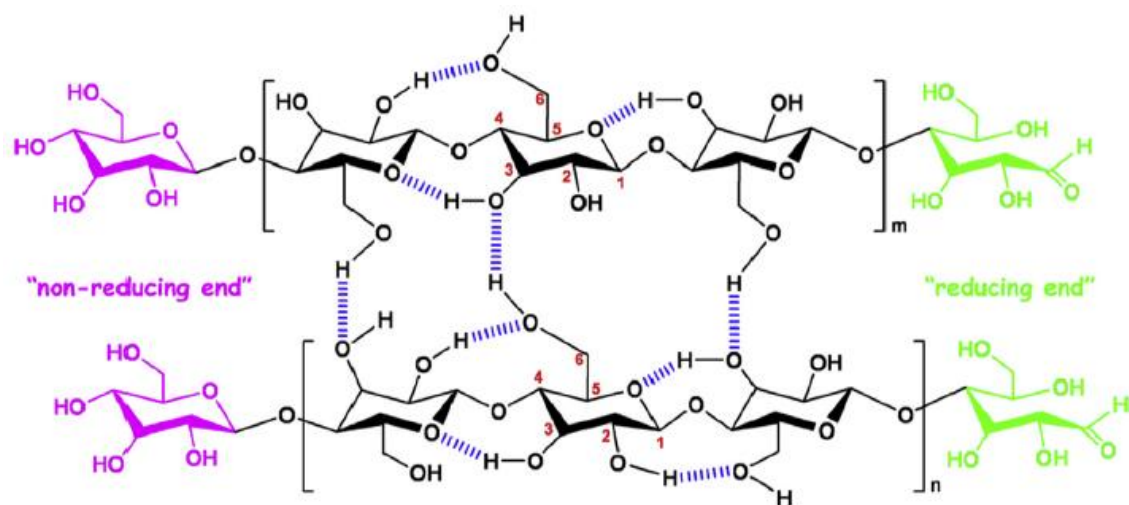


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química e das ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares da celulose cristalina. Adaptado de (Lin & Dufresne, 2014).

Entre os polímeros naturais destaca-se a celulose, devido à sua sustentabilidade, biodegradabilidade, e segurança biológica, tendo sido amplamente utilizada nos últimos anos em diversos campos (Águas *et al.*, 2015). De um ponto de vista estrutural, a celulose é um polissacárido com elevado peso molecular composto por unidades de β -1,4-anidro-D-glicopiranosose (Figura 2). Estas unidades não se encontram exatamente no plano com a estrutura, mas assumem uma conformação em cadeira com sucessivos monómeros de glicose rodados através de um ângulo de 180° sobre o eixo molecular, e os grupos hidroxilo em uma posição equatorial. A capacidade destes grupos hidroxilo em formar ligações de hidrogênio desempenha um papel importante na formação da embalagem fibrilar e semicristalina, a qual regula as propriedades físicas importantes deste material altamente coesivo. Tal como indicado com linhas tracejadas a azul na figura 2, as ligações de hidrogênio intramoleculares ocorrem principalmente entre o hidrogênio suportado pelo grupo OH do carbono C3 e o oxigênio do anel da unidade de glicose adjacente (O5). As

ligações de hidrogénio intermoleculares ocorrem entre o hidrogénio do grupo hidroxilo primário (OH-6) e o oxigénio na posição O3 num ciclo de uma unidade vizinha, bem como entre o hidrogénio de OH-2 e o oxigénio na posição O6. Para além disso, é sabido que a orientação paralela unidirecional de cadeias de celulose no interior das fibrilas primárias, que ocorrem durante a biossíntese e deposição, induz a formação de cristais com uma funcionalidade hidroxilo em uma extremidade, conhecida como a extremidade não redutora (mostrado a cor-de-rosa na figura 2), e a funcionalidade hemiacetal na outra, conhecida como a extremidade redutora (mostrado a verde na figura 2). Uma das características mais específicas da celulose é que cada uma das suas unidades de glicose carrega três grupos hidroxilo, o que confere à nanocelulose uma superfície reativa coberta com numerosos grupos hidroxilo ativos. Para cada unidade de glicose, a reatividade dos grupos hidroxilo em posições diferentes é heterogénea. O grupo hidroxilo na posição 6 atua como um álcool primário ao passo que os grupos hidroxilo nas posições 2 e 3 comportam-se como álcoois secundários. De facto, o átomo de carbono que possui o grupo hidroxilo na posição 6 só é ligado a um grupo alquilo, enquanto que os carbonos com os grupos hidroxilo nas posições 2 e 3 são diretamente unidos a dois grupos alquilo, o que irá induzir efeitos estéricos derivados da estrutura supramolecular da celulose e do agente de reação. Tem sido relatado que na estrutura da celulose, o grupo hidroxilo na posição 6 pode reagir dez vezes mais rápido do que os outros grupos OH, enquanto que a reatividade do grupo hidroxilo na posição 2 foi considerada duas vezes maior que na 3 posição. No entanto, em relação à reatividade de superfície a partir de grupos hidroxilo, a utilização de reagentes ou solventes pode afetar a reatividade dos grupos hidroxilo de posições diferentes (Lin & Dufresne, 2014).

A utilização da celulose vegetal requer o conhecimento das características morfológicas das suas fibras, tais como a sua largura e comprimento. Podem encontrar-se na literatura diversos valores para a morfologia das fibras de celulose pois tanto o processo de produção de pasta como o tipo de matéria prima afetam as dimensões e propriedades das fibras (Joutsimo, & Asikainen, 2013; Miao & Hamad, 2013; Curto *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2008). Por esta razão as características morfológicas dos elementos podem adotar diversas dimensões, no qual se destaca o diâmetro das fibras que pode variar de 18 a 40 µm. No presente trabalho as propriedades morfológicas das fibras foram determinadas, em suspensão, utilizando um equipamento de medição que integra uma câmara e um programa de análise de fibras, designado por MorFi® (Techpap, Grenoble, França). Esta abordagem permite uma medição estatística confiável de milhares de fibras de forma rápida, e uma

determinação precisa das características importantes de sua morfologia, tais como o comprimento, largura, grosseria, torção e curvatura das fibras (Moral *et al.*, 2010; Hirn & Bauer, 2006; Sawoszczuk, 2004).

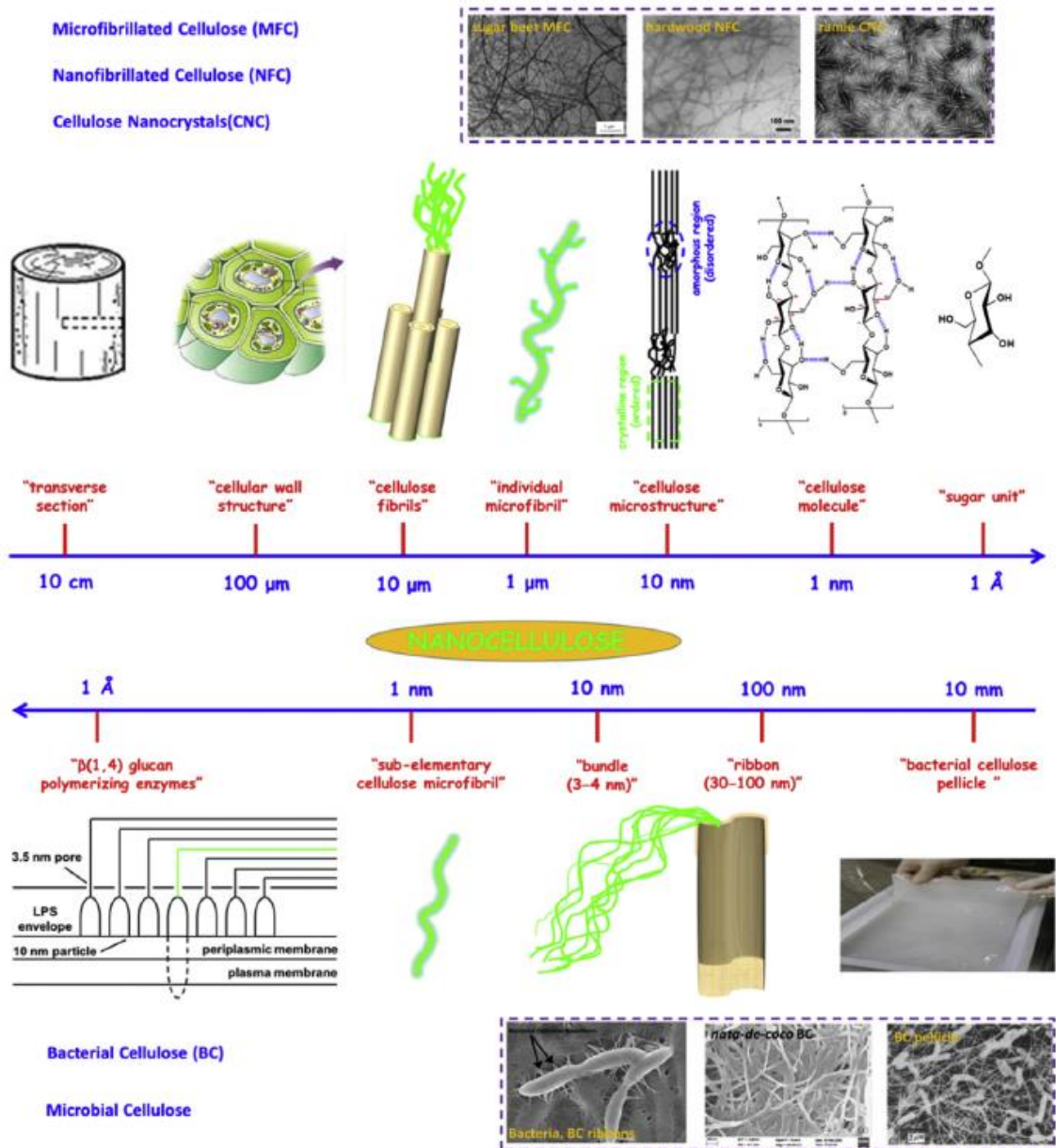


Figura 3 - Estrutura hierárquica da celulose adaptado de (Lin & Dufresne, 2014); imagem superior (da unidade grande para unidade pequena): nanocristais de celulose (NCC), micro/celulose nanofibrilada (CMF e CNF); imagem inferior (da unidade minúscula para unidade pequena): celulose bacteriana (CB). Micrografias eletrônicas de transmissão de CMF de beterraba sacarina (adaptado com permissão de Dufresne *et al.*, 1997), CMF de fibra curta (adaptado com permissão de Saito *et al.*, 2007), NCC de rami (adaptado com permissão de Habibi *et al.*, 2008); e imagens do MEV de fitas de CB (adaptado com permissão de Gatenholm & Davalos, 2008), CB de nata-de-coco (adaptado com permissão de Lee *et al.*, 2009), CB de película (adaptado com permissão de Iguchi *et al.*, 2000).

Com o surgimento e desenvolvimento de nanotecnologia, a celulose atrai mais atenção na nova forma de "nanocelulose" para ser usada como um material novo e avançado. A nanocelulose é descrita como os produtos ou extractos de celulose nativa, composta pela estrutura nanométrica do material. Geralmente, a família de nanocelulose pode ser dividida em três tipos: (1) nanocristais de celulose (NCC), com outras designações, tais como a celulose nanocristalina, "nanowhiskers" ou microcristais de celulose em forma de bastões; (2) nanofibrilas de celulose (NFC), tais como a celulose nanofibrilada (CNF), celulose microfibrilada (CMF) e nanofibras de celulose; e (3) celulose bacteriana (CB), também referida como celulose microbiana (Almeida *et al.*, 2014; Klemm *et al.*, 2011). As fontes para a extração de NCC e NFC são a madeira, algodão, linho, palha de trigo, algas, entre outros. Como indicado na figura 3 (parte superior), a produção de NCC ou NFC é um procedimento que consiste em converter a unidade grande (cm) para a unidade pequena (nm). Ao contrário da produção de NCC e NFC, a biossíntese de CB é um processo de construção desde a unidade mínima (Å) à unidade pequena (nm). Como indicado na figura 3 (parte inferior), a CB é tipicamente sintetizada por bactérias (tais como a *Acetobacter xylinum*) no seu estado puro, não requerendo um processamento intensivo para remover impurezas não desejadas ou contaminantes tais como lignina, hemicelulose e pectina.

Em relação à preparação de NFC, a estratégia de desestruturação induzida mecanicamente é a principal aplicada, a qual envolve a homogeneização de alta pressão e trituração antes e/ou após tratamento químico ou enzimático. Várias ações mecânicas de cisalhamento pode, efetivamente, individualizar microfibrilas a partir de fibras celulósicas. NFC consiste em ambas nanofibrilas individuais e agregadas, constituídas por domínios de celulose cristalina e amorfa, que atribui a morfologia do NFC com cadeias flexíveis e longas (Chirayil *et al.*, 2014; Lin & Dufresne, 2014; Zhou *et al.*, 2012; Besbes *et al.*, 2011a; Besbes *et al.*, 2011b). A preparação da NCC e da CB pode ser encontrada na literatura (Lin *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013).

Sendo um nanomaterial natural, a nanocelulose possui diversas características diferentes dos materiais tradicionais, incluindo a sua morfologia e as dimensões geométricas, cristalinidade, área superficial específica elevada, propriedades reológicas, comportamento cristalino líquido, alinhamento e orientação, o reforço mecânico, propriedades de barreira, a reatividade química de superfície, biocompatibilidade, biodegradabilidade, a falta de toxicidade, baixo custo, etc. Todas as propriedades da nanocelulose podem ser geralmente classificadas em três

categorias: propriedades físicas, propriedades biológicas e química da superfície (Lin & Dufresne, 2014; Kümmerer *et al.*, 2011; Vartiainen *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2009; Miyamoto *et al.*, 1989). Tendo por base estas propriedades únicas, os nanomateriais celulósicos têm um vasto número de aplicações, tais como na engenharia de tecidos (Bhattacharya, 2012), imobilização e reconhecimento de enzimas/proteínas (Arola *et al.*, 2012), substituto/biomaterial médico (Mathew *et al.*, 2012), regeneração e cura de tecidos (Gonzalez *et al.*, 2014), estruturas com atividade antimicrobiana (Andresen *et al.*, 2007), e em sistemas de entrega de fármacos (Jorfi & Foster, 2015; Lavoine *et al.*, 2014; Kolakovic *et al.*, 2011). As formas mais comuns de transportadores de fármacos à base de nanomateriais celulósicos podem ser divididos principalmente em três vertentes: microesferas (ou micropartículas), hidrogéis (ou géis), e membranas (ou filmes). A tabela 1 resume vários sistemas de transporte de fármacos baseados em nanocelulose, contendo diferentes matrizes de materiais celulósicos com a capacidade de incorporar moléculas terapêuticas e regular a libertação do fármaco.

Tabela 1 - Sistemas de transporte e entrega de fármacos com base em nanomateriais de celulose adaptado de (Lin & Dufresne, 2014).

Sistema de transporte	Nanocelulose	Matriz	Fármaco modelo	Tempo de libertação e meio
Microesfera	NCC	EA; MMA; BMA	Cloridrato de propranolol	12 h em PBS a pH 6.8
		Alginate de sódio	Tiofilina	16 h em PBS a pH 7.4, pH 6.8, pH 1
	NFC	-	Indometacina; nadolol; atenolol; metoprolol tartarato; verapamil; ibuprofeno	10-14 d em PBS pH 7.4
		Hidrofobina	Itraconazol	90 min em solução de NaCl/HCL a pH 1.2
Suspensão	NCC	CTAB	Paclitaxel; docetaxel; DOX; TET; etoposide	1-4 d em PBS
		oligossacarídeos de quitosano	Cloridrato de procaína	100 min em solução de NaCl a pH 8
Hidrogel ou gel	NCC	Ciclodextrina/Pluronic	DOX	6.5 d em água
		Ciclodextrina/Pluronic	Albumina de soro bovino	20 h em PBS a pH 7.4

		Celulose regenerada	Albumina de soro bovino	48 h em fluido corporal simulado	
	CB	-	Albumina de soro bovino	48 h em PBS a pH 7.4	
		-	Colagénio; ácido hialurónico; factores de crescimento	36-96 h em PBS	
		Ácido acrílico	Albumina de soro bovino	8 h em fluido intestinal simulado	
		Poliacrilamida	Teofilina	24 h em PBS a pH 7.4	
Membrana ou revestimento	NFC	-	Paracetamol	5-10 min em água	
		-	Lisozima	10 h em água pura ou numa solução de água/etanol	
		-	Cafeína	9 h em água	
		-	Indometacina	30 d em tampão de pH 5 fosfato	
				Itraconazol	90 d em solução de NaCl/HCl a pH 1.2
				Dipropionato de beclometasona	90 d em água
	CB	-	Paracetamol	2 h em PBS pH 5.8	
		-	Lidocaína	7 h em PBS pH 7.4	
		-	Lidocaína; ibuprofeno	8 h em PBS pH 7.4	
		-	Cafeína	15 h em PBS pH 7.4	
-		Cloridrato de berberina, sulfato de berberina	24 h em HCl ou numa solução de H ₂ SO ₄ a pH 2.1; PBS a pH 6.8; solução de NaOH a pH 12		
-		Glicerina	24 h na avaliação <i>in vivo</i> (pele)		
Nanofibras	NCC	Álcool polivinílico	Vanilina	1 h em água	
		Poli(ácido láctico)	Azul Columbia	48 h em água	
		Hordeína/zeína	Riboflavina	24 d em PBS pH 7.4	
Aerogel	NFC	-	Dipropionato de beclometasona	700 min em solução SDS a pH 8	

1.3.2 Álcool polivinílico

O PVA é um polímero hidrofílico, obtido industrialmente através da hidrólise alcalina do acetato polivinílico em solução (Figura 4) e utilizado em diversas aplicações, tais como por exemplo, fibras, mantas, membranas, filmes, adesivos, revestimento de papéis, estabilizantes para polimerizações, entre outros (Guerrini *et al.*, 2006). Atualmente devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade o PVA está sendo muito utilizado na produção de hidrogéis, lentes de contacto, componentes artificiais do organismo e sistemas de liberação de fármacos (Guerrini *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1998).

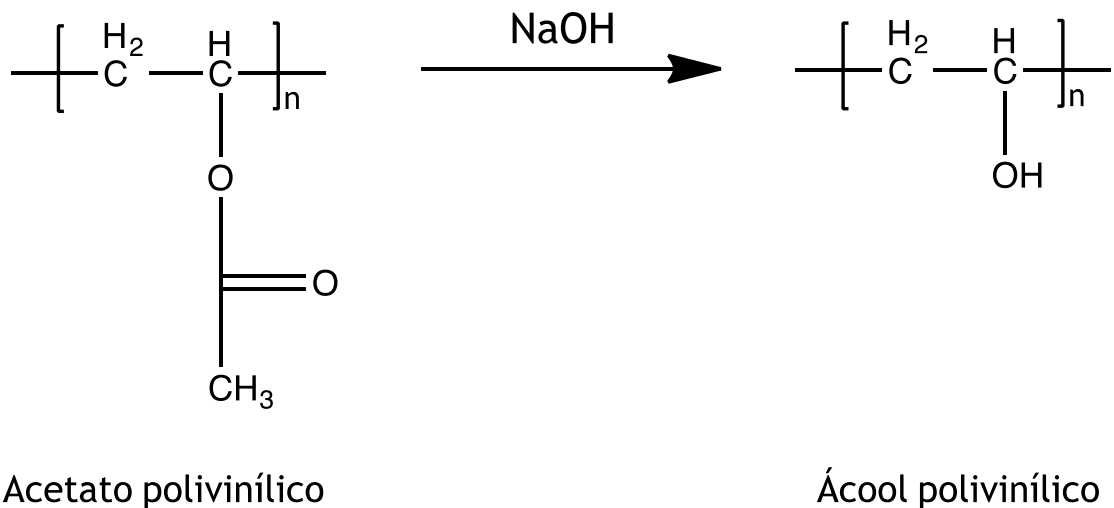


Figura 4 - Estrutura química do álcool polivinílico obtido através da hidrólise alcalina do acetato polivinílico.

Industrialmente, são produzidos diversos tipos de PVA, possuindo diferentes graus de hidrólise e diferentes graus de polimerização. Os PVA utilizados na produção de fibras são em sua grande maioria parcialmente hidrolisados (88% mol) ou altamente hidrolisados (98-99% mol). Estes polímeros possuem excelente resistência química, resistência à tração e compressão. Estas propriedades associadas à boa estabilidade química resultam em um vasto campo de aplicação tais como fibras e filmes.

As fibras de PVA na faixa de 5 a 500 μm são produzidas tanto por processos convencionais como por “electrospinning”. Porém, para aplicações específicas como filtros de sistemas de partículas, membranas semi-impermeáveis, nanocompósitos,

roupas protetoras, revestimentos de pele humana e sistemas de liberação de fármacos, são necessárias fibras com dimensões de nanómetros. Estas fibras são geradas utilizando-se o processo de “electrospinning” via solução (Guerrini *et al.*, 2006).

1.4 Métodos de produção de nanofibras

Os nanomateriais podem ser preparados por distintos processos, tais como o “electrospraying”, “electrospinning”, automontagem e através de bactérias (Poncelet *et al.*, 2012; Beachley & Wen, 2010). Estes métodos possuem a capacidade de lidar com suspensões, biopolímeros, micro/nanomateriais e ainda populações celulares heterogêneas para a formação direta de reconstruções biológicas funcionais e tridimensionais. Neste contexto, o “electrospinning” aparece como um método simples e barato para a produção de nanofibras contínuas, sendo capaz de utilizar uma ampla gama de polímeros e misturas de polímeros (Liu *et al.*, 2012; Bhardwaj & Kundu, 2010). Este método tem vindo a aumentar a sua importância na última década, pois é uma técnica versátil que oferece características únicas para produzir materiais nano fibrosos com uma estrutura porosa controlável. O diâmetro das fibras formadas variam de apenas 2 nanómetros a alguns micrómetros. As novas descobertas no desenvolvimentos de matérias têm proporcionado uma ampla gama de aplicações, incluindo por exemplo a cicatrização de feridas, preparação de “scaffolds”, sistemas de entrega de fármacos e biossensores (Jeffries *et al.*, 2014; Zamani *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2011; Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.4.1 “Electrospinning”

O “electrospinning” utiliza um meio carregado que flui no interior de uma agulha e que é subsequentemente exposto a um campo elétrico provocado pela diferença de potencial entre dois elétrodos carregados (a agulha carregada e o coletor). Este campo elétrico externo acelera o líquido que sai da agulha em direção ao coletor desenhando um jato, que tanto gera gotículas como fibras contínuas. Durante este processo de aceleração, um cone de líquido é formado na saída da agulha a partir do vértice do qual um jato é gerado (Figura 5). Curiosamente o “electrospinning” tem demonstrado possuir a capacidade de formar com precisão materiais em três dimensões na escala nano (Poncelet *et al.*, 2012).

Há muitos aspectos únicos para estes jatos, alguns dos quais são:

- A capacidade de gerar gotículas e fios nanométricos (<50 nm), utilizando agulhas com diâmetros internos de 500 μm ;
- A capacidade para processar grandes quantidades de materiais em suspensão;
- A capacidade de processamento de líquidos altamente viscosos (> 10 000 mPa s).

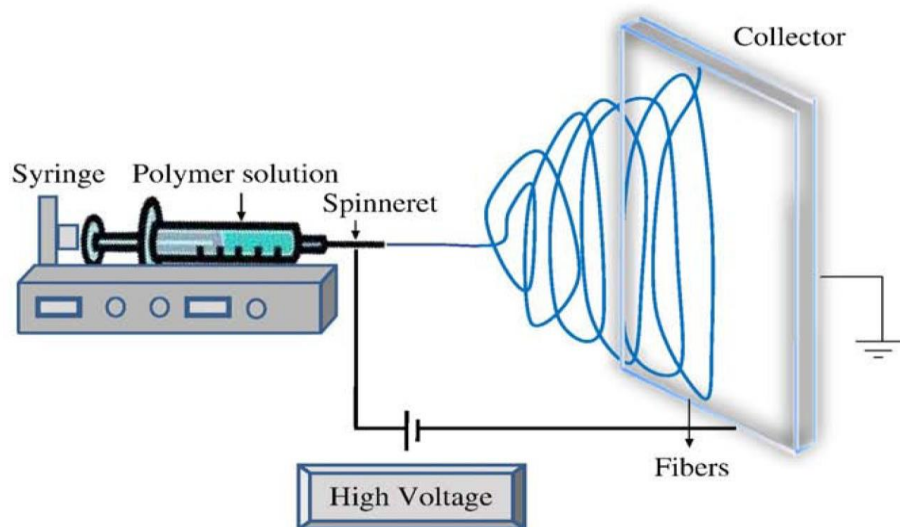


Figura 5 - Esquema de “electrospinning” adaptado de (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Apesar das vantagens do “electrospinning”, a otimização da produção das nanofibras é influenciada por diversos parâmetros, classificados geralmente em parâmetros de solução, parâmetros do processo e parâmetros ambientais. Os parâmetros da solução incluem a viscosidade, condutividade, peso molecular e a tensão superficial; parâmetros do processo incluem o campo elétrico aplicado, caudal e distância entre a agulha e o coletor; parâmetros ambientais englobam a umidade e temperatura do meio ambiente. Cada um destes parâmetros afeta significativamente a morfologia das fibras obtidas, no entanto, através de uma manipulação adequada pode-se obter nanofibras de morfologia e diâmetros desejados. Na tabela 2 estão presentes alguns parâmetros e os seus efeitos na morfologia das fibras (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Para além destes fatores, as interações entre o polímero e o solvente de igual modo afetam a formação das estruturas. Selecionar o solvente adequado, ou uma

combinação de solventes, é muito importante para determinar as propriedades físicas da solução polimérica.

Tabela 2 - Parâmetros do “electrospinning” e os seus efeitos na morfologia das fibras. Adaptado de (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Parâmetros	Efeito na morfologia das fibras
<i>Parâmetros de solução</i>	
Viscosidade	Baixa formação de esferas; grande aumento no diâmetro da fibra
Concentração do polímero	Aumento do diâmetro da fibra com o aumento da concentração
Peso molecular do polímero	Redução no número de esferas e gotas com o aumento do peso molecular
Condutividade	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da condutividade
Tensão superficial	Alta tensão superficial resulta na instabilidade dos jatos
<i>Parâmetros do processo</i>	
Voltagem aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da tensão
Distância agulha-coletor	Formação de esferas com distâncias demasiado pequenas ou grandes;
Caudal	Diminuição do diâmetro da fibra com diminuição do caudal; formação de esferas com caudal muito alto
<i>Parâmetros ambientais</i>	
Humidade	Humidade elevada nos intraporos das fibras
Temperatura	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da temperatura

As estruturas obtidas por “electrospinning” apresentam dimensões uniformes de largura de fibras, porosidade elevada, e distribuição de poros uniforme, o que as torna candidatas ideais para a validação de metodologias de análise de imagem. É precisamente com esse objetivo que as estruturas de PVA serão utilizadas no contexto deste trabalho.

1.5 Microscopia eletrónica de varrimento

O microscópio eletrónico de varrimento (MEV) (Figura 6) é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. A principal razão da sua utilidade é a capacidade de obter imagens com alta resolução, na ordem de 1 a 5 nm. A utilização deste método é comum em diversas áreas, entre elas a biologia, engenharia, química e medicina (Dedavid *et al.*, 2007).

O MEV baseia-se no lançamento de feixes de eletrões que bombardeiam uma ou mais amostras, sem atravessá-la, por forma a retirar-se todas as informações do que se quer estudar. Para que haja bombardeamento de eletrões é necessário que as amostras sejam condutoras pois, se não apresentarem esta propriedade, o MEV não consegue criar uma imagem. Como nem todos os objetos de estudo possuem boa condutividade, muitas vezes é necessário revesti-los a ouro de forma a se tornarem melhores condutores. Após o revestimento com este metal, as amostras são encaminhadas para o MEV onde é formada uma imagem da amostra.

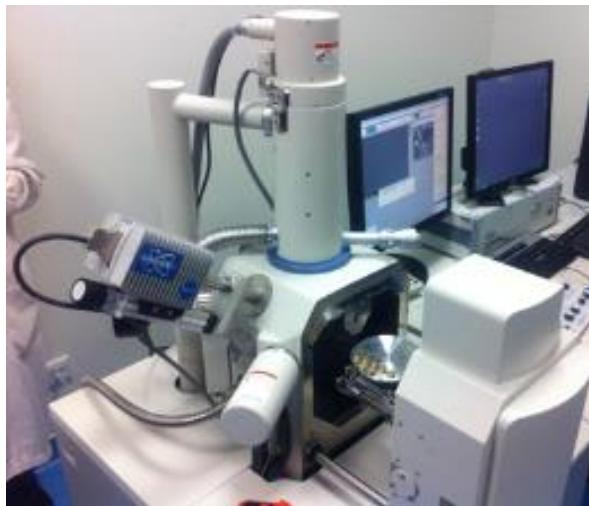


Figura 6 - Microscópio eletrónico de varrimento (HITACHI, S-3400N).

1.6 Tratamento e análise de imagens

No estudo científico de nanoestruturas poliméricas um parâmetro muito importante é a obtenção de imagens de qualidade para a análise e recolha de dados/resultados (Chinga-Carrasco, 2010). Na análise de imagens de nanofibras é relevante poder-se determinar várias dimensões tais como a espessura, tamanho dos poros, diâmetro das fibras, entre outros (Badami *et al.*, 2006; Hildebrand & Rügsegger, 1997). Um dos métodos de análise de imagem mais utilizado é o do programa ImageJ. Wayne Rasband é o principal autor desta ferramenta, após ter criado anteriormente o programa “National Institutes of Health Image”, na qual utilizou como linguagem de programação o Java (Schneider *et al.*, 2012).

O ImageJ é um programa de processamento de imagem de acesso livre, concebido para imagens científicas multidimensionais. O programa é extenso, contendo um grande número de “plug-ins” e macros para executar diversas funcionalidades de acordo com o que se pretende analisar. É uma ferramenta com uma curva de aprendizagem que pode ser demorada, mas cujo manuseamento se torna relativamente fácil após vencidas as barreiras iniciais. É um programa muito útil que dispõe de bons tutoriais, com diversas aplicações e funcionalidades (Ferreira & Rasband, 2012; Haeri & Haeri, 2015; Collins, 2007; Abràmoff *et al.*, 2004). Uma vez que neste trabalho se pretende estudar as propriedades de nanofibras, vários “plug-ins” estão disponíveis para auxiliar nesta tarefa, como por exemplo: o BoneJ (Doubé *et al.*, 2010) para medição da espessura; DiameterJ (Hotaling *et al.*, 2015) para medição do diâmetro das fibras; jPOR (Grove & Jerram, 2011) para medição de poros; OrientationJ (Hotaling *et al.*, 2015) para analisar a orientação das fibras; Skeleton (Chinga-Carrasco G, 2013) para medição do comprimento das fibras, entre outros (Fischer *et al.*, 2010). É de realçar que nem todos estes “plug-ins” foram criados com a intenção de trabalhar apenas com nanomateriais, mas sim com um vasto número de imagens biológicas. Por outro lado existe uma vertente do ImageJ, o programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012), que visa melhorar algumas funcionalidades do ImageJ e explora outros plug-ins adequados à análise de imagens biológicas.

A metodologia a desenvolver neste trabalho para o tratamento de análise de imagem aplica-se em imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. Para esta ferramenta ser capaz de analisar a imagem, esta tem de ser do tipo 8-bit e estar no formato “tagged image file format” (Tiff). O primeiro passo antes de qualquer análise é a calibração da imagem. Após este passo, o DiameterJ segmenta

automaticamente as imagens em imagens binárias, nas quais as fibras ficam definidas com a cor branca (primeiro plano) e os poros com a cor preta (segundo plano). A binarização é um parâmetro muito importante pois pode definir toda a análise, isto é, os melhores resultados são obtidos se o operador seleciona o algoritmo de segmentação que funciona melhor para os seus conjuntos de imagens. O DiameterJ contém algoritmos capazes de realizar este processo automaticamente, gerando 8 imagens diferentes por cada algoritmo. Esta ferramenta é também capaz de analisá-las, de encontrar o diâmetro de nanofibras/microfibras em cada pixel ao longo de um eixo e, em seguida, produz um histograma destes diâmetros. Nos resultados estão incluídas estatísticas resumidas tais como o diâmetro médio das fibras e o diâmetro das fibras mais ocorrido (moda). O DiameterJ dispõe também da função denominada "Analisar Partículas" incluída no ImageJ/Fiji para analisar o espaço poroso e gerar estatísticas para os poros. Na figura 7 está esquematizada uma visão geral de como o DiameterJ analisa o diâmetro das fibras, dimensões dos poros e outras propriedades (Hotaling *et al.*, 2015).

Alternativamente ao DiameterJ, irá utilizar-se o programa Esprit comercializado pela Bruker para tratamento e análise de imagens e posterior quantificação das dimensões dos poros das estruturas. Este "software" tem a capacidade de detectar os poros, considerando-os como sendo partículas, medi-los e analisá-los automaticamente. Além disso, quando o MEV tem acoplado um aparelho de espectroscopia de raio-X por dispersão de energia, o programa é capaz de produzir um mapa da estrutura com identificação dos elementos químicos presentes na amostra. Qualquer imagem com suficiente contraste pode ser analisada pela metodologia desenvolvida para análise de poros. O sistema pode ser configurado para aplicar filtros e melhorar a imagem original de acordo com o que se pretende analisar. Ele diferencia o fundo e/ou características indesejáveis das de interesse, e permite a detecção de múltiplas fases na amostra. Existem uma série de diâmetros de poros que podem ser obtidos através deste programa, entre eles salientam-se o comprimento (a maior distância), largura (a distância mais estreita), diâmetro médio, o diâmetro equivalente (o diâmetro equivalente supondo que o poro é circular), a projeção ao longo do eixo do X e a projeção ao longo do eixo do Y. Qualquer uma das propriedades de partícula pode ser usada para filtrar o resultado final. Os resultados da análise dos poros, por sua vez, podem ser apresentados de várias formas incluindo a lista de partículas, imagens das propriedades analisadas, espectros e histogramas de todas as características. Além disso, um gráfico binário ou ternário com parâmetros selecionáveis também está disponível.

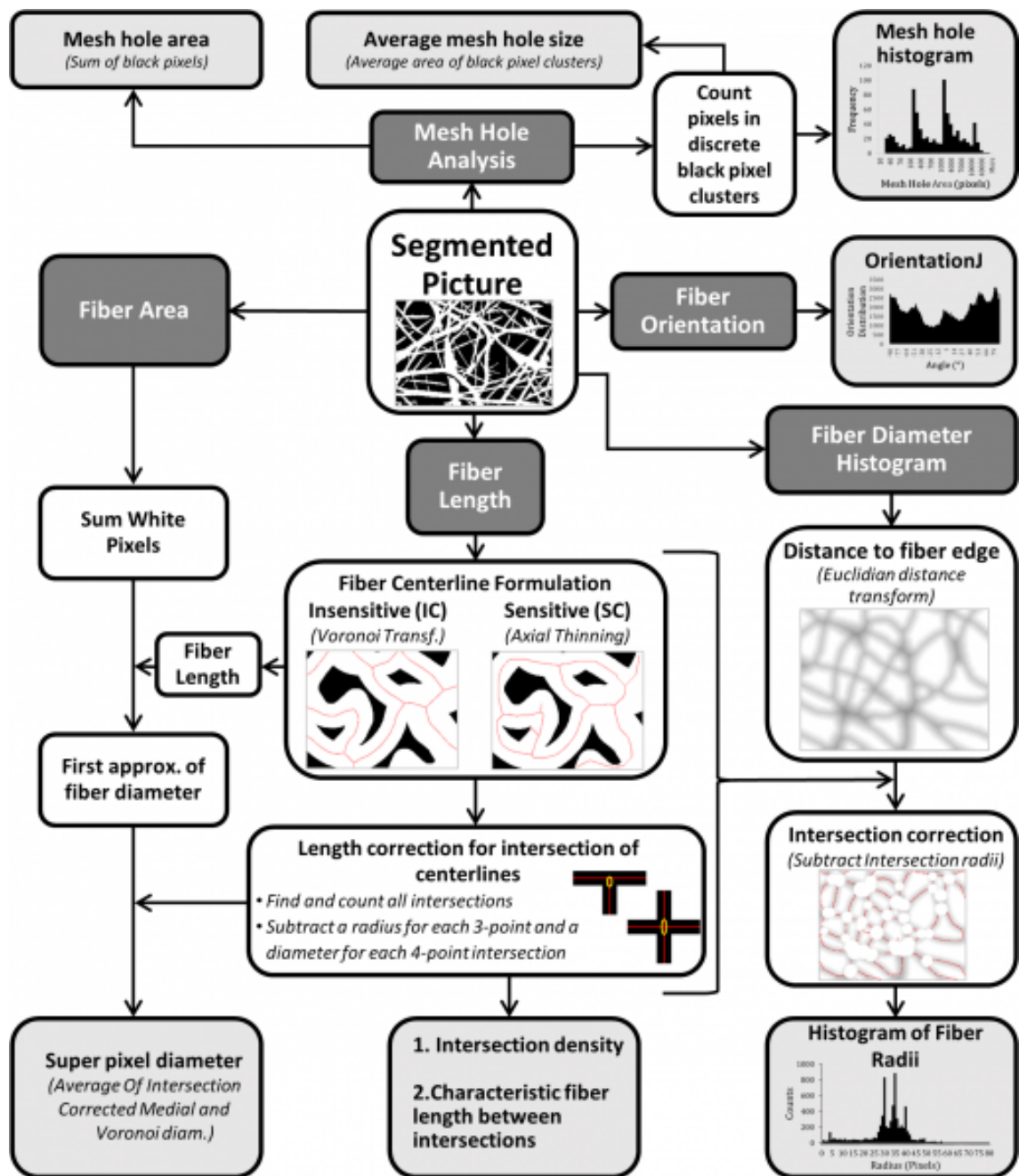


Figura 7 - Diagrama do algoritmo de análise de fibras. O ponto de partida é a caixa com o rótulo "Segmented Picture". As caixas cinzentas são resultados do DiameterJ. Os algoritmos não são capazes de determinar eficazmente o diâmetro das fibras nas intersecções fibra, necessitando de subprocessos para remover as intersecções conforme indicado. Adaptado de (Hotaling *et al.*, 2015).

1.7 Área elementar representativa

Para se poder utilizar uma fração de uma imagem para análise é necessário demonstrar que essa mesma fração é representativa da imagem original. Assim, um elemento representativo é a mais pequena área que representa a amostra para uma dada propriedade, devendo ser ampla o suficiente para conter uma informação satisfatória sobre a nanoestrutura de modo a ser estatisticamente representativa. É de realçar que a fração representativa está associada a uma propriedade física, a uma estrutura e a um erro relativo (Bloch, 2009).

Dado que se divide uma imagem original em frações, é necessário provar que essa área é suficientemente ampla para permitir a quantificação de parâmetros estruturais tais como porosidade, espessura e diâmetro das fibras.

Se o elemento representativo está associado a uma propriedade física/estrutural, é normal que a área elementar representativa (AER) para uma determinada propriedade seja diferente da AER de outra propriedade. Nesta perspectiva, dada as imagens obtidas pelo MEV, aquelas que apresentam muitas fibras são boas para avaliar a porosidade mas não o diâmetro das fibras, isto porque, geralmente ocorre sobreposição de fibras após segmentação da imagem. Por outro lado, as imagens que têm menos fibras apresentam uma resolução melhor e o diâmetro das fibras é avaliado com maior exatidão, ao contrário da porosidade. Assim, é fácil de entender que o AER para a porosidade será diferente do AER para o diâmetro das fibras.

1.8 Simulação computacional

No desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de fármacos em Química Medicinal, a otimização das propriedades estruturais é determinante para conseguir as funcionalidades pretendidas. Neste trabalho serão utilizadas ferramentas computacionais avançadas para otimizar propriedades de estruturas de nanomateriais 3D, tais como a porosidade e a espessura. Para se obter um modelo computacional realista é importante escolher os passos determinantes do processo e os parâmetros. As fibras são modeladas de acordo com as suas dimensões, flexibilidade e colapso. Os parâmetros de entrada são a relação comprimento/largura, espessura da parede, espessura do lúmen, flexibilidade das fibras e resolução (número de camadas na direção da espessura). Enchimento e purificação são parâmetros que também podem ser introduzidos. O espaço é descrito numa “grid” cartesiana uniforme de células (“voxels”), assim cada fibra no modelo é representada por uma sequência de células. A espessura da parede e do lúmen podem ser mudadas independentemente, o que permite a implementação de diferentes graus de colapso da fibra. As camadas poliméricas são formadas pela deposição de fibras únicas, uma de cada vez. Dependendo da sua posição, dimensão e flexibilidade, a fibra obedece à estrutura subjacente. As fibras são posicionadas aleatoriamente e orientadas no plano x-y para simular a formação de folhas isotrópicas produzidas no laboratório, usadas para validar o modelo. Para melhor simular o processo físico de fabrico de papel, a formação de um parâmetro de controlo é introduzido para modelar a floculação da fibra. O modelo de papel é desenvolvido e implementado usando MAT-LAB®.

A simulação computacional representada na figura 8 pode ser descrita da seguinte forma:

- Geração de uma fibra na direção do plano x-y;
- Regra de deposição de partículas de teste. Se a fibra não for aceite repete-se o processo de formação;
- Extração da parte de fora do plano da rede 3D onde ocorre o processo de flexão;
- Deposição da fibra de acordo com a flexibilidade e conformação desta para a superfície adjacente;
- Atualização da rede 3D.

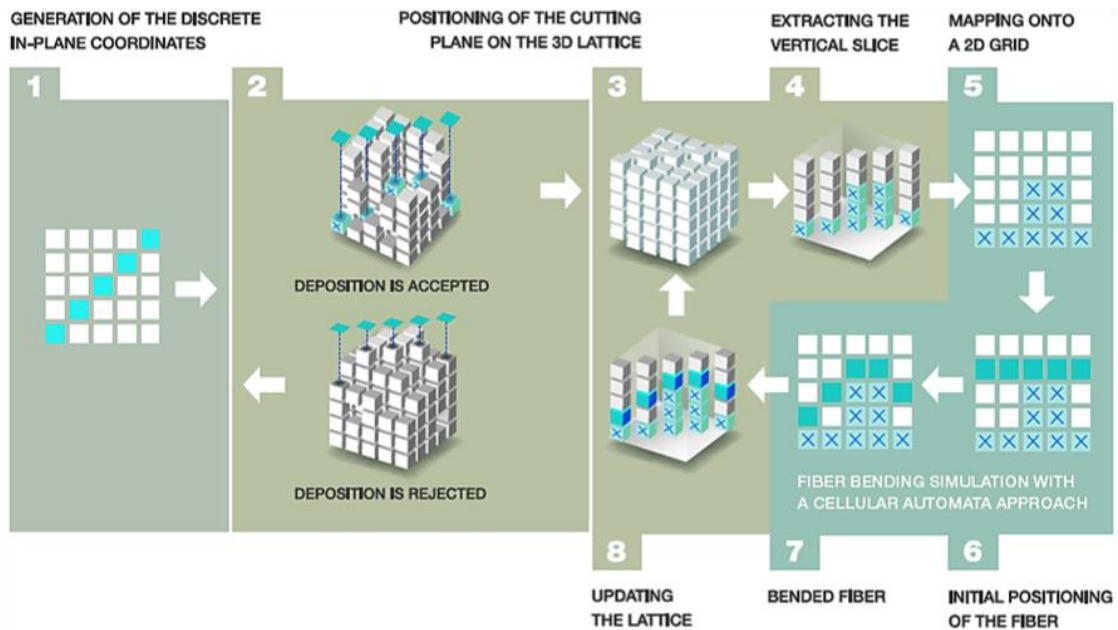


Figura 8 - Deposição das fibras por simulação computacional. Adaptado de (Curto *et al.*, 2011a).

Para se relacionar simulações com dados experimentais, a espessura das fibras computacionais necessitam ser definidas. Comparar a espessura aparente de camadas simuladas com dados experimentais é muito útil porque mimetiza a medida da espessura real. A flexibilidade das fibras tem crucial impacto na estrutura dos polímeros. Para estudar a influência do colapso das fibras na espessura do material polimérico final é implementado um design completo de experiências de simulação. Para cada espessura das paredes das fibras, diferentes dimensões do lúmen são testadas e as propriedades do polímero determinadas (Curto *et al.*, 2015b; Curto *et al.*, 2015c; Curto *et al.*, 2011a).

Este modelo computacional tem várias vantagens, desde já permite obter dados que refletem os dados experimentais/reais, bem como permite simular o sistema em causa em 3D, e possibilita poupar imenso tempo e recursos nas experiências. É muito importante conseguir simular computacionalmente em três dimensões (3D) e não em duas dimensões (2D), pois é nesta dimensão que se encontram as nossas moléculas terapêuticas. Representações bidimensionais de moléculas só ilustram átomos que estão ligados entre si, não mencionando os parâmetros estéricos e eletrônicos, assim como as posições dos átomos no espaço. Por outro lado as representações tridimensionais têm várias vantagens: as moléculas podem adotar mais de uma conformação de baixa energia; a função de uma macromolécula biológica está relacionada com a sua estrutura 3D; ajuda a compreender os processos biológicos a

nível atômico; estudar as interações entre proteínas e outras moléculas; auxilia no design molecular de inibidores específicos/ativadores candidatos a fármacos.

1.9 Objetivos

Tendo em consideração o que foi descrito anteriormente, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Produzir diferentes estruturas poliméricas porosas de celulose como potenciais sistemas de entrega de fármacos;
- Desenvolver uma metodologia de análise de imagem;
- Integrar os dados dos métodos de análise de imagem 2D provenientes do MEV com os dados das dimensões das fibras e da estrutura 3D do simulador computacional;
- Otimizar computacionalmente as propriedades estruturais de nanomateriais porosos utilizados no transporte de moléculas terapêuticas.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A pasta de celulose de fibra curta foi obtida a partir do *Eucalyptus globulus*, enquanto que a pasta de celulose de fibra longa foi obtida a partir de *Picea abies*. A poliacrilamida (PAM) $(C_3H_5NO)_n$ utilizada em materiais celulósicos foi cedida pela Ashland, enquanto que a carboximetilcelulose (CMC) $(C_8H_{15}O_8)_n$ foi adquirida a partir da Sigma-Aldrich (Alemanha), respetivamente. O PVA $(C_2H_4O)_n$ (PM = 44.05 g/mol) foi comprado à Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Uma representação 2D dos materiais poliméricos, bem como uma representação 3D dos respetivos monómeros estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Representação 2D e 3D do monómero dos materiais poliméricos.

Material	Representação 2D	Representação 3D do monómero
Celulose		
Poliacrilamida		
Carboximetilcelulose		
Álcool polivinílico		

2.2 Métodos

2.2.1 “Electrospinning”

Estruturas fibrosas de PVA foram produzidas na Universidade da Beira Interior, onde o “electrospinning” foi configurado horizontalmente. O “electrospinning” foi composto por uma fonte de tensão de alta potência, uma bomba de seringa, uma seringa com uma agulha de extremidade romba em aço inoxidável e uma placa de alumínio como colector (25 cm x 25 cm). A distância do colector foi mantida a 20 cm da agulha, a qual foi carregada até +30 kV e o caudal foi mantido a 60 ml/h.

2.2.2 Produção de estruturas fibrosas

2.2.2.1 Produção Global

Estruturas fibrosas de celulose de *Eucalyptus globulus* e *Picea abies* foram produzidas e prensadas de acordo com a norma ISO 5269/1. As estruturas foram formadas com um peso base de 60 e 120 g/m² e secas numa sala condicionada a 23°C e 50% de humidade relativa.

2.2.2.2 Tratamento mecânico

A pasta de celulose de fibra curta sofreu tratamento mecânico num moinho PFI a 0, 1000, 3000, 6000 e 9000 revoluções sob uma intensidade de refinação de 3,33 N/mm, enquanto a pasta de fibra longa foi refinada a 1000 e 9000 revoluções. PFI é um moinho de norma ISO que proporciona um tratamento mecânico à pasta de celulose definido de refinação.

2.2.2.3 Adição de agentes modificadores da pasta de celulose

As pastas de celulose de fibra curta refinadas a 1000 e 9000 revoluções foram combinadas com dois aditivos poliméricos: CMC e PAM. Soluções de 1 g/100 ml de cada aditivo foram preparadas e adicionadas a cada pasta selecionada, separadamente.

2.2.2.3 Formação de estruturas porosas com mistura de fibras

As pastas de celulose de fibra curta refinadas a 1000 e 9000 revoluções foram misturadas numa proporção de 20/80, 50/50 e 80/20. Paralelamente, pastas de celulose de fibra curta refinadas a 1000 e 9000 revoluções e modificadas foram misturadas numa proporção de 50/50 (sem mistura entre agentes de retenção).

2.2.3 Caracterização das estruturas fibrosas

2.2.3.1 Determinação da espessura

Os ensaios físicos foram realizados a fim de caracterizar as estruturas fibrosas celulósicas. A espessura destas estruturas foi medida de acordo com a norma ISO 534 e usando o programa de análise de imagem ImageJ.

2.2.3.2 Determinação do ângulo de contacto

O ângulo de contacto das fibras de celulose foi determinado usando o “software” SCA 20. Para cada amostra analisada foram depositadas gotas de água em diferentes locais da superfície. Os ângulos de contacto apresentados são a média de três medições.

2.2.3.3 Morfologia das fibras

As propriedades morfológicas das fibras foram determinadas com um programa de análise de fibras, MorFi[®], produzido pela Techpap, Grenoble, França. O equipamento integra uma câmara digital e um “software” de análise de imagens, para a medição automática de fibras em suspensão. Parâmetros como o comprimento da fibra, largura, grosseria, torção e curvatura foram analisados.

2.2.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia das matrizes fibrosas e os diâmetros correspondentes das fibras e dos poros foram investigados utilizando a MEV. As amostras foram cortadas e colocadas sobre um suporte de alumínio, utilizando uma fita adesiva de lado duplo. De seguida as amostras foram cobertas de ouro usando um Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, Reino Unido) e analisadas por meio de dois microscópios eletrónicos de

varrimento da Hitachi (Tóquio, Japão): modelos S3400N-II e S2700, ambos operando a +20 kV e em diferentes ampliações.

2.2.3.5 Análise de imagem

As imagens obtidas a partir do MEV foram processadas e analisadas utilizando o programa Esprit da Bruker e a ferramenta Diameterj do programa ImageJ. O comando Diameterj é uma ferramenta que segmenta automaticamente imagens em imagens binárias e é capaz de analisá-las, de encontrar o diâmetro de nanofibras ou microfibras em cada pixel ao longo de um eixo e, em seguida, produz um histograma destes diâmetros. Nos resultados estão incluídas estatísticas resumidas tais como o diâmetro médio das fibras e o diâmetro da fibra mais ocorrido (moda). DiameterJ também contém a função "Analisar Partículas" incluída no ImageJ/Fiji para analisar o espaço poroso e gerar estatísticas para os poros.

2.2.4 Simulação computacional

Foi realizada a simulação computacional dos materiais fibrosos experimentais para o desenvolvimento de nano estruturas poliméricas aplicadas em Química Medicinal. O modelo computacional foi desenvolvido e implementado usando MAT-LAB®.

2.2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada em Excel por cálculo de médias aritméticas, desvios-padrão e coeficientes de variação relacionados, bem como outros parâmetros tais como a porosidade e densidade. Por fim, foram construídos gráficos e histogramas relacionando os resultados.

Capítulo III

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização de estruturas fibrosas

3.1.1 Porosidade, espessura e densidade das estruturas fibrosas de celulose

As propriedades físicas, nomeadamente em termos de porosidade, espessura e densidade global de estruturas fibrosas de celulose foram determinadas por ensaios físicos.

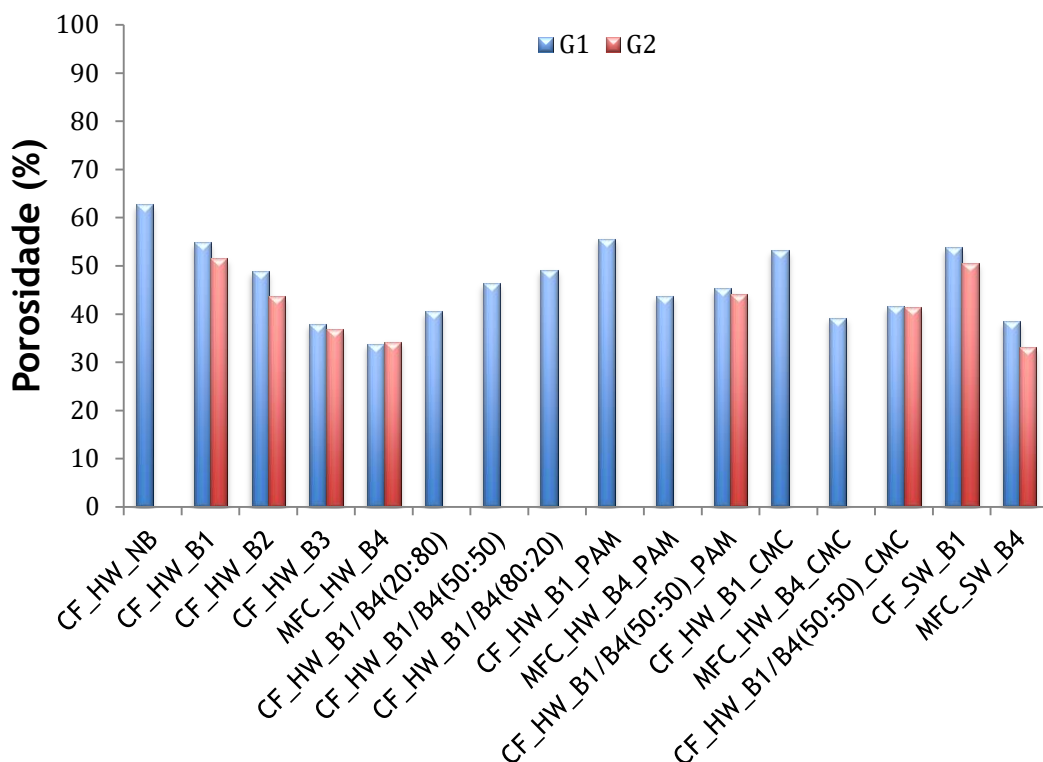


Figura 9 - Gráfico da porosidade das estruturas fibrosas de celulose com diferentes gramagens (G1=60 g/m²; G2=120 g/m²).

Tabela 4 - Caracterização física de estruturas fibrosas de celulose.

Amostras	Porosidade (%)	Espessura (μm)	Densidade (g/cm^3)
CF_HW_NB_G1	62.8	113.12	0.54
CF_HW_B1_G1	54.8	91.60	0.65
CF_HW_B1_G2	51.5	173.40	0.70
CF_HW_B2_G1	48.9	81.84	0.74
CF_HW_B2_G2	43.7	151.84	0.82
CF_HW_B3_G1	37.9	67.00	0.90
CF_HW_B3_G2	36.8	135.68	0.92
MFC_HW_B4_G1	33.8	67.04	0.96
MFC_HW_B4_G2	34.2	141.30	0.95
CF_HW_B1/B4(20:80)_G1	40.6	73.13	0.86
CF_HW_B1/B4(50:50)_G1	46.4	79.47	0.77
CF_HW_B1/B4(80:20)_G1	49.1	85.68	0.73
CF_HW_B1_PAM_G1	55.6	97.53	0.64
MFC_HW_B4_PAM_G1	43.8	80.60	0.81
CF_HW_B1/B4(50:50)_PAM_G1	45.4	79.00	0.79
CF_HW_B1/B4(50:50)_PAM_G2	44.1	158.30	0.81
CF_HW_B1_CMC_G1	53.2	88.87	0.67
MFC_HW_B4_CMC_G1	39.2	55.93	0.88
CF_HW_B1/B4(50:50)_CMC_G1	41.6	64.53	0.84
CF_HW_B1/B4(50:50)_CMC_G2	41.4	129.15	0.85
CF_SW_B1_G1	53.8	90.64	0.68
CF_SW_B1_G2	50.6	172.16	0.73
MFC_SW_B4_G1	38.4	69.56	0.91
MFC_SW_B4_G2	33.1	132.72	0.99

Como se pode observar pela tabela 4 e figura 9, aplicando diferentes metodologias às estruturas celulósicas consegue-se obter diversos sistemas com diferentes porosidades e espessuras, e por conseguinte, diferentes densidades.

Em relação aos tratamentos mecânicos aplicados, o aumento do número de revoluções na refinação dos materiais celulósicos leva à diminuição da porosidade total das estruturas. Quando as fibras de celulose passam de macro a microfibriladas, são geradas partículas mais pequenas, e estas quando se depositam para formar a estrutura final são capazes de ocupar os espaços das camadas adjacentes formando uma rede menos porosa. Este fenómeno resulta numa variação de porosidades entre os 33 e 63 %, dependendo do tipo de tratamento aplicado. Como consequência, à medida que se aumenta o tempo de refinação dos materiais, a espessura tem tendência a diminuir e a densidade a aumentar.

Quanto aos polímeros adicionados, observa-se que no caso das fibras refinadas a 1000 revoluções as estruturas não sofrem alterações significativas a nível de porosidade e espessura com a adição de um agente de retenção. Por outro lado, nas estruturas de celulose microfibrilada esta adição provoca modificações na porosidade e espessura, onde a adição do polímero PAM resulta na alteração da porosidade de 33.8 % para 43.8 %, ao passo que a espessura da estrutura global altera de 67.04 μm para 80.60 μm . Com a adição do polímero CMC a maior diferença revela-se na diminuição da espessura do sistema, que pode ser explicado pelo aumento da interligação dos compostos.

Relativamente às estruturas porosas produzidas com mistura de fibras, estas apresentam valores de porosidade e espessura intermédios em comparação às amostras sem mistura. Estes sistemas beneficiam da particularidade de apresentarem duas camadas de fibras distintas no mesmo sistema. Este atributo permite por exemplo que uma molécula se fixe melhor numa determinada zona da estrutura, ocorrendo uma maior taxa de libertação pela outra. Deste modo podem projetar-se materiais com estruturas inovadoras, que podem ser aplicadas para a incorporação, transporte e libertação de moléculas terapêuticas.

No que diz respeito ao tipo de fibra produzida, observa-se que os valores obtidos da porosidade, espessura e densidade das estruturas de fibra longa são idênticos aos da fibra curta. Apesar da similaridade de ambos os resultados, sabe-se que estes dois tipos de fibras apresentam diferenças morfológicas entre si como referido

anteriormente. Então, mesmo exibindo a mesma porosidade e espessura, a distribuição dos poros numa das estruturas é diferente da outra. Esta característica é relevante na seleção de um sistema de transporte de fármacos.

Todas estas estruturas produzidas com diferentes porosidades e espessuras formam um vasto leque de opções na escolha de um sistema, dependendo sempre do tipo de aplicação, tamanho da molécula a incorporar/transportar e da cinética de libertação que se pretende.

3.1.2 Desenvolvimento da metodologia de análise de imagem

A morfologia das estruturas fibrosas de celulose bem como da rede polimérica de PVA anteriormente preparada por “electrospinning”, foi observada e analisada através de imagens obtidas pelo MEV. A análise de imagens do MEV é um processo ambíguo que pode ser efetuado a partir do método manual, ou através de programas de análise de imagem capazes de desempenhar esta tarefa. Sendo o método manual um processo trabalhoso e que despense muito tempo para a obtenção de um número significativo de dados por imagem, o objetivo deste trabalho passa por desenvolver uma metodologia de análise de imagens para posterior integração com a simulação computacional 3D de nanomateriais poliméricos aplicados a “drug delivery systems”.

No presente trabalho discute-se o desempenho de duas técnicas de análise de imagem para o desenvolvimento da metodologia: a ferramenta DiameterJ, avaliada numa primeira fase com estruturas poliméricas sintéticas de PVA devido a formarem fibras e poros bem definidos; e numa segunda fase é avaliada com as estruturas poliméricas naturais de celulose obtidas. A segunda técnica consiste na análise das dimensões dos poros e da porosidade pelo programa Esprit, neste caso aplicada em imagens da espessura de estruturas fibrosas de celulose. Paralelamente foram realizadas medições manuais nas imagens analisadas pelos programas mencionados, de modo a validá-los.

3.1.2.1 Utilização de estruturas de PVA

Na figura 10a encontra-se uma imagem MEV da matriz polimérica de PVA no plano XY, onde se identificam as fibras depositadas e os poros formados bem definidos, demonstrando desta forma a enorme capacidade do “electrospinning” em formar redes poliméricas muito porosas. Na mesma figura apresenta-se um corte no eixo Z

da estrutura, que representa a sua espessura (Figura 10b), um parâmetro fundamental na caracterização da estrutura no espaço e na sua futura reconstrução em 3D. Na imagem é visível que o material tem diferentes níveis de organização, onde se observa duas zonas distintas: uma com maior liberdade espacial junto à folha de alumínio do colectador; ao passo que na outra as camadas mais superiores dispõem uma maior compactação das fibras depositadas. O valor medido para a espessura da rede polimérica deste polímero foi de aproximadamente 33 μm .

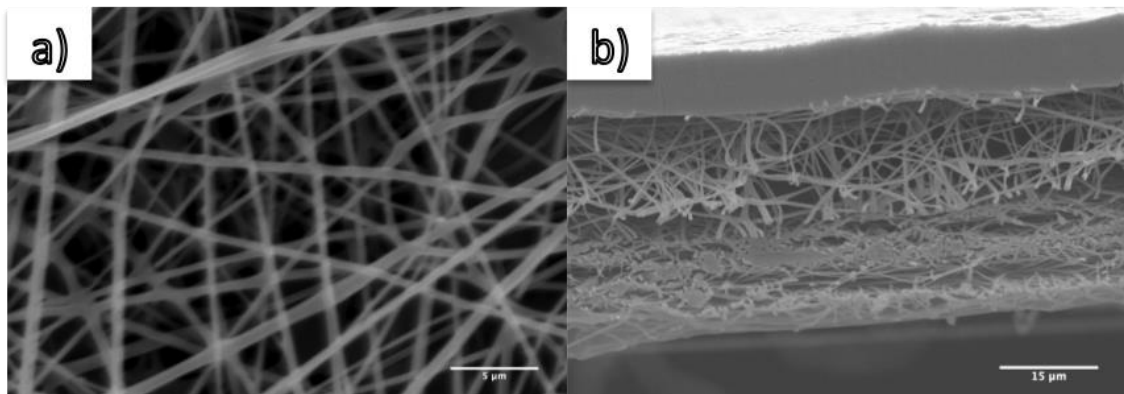


Figura 10 - Imagens do MEV da a) rede polimérica de PVA no plano XY (4000x); e da b) espessura da rede polimérica de PVA (1500x), formada por “electrospinning”.

De seguida, procedeu-se à análise das dimensões das estruturas fibrosas no plano XY com o auxílio da ferramenta DiameterJ do programa ImageJ. Após calibração da imagem, o passo seguinte a realizar no “software” é a segmentação da imagem. A segmentação é o processo de conversão da imagem numa representação binária, onde as fibras ficam definidas com a cor branca (primeiro plano) e os poros com a cor preta (segundo plano). A binarização é um parâmetro muito importante pois pode definir toda a análise, isto é, os melhores resultados são obtidos se o operador seleciona o algoritmo de segmentação que funciona melhor para os seus conjuntos de imagens. O DiameterJ contém algoritmos capazes de realizar este processo automaticamente, gerando 8 imagens diferentes por cada algoritmo (Hotaling *et al.*, 2015). A figura 11 representa uma comparação entre a imagem original e as diferentes metodologias de segmentação de uma estrutura porosa de PVA.

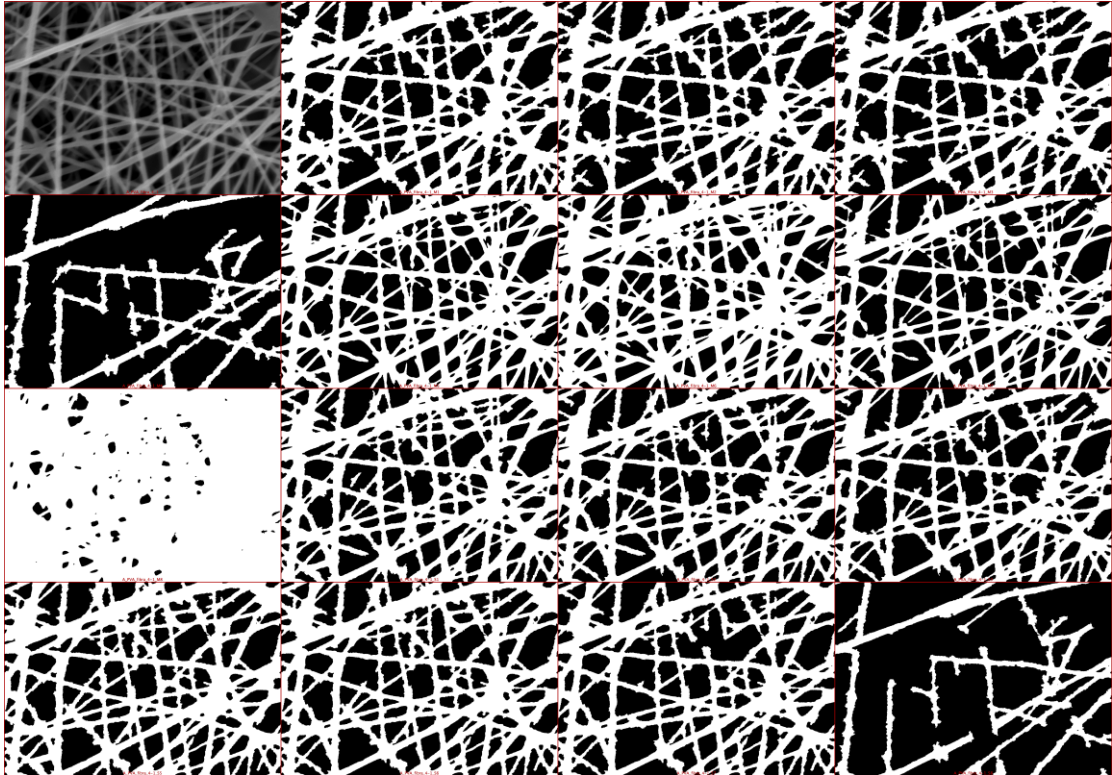


Figura 11 - Comparação entre a imagem original e as imagens segmentadas obtidas pelo DiameterJ de uma estrutura porosa de PVA.

De forma a seleccionar a melhor segmentação foi necessário ter em consideração em cada imagem segmentada as seguintes características chave:

- Não estarem presentes fibras parcialmente segmentadas;
- Não conterem manchas pretas (cavidades) nas interseções entre fibras;
- As fibras segmentadas serem representativas de fibras reais e não serem fundo/artefactos de imagem;
- As segmentações representarem de forma precisa o diâmetro real das fibras.

Note-se que no caso em que todos os aspetos acima são igualmente representados nas imagens segmentadas, escolhe-se a imagem com mais fibras. Assim, escolhe-se sempre a imagem com as fibras mais representativas não parciais.

Por vezes nenhum dos algoritmos padrão de segmentação fazem um trabalho adequado de segmentar uma imagem em primeiro plano/fundo. Isto pode ocorrer por uma variedade de razões e não significa que uma imagem não seja capaz de ser analisada pelo DiameterJ.

Os operadores têm três opções primárias se os algoritmos não segmentarem a imagem corretamente:

- Selecionar a imagem melhor segmentada com os algoritmos padrão e editar manualmente a imagem até que seja representativa da imagem original;
- Usar outro algoritmo de segmentação incluído no ImageJ, ou que possa ser encontrado na internet como um “plug-in” para ImageJ, e segmentar a imagem independentemente do DiameterJ;
- Desenvolver um novo método/algoritmo de segmentação.

Na figura 12 está representada uma montagem de imagens de análise produzidas pelo DiameterJ, onde se situa a imagem segmentada selecionada, uma linha central das fibras, a transformada de distância euclidiana das fibras com sobreposição da linha central a vermelho, e os poros analisados pelo DiameterJ a partir da imagem segmentada. Como se pode observar, as fibras que foram medidas, bem como as linhas centrais traçadas, correspondem à imagem original.

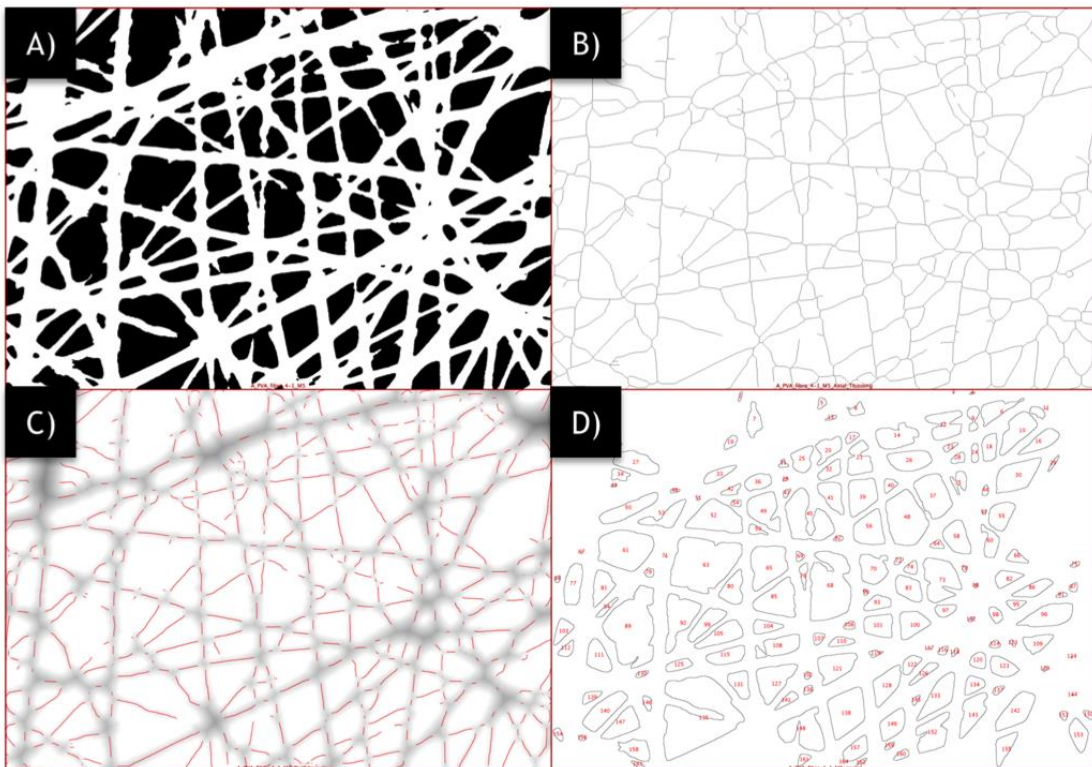


Figura 12 - Montagem de imagens de análise produzidas pelo DiameterJ. (A) Imagem de PVA segmentada. (B) Linha central das fibras. (C) Transformada de distância euclidiana das fibras com sobreposição da linha central a vermelho. (D) Poros analisados pelo DiameterJ na imagem segmentada.

A linha central vermelha (Figura 12c) representa o local nas fibras onde o DiameterJ fez as medições para obter os valores dos diâmetros das fibras. É relevante salientar que as interseções das fibras não têm nenhuma linha vermelha sobreposta sobre elas porque o DiameterJ não realiza medições em zonas onde as fibras se sobrepõem, devido às imprecisões nessas regiões. Além disso, nem todos os poros aparecem na imagem de análise dos poros porque o DiameterJ não analisa poros que estejam nos limites da imagem.

O valor do diâmetro médio das fibras de PVA obtido através da análise pelo DiameterJ, bem como, o valor médio obtido a partir de 20 medições manuais para o diâmetro das fibras estão apresentados na tabela 5. Quando se comparam ambos os valores, verifica-se que eles são muito semelhantes, sendo o coeficiente de variação calculado apenas de 0.1 %, aproximadamente. A maior diferença reside no número de medições efetuado pelos dois métodos, resultando num erro absoluto e relativo muito superior no caso do método manual quando comparado com o DiameterJ.

Tabela 5 - Comparação entre os valores do diâmetro médio das fibras de PVA obtidos através da análise pelo método manual e pelo DiameterJ.

	Diâmetro médio das fibras (nm)	Erro Absoluto (nm)	Erro Relativo (%)	Nº de medições
PVA - Método Manual	455±154	34.62	7.60	20
PVA - Diameterj	456±220	1.26	0.28	30497

Na figura 13 está representada a distribuição do diâmetro das fibras de PVA medidas obtido pelo DiameterJ. O valor do pico do histograma corresponde ao valor da moda, ou seja, o valor do diâmetro mais vezes medido pelo programa. Como se pode observar, as matrizes poliméricas de PVA são formadas por fibras com uma variedade de dimensões.

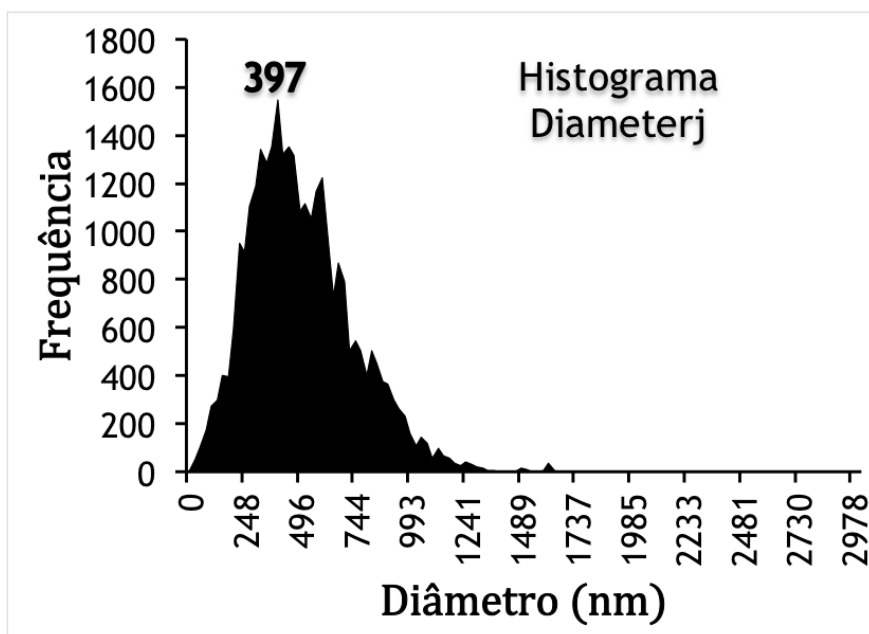


Figura 13 - Histograma do diâmetro das fibras obtido a partir do DiameterJ. Valor do pico (moda) indicado na figura.

A análise do tamanho dos poros pelo DiameterJ revelou que a estrutura de PVA apresenta uma porosidade superficial de 43.4 % (Tabela 6). O programa foi capaz de medir 164 poros cuja área média é de $1.41 \pm 1.91 \mu\text{m}^2$. Comparando o valor do diâmetro médio dos poros obtido pelo método manual ($1.54 \pm 0.81 \mu\text{m}$) com os resultados do DiameterJ, verifica-se que o valor da média do maior eixo ($1.51 \pm 0.99 \mu\text{m}$) é o mais semelhante.

Desta forma, confirma-se que o “plug-in” DiameterJ é um método válido para a análise de imagens de estruturas fibrosas sintéticas produzidas por “electrospinning”.

Tabela 6 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo DiameterJ.

	Média do maior eixo (μm)	Média do menor eixo (μm)	Área média dos poros (μm^2)	Porosidade (%)	Nº de poros
PVA - Diameterj	1.51 ± 0.99	0.83 ± 0.64	1.41 ± 1.91	43.4	164

3.1.2.2 Utilização de estruturas de celulose

Relativamente às estruturas fibrosas de celulose, foram obtidas imagens MEV no plano XY com ampliações de 300x e 100x, e no eixo Z com ampliações de 1000x, 300x e 100x. Na figura 14 é possível observar-se as diferentes superfícies possíveis de obter (face rugosa e lisa), devido ao processo de secagem seguido. Quanto ao tipo de fibra produzida, distingue-se facilmente a morfologia das fibras curtas em relação às longas, tendo estas maior comprimento e largura. Denota-se também que a porosidade superficial das estruturas de fibra longa aparenta ser menor do que as de fibra curta.

Focando nas imagens de fibra curta, é notório as fibrilas presentes nas estruturas, principalmente na face rugosa, resultantes do tratamento mecânico aplicado. Por outro lado, nas estruturas com mistura de fibras ilustradas é visível em ambas as faces, sobretudo na face lisa, a presença dos aditivos químicos. De igual modo também se observa a formação de aglomerados entre as fibras, resultantes dos agentes de retenção, sendo este um fator relevante na porosidade das matrizes.

Quanto à análise de imagem pelo DiameterJ, inicialmente foram utilizadas imagens MEV com ampliação de 300x do plano XY das estruturas. Na figura 15 estão representados exemplos de segmentações efetuadas pelo programa nas amostras. É importante referir que algumas imagens tiveram de ser tratadas previamente, quer por ajuste de contraste, inversão de cores ou por uma segmentação manual, de modo a aperfeiçoar a análise do DiameterJ. No entanto, observa-se que as imagens com ampliação de 300x das estruturas de celulose não são as mais indicadas para se realizar a análise devido à má segmentação. Como se pode verificar pela figura 15, as estruturas exibem uma grande densidade de fibras, resultando em imagens que não apresentam as características chave de uma boa segmentação anteriormente mencionadas, o que prejudica a análise do DiameterJ. Isto acontece porque os algoritmos aplicados não são suficientemente bons para avaliar estruturas fibrosas naturais, logo os resultados obtidos não são de confiança. Outro fator que teve influência foi a preparação das amostras para o MEV. Dado que a distribuição do revestimento em ouro não é uniforme em toda a amostra, e sendo a segmentação um processo dependente do contraste/coloração dos elementos presentes na imagem, o “software” em muitos casos não é capaz de diferenciar as fibras dos poros.

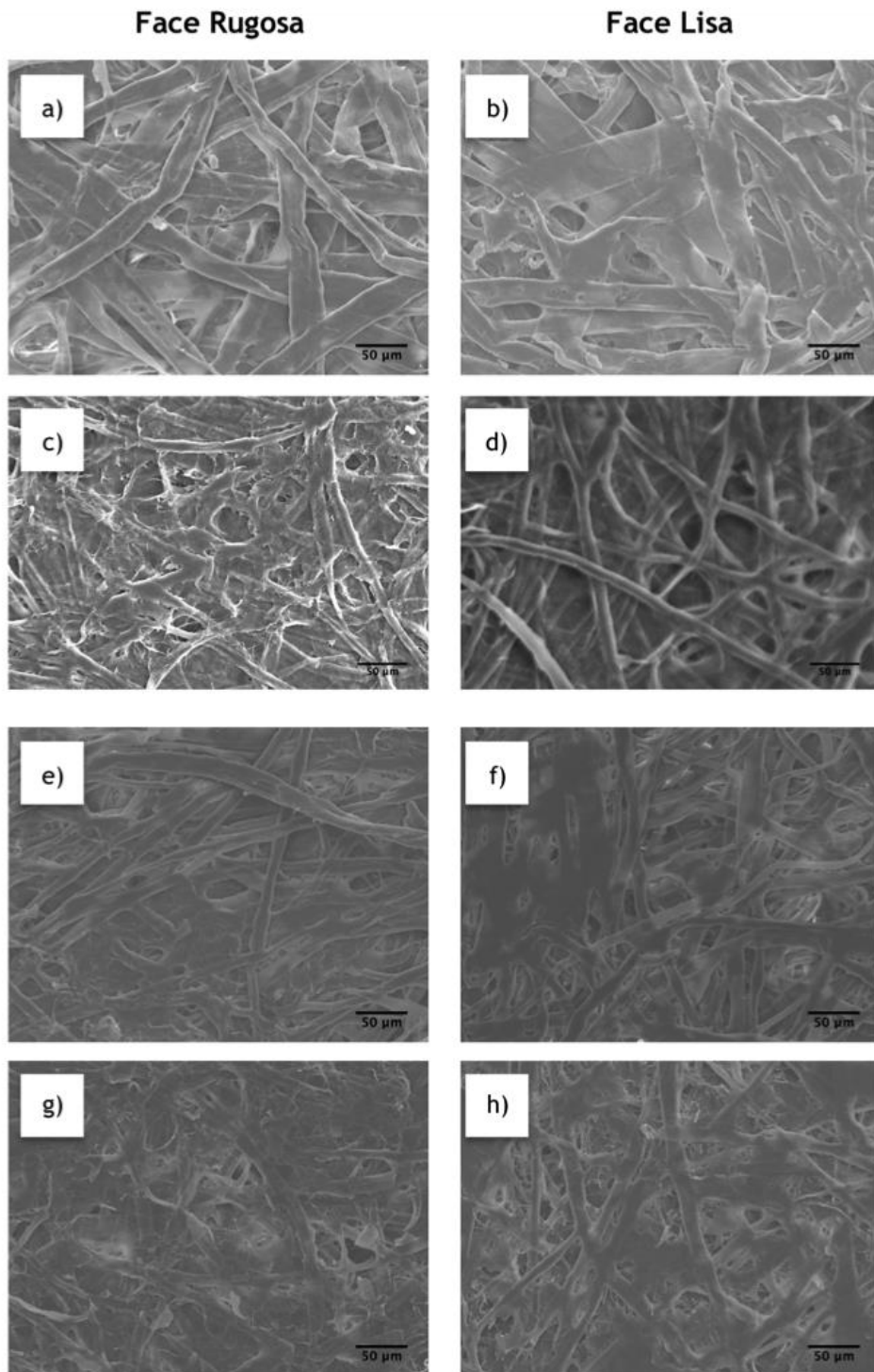


Figura 14 - Imagens do MEV das amostras a) CF_SW_B1_G1 (face rugosa); b) CF_SW_B1_G1 (face lisa); c) MFC_HW_B4_G1 (face rugosa); d) MFC_HW_B4_G1 (face lisa); e) CF_HW_B1/B4_PAM_G2 (face rugosa); f) CF_HW_B1/B4_PAM_G2 (face lisa); g) CF_HW_B1/B4_CMC_G2 (face rugosa) e h) CF_HW_B1/B4_CMC_G2 (face lisa). Ampliação de 300x.

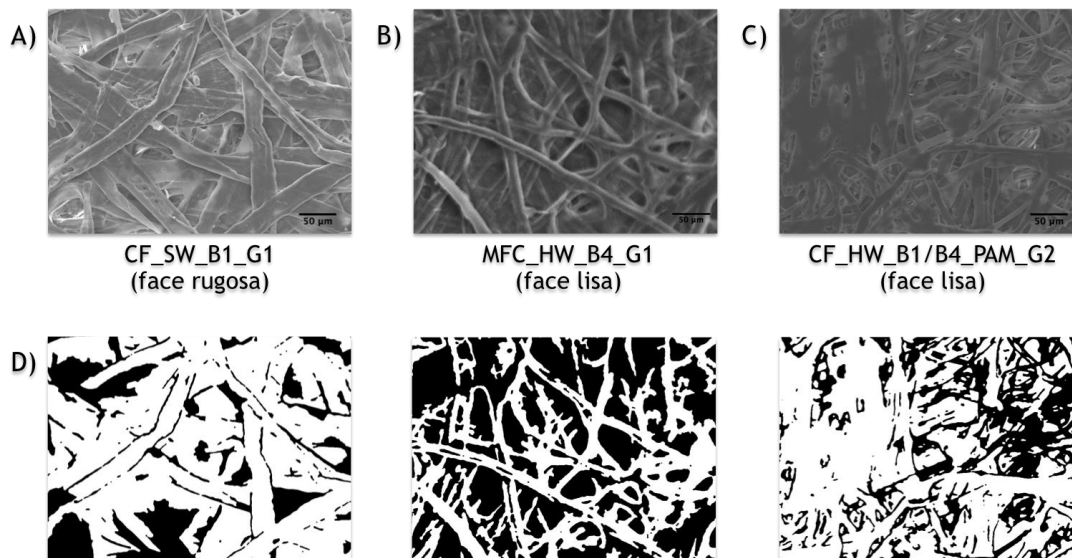


Figura 15 - Imagens do MEV das amostras (A) CF_SW_B1_G1 (face rugosa); (B) MFC_HW_B4_G1 (face lisa); (C) CF_HW_B1/B4_PAM_G2 (face lisa). (D) Segmentações das imagens em (A), (B) e (C). Ampliação de 300x.

Posto isto, procedeu-se à análise de imagens MEV das mesmas amostras mas com ampliação de 100x (Figura 16). Neste caso obteve-se melhores segmentações do que no processo anterior, no entanto, identificam-se igualmente zonas (principalmente nas extremidades das imagens) em que o programa define aglomerados fibrosos como sendo poros, apresenta fibras parcialmente segmentadas e/ou cavidades nas interseções entre fibras.

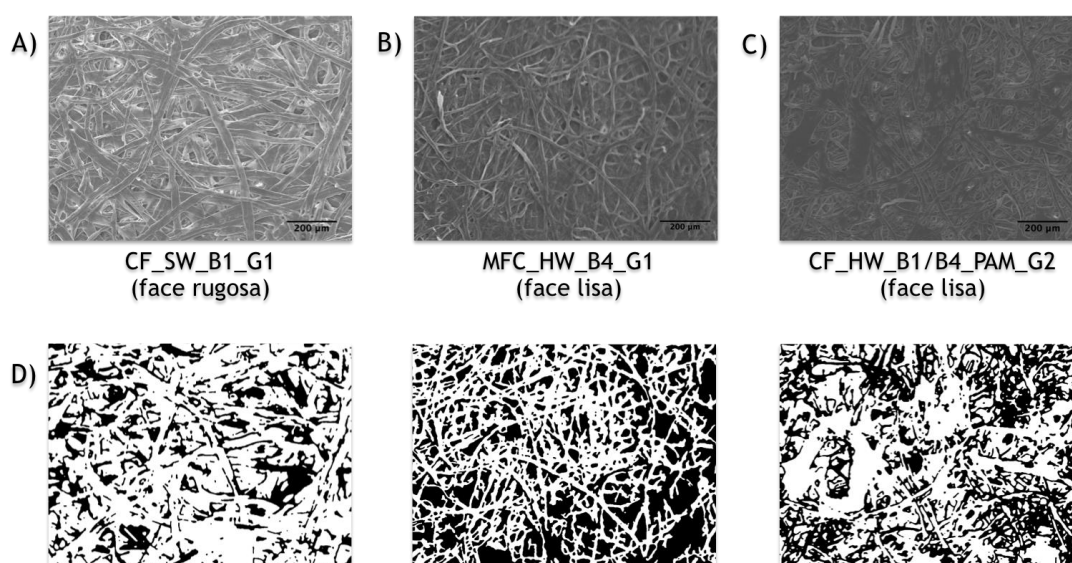


Figura 16 - Imagens do MEV das amostras (A) CF_SW_B1_G1 (face rugosa); (B) MFC_HW_B4_G1 (face lisa); (C) CF_HW_B1/B4_PAM_G2 (face lisa). (D) Segmentações das imagens em (A), (B) e (C). Ampliação de 100x.

De maneira a contornar estes obstáculos, foi selecionada uma fração em cada imagem que possuísse uma AER tanto a nível das dimensões das fibras como dos poros, e que rejeitasse zonas mal segmentadas ou sem interesse (exemplo demonstrado na figura 17). Deste modo, todas as medições manuais foram efetuadas na fração elementar representativa de forma a validar o método.

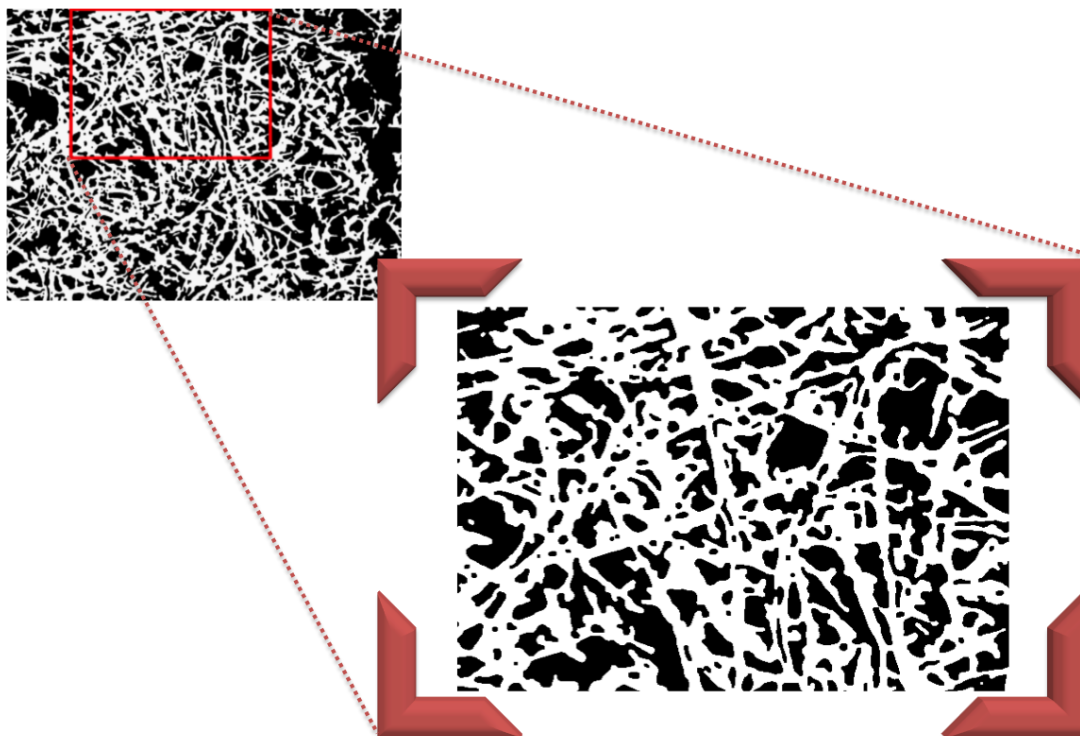


Figura 17 - Fração elementar representativa da imagem segmentada da amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa).

Nas tabelas 7 e 8 encontram-se os valores do diâmetro médio das fibras das amostras obtidos através do DiameterJ e do método manual, bem como os desvios padrão, erros absolutos e relativos. Como se pode observar, os valores do diâmetro médio das fibras longas é superior ao das fibras curtas. Por sua vez, os diâmetros médios das fibras das estruturas com mistura também são maiores relativamente à estrutura de celulose microfibrilada devido há existência de fibras com diferentes refinações na mesma matriz. Quando se compara as duas faces de cada amostra igualmente se observa diferenças, apesar de não serem significativas. No entanto, denota-se que nas estruturas celulósicas de fibra longa e fibra curta microfibrilada a face lisa apresenta valores maiores, possivelmente devido à pressão sofrida durante a secagem. É ainda de salientar os valores dos desvios padrão, que em conjunto com a

figura 14, demonstram a diversidade na distribuição dos diâmetros das fibras, assim como a heterogeneidade das estruturas poliméricas produzidas.

Tabela 7 - Diâmetro médio, desvio padrão, erros associados e nº de medições das fibras das estruturas de celulose com tratamento mecânico e com aditivos químicos, obtidos através do DiameterJ.

	Face	Diâmetro médio das fibras (μm)	Erro Absoluto (μm)	Erro Relativo (%)	Nº de medições
CF_SW_B1_G1	R*	14.3±7.7	0.11	0.80	4547
	L**	15.7±7.8	0.13	0.82	3592
MFC_HW_B4_G1	R	8.8±3.5	0.04	0.42	8542
	L	9.8±4.0	0.05	0.47	7483
CF_HW_B1/B4_PAM_G2	R	10.7±4.9	0.07	0.62	5453
	L	10.3±4.3	0.06	0.55	5789
CF_HW_B1/B4_CMC_G2	R	10.4±4.7	0.06	0.61	5537
	L	11.6±4.9	0.07	0.57	5316

*R=face rugosa; **L=face lisa

Tabela 8 - Diâmetro médio, desvio padrão e erros associados das fibras das estruturas de celulose com tratamento mecânico e com aditivos químicos, obtidos através do método manual.

	Face	Diâmetro médio das fibras (μm)	Erro Absoluto (μm)	Erro Relativo (%)
CF_SW_B1_G1	R*	20.4±11.5	2.57	12.61
	L**	21.5±11.6	2.60	12.11
MFC_HW_B4_G1	R	9.1±3.3	0.74	8.16
	L	9.6±3.9	0.86	9.00
CF_HW_B1/B4_PAM_G2	R	11.5±4.8	1.07	9.33
	L	11.2±5.2	1.17	10.39
CF_HW_B1/B4_CMC_G2	R	10.8±4.2	0.94	8.68
	L	10.6±4.0	0.89	8.42

*R=face rugosa; **L=face lisa

Comparando os valores obtidos por ambos os métodos, verifica-se que eles são muito semelhantes entre si (Figura 18), sendo que a maior diferença reside no número de medições efetuado pelos dois métodos, resultando num erro absoluto e relativo muito superior no caso do método manual. Os grandes conjuntos de dados obtidos pelo DiameterJ habilita a criação de um histograma com a distribuição dos diâmetros

de fibra, bem como um ajuste do pico do gráfico, proporcionando uma melhor confiança nas medições do diâmetro da fibra (Figura 19).

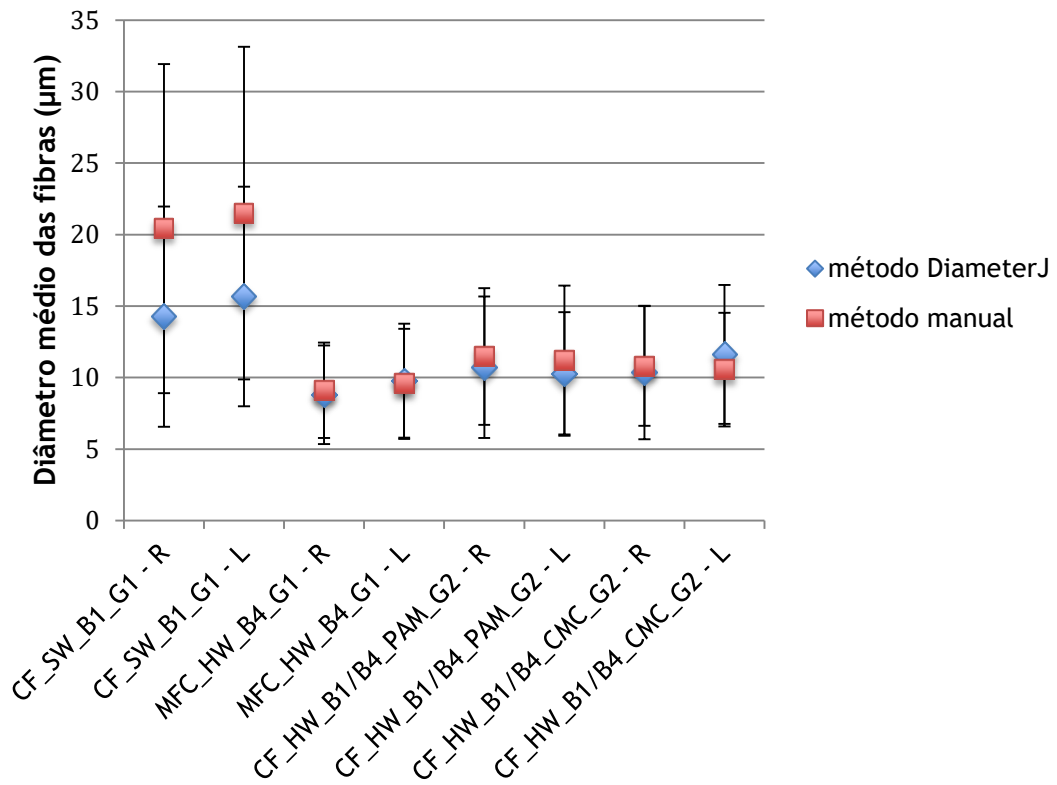


Figura 18 - Gráfico dos diâmetros médios das fibras com respectivo desvio padrão, obtidos através do DiameterJ e do método manual.

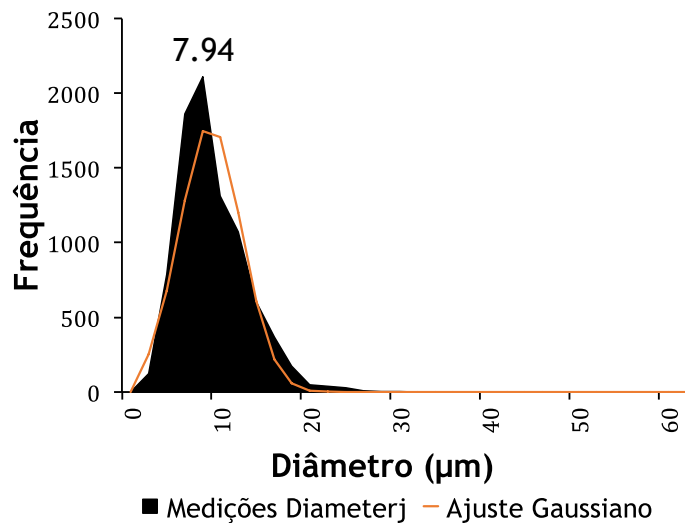


Figura 19 - Histograma do diâmetro das fibras e seu respectivo ajuste Gaussiano, obtido a partir do DiameterJ relativamente à amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa). Valor do pico (moda) indicado na figura.

Relativamente à análise dos poros, na tabela 9 estão inseridos os resultados do tamanho dos poros obtidos através do DiameterJ, enquanto que na tabela 10 encontram-se os valores do diâmetro médio dos poros, com respetivos desvios padrão, erros absolutos e relativos, referentes às amostras. Analisando os valores das estruturas celulósicas de fibra curta, observa-se que apesar das estruturas com mistura de fibras serem diferentes da estrutura microfibrilada, os valores do diâmetro médio dos poros não é significativamente diferente. Por outro lado, as matrizes de fibra longa apresentam valores superiores ainda que apresentem um porosidade superficial menor.

Quando se comparam os resultados obtidos pelos 2 métodos verifica-se que o DiameterJ fornece um maior número de dados, incluindo valores de porosidade e área média dos poros, que pelo método manual seriam parâmetros trabalhosos de se obter. Por outro lado, esta ferramenta é capaz de realizar um número muito maior de medições num curto espaço de tempo. Na figura 20 está ilustrado um exemplo de uma análise de poros efetuada pelo DiameterJ, sendo possível observar-se a azul quais os poros analisados. Comparando os valores dos diâmetros médios dos poros obtidos pelo método manual com os resultados do DiameterJ verifica-se que os valores da média do maior eixo são os mais semelhantes.

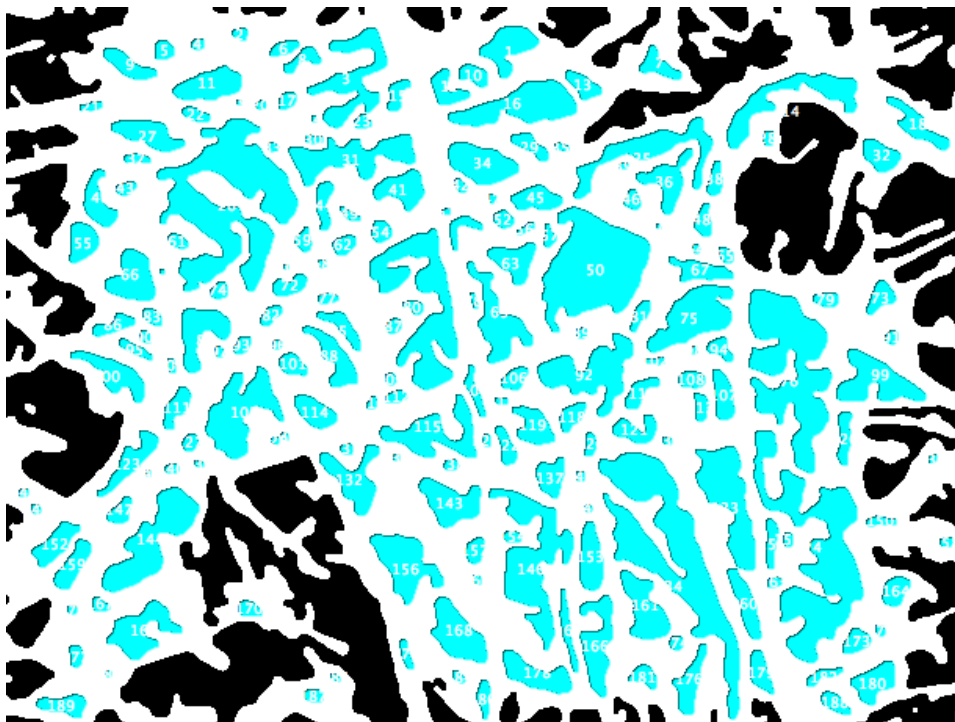


Figura 20 - Poros analisados (a azul) da amostra MFC_HW_B4_G1 (face lisa) através do DiameterJ.

Tabela 9 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo DiameterJ.

	Face	Média do maior eixo (µm)	Média do menor eixo (µm)	Área média dos poros (µm ²)	Porosidade (%)	Nº de poros
CF_SW_B1_G1	R*	31.7±29.6	14.0±14.9	608.7±1205.0	27.6	78
	L**	25.9±27.1	12.0±16.0	549.8±1978.4	20.1	84
MFC_HW_B4_G1	R	26.1±22.0	12.6±9.4	389.4±688.3	43.9	185
	L	29.2±25.7	14.0±10.4	494.0±843.6	37.7	171
CF_HW_B1/B4_PAM_G2	R	23.9±25.5	10.4±9.1	332.6±627.3	36.8	56
	L	26.8±25.1	14.0±14.2	539.5±1215.6	38.8	59
CF_HW_B1/B4_CMC_G2	R	23.5±20.7	13.0±10.2	378.7±725.3	32.1	66
	L	25.8±27.7	12.3±12.0	478.5±1670.3	31.5	69

*R=face rugosa; **L=face lisa

Tabela 10 - Diâmetro médio dos poros, desvio padrão e erros associados das estruturas fibrosas de celulose com tratamento mecânico e com aditivos químicos, obtidos através do método manual.

	Face	Diâmetro médio dos poros (µm)	Erro Absoluto (µm)	Erro Relativo (%)
CF_SW_B1_G1	R*	29.4±15.7	3.51	11.98
	L**	29.0±18.5	4.15	14.30
MFC_HW_B4_G1	R	24.9±20.0	4.47	17.92
	L	26.2±16.7	3.73	14.21
CF_HW_B1/B4_PAM_G2	R	25.6±16.0	3.58	14.00
	L	25.1±17.5	3.92	15.61
CF_HW_B1/B4_CMC_G2	R	23.6±22.5	5.04	21.36
	L	26.0±17.0	3.80	14.61

*R=face rugosa; **L=face lisa

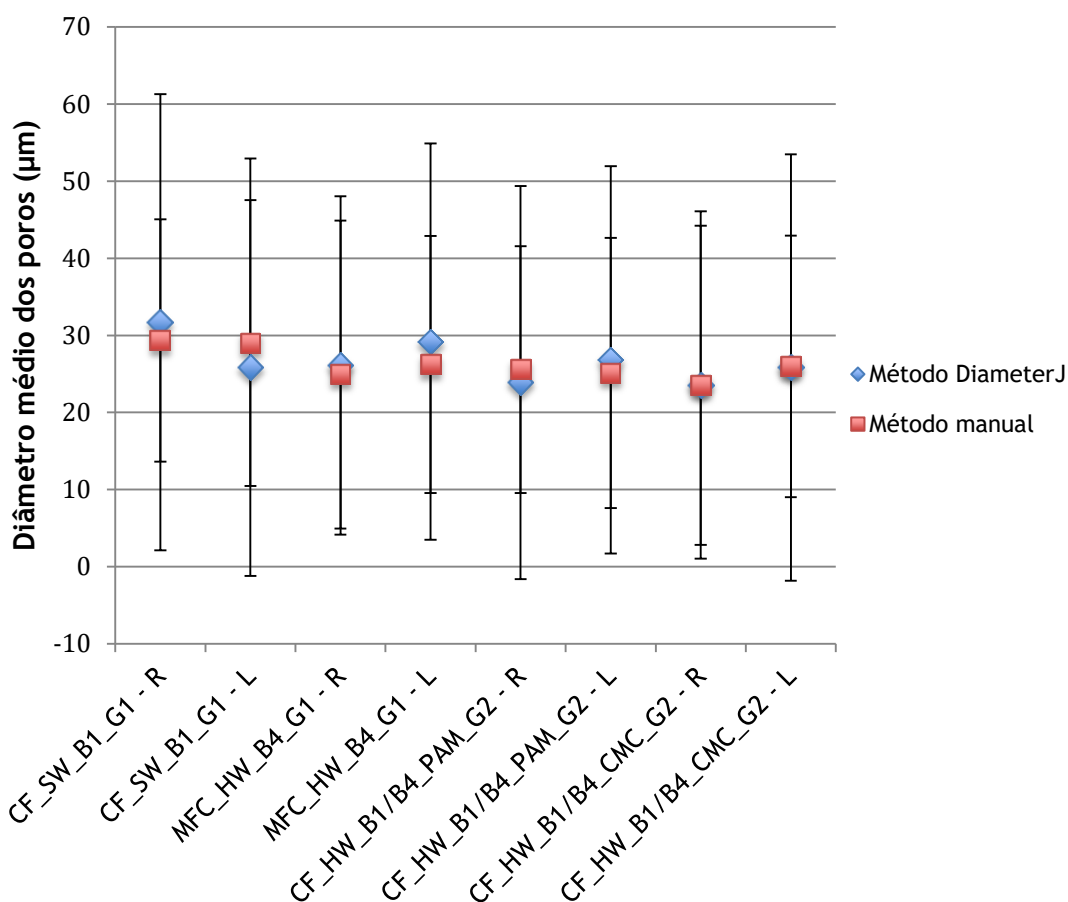


Figura 21 - Gráfico dos diâmetros médios dos poros com respetivo desvio padrão, obtidos através do DiameterJ e do método manual.

Na figura 21 está representado um gráfico com os valores do diâmetro médio dos poros mais semelhantes entre os métodos do DiameterJ e manual, pelo qual se confirma que os valores estão no mesmo intervalo, o que deste modo valida a utilização desta ferramenta. Novamente demonstra-se a heterogeneidade das redes poliméricas a partir do elevado desvio padrão, devido à presença de numerosos poros profundos em contraste com os poros de maiores dimensões situados à superfície.

Tal como no caso das matrizes poliméricas de PVA, igualmente se obteve imagens MEV da espessura das estruturas celulósicas a partir de um corte no eixo Z (Figura 22). No caso da celulose microfibrilada (Figura 22a), esta estrutura tem cerca de 39 a 56 µm e a estrutura com mistura de fibras (Figura 22b) tem cerca de 156 a 185 µm de espessura. Na figura 22b é notória a presença de duas camadas distintas. A camada mais compacta diz respeito à celulose microfibrilada, enquanto que a outra camada é referente à celulose refinada a 1000 revoluções.

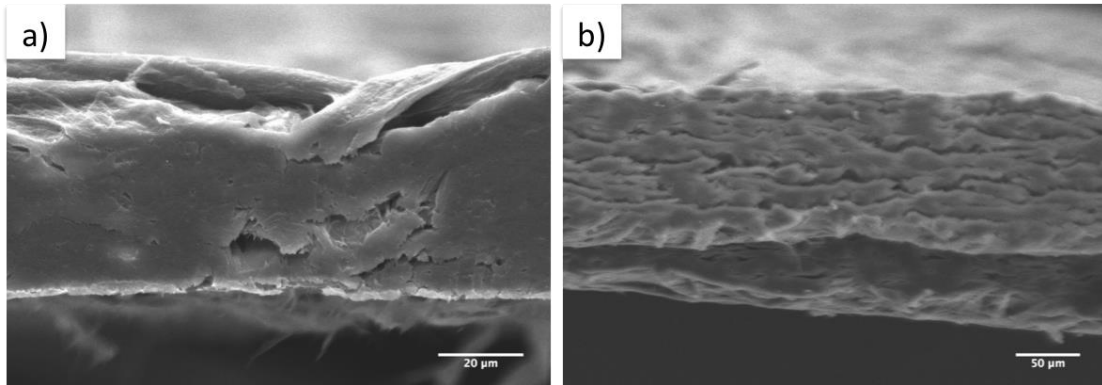


Figura 22 - Imagens do MEV da a) espessura da estrutura de celulose microfibrilada no eixo Z (1000x); e da b) espessura da estrutura compósita CF_HW_B1/B4_CMC_G2 no eixo Z (300x).

A análise destas estruturas poliméricas tem o intuito de obter dados numéricos sobre o tamanho dos poros para posterior comparação dos métodos de análise de imagem, tendo como objetivo final a reconstrução 3D virtual destas matrizes no simulador computacional desenvolvido e implementado. Neste contexto, a imagem do MEV representada na figura 22a foi submetida a análise através do programa DiameterJ e de seguida no programa Esprit.

Imagem MEV

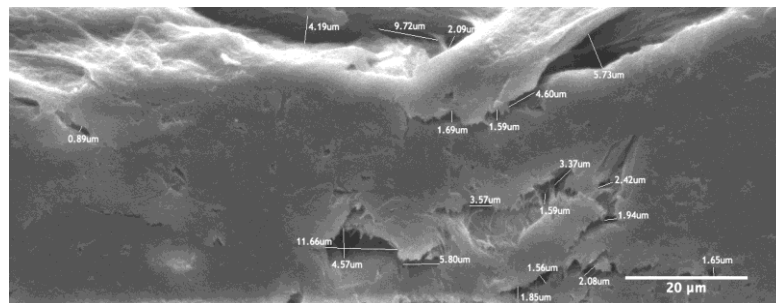


Imagem Segmentada



Figura 23 - Representação esquemática da segmentação de uma imagem do MEV da amostra MFC_HW_B4_G1 (plano Z) através do DiameterJ.

Na figura 23 está representado um esquema da segmentação da imagem do MEV da amostra MFC_HW_B4_G1 (plano Z) através do DiameterJ. É possível observar-se que os poros principais da estrutura foram identificados pelo programa, permitindo que a imagem siga para análise. Os valores do diâmetro médio dos poros, bem como o número de medições e os erros absoluto e relativo associados, apresentam-se na tabela 12.

Posteriormente à análise do DiameterJ, a mesma imagem (Figura 22a) foi analisada no programa Esprit. Na figura 24 observa-se a segmentação manual aplicada à amostra, enquanto que na figura 25 está exibida uma imagem final da análise, onde estão identificados os poros analisados pelo “software”. Verifica-se que os poros analisados pelo programa Esprit são praticamente os mesmos que foram observados na análise pelo DiameterJ.

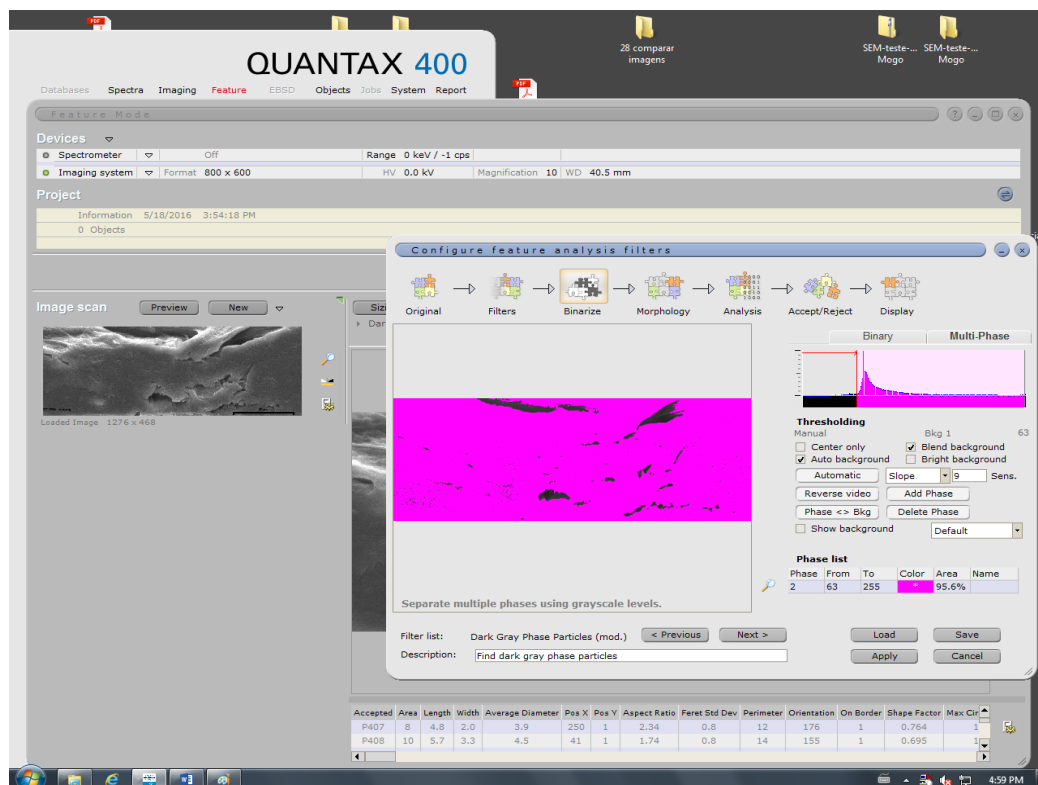


Figura 24 - Representação da segmentação manual de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), realizada através do programam Esprit.

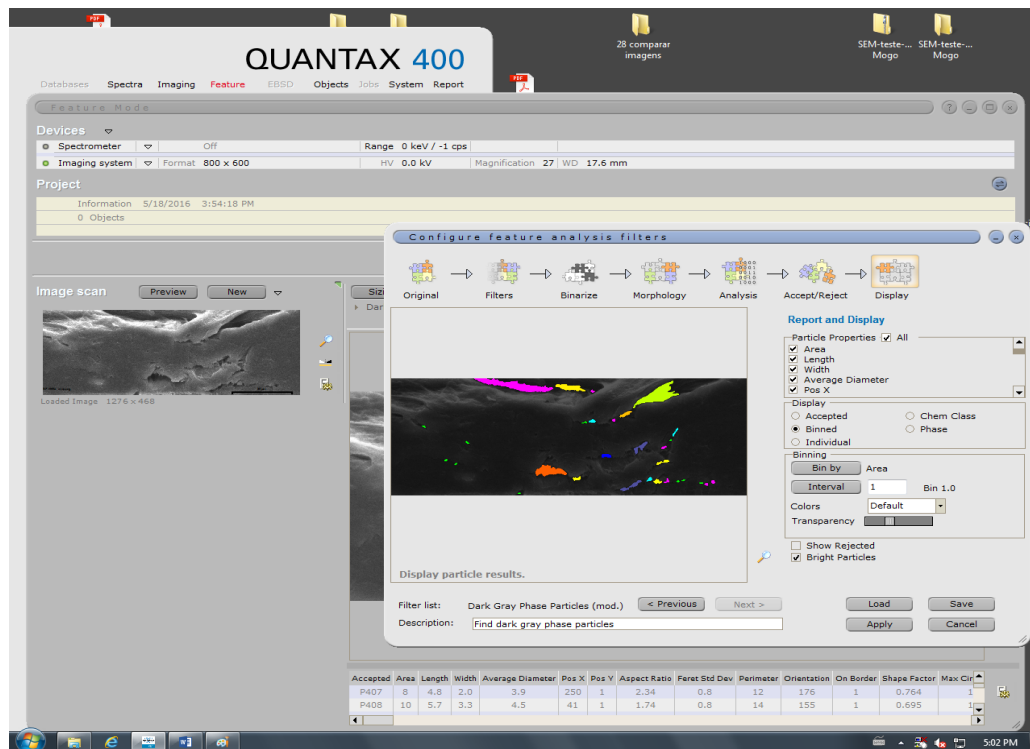


Figura 25 - Representação dos poros analisados de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), através do program Esprit.

Existem uma série de diâmetros de poros que podem ser obtidos através do programa Esprit, entre eles salientam-se o comprimento (a maior distância), largura (a distância mais estreita), diâmetro médio, o diâmetro equivalente (o diâmetro equivalente supondo que o poro é circular), a projeção ao longo do eixo do X e a projeção ao longo do eixo do Y. A tabela 11 apresenta os resultados obtidos para as diferentes medições realizadas pelo Esprit.

Tabela 11 - Resultados do tamanho dos poros obtidos através da análise pelo Esprit.

	Comprimento	Largura	Diâmetro médio	Projeção no X	Projeção no Y	Diâmetro Equivalente
Média do diâmetro (μm)	4.60	1.64	3.40	4.39	2.65	2.31
Desvio padrão (μm)	5.98	1.27	4.02	6.11	2.72	2.13
Erro absoluto (μm)	1.09	0.23	0.73	1.12	0.50	0.39
Erro relativo (%)	23.73	14.14	21.59	25.41	18.74	16.83
Nº de poros	30	30	30	30	30	30

Adicionalmente, o programa Esprit permite relacionar diversas características e morfologias dos poros, através da obtenção de histogramas e de gráficos binários e/ou ternários (Figura 26). Esta análise possibilita o estudo do comportamento de certas propriedades, assim como, agrupar os poros em categorias conforme as suas dimensões, e fazer uma comparação com os resultados das simulações.

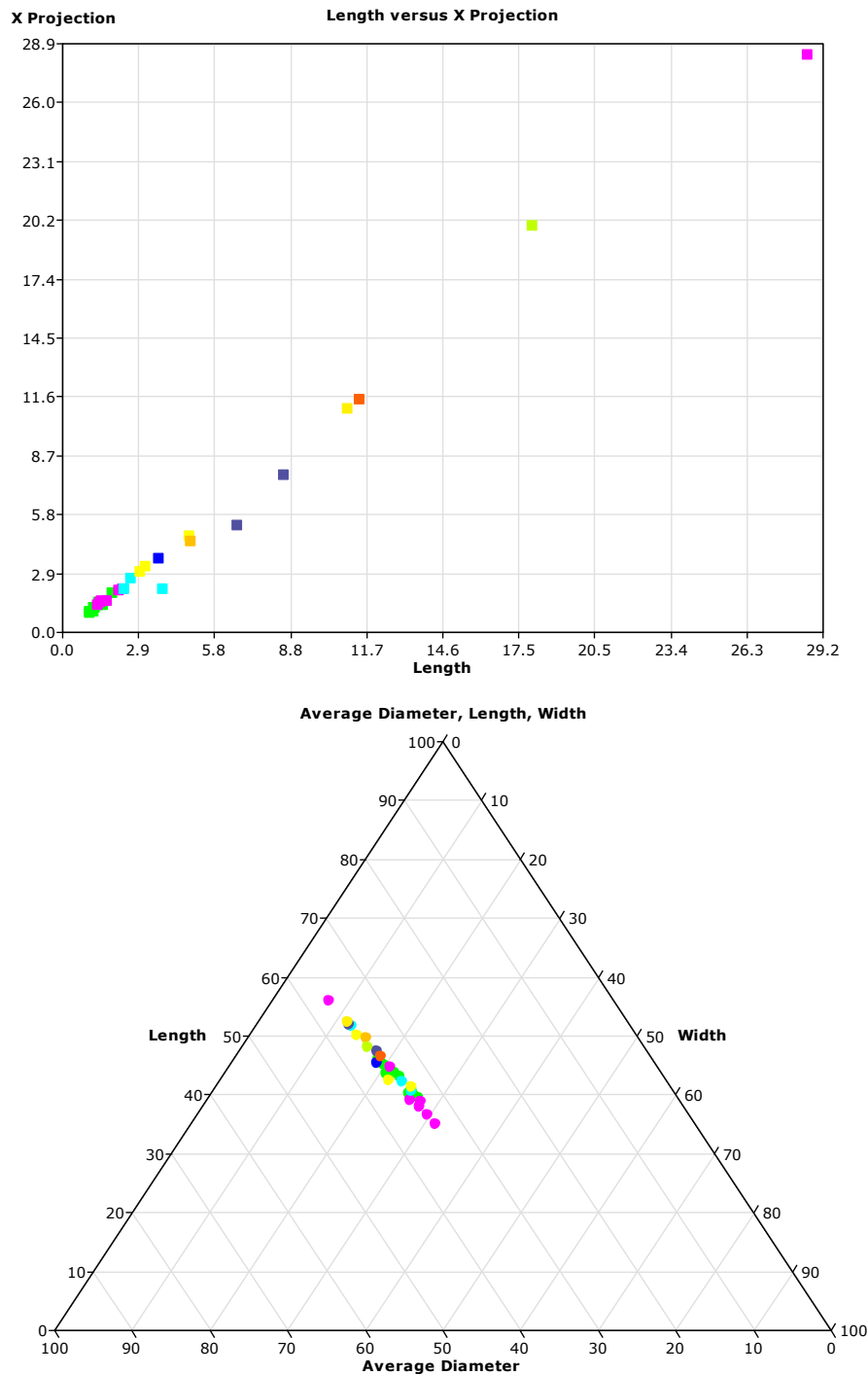


Figura 26 - Gráficos binário e ternário de dimensões dos poros de uma amostra de celulose microfibrilada (plano Z), realizada através do programam Esprit. A) Comprimento versus projeção no X. B) Diâmetro médio versus comprimento versus largura.

Em relação às medições manuais, o diâmetro médio dos poros obtido a partir de 20 medições foi de $3.6 \pm 2.8 \mu\text{m}$. Comparando este resultado com os obtidos pelo DiameterJ verifica-se que o valor mais próximo é o da média do maior eixo ($2.9 \pm 3.1 \mu\text{m}$). Por outro lado, quando se compara com os resultados obtidos pelo programa Esprit, observa-se que o valor do diâmetro médio é o mais semelhante. Um resumo desta comparação está representado na tabela 12 e figura 27. Através destes dados confere-se que os valores dos diâmetros dos poros obtidos pelos diferentes métodos são idênticos, validando desta forma o modelo. Além disso, é importante referir que a porosidade superficial obtida, bem como o número de poros analisados pelas duas técnicas de análise de imagem são muito semelhantes.

Tabela 12 - Comparação entre os valores do diâmetro médio dos poros de celulose microfibrilada (plano Z) obtidos através da análise pelo DiameterJ, Esprit e método manual.

Método	Diâmetro médio dos poros (μm)	Erro Absoluto (μm)	Erro Relativo (%)	Nº de medições	Porosidade (%)
DiameterJ	2.9 ± 3.1	0.52	17.78	35	3.78
Esprit	3.4 ± 4.0	0.73	21.59	30	3.80
Manual	3.6 ± 2.8	0.63	17.49	20	-

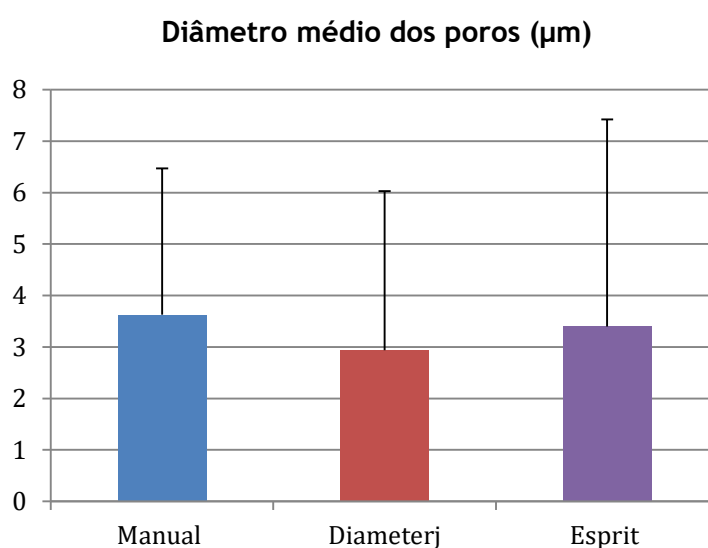


Figura 27 - Diâmetro médio dos poros para diferentes metodologias. A média e o desvio padrão em μm são apresentados nas barras.

3.1.3 Morfologia das fibras: Morfi

As principais propriedades morfológicas das fibras foram também determinadas automaticamente através da análise no Morfi. Os resultados obtidos para uma amostra de CMF estão apresentados na figura 28, nos quais se destacam o valor do diâmetro médio (19.7 μm) e do comprimento médio das fibras (625 μm). Todos os dados obtidos podem ser usados como parâmetros de entrada para formar a estrutura de celulose 3D no simulador computacional. Através da figura 28 observa-se que o programa é capaz de analisar um grande número de fibras, de organizar os dados e gerar gráficos representativos da distribuição das dimensões das fibras.

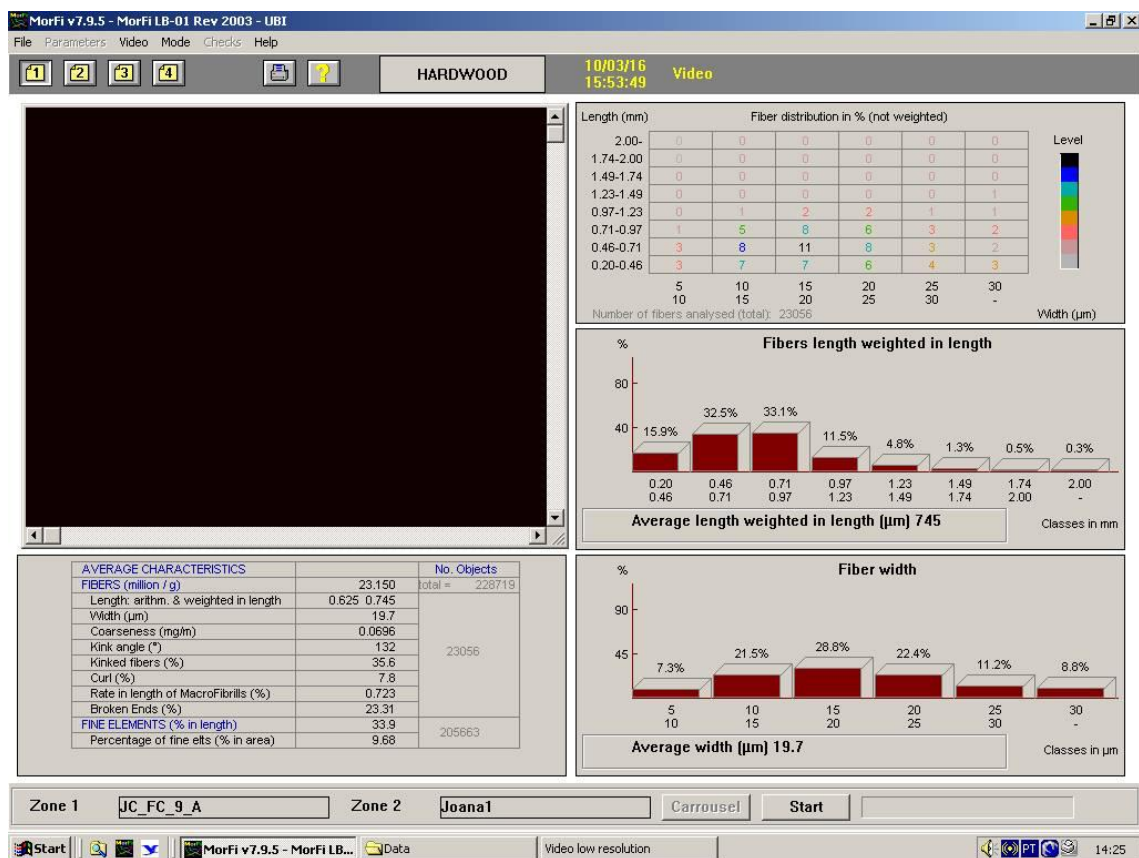


Figura 28 - Resultados das dimensões morfológicas das fibras de CMF obtidos através da análise do programa Morfi.

3.1.4 Determinação do ângulo de contacto de celulose microfibrilada tratada

De modo a caracterizar adicionalmente as propriedades de superfície dos materiais de CMF produzidos, os ângulos de contacto da água também foram determinados para avaliar a hidrofobicidade das estruturas. Esta é uma propriedade importante para testes de permeabilidade; na seleção da molécula terapêutica que se pretende incorporar devido às interações que estabelece com a estrutura; e também no estudo da cinética de libertação do fármaco. Na verdade, quando se considera a administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de novos medicamentos, este é um dos principais fatores.

Os ângulos de contacto obtidos estão indicados na tabela 13. Como pode ser observado, a estrutura de celulose microfibrilada apresenta um ângulo de contacto de 50.8° , o que é indicativo de um carácter hidrofílico. Após adição da PAM o ângulo de contacto aumentou para 56.0° , enquanto que com a adição da CMC diminuiu para 47.3° , sendo ambos os valores semelhantes ao da estrutura sem aditivos. Dado as propriedades higroscópicas destes materiais poliméricos, este comportamento hidrofílico era o esperado.

Tabela 13 - Ângulo de contacto.

Amostras de CMF	Ângulo de contacto
MFC_HW_B4_G1	$50.8^\circ \pm 4.7^\circ$
MFC_HW_B4_PAM_G1	$56.0^\circ \pm 3.3^\circ$
MFC_HW_B4_CMC_G1	$47.3^\circ \pm 3.3^\circ$

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. Estas variáveis contribuem de forma diferente para a quantidade total de grupos OH disponíveis à superfície.

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. Este fato ocorreu em amostras de

celulose muito porosas. Neste caso, será útil proceder à determinação do tempo de penetração da gota de líquido e a área de espalhamento, pois estes proporcionam informação complementar relevante 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.*, 2015a).

3.2 Proposta de metodologia

Este trabalho tem como um dos objetivos o desenvolvimento de uma metodologia de análise de imagens para aplicação na simulação computacional e posterior otimização de nanomateriais poliméricos porosos. A figura 29 representa um fluxograma do processo proposto. Esta metodologia foi estabelecida com base nas etapas seguidas na análise realizada através dos programas DiameterJ e Esprit. Em primeiro lugar, em ambos os programas é indispensável obter uma imagem do MEV com os requisitos necessários. De seguida a imagem é tratada pela aplicação de filtros adequados ao tipo de análise pretendida. Posteriormente segue para a sua segmentação, sendo este um passo automático executado pelo DiameterJ, enquanto que no Esprit é realizado manualmente. Após segmentação, a imagem pode ser otimizada por novo tratamento com filtros ou pela rejeição de zonas mal segmentadas (seleção de uma AER). Em relação à análise, o operador tem a possibilidade de selecionar e verificar quais os elementos estruturais são analisados. A partir da análise faz-se o tratamento dos resultados, quer por tabelas ou gráficos. Por último, os resultados obtidos podem ser usados como dados de entrada na simulação computacional das estruturas tridimensionais de modo a otimizar os potenciais sistemas de entrega e libertação de fármacos.

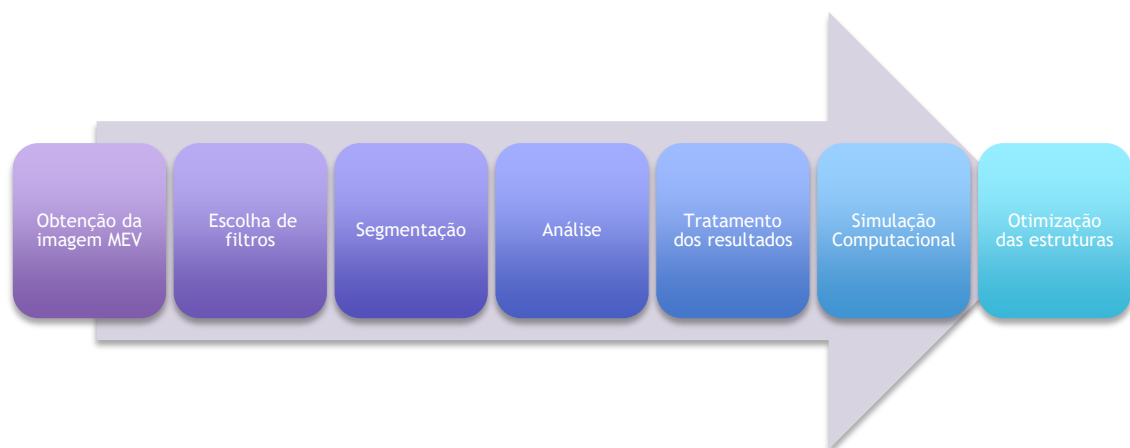


Figura 29 - Fluxograma da metodologia proposta de análise de imagens para aplicação na simulação computacional.

3.3 Integração com a simulação computacional

No seguimento do desenvolvimento da metodologia realizou-se a integração dos dados obtidos dos métodos de análise para formar a estrutura 3D no simulador computacional. Neste método, as camadas poliméricas são formadas pela deposição sistemática de fibras únicas, uma de cada vez. Dependendo da sua posição, dimensão e flexibilidade, a fibra obedece à estrutura subjacente e não ocupa o mesmo espaço (Figura 20). As fibras são posicionadas aleatoriamente e orientadas no plano x-y para simular a formação de folhas isotrópicas produzidas no laboratório, usadas para validar o modelo. Através da figura 30b é possível observar a organização espacial das fibras já depositadas na rede.

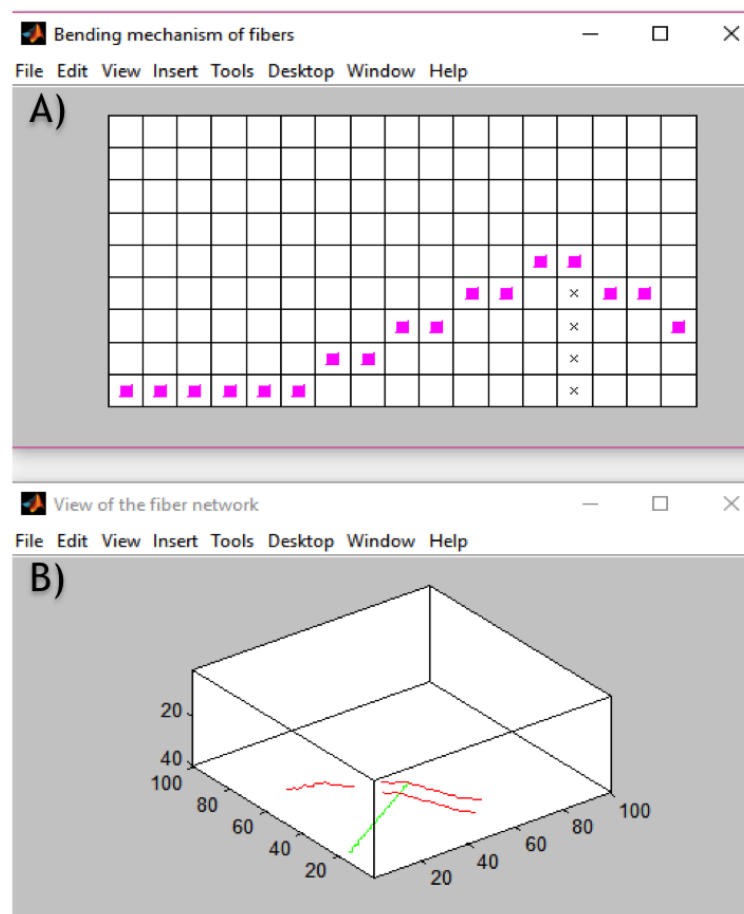


Figura 30 - Imagens obtidas computacionalmente do A) mecanismo de deposição das fibras e B) organização espacial das fibras na matriz.

A porosidade é um propriedade muito importante nestas estruturas dado que se trata de um sistema de entrega e libertação de fármacos. Este parâmetro é bem visível na

rede polimérica formada, sendo caracterizada pelos “voxels vazios” (Figura 30a). A partir deste dado é também possível fazer um estudo sobre a flexibilidade das fibras.

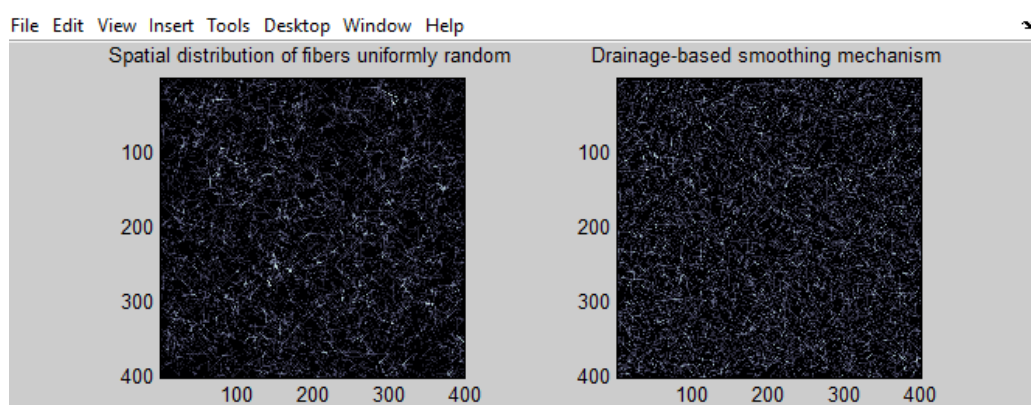


Figura 31 - Imagens radiográficas da densidade dos poros obtida computacionalmente.

De modo a estudar a porosidade do material simulado o programa cria diversas imagens, incluindo imagens radiográficas da densidade dos poros onde está representada a distribuição espacial das fibras (Figura 31), e imagens 3D da rede polimérica final (Figura 32).

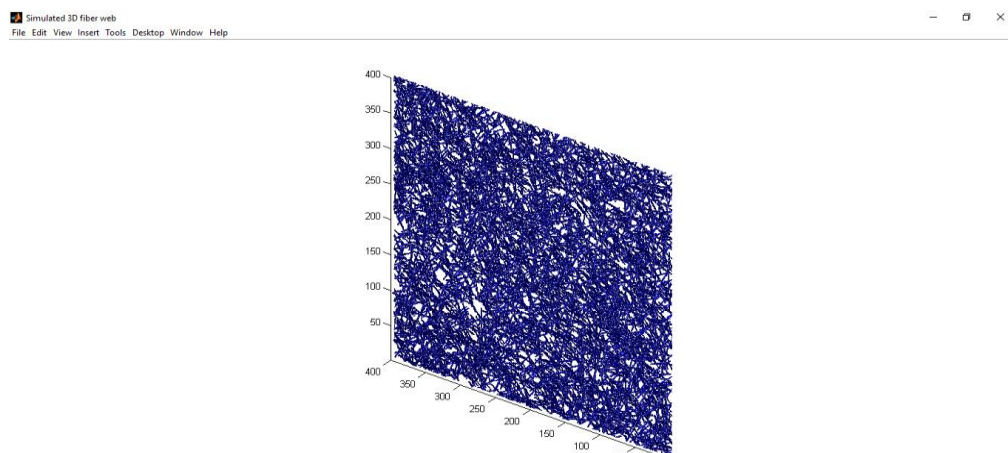


Figura 32 - Imagem 3D da matriz obtida através do simulador computacional.

Com base na figura 32 é possível observar-se que o simulador foi capaz de representar os elementos estruturais da celulose com sucesso, apresentando uma boa aproximação experimental. Este facto verifica-se pela porosidade, dimensões e distribuições das fibras e dos poros.

Neste trabalho a validação da simulação computacional é feita pela comparação dos valores da porosidade superficial das imagens obtidas pelo simulador, utilizando o mesmo procedimento para o seu tratamento e análise (Figura 33).

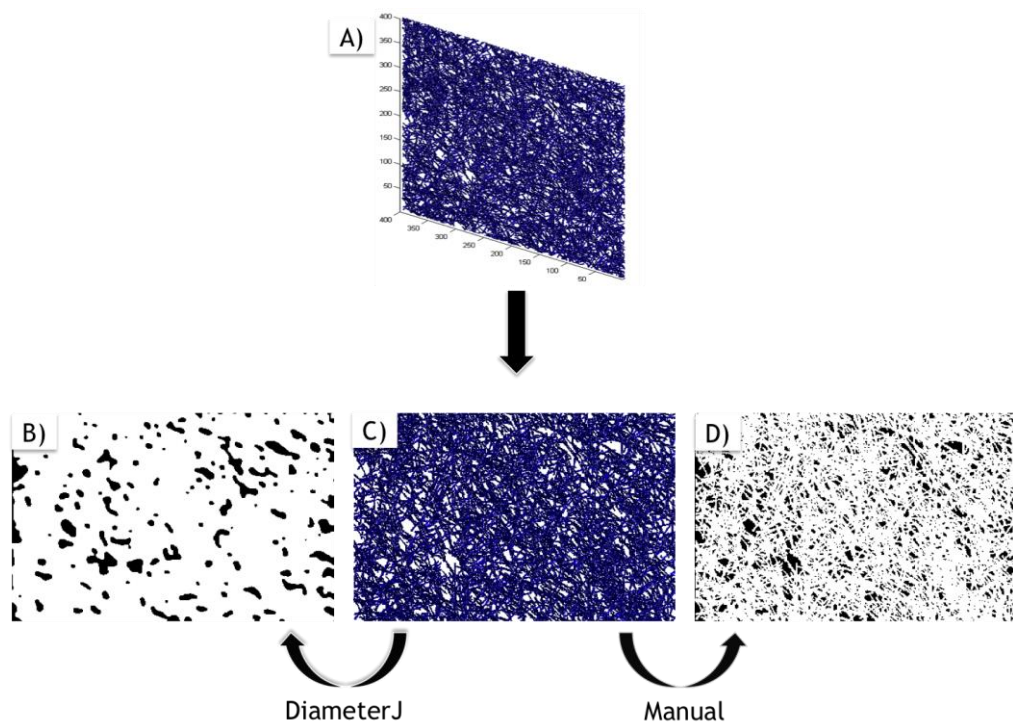


Figura 33 - Esquema do tratamento efetuado numa imagem 3D obtida através do simulador computacional. A) Imagem 3D obtida computacionalmente. B) Imagem obtida pela segmentação do DiameterJ. C) Fração elementar da imagem 3D do simulador. D) Imagem obtida pela segmentação manual.

Os resultados do tratamento efetuado na imagem 3D pelo DiameterJ (Figura 33b) indicam que esta ferramenta não possui um algoritmo suficientemente capaz de analisar corretamente a amostra. Com base nas características chave de uma boa imagem segmentada observa-se que as fibras segmentadas não representam as fibras formadas pelo simulador, resultando em aglomerados. A ocorrência destes obstáculos deve-se ao facto da estrutura global se apresentar num plano com inclinação e os poros estarem representados em 3D, bem como pela densidade, qualidade e tamanho da amostra que podem não ser os mais adequados para uma análise fidedigna. Como alternativa realizou-se uma segmentação manual (Figura 33d), na qual é visível uma boa aproximação da representação dos elementos estruturais, tendo sido obtida uma porosidade de 18.4 %. No entanto, por um lado verifica-se igualmente a presença de aglomerados de fibras, e por outro, o “ruído” da imagem está a ser considerado como poros afetando as medições, e por consequência os resultados finais.

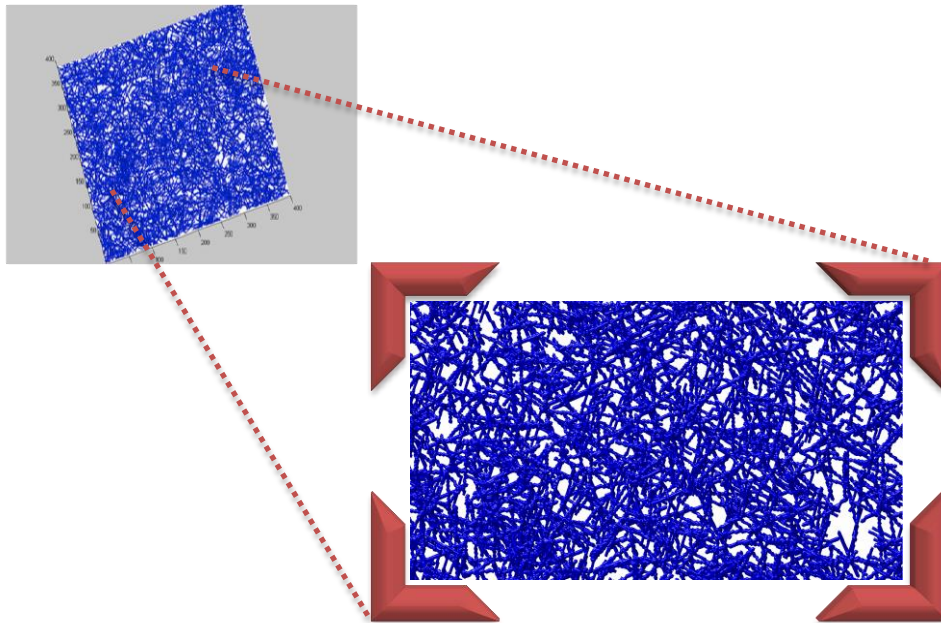


Figura 34 - Fração elementar representativa da imagem 3D obtida através do simulador computacional.

De modo a otimizar o método foi selecionada uma imagem no plano XY, evitando distúrbios tais como o brilho da imagem, pois este pode interferir na análise de imagem. Devido à alta densidade de fibras na imagem foi escolhida uma fração elementar representativa (Figura 34), na qual se realizou o seu tratamento e análise. Desta vez o programa DiameterJ foi capaz de segmentar corretamente a imagem do simulador (Figura 35), permitindo que seguisse para a sua análise.

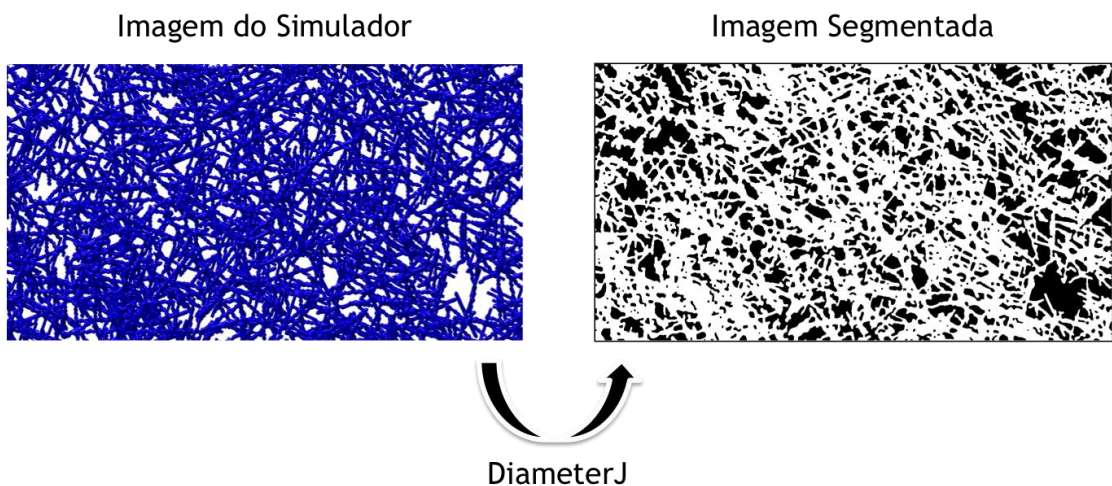


Figura 35 - Representação esquemática da segmentação de uma imagem do simulador computacional através do DiameterJ.

Segundo a análise através do DiameterJ o valor da porosidade superficial da imagem obtida da simulação computacional é de 35.8 %. Dado que os valores da porosidade das imagens 2D provenientes do MEV variam dos 20 aos 44 %, verifica-se que o valor da porosidade da imagem 3D do simulador encontra-se neste intervalo, validando experimentalmente o método. Deste modo pode-se utilizar esta metodologia para otimizar computacionalmente as propriedades estruturais de nanomateriais porosos.

O cálculo da porosidade das estruturas tridimensionais e a sua modelação computacional revelam ser importantes na aplicação a sistemas de transporte de fármacos graças à influência que têm na cinética de libertação do agente terapêutico. Um exemplo é o estudo realizado pela nossa equipa (Curto *et al.*, 2016), no qual se observa a cinética de libertação do fármaco Diclofenac, a diferentes pH, para diferentes “drug delivery systems” produzidos a partir de polímeros de CNF, CB e CMC (Figura 36). Este estudo prova que com a utilização de estruturas diferentes se obtêm respostas diferentes, sendo a porosidade da estrutura determinante para conseguir a cinética de libertação pretendida. Por outro lado, conseguir o sistema ideal significa obter uma porosidade otimizada sem comprometer a estrutura dos materiais.

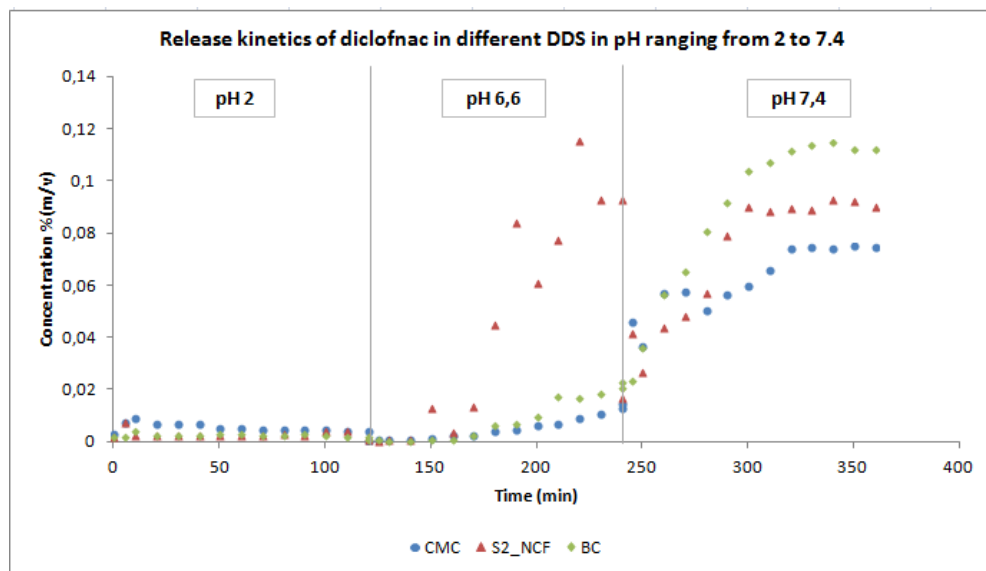


Figura 36 - Cinética de libertação do fármaco Diclofenac para diferentes “drug delivery systems” produzidos a partir de CNF, CB e CMC.

Capítulo IV

Conclusão &

perspetivas futuras

4. Conclusão e perspectivas futuras

Tendo em consideração os objetivos estabelecidos neste trabalho, foi possível desenvolver novos sistemas de entrega de fármacos inovadores através da combinação de diferentes unidades estruturais poliméricas. A aplicação de diferentes tratamentos na pasta de celulose permitiu a produção de diversas estruturas com diferentes porosidades, espessuras e densidades.

Os sistemas de entrega de fármacos produzidos em laboratório foram pela primeira vez caracterizados por métodos de análise de imagem, contendo critérios de avaliação bem definidos. Deste modo desenvolveu-se uma metodologia que permitiu identificar as características chave para a determinação das dimensões das fibras e do tamanho e distribuição dos poros. Os resultados obtidos permitem comparar diferentes amostras, com estruturas diferentes, retirando informação valiosa sobre as dimensões dos elementos estruturais.

As propriedades morfológicas na escala micro, em suspensão fibrosa, foram também determinadas utilizando um equipamento designado por “Morfi”, sendo que o diâmetro médio das fibras de celulose microfibrilada (MFC) em suspensão foi de 20 μm . Além da caracterização estrutural, determinou-se a sua hidrofobicidade das estruturas de MFC através do ângulo de contacto, obtendo-se valores que variam entre 47° e 56°.

Os resultados provenientes dos métodos de análise utilizaram-se como dados de entrada para formar a estrutura 3D através da simulação computacional. O simulador foi capaz de representar os elementos estruturais da celulose com sucesso, apresentando uma boa modelação das estruturas obtidas experimentalmente. O simulador computacional foi validado experimentalmente para sistemas de entrega de fármacos, tendo-se obtido porosidades idênticas às das estruturas reais. Assim, conclui-se que o simulador é uma ferramenta valiosa, que pode ser programada e estendida para calcular, analisar e otimizar a porosidade de novos nanomateriais.

O estudo da cinética da libertação do fármaco Diclofenac provou que com a utilização de estruturas diferentes podem-se obter respostas diferentes, sendo a porosidade da estrutura determinante para conseguir a cinética de libertação pretendida.

Conclui-se que se pode utilizar a metodologia de tratamento e análise de imagem apresentada neste trabalho, juntamente com a simulação computacional, para caracterizar e otimizar a porosidade de nanomateriais porosos, de forma a escolher o sistema mais adequado e otimizar o transporte de moléculas terapêuticas.

Relativamente a perspectivas futuras, pretende-se construir árvores de regressão/decisão destas estruturas de forma a ter uma visão e um modelo organizacional que integre os diferentes materiais celulósicos desenvolvidos no decorrer deste trabalho. Este estudo permitirá relacionar várias propriedades dos materiais e fazer um plano experimental para a obtenção de estruturas com a porosidade, a capacidade de incorporação e a cinética de libertação de fármacos pretendidas.

No futuro o desenvolvimento de novos algoritmos para a formação de microfibrilas nas estruturas de celulose criadas no simulador será um desafio importante. Por outro lado, é fundamental continuar a desenvolver algoritmos capazes de tratar e analisar as estruturas 3D provenientes do simulador computacional, de forma a obter informações 3D dessas mesmas estruturas que possibilitam a sua otimização.

Capítulo V

Bibliografía

5. Bibliografia

- Águas, H., Mateus, T., Vicente, A., Gaspar, D., Mendes, M.J., Schmidt, W.A., Pereira, L., Fortunato, E. & Martins, R., 2015. Thin Film Silicon Photovoltaic Cells on Paper for Flexible Indoor Applications. *Advanced Functional Materials*, 25, pp.3592-3598.
- Abdul, K.H.P.S., Davoudpour, Y., Islam, N.M., 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.
- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, pp.36-41.
- Aliuos, P., Reich, U., Lenarz, T. & Reuter, G., 2008. Effects of micro and nano structured surfaces on the cell adhesion using single cell force spectroscopy. *JPK Instruments*, pp.1-8.
- Allen, T.M. & Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303, pp.1818-1822.
- Almeida, I.F., Pereira, T., Silva, N.H.C.S., Gomes, F.P., Silvestre, A.J.D., Freire, C.S.R., Lobo, J.M.S. & Costa, P.C., 2014. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An *in vivo* skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86, pp.332-336.
- Andresen, M., Stenstad, P., Moretro, T., Langsrud, S., Syverud, K., Johansson, L-S. & Stenius, P., 2007. Nonleaching antimicrobial films prepared from surface-modified microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules*, 8, pp.2149-2155.
- Arola, S., Tammelin, T., Setälä, H., Tullila, A. & Linder, M.B., 2012. Immobilization-stabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation. *Biomacromolecules*, 13, pp.594-603.
- Azzopardi, E. A., Conlan, R.S. & Whitaker, I.S., 2016. Polymer therapeutics in surgery: the next frontier. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 1, pp.19-29.

- Babu, R.P., O'Connor, K. & Seeram, R., 2013. Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Progress in Biomaterials*, 2, pp.8-23.
- Badami, A.S., Kreke, M.R., Thompson, M.S., Riffle, J.S. & Goldstein, A.S., 2006. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*, 27, pp.596-606.
- Beachley, V. & Wen, X., 2010. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(7), pp.868-892.
- Besbes, I., Alila, S. & Boufi, S., 2011a. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), pp.975-983.
- Besbes, I., Vilar, M.R. & Boufi, S., 2011b. Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: Preparation, characteristics and reinforcing potential. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), pp.1198-1206.
- Bhardwaj, N. & Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, pp.325-347.
- Bhattacharya, M., Malinen, M.M., Lauren, P., Lou, Y-R., Kuisma, S.W., Kanninen, L., Lille, M., Corlu, A., GuGuen-Guillouzo, C., Ikkala, O., Laukkaen, A., Urtti, A & Yliperttula, M., 2012. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *Journal of Controlled Release*, 164(3), pp.291-298.
- Blaiszik, B.J., Caruso, M.M., Mclroy, D.A., Moore, J.S., White, S.R. & Sottos, N.R., 2009. Microcapsules filled with reactive solutions for self-healing materials. *Polymer*, 50(4), pp.990-997.
- Bloch, J-F., 2009. Advances in Pulp and Paper Research, FRC. *14th Fundamental Research Symposium, Oxford, England*, pp.599-664.
- 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.

- Cerqueira, M.A., Pinheiro, A.C., Silva, H.D., Ramos, P.E., Azevedo, M.A., Flores-López, M.L., Rivera, M.C., Bourbon, A.I., Ramos, Ó.L. & Vicente, A.A., 2014. Design of Bio-nanosystems for Oral Delivery of Functional Compounds. *Food Engineering Reviews*, 6, pp.1-19.
- Cheng, Q., Wang, S. & Harper, D.P., 2009. Effects of process and source on elastic modulus of single cellulose fibrils evaluated by atomic force microscopy. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 40(5), pp.583-588.
- Chinga-Carrasco, G., Solheim, O., Lenes, M. & Larsen, Å., 2013. A method for estimating the fibre length in fibre-PLA composites. *Journal of Microscopy*, 250(7491), pp.15-20.
- Chinga-Carrasco, G., 2010. Microscopy and computerized image analysis of wood pulp fibres multi- scale structures. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, pp.2182-2189.
- Chirayil, C.J., Mathew, L. & Thomas, S., 2014. Review of recent research in nano cellulose preparation from different lignocellulosic fibers. *Reviews on Advanced Materials Science*, 37, pp.20-28.
- Collins, T., 2007. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1), pp.S25-S30.
- Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa V.L.D., Martins, N.V., Videria, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. & Silva, M.J.S., 2016. The importance of optimizing the 3d structure when developing cellulosic materials for medical applications: the case of drug delivery systems (DDS). *XXIII Technicelpa - International Forest, Pulp and Paper Conference, 12-14 of October, Porto, Portugal*.
- 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., 2015a. Development of an Innovative 3D Simulator for Structured Polymeric Fibrous Materials and Liquid Droplets. *Mechanical and Materials Engineering of Modern Structure and Component Design*. Springer International Publishing, pp. 301-321.
- Curto, J.M.R., Rodrigues, T.I.F. & Silva, M.J.S., 2015b. Optimization of fibrous structures with cellulose fibres, polyacrylamide polymers and CaCO₃ fillers. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 46(4), pp.434-439.

- Curto, J.M.R., Videira, P.E.M., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., & Silva, M.J.S., 2015c. Optimization of polymeric nanomaterials for biomedical applications using computational simulation. *3rd Imaginenano: Nanospain BioMed, 10-13 of March, Bilbao, Spain*, p.6.
- Curto, J.M.R., Belino, N.J.R., Conceição, E.L.T., Rodrigues, P.A.F., Portugal, A.T.G. & Simões, R.M.S., 2012. Contribution to the Structural Characterization of Poly(vinyl alcohol) PVA Nano Structured Polymeric Materials using a 3D Computational Simulation Model. *4th Symposium of Textile and Paper Materials, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal*.
- Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G. & Simões, R.M.S., 2011a. Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 42(5), pp.370-374.
- Curto, J.M.R., Hekmati, A.H., Drean, J.Y., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. & Silva M.J.S., 2011b. Three dimensional polyamide-6 nanowebs modeling and simulation. *11th World Textile Conference, Autex 2011, Mulhouse, France, 2*, pp.639-643.
- Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G. & Simões, R.M.S., 2010. The fibre properties influence on a three dimensional paper model. *XXI TECNICELPA Conference and Exhibition/VI CIADICYP, Lisboa, Portugal*.
- Dedavid, B.A., Gomes, C.I. & Machado, G., 2007. Microscopia eletrônica de varredura - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. *Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)*, pp.1-60.
- Doube, M., Kłosowski, M.M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F.P., Dougherty, R.P., Jackson, J.S., Schmid, B., Hutchinson, J.R. & Shefelbine, S.J., 2010. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, 47, pp.1076-1079.
- Dufresne, A., Cavaille, J. & Vignon, M.R., 1997. Mechanical Behavior of Sheets Prepared from Sugar Beet. *Journal of Applied Polymer Science*, 4628, pp.1185-1194.

- Fang, J., Wang, X. & Lin, T., 2011. Functional Applications of Electrospun Nanofibers. *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, pp.287-326.
- Ferreira, T. & Rasband, W., 2012. ImageJ User Guide. *IJ 1.46r Revised edition*, 9(7), pp.1-187.
- Fischer, M.J.M., Uchida, S. & Messlinger, K., 2010. Measurement of meningeal blood vessel diameter in vivo with a plug-in for ImageJ. *Microvascular Research*, 80(2), pp.258-266.
- Fitzgerald, K.A., Malhotra, M., Curtin, C.M., O' Brien, F.J. & O' Driscoll, C.M., 2015. Life in 3D is Never Flat: 3D Models to Optimise Drug Delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 215, pp.39-54.
- Fortunato, E., 2005. As Metas da Nanotecnologia : Aplicações e Implicações. *Centro de Inovação de Materiais*, pp.1-10.
- Guerrini, L.M., Branciforti, M.C., Bretas, R.E.S. & Oliveira, M.P., 2006. Eletrofiação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa. *Polímeros*, 16, pp.286-293.
- Gonzalez, J.S., Ludueña, L., Ponce, A., & Alvarez, V.A., 2014. Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Materials Science and Engineering C*, 34, pp.54-61.
- Grove, C. & Jerram, D.A., 2011. JPOR: An ImageJ macro to quantify total optical porosity from blue-stained thin sections. *Computers and Geosciences*, 37(11), pp.1850-1859.
- Gund, P., Andose, J.D., Rhodes, J.B. & Smith, G.M., 1980. Three-dimensional molecular modeling and drug design. *Science (New York, N.Y.)*, 208(12), pp.1425-1431.
- Habibi, Y., Goffin, A-L., Schiltz, N., Duquesne, E., Dubois, P. & Dufresne, A., 2008. Bionanocomposites based on poly(ϵ -caprolactone)-grafted cellulose nanocrystals by ring-opening polymerization. *Journal of Materials Chemistry*, 18, pp.5002-5010.

- Haeri, M. & Haeri, M., 2015. ImageJ Plugin for Analysis of Porous Scaffolds used in Tissue Engineering. *Journal of Open Research Software*, 3, pp.2-5.
- Håkansson, K.M.O., Fall, A.B., Lundell, F., Yu, S., Krywka, C., Roth, S.V., Santoro, G., Kvick, M., Wittberg, L.P., Wågberg, L. & Söderberg, L.D., 2014. Hydrodynamic alignment and assembly of nanofibrils resulting in strong cellulose filaments. *Nature communications*, 5, pp.4018-4027.
- He, C., Zhuang, X., Tang, Z., Tian, H. & Chen, X., 2012. Stimuli-Sensitive Synthetic Polypeptide-Based Materials for Drug and Gene Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 1, pp.48-78.
- Hildebrand, T. & Rügsegger, P., 1997. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*, 185, pp.67-75.
- Hirn, W. & Bauer, U., 2006. A review of image analysis based methods to evaluate fiber properties. *Lenzinger Berichte*, 86, pp.96-105.
- Hotaling, N.A., Bharti, K., Kriel, H. & Simon, C.G., 2015. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. *Biomaterials*, 61, pp.327-338.
- Hu, J. & Liu, S., 2015. Supramolecular assembly-assisted synthesis of responsive polymeric materials with controlled chain topologies. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 216, pp.591-604.
- Hu, L., Sun, C., Song, A., Chang, D., Zheng, X., Gao, Y., Jiang, T., Wang, S., 2014. Alginate encapsulated mesoporous silica nanospheres as a sustained drug delivery system for the poorly water-soluble drug indomethacin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), pp.183-190.
- Hubbell, J.A. & Chilkoti, A., 2012. Nanomaterials for Drug Delivery. *Science*, 337 (6092), pp.303-305.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. & Budhiono, A., 2000. Bacterial cellulose – a masterpiece of nature ' s arts. *Journal of Materials Science*, 35, pp.261-270.

- Jeffries, E.M., Nakamura, S., Lee, K-W., Clampffer, J., Ijima, H. & Wang, Y., 2014. Micropatterning Electrospun Scaffolds to Create Intrinsic Vascular Networks. *Macromolecular Bioscience*, 14, pp.1514-1520.
- Jorfi, M. & Foster, E.J., 2015. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132, pp.1-19.
- Joutsimo, O.P. & Asikainen, S., 2013. Effect of fiber wall pore structure on pulp sheet density of softwood kraft pulp fibers. *BioResources*, 8, pp.2719-2737.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D. & Dorris, A., 2011. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50, pp.5438-5466.
- Kolakovic, R., Peltonen, L., Laaksonen, T., Putkisto, K., Laukkanen, A. & Hirvonen, J., 2011. Spray-Dried Cellulose Nanofibers as Novel Tablet Excipient. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), pp.1366-1373.
- Kümmerer, K., Menz, J., Schubert, T. & Thielemans, W., 2011. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere*, 82, pp.1387-1392.
- Lavoine, N., Desloges, I. & Bras, J., 2014. Microfibrillated cellulose coatings as new release systems for active packaging. *Carbohydrate Polymers*, 103, pp.528-537.
- Lee, K.Y., Blaker, J.J. & Bismarck, A., 2009. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composites Science and Technology*, 69(15-16), pp.2724-2733.
- Li, J.K., Wang, N. & Wu, X.S., 1998. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 56, pp.117-126.
- Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V. Peppas, N.A., 2010. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, pp.149-173.

- Lin, N. & Dufresne, A., 2014. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, pp.302-325.
- Lin, N., Huang, J. & Dufresne, A., 2012. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review. *Nanoscale*, 4, pp.3274-3294.
- Lin, S.P., Calvar, L.I., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A. & Cheng, K.C., 2013. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20, pp.2191-2219.
- Liu, J., Huang, J., Wujcik, E.K., Qiu, B., Rutman, D., Zhang, X., Salazard, E., Wei, S. & Guo, Z., 2015. Hydrophobic Electrospun Polyimide Nanofibers for Self-cleaning Materials. *Macromolecular Materials and Engineering*, 300, pp.358-368.
- Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A. & Liang, X.J., 2014. PH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 32(4), pp.693-710.
- Liu, W., Thomopoulos, S. & Xia, Y., 2012. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced Healthcare Materials*, 1, pp.10-25.
- Martins, N.V.D.F., Curto, J.M.R., A.T.G., Simões, R.M.S., Santos Silva, M. J., 2016. Development of drug delivery systems coated with polymeric materials. *I Symposium of FibEnTech 2016, Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, 26-29 of January, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, pp. 95-98, ISBN 978-989-654-296-2.*
- Martins, M.A. & Trindade, T., 2012. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Quimica Nova*, 35(7), pp.1434-1446.
- Mathew, A.P., Oksman, K., Pierron, D. & Harmand, M.F., 2012. Fibrous cellulose nanocomposite scaffolds prepared by partial dissolution for potential use as ligament or tendon substitutes. *Carbohydrate Polymers*, 87, pp.2291-2298.
- Miao, C. & Hamad, W.Y., 2013. Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: A critical review. *Cellulose*, 20, pp.2221-2262.

- Mit-uppatham, C., Nithitanakul, M. & Supaphol, P., 2004. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter RID C-4353-2008. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205, pp.2327-2338.
- Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H. & Noishiki, Y., 1989. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal of biomedical materials research*, 23, pp.125-133.
- Moral, A., Monte, M.C., Cabeza, E. & Blanco, A., 2010. Morphological Characterization of Pulps To Control Paper Properties. *Cellulose chemistry and technology*, 44(10), pp.473-480.
- Musyanovych, A. & Landfester, K., 2014. Polymer micro- and nanocapsules as biological carriers with multifunctional properties. *Macromolecular Bioscience*, 14, pp.458-477.
- Pina, K.V., Pinto, L.R., Moratori, R.B., Souza, C.G. & Barbastefano, R.G., 2006. Nanotechnology and nanobiotechnology: state of the art, perspectives of innovation and investments, *Revista Gestão Industrial*, pp.115-125.
- Poncelet, D., Vos, P., Suter, N. & Jayasinghe, S.N., 2012. Bio-electrospraying and cell electrospinning: Progress and opportunities for basic biology and clinical sciences. *Advanced Healthcare Materials*, 1, pp.27-34.
- Richardson, J.J., Maina, J.W., Ejima, H., Hu, M., Guo, J., Choy, M.Y., Gunawan, S.T., Lybaert, L., Hagemeyer, C.E., Geest, B.G. & Caruso, F., 2015. Versatile Loading of Diverse Cargo into Functional Polymer Capsules. *Advanced Science*, 2, pp.1-6.
- Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y. & Isogai, A., 2007. Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, pp.2485-2491.
- Salehi, R., Irani, M., 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, pp.515-527.

- Sams-Dodd, F., 2013. Is poor research the cause of the declining productivity of the pharmaceutical industry? An industry in need of a paradigm shift. *Drug Discovery Today*, 18(5-6), pp.211-217.
- Santos, A., Amaral, E.M., Vaz, Á., Anjos, O. & Simões, R., 2008. Effect of *Eucalyptus globulus* wood density on papermaking potential. *Tappi Journal*, 27, pp.25-32.
- Sawoszczuk, T., Wandelt, P., Barański, A., Łagan, J.M. & Łojewski, T., 2004. Degradation of Paper As Studied By Fiber Length Measurements After Hydrodynamical Treatment. *International conference on durability of paper and writing, Ljubljana, Eslovenia*, pp.78-80.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth*, 9(7), pp.676-682.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671-675.
- Städler, B., Price, A.D., Chandrawati, R., Hosta-Rigau, L., Zelikin, Alexander N. & Caruso, F., 2009. Polymer hydrogel capsules: en route toward synthetic cellular systems. *Nanoscale*, 1(1), pp.68-73.
- Sukhorukov, G.B., Rogach, A.L., Garstka, M., Springer, S., Parak, W.J., Muñoz-Javier, A., Kreft, O., Skirtach, A.G., Susha, A.S., Ramaye, Y., Palankar, R. & Winterhalter, M., 2007. Multifunctionalized polymer microcapsules: Novel tools for biological and pharmacological applications. *Small*, 3(6), pp.944-955.
- Thoniyot, P., Tan, M.J., Karim, A.A., Young, D.J. & Loh, X.J., 2015. Nanoparticle-Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science*, 2, pp.1-13.
- Vartiainen, J., Pöhler, T., Sirola, K., Pylkkänen, L., Alenius, H., Hokkinen, J., Tapper, U., Lahtinen, P., Kapanen, A., Putkisto, K., Hiekkataipale, P., Eronen, P., Ruokolainen, J. & Laukkanen, A., 2011. Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. *Cellulose*, 18, pp.775-786.

- Wang, C., He, C., Tong, Z., Liu, X., Ren, B. & Zeng, F., 2006. Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 308, pp.160-167.
- Xu, J.H., Zhao, H., Lan, W-J., Luo, G-S., 2012. A novel microfluidic approach for monodispersed chitosan microspheres with controllable structures. *Advanced Healthcare Materials*, 1, pp.106-111.
- Zamani, M., Prabhakaran, M.P. & Ramakrishna, S., 2013. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.2997-3017.
- Zarbin, A.J.G., 2007. Química de (Nano)materiais. *Quimica Nova*, 30(6), pp.1469-1479.
- Zeng, J., Xu, X., Cheng, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L. & Jing, X., 2003. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 92, pp.227-231.
- Zhou, Y.M., Fu, S.Y., Zheng, L.M. & Zhan, H.Y., 2012. Effect of nanocellulose isolation techniques on the formation of reinforced poly(vinyl alcohol) nanocomposite films. *Express Polymer Letters*, 6(10), pp.794-804.
- Zimmermann, T., Bordeanu, N. & Strub, E., 2010. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), pp.1086-1093.

Web grafia

<http://nanotecnologiananotecnologia.blogspot.pt/>. Acedido em maio de 2016.

<http://www.vtnews.vt.edu/articles/2008/11/2008-693.html>. Acedido em setembro de 2016.

Capítulo VI

Anexos

6. Anexos

Anexo 1 - Comunicações

Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa V.L.D., Martins, N.V., Vidéria, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. & Silva, M.J.S., 2016. The importance of optimizing the 3d structure when developing cellulosic materials for medical applications: the case of drug delivery systems (DDS). *XXIII Technicelpa - International Forest, Pulp and Paper Conference, 12-14 of October, Porto, Portugal.*

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. *Nanoscience and Nanotechnology International Conference: NanoPT 2016 International Conference, 16-19 of February, International Nanotechnology Laboratory, Braga, Portugal.*

Martins, N.V.D.F., Curto, J.M.R., A.T.G., Simões, R.M.S., Santos Silva, M. J., 2016. Development of drug delivery systems coated with polymeric materials. *I Symposium of FibEnTech 2016, Fibrous Materials and Environmental Technologies Research Unit, 26-29 of January, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, pp. 95-98, ISBN 978-989-654-296-2.*

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^{1,2,4*}, A.P. Costa^{1,2}, M.E. Amaral^{1,2}, J.S. Ferreira², V.L.D. Costa¹, N.V. Martins², P.E.M Videira², F.P. Morais^{1,2}, A.R.L. Sousa^{1,2}, E.L.T. Conceição³, A.T.G. Portugal⁴, R.M.S. Simões^{1,2}, M.J. Santos Silva¹

¹ FibEnTech, University of Beira Interior, Portugal

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

³ SABIC Technology Center, Riyadh, Saudi Arabia

⁴ CIEPQPF, Chemical Engineering Dep., University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Corresponding author: Joana Curto; 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 4dm³ 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 CaCl₂ 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/m² 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 CO₂ 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 CO₂ 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/m² 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

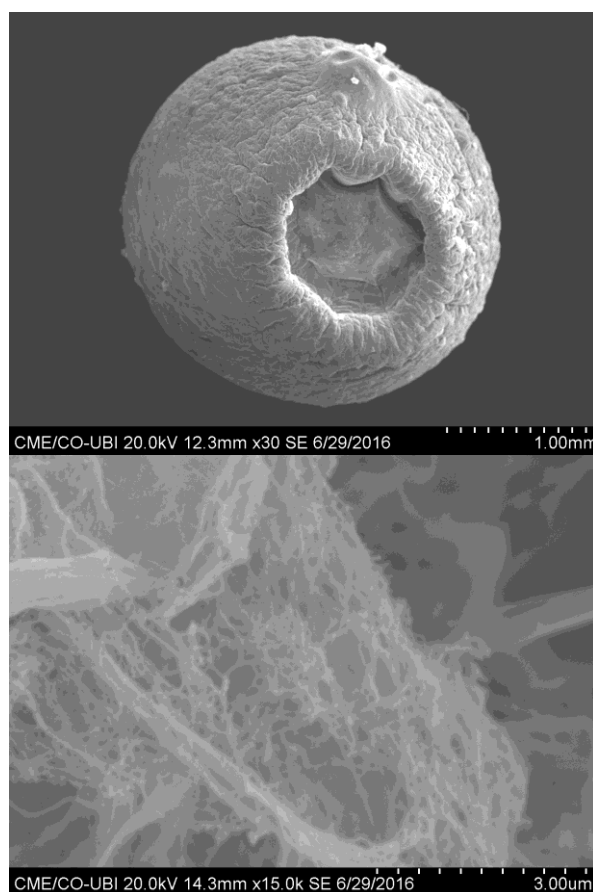


Figure 1. a) SEM image of DDS made from NFC (30X). b) SEM image of NFC structure inside the DDS (15000X)

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.

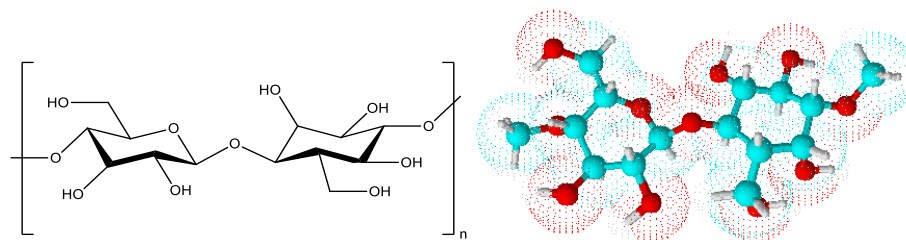


Figure 2. 2D and 3D Cellulose polymer molecules made with ChemSketch from ACD/Labs.

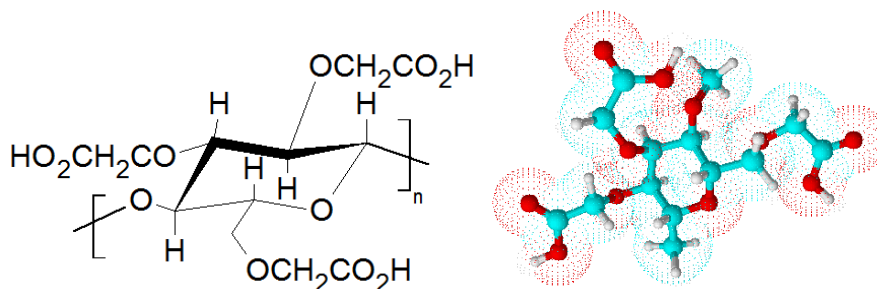


Figure 3. 2D and 3D carboxymethylcellulose (CMC) made with ChemSketch from ACD/Labs.

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.

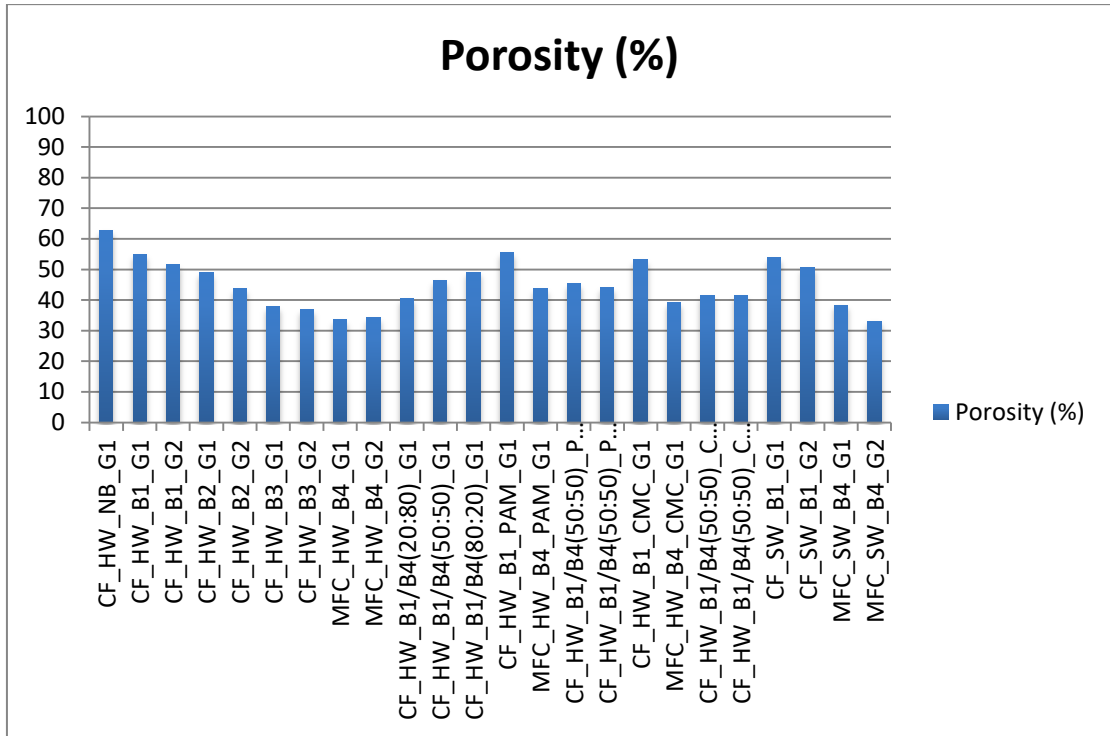


Figure 4. Porosity of cellulose structures made from different fibers with mechanical and chemical modifications

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 matrixial 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.

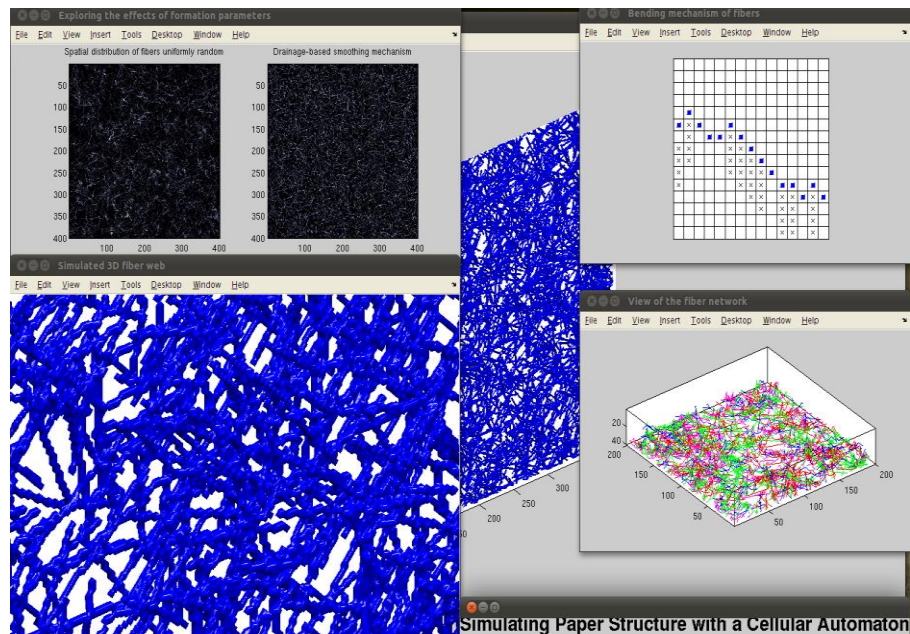


Figure 5. Computational simulation of a porous cellulose structure

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.

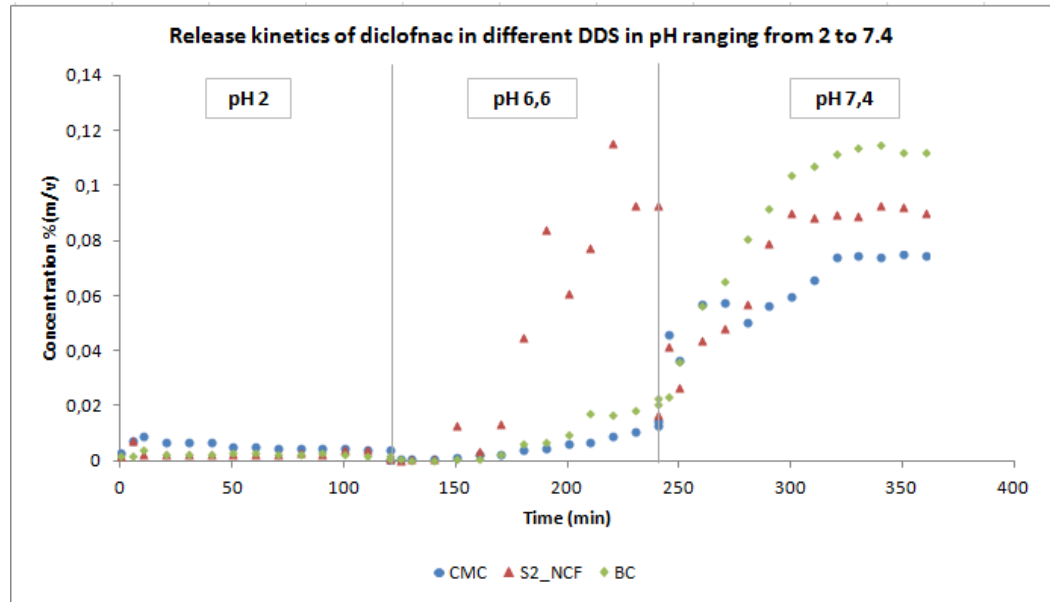


Figure 6. Kinetics of diclofenac release from different DDS made with a combination of polymers containing NFC, BC and CMC.

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^o UID/Multi/00195/2013) and RAIZ.

REFERENCES

- [1] S.E. Moulton, G.G. Wallace, 2014. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems., *J. Control. Release* 193:27–34. Doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.005.
- [2] S. Butun, F.G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, 2011. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 86:636–643. Doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.001.
- [3] R. Salehi, M. Irani, M.-R. Rashidi, A. Aroujalian, A. Raisi, M. Eskandani, 2013. Stimuli-responsive nanofibers prepared from poly(N-isopropylacrylamide-acrylamide-vinylpyrrolidone) by electrospinning as an anticancer drug delivery, *Des. Monomers Polym.* 16:515–527. Doi:10.1080/15685551.2013.771303.
- [4] W.H. de Jong WH and P.J. Borm, 2008. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 3(2):133-149. Doi:10.2147/IJN.S596.
- [5] M. Jorfi, E.J. Foster, 2014, Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 41719. Doi:10.1002/app.41719.
- [6] K. a Fitzgerald, M. Malhotra, C.M. Curtin, F.J. O' Brien, C.M. O' Driscoll, 2015. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery., *J. Control. Release.* 215:39–54. Doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- [7] J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal and R.M.S Simões, 2011. Three dimensional modeling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, Wiley-vch* 42(5): 370-374. ISSN: 0933-5137. ISI Accesion Number: CCC: 000290455700006.
- [8] J.M.R. Curto, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2015. Optimization of polymeric nanomaterials for biomedical applications using computational simulation. In *Proceedings of the 3rd Imagenano: Nanospain BioMed, Bilbao, Spain.*
- [9] J.M.R. Curto, N.V.D.F. Martins, J. S. Ferreira, P.E.M. Videira, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. "The challenge of using 3D Computational Simulation to develop 3D Drug Delivery Systems made from nano Polymeric Porous Materials", in *Proceedings of Nanoscience and Nanotechnology International Conference: NanoPt 2016 International Conference, 16 to 19 of February 2016, International Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal.*
- [10] M. Jorfi and E.J. Foster, 2014. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.* 41719.
- [11] Kamel, S., 2008. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *express Polymer Letters* 11(2):758–778.
- [12] S. Butun, F.G. Ince, H. Erdugan, N. Sahiner, 2011. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 86:636–643.
- [13] T. Saito and A. Isogai, 2004. TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions *Biomacromolecules* 2004, 5, 1983-1989.
- [14] A. Isogai, T. Saito and H. Fukuzumi, 2011. TEMPO TEMPO-oxidized cellulose nanofibers *Nanoscale*, 3, 71. Doi: 10.1039/c0nr00583e.
- [15] J. S. Ferreira, J. M.R. Curto, R. M.S. Simões, M. J. Santos Silva, 2016. 3D Computational simulation of Drug Delivery Systems (DDSs) made from carboxymethyl cellulose (CMC). *Proceedings of the*

FibEnTech Symposium, UBI, Covilhã, ISBN 978-989-654-296-2, 89-92 .

- [16] I.F. Almeida, T. Pereira, N.H.C.S. Silva, F.P. Gomes, A.J.D. Silvestre, C.S.R. Freire, J.M.S. Lobo, P.C. Costa, 2014. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* 86(3):332-336.
- [17] J.M.R. Curto, E.L.T. Conceição, A.T.G. Portugal, R. M.S. Simões, 2010. The fibre properties influence on a three dimensional paper model. In *Proceedings of the XXI TECNICELPA Conference and Exhibition / VI CIADICYP*.
- [18] Bhatnagar, A., & Sain, M. (2005). Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 24(12), 1259–1268.
- [19] Chakraborty, A., Sain, M., & Kortschot, M. (2005). Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforchung*, 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^{1 *}, N.V.D.F. Martins¹, J. S. Ferreira¹, P.E.M. Videira¹, E.L.T.

Conceição^{2,3}, A.T.G. Portugal³, R. M.S. Simões¹, M. J. Santos Silva¹

¹FibEnTec, Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior

²SABIC Technology Center, Riyadh, Saudi Arabia,

³Research 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

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.

Development of drug delivery systems coated with polymeric materials

N.V.D.F. Martins^{1,2*}, J.M.R. Curto¹, R.M.S Simões¹, M.J. Santos Silva¹

¹ Research Center for Fiber Materials and Environmental Technologies FibEnTech, University of Beira Interior, Portugal

² Medicinal Chemistry Master Science Student, Chemistry Dep., UBI

Abstract

The main goal of the present work is to model and study drug delivery systems (DDS) which are polymer capsules. The main way for these capsules to exhibit functionality is through the incorporation/encapsulation of a functional cargo. Using computational simulation it was possible to perform a computer simulation of the coating polymer. The aim was to simulate the thin layer formed to coat the capsules and then compare the real data with the experimental one. The computer results proved that the simulation was able to represent the polymer thin layer successfully. Comparing the computational and experimental thickness of the polymeric coating structures, the dimensions were similar. For these reasons computer simulation of functional polymeric capsules was found to have an important role developing coated drug delivery systems in advanced scientific studies.

Introduction

Nowadays nanotechnology is an area of interest due to its applications in several systems, for example, coatings for biomedical devices,^[1] bioreactions,^[2] biosensors,^[3] preparation of scaffolds for wound healing and tissue regeneration^[4] and for drug delivery systems (DDS).^[5] These applications arise from the need to provide certain properties to therapeutic molecules that can't alone perform the desired action. Drugs usually are limited by poor stability, low efficacy, high toxicity, low controllability, small half-lives, aggregation or difficult transportation.^[6] A DDS is based on a formulation that allows the introduction of a therapeutic agent in the body and increases its efficacy and safety by controlling the rate, time and the point of release inside the body. This system aims to produce and maintain a sufficient amount of drug over an appropriate period of time, and is expected to avoid the degradation of the non-released drug into the body. As a result, adverse effects associated with undesirable variations in drug concentration or inefficacy of therapeutic molecules can be overcome. During the last decades, polymer nanostructures have reached substantial interest as DDS. The development of DDS relies on the principle that an increase of the drug carrier surface area enhances the dissolution rate of therapeutic molecules, that is why it is so important to have a 3D structural characterization.^[7] Several materials may be used in the development of DDS, like lipid

nanoparticles, polymer-drug conjugates,^[5] hydrogels^[8] and nanocapsules such as polymeric capsules.

To achieve the desired functionality the first step is the incorporation of active substances in the capsule wall or cavity. In this context, *Richardson et al.*^[10] idealized a method for the synthesis of polymer-stabilized CaCO_3 particles that are capable of adsorbing a large variety of substances (from biomolecules to inorganic compounds) for the preparation of a wide range of functional capsules coated with a thin polymer layer (Figure 1).

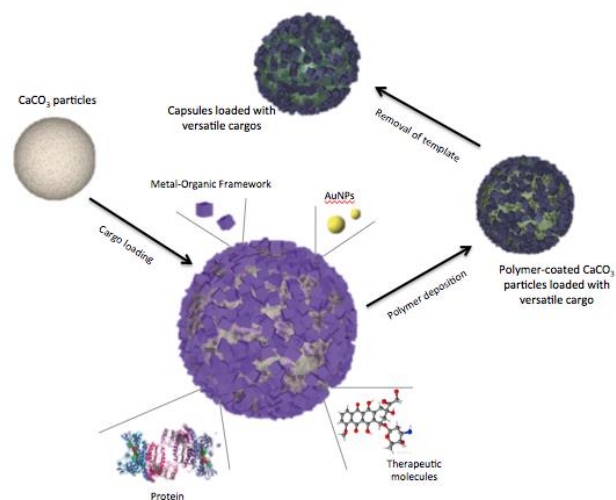


Figure 1 – Scheme of the capsule assembly process. Polymer-stabilized calcium carbonate particles are loaded with diverse cargo, ranging from biomolecule to inorganic particles and then coated with a polymer such as a polypeptide or a supramolecular polymer. After coating, the calcium carbonate core can be removed, originating highly loaded functional capsules. Image adapted from.^[9]

In order to have a better understanding of this mechanism at the atomic level it is important to get information in three dimensions for the polymer coating and the molecules to be considered for transport. To obtain a realistic computer model it is important to choose critical process steps and parameters to be simulated. For the computational simulation of the polymeric coating material a Computational simulator developed in Matlab was used.^[10]

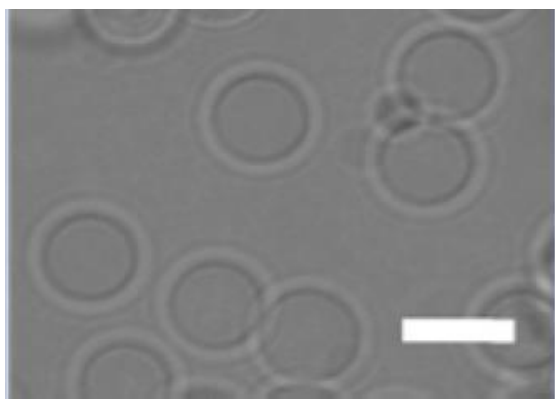


Figure 2 – PAH-capped particles. The scale bar is 5 μm .^[9]

Materials and Methods

To perform the computer simulation the chosen polymer was poly(allylamine hydrochloride) (PAH).

This model was developed and implemented using MATLAB^[10].

Results and Discussion

The computer simulation results are saved as Matlab Matrix structures and images (figures 3 and 4).

The simulation was able to represent the polymer thin layer successfully. Comparing the dimension of the coating polymer thickness obtained in experimental data (Figure 2) with computational simulation the same values were obtained. Porosity is a very important parameter for a drug delivery system and it is obtained by the quantification of the empty and occupied voxels.

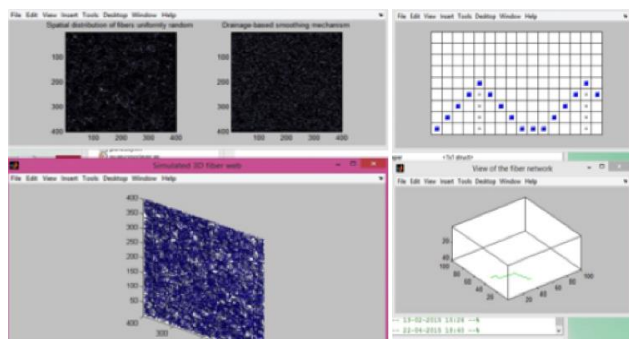


Figure 3 – Computer simulation of PAH, obtained by N.V.D.F. Martins, 2015, from MAT-LAB.

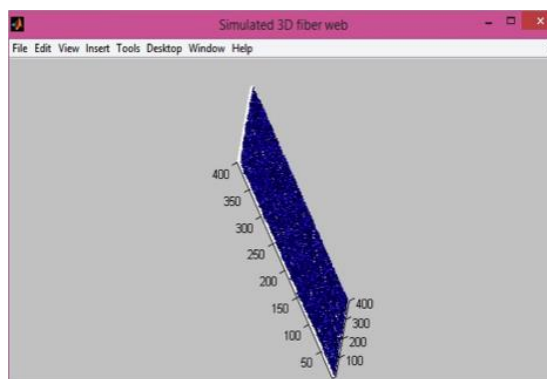


Figure 4 – Computer simulation of PAH (Z view), obtained by N.V.D.F. Martins, 2015, using MATLAB.

This computer model has several advantages when the computational data that reflects the experimental/real data. One of the most important is the simulation of the system in 3D.

Figure 5 presents the chemical formula of the PAH monomer and figure 6 is a 3D representation of the polymer.

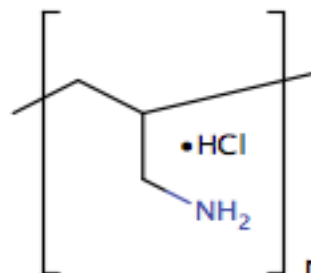


Figure 5 – PAH molecular formula in 2D, obtained by N.V.D.F. Martins, 2016, from MarvinSketch 6.3.0.

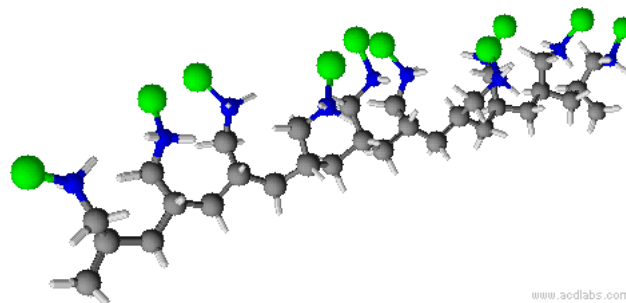


Figure 6 – PAH polymer in 3D, obtained by N.V.D.F. Martins, 2016, from MarvinSketch 6.3.0.

Two-dimensional representations of molecules only illustrate atoms that are bonded together, not mentioning the electronic and steric parameters, and the positions of atoms in space. On the other hand, the three-dimensional representations have several advantages: the molecules can adopt more than one low-energy conformation; the

function of a biological macromolecule is related to its 3D structure; It helps to understand the biological processes at the atomic level; allows to study the interactions between proteins and other molecules; supports in molecular design of specific inhibitors/activators drug candidates.

The validation of the computational model using real experimental data is very important. The results for thickness compared in this work proved that the model significantly fits the experimental data for the coating polymer.

In order to improve the study of these capsules it is important to optimize the thickness, the coating polymer should be as thin as possible. The porosity, linked to the release of the therapeutic molecule, is also an important determination. The possibility to perform hundreds of simulations helps to study the system: to study the influence of input parameters, organize the data, and quantify the changes in the output parameters in order to model and optimize these complex drug delivery systems.

Conclusions

Computer simulation was successfully performed and important parameters were calculated, such as 3D porosity and thickness, which are important for the transport and release of drugs.

The use of validated computational simulations can save a lot of time and resources. It is very important to get the computer simulation in 3D and not only in 2D.

The validation of the computational model was very important, showing great potential for advanced studies of this system or other systems with different cargo and/or materials.

In order to improve this work other input parameters can be optimized to obtain the desired thickness and porosity.

Acknowledgements

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

References

- [1] B. J. Blaiszik, M.M. Caruso, D. A. McIlroy, J. S. Moore, S. R. White, N. R. Sottos, *Polymer* **2009**, 50, 990.
- [2] B. Städler, A. D. Price, R. Chandrawati, L. Hosta-Rigau, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Nanoscale* **2009**, 1, 68.
- [3] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, M. Garstka, S. Springer, W. J. Parak, A. Muñoz-Javier, O. Kreft, A. G. Skirtach, A. S. Susha, Y. Ramaye, *Small* **2007**, 3, 944.
- [4] W. Liu, S. Thomopoulos, Y. Xia, *Advanced Healthcare Materials* **2012**, 1, 10.
- [5] T. Allen, P. Cullis, *Science (New York)* **2004**, 303, 1818.
- [6] J. A. Hubbell, A. Chilkoti, *Science* **2012**, 337, 303.
- [7] M. Zamani, M. P. Prabhakaran, S. Ramakrishna, *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 8, 2997.
- [8] P. Thoniyot, M. J. Tan, A. A. Karim, *Advanced Science* **2015**, 2.

[9] J. J. Richardson, J. W. Maina, H. Ejima, M. Hu, J. Guo, M. Y. Choy, S. T. Gunawan, L. Lybaert, C. E. Hagemeyer, B. G. De Geest, F. Caruso, *Advanced Science* **2015**, 2.

[10] J. M. R. Curto, E. L. T. Conceição, A. T. G. Portugal, R. M. S. Simões, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, Wiley-vch* **2011**, 42, 370.