



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Produção e caracterização de estruturas de
celulose microfibrilada (CMF) e nanofibrilada (CNF)
para o transporte e libertação controlada
de anti-inflamatórios**

Benjamim José Pedro Maielano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto

Covilhã, julho de 2018

Dedicatória

Dedico ao meu irmão, Mpasi Nkanga Pedro Maielano, “Da Kike”

Paz a sua alma!

Não adiante olhar para o céu com muita fé e pouca luta.

“Gabriel pensador”

Agradecimentos

Chegado o fim deste percurso, tenho a primazia de agradecer a todos quanto tornaram possível a concretização deste trabalho.

À Deus, pelo dom da vida e por ter me dado a sabedoria e a saúde durante toda esta trajetória.

À minha Orientadora, Professora Doutora Joana Curto, por aceitar me orientar desde o início de bom grado, pelos preciosos ensinamentos sobre o que é ser um pesquisador. Agradeço pela paciência na compreensão das minhas insuficiências e de me oferecer a possibilidade de apreender e crescer, sendo que a sua palavra de ordem sempre foi a de “trabalhar”.

Agradeço ainda por todo seu apoio moral, material e até financeiro. Sou eternamente grato!

Agradeço à Unidade FibEnTech na pessoa do Seu Coordenador Professor Doutor Manuel Santos Silva e no responsável do grupo, o Professor Doutor Rogério Simões, e a todos integrantes pois sem o seu apoio este trabalho não seria possível. Agradeço aos colegas de laboratório, à Sónia, Vasco, Henrique, Marta e a todos os colegas com que partilhei os laboratórios pelo agradável ambiente. Agradeço de modo especial à Flávia Pinto Morais, colega e companheira de experiências e técnicas de análises, pois sem o seu “olhar clínico” bem como toda sua disponibilidade, este trabalho não conheceria hoje o seu fim. Agradeço por seres a minha fonte de inspiração.

Agradeço ao Departamento de Química, aos seus Professores, bem como do curso de Mestrado em Química Medicinal, em especial aos Professores Paulo Almeida, Isabel Ismael, Albertino, Renato Boto, Professora Ana Carreira Lopes, pela disponibilidade, condições de trabalho e pela partilha dos conhecimentos científicos. Agradeço à Doutora Ana Paula Gomes do Centro de Ótica, pela disponibilidade na análise das amostras a partir do SEM.

Agradeço à turma de mestrado em Química Medicinal 2017, pela amizade e apoio de todos. Em especial o António Selua, Henrique Mariti, Domingos Morais, Cahilo Martins, Pedro Soreiro, Nadir Cardoso, Elías K. Watengala, Panzo Nelo, Milaberta e Marta, pela disponibilidade, amizade e partilha de conhecimentos.

Ao Governo de Angola através do INAGBE, pela oportunidade e pela bolsa concedida. Agradeço à direção do ISCED-Uíge (2016-2017), aos Professores Luís Alberto Lema, Arminda Filipe, Mantantu K. Francisco, Paulo Manuel, Alves Makonga, Nsinga Lufuankenda e Teresa da Glória Paulo, por todo apoio moral concedido.

Obrigada à minha querida Esposa, Maria Rosária Samuel José, especialmente porque a amo.

Obrigada aos meus Pais e irmãos, pela força impulsionadora e incentivo aos meus compadres nomeadamente, Nsevolo Samba, Wakala Muzombo, Ya Fuala, Dalne António, Joaquim Mussandi, Ramos Pedro e Luzizila Salambiako, pela amizade e apoio moral.

Agradeço aos amigos Henrique Nelson Mariti “Kito” e Xavier Jorge Mafuassa “Lunguani” especialmente pela camaradagem e “conversas do Bureau”.

Agradeço todos, que de uma forma direta ou indireta, deram o seu apoio, o meu muito obrigado!

Resumo

A libertação dirigida de fármacos é importante no caso dos fármacos anti-inflamatórios, tais como o Diclofenac e Etoricoxib, para evitar a sua libertação no pH ácido do estômago (pH 2), e conseguir a sua libertação apenas no pH do duodeno (pH 6,6) e minimizar os efeitos secundários adversos na mucosa gástrica. Produziram-se e caracterizaram-se sistemas de entrega de fármacos (SEF) utilizando materiais poliméricos naturais, tais como o alginato, com a função de fixar a estrutura por reticulação, formando um gel, com a incorporação de uma matriz de celulose microfibrilada (CMF) ou celulose nanofibrilada (CNF). Compararam-se os SEF contendo celulose microfibrilada (MFC) e celulose nanofibriladas (CNF) tendo-se concluído que apresentam libertações com perfis diferentes. Para a obtenção laboratorial da CMF fez-se a desintegração e refinação de pasta Kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*, utilizando um refinador PFI laboratorial (9000 revoluções), com a pasta a 10% de consistência, seguindo as normas ISO para a desintegração, refinação e produção de estruturas na forma de folha. Utilizou-se a Carboximetilcelulose (CMC) como aditivo e verificou-se, por medição do ângulo de contacto, que a sua adição aumenta a hidrofiliabilidade das estruturas. A CNF utilizada foi obtida por oxidação com TEMPO seguida de tratamento mecânico num homogeneizador de alta Pressão, a partir de pasta Kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* e a sua caracterização foi feita por MEV. Fez-se a caracterização das fibras de CMF medindo o seu comprimento (0,8mm) e largura (19 μ m), com o MORFI, e a avaliação da drenabilidade das pastas medindo o grau Schopper-Riegler. Verificou-se que o processo de refinação permitiu obter microfibrilação das fibras e diminuiu a porosidade das estruturas. Verificou-se pelos estudos cinéticos que a porosidade da matriz de celulose é importante para a libertação controlada das moléculas terapêuticas, e que os SEF de Celulose não refinada, que apresentam maior porosidade, são os menos eficazes. Os SEF contendo CMF permitem evitar a libertação do Diclofenac no pH do estômago, libertando-o no pH do intestino, enquanto que não se conseguiu libertação dirigida do Etoricoxib com CMF. Os resultados obtidos por simulação computacional indicam que a mistura de CMF e CNF permitirá obter uma porosidade menor, que a obtida apenas com CMF, e sugere-se que se investiguem SEF com mistura de CMF e CNF em trabalhos futuros.

Palavras-chave

Celulose microfibrilada (CMF), Celulose nanofibrilada (CNF), Cinética de libertação, Diclofenac, Etoricoxib, Sistemas de entrega de fármacos.

Abstract

Targeted release of drugs is important in the case of anti-inflammatory drugs, such as Diclofenac and Etoricoxib, to avoid their release into the acidic pH of the stomach (pH 2) and achieve their release only at the pH of the duodenum (pH 6,6) to minimize adverse side effects on the gastric mucosa. Drug delivery systems (DDS) were produced and characterized using natural polymeric materials, such as alginate, with the function of fixing the structure by crosslinking, forming a gel, with the incorporation of a microfibrillated cellulose matrix (MFC) or nanofibrillated cellulose (NFC). The DDS containing microfibrillated cellulose (MFC) and nanofibrillated cellulose (CNF) were compared and presented different delivery profiles. To obtain MFC, the disintegration and beating of bleached Kraft pulp of *Eucalyptus globulus* was carried out using a laboratory PFI refiner (9000 revolutions) with 10% consistency, following ISO standards for disintegration, beating and production the paper sheet form structures. Carboxymethylcellulose (CMC) was used as an additive and the structures affinity with water was verified by measuring the contact angle, and the results indicate that the hydrophilicity of the structures increased with the addition of CMC. The NFC used was obtained by oxidation with TEMPO followed by mechanical treatment in a high-pressure homogenizer, also from bleached Kraft pulp of *Eucalyptus globulus*. The CMF fibers were characterized by measuring their length (0.8mm) and width (19 μ m), with the MORFI, and the evaluation of the drainage of the pulps was done by the Schopper-Riegler degree. It was verified that the refining process allowed to obtain microfibrillation of the fibers and decreased the porosity of the structures. It has been found by kinetic studies that the porosity of the cellulose matrix is important for the controlled release of the therapeutic molecules, and that unrefined cellulose DDS have higher porosity and are not effective. The DDS containing CMF avoided the release of Diclofenac at the pH of the stomach, releasing it at the pH of the intestine while the DDS for Etoricoxib did not. The results obtained by computational simulation and experiments indicate that the mixture of CMF and CNF will originate lower porosity when comparing with DDS obtained with CMF, and it is suggested to be investigated in future work.

Keywords

Diclofenac, Drug Delivery Systems (DDS), Microfibrillated Cellulose (MFC), Nanofibrillated Cellulose (NFC), Etoricoxib, Release Kinetics.

Índice

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1. Introdução e Objetivos	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Sistema de libertação de fármacos (SLF)	2
2.1.1. Definição de sistemas de libertação de fármacos	2
2.1.2. Sistemas de libertação convencional e controlada	2
2.1.2.1. Sistemas de libertação convencional	2
2.1.2.2. Sistemas de libertação controlada	3
2.1.2.2.1. Formas de abordagens dos sistemas de libertação controlada	4
2.1.2.2.1.1. Sistemas controlados por difusão	5
2.2. Polímeros no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos	6
2.2.1. Alginato	7
2.2.1.1. Estrutura química do Alginato	7
2.2.2. Celulose	8
2.2.2.1. Estrutura molecular da celulose	8
2.2.2.2. Geometria das fibras de celulose	9
2.2.2.3. Derivados da celulose	10
2.2.2.3.1. Carboximetilcelulose	10
2.2.2.3.2. Celulose microfibrilada	11
2.2.2.3.3. Celulose nanofibrilada	12
2.3. Moléculas terapêuticas incorporadas nos sistemas de entrega de fármacos	13
2.3.1. Abordagem das moléculas incorporadas. Seu mecanismo de ação	13
2.3.1.1. Etoricoxib Alter, um AINE	14
2.3.1.2. Diclofenac Alter, um AINE	15
2.4. Métodos de caracterização dos materiais fibrosos poliméricos	17
2.4.1. Método de caracterização pelo MORFI	17
2.4.2. Método de caracterização pelo SEM	18

2.4.3. Método de caracterização pelo Ângulo de contacto	18
2.4.4. Método de caracterização pelo grau Schopper-Rieder	18
2.4.5. Método de análise pelo FTIR-ATR	19
2.5. Representação 3D estruturais das moléculas	19
2.6. Simulação computacional e modelação de redes de materiais poliméricos das estruturas	20

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais	26
3.1.1. Materiais fibrosos	26
3.1.2. Reagentes	26
3.2. Métodos	28
3.2.1. Determinação do TMS	28
3.2.2. Tratamento por desintegração das fibras de <i>Eucalyptus globulus</i>	28
3.2.3. Produção laboratorial da CMF a partir da Pasta Kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	29
3.2.4. Formação das estruturas	25
3.2.5. Produção de uma estrutura com CMF e CNF	26
3.2.6. Caracterização biométrica das fibras de <i>Eucalyptus globulus</i> com o Morfi	31
3.2.7. Caracterização da drenagem das pastas de fibras de celulose de <i>Eucalyptus globulus</i> provenientes de pastas Kraft pelo grau Schopper-Rieder	33
3.2.8. Caracterização morfológica das fibras de <i>Eucalyptus globulus</i> pelo SEM	33
3.2.9. Caracterização superficial das estruturas em folha pelo Ângulo de contacto	34
3.2.10. Determinação das propriedades estruturais das folhas de papel	28
3.2.10.1. Espessura	29
3.2.10.2. Gramagem	30
3.2.10.3. Porosidade	
3.2.11. Caracterização das estruturas de folhas pelo FTIR-ATR	36
3.2.12. Produção dos Sistemas de entrega de fármacos (SEF)	36
3.2.13. Estudos cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas	36

3.2. Representação das moléculas em 3D e simulação computacional das estruturas	38
3.31. Representação das moléculas em 3D	38
3.2.9.2. Simulação computacional das estruturas	
APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	41
4.1. Caracterização biométrica das fibras de <i>Eucalyptus globulus</i> pelo MORFI	41
4.2. Caracterização biométrica das fibras de <i>Eucalyptus globulus</i> pelo SEM	41
4.3. Determinação das propriedades estruturais das folhas de papel	44
4.4. Caracterização superficial das estruturas em folhas	45
4.5. Modelação e análise química das estruturas e moléculas terapêuticas	46
4.6. Curva de calibração dos fármacos	47
4.7. Estudos cinéticos dos SEF	48
4.7.1. Estudos cinéticos de libertação do Diclofenac do SEF com CMF	49
4.7.2. Estudos cinéticos de libertação do Etoricoxib do SEF com CMF	51
4.8. Estudos comparativos dos perfis cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas (Diclofenac e Etoricoxib) com a CMF	52
4.9. Caracterização da drenagem das pastas de <i>Eucalyptus globulus</i> utilizando o Grau Schopper-Riegler	54
	55
4.12. Caracterização das estruturas das folhas pelo FTIR-ATR	55
4.13. Estudos de simulação computacional das estruturas e proposta de novos SEF.	
CONCLUSÕES	58
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	70
Anexos A_ Publicações _ Comunicações em póster	70
Comunicação 1	71
Comunicação 2	73
Anexos B_ Normas ISO_ Procedimentos experimentais	77
Anexo B1: TMS_ Norma ISO 638	77
Anexo B2_ Desintegração e refinação mecânica_ Norma ISO 5263 e 5264	77

Anexo B3_ Produção de folhas_ Norma ISO 5269	78
Anexo B4_ Produção de filme em dupla camada _ Norma ISO 5269	79
Anexo B5_ Análise de tamanhos das fibras e quantidades de finos pelo MORFI (Manual do equipamento)	85
Anexo B6_ Análise do grau de drenabilidade/refinação pelo grau Schopper-Rieder_ (Norma ISO 5267)	76
Anexo C_ Procedimentos	82
Anexo C1_ Estudos cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas_ Vijayalakshmi, Gomathi and Sudha, 2014.	82

Lista de Figuras

Figura 2.2.2. Representação característica de concentração no plasma de uma forma de libertação imediata convencional, sustentada e uma forma de dosagem idealizada de libertação.

Figura 2.2.2.1.1. Esquema de dispositivos projetados para libertação controlado por difusão de membrana

Figura 2.3.1.1. Estrutura química do Alginato com duas cadeias lineares de monómeros de ácido beta-D- manurónico e de ácido alfa-L-gulorónico, unidos por ligação glicosídica 1_4.

Figura 2.2.2. Representação característica de concentração no plasma de uma forma de libertação imediata convencional, sustentada e uma forma de dosagem idealizada de libertação.

Figura 2.2.2.1.1. Esquema de dispositivos projetados para libertação controlado por difusão de membrana

Figura 2.3.1.1. Estrutura química do Alginato com duas cadeias lineares de monómeros de ácido beta-D- manurónico e de ácido alfa-L-gulorónico, unidos por ligação glicosídica 1_4.

Figura 2.3.2.1. Estrutura química da celulose.

Figura 2.3.2.3.1. Estrutura química de uma unidade de CMC

Figura 2.3.2.3.2. Equipamento de ângulo de contacto e o resultado da gota sobre uma superfície sólida.

Figura 2.4.1. Enzimas COX 2 e 1 (Diferenciadas pelos amino ácidos valina e isoleucina)

Figura 2.4.1.1. Estrutura química do Etoricoxib

Figura 2.4.1.2. Estrutura química do Diclofenac Alter

Figura 3.1.2.1. Medidor de TMS

Figura 3.1.2.2. Principais equipamentos utilizados para formação das folhas em papel

Figura 3.1.2.3. Refinador PFI

Figura 3.1.2.4.1. Produção laboratorial da CMF a partir da Pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*

Figura 3.1.2.4.3.1. Equipamento MORFI para caracterização biométrica das fibras

Figura 3.1.2.4.3.2. Medidor do grau Schopper-Riegler de Caracterização morfológica das fibras de *Eucalyptus globulus*

Figura 3.1.2.4.3.3. Equipamento SEM

Figura 3.1.2.4.3.4. Equipamento de ângulo de contacto e o resultado da gota sobre uma superfície sólida.

Figura 3.1.2.4.3.5.1. Micrómetro, medidor da espessura das folhas de papel

Figura 3.1.2.4.3.5.2. Balança, medidor de massa das amostras

Figura 3.1.2.4.4. SEF produzido em laboratório

Figura 3.1.2.4.5.1. Curva de calibração do Diclofenac com a matriz de CNF

Figura 4.1. Caracterização biométrica das fibras celulósicas

Figura 4.2.. Caracterização morfológica das fibras celulósicas

Figura 4.3. Caracterização morfológica das fibras celulósicas4.4. Caracterização superficial das estruturas com médias dos valores do ângulo de contacto

Figura 4.4. Caracterização superficial das estruturas com médias dos valores do ângulo de contacto

Figura 4.5. Determinação das propriedades estruturais das folhas de papel

Figura 4.6. Espectro resultante da caracterização das estruturas utilizando FTIR-ATR

Figura 4.7.1. Perfil de libertação do Diclofenac puro em função do tempo

Figura 4.7.2. Perfil de libertação do Diclofenac Alter comercial em função do tempo

Figura 4.7.3. Perfil de libertação do Etoricoxib comercial em função do tempo

Figura 4.9.1. Estrutura dos materiais desenhadas através do programa ChemSketch 12.0

Figura 4.9.2. Exemplo de simulação computacional de um material celulósico poroso utilizando o modelo validado em MATLAB.

Lista de Acrónimos

AINE: Anti-inflamatório não esteroide

CMC: Carboximetilcelulose

CMF: Celulose microfibrilada

CNF: Celulose nanofibrilada

COX: Cicloxigenase

FTIR-ATR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à técnica de reflexão total atenuada

MEV: Microscópio electrónico de Varrimento

MORFI: Morphological Fibre

PG: Prostaglandinas

SEF: Sistema de entrega de fármaco

SEM: *Scanning Electron Microscope*

SLC: Sistema de libertação controlada

TMS: Teor da massa seca

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.Introdução e objetivos

Na área da Química Medicinal é importante escolher materiais biocompatíveis, sendo objetivo deste trabalho escolher sistemas de transporte e entrega dirigida de fármacos escolhendo materiais provenientes de moléculas vegetais biocompatíveis e biodegradáveis, tais como a celulose e seus derivados. Verifica-se que é cada vez maior a preocupação com a biocompatibilidade e o ciclo de vida dos materiais visto que os polímeros sintéticos têm estado, nos últimos anos, a provocar inúmeros danos ao meio ambiente. Um exemplo recente, é o fato da Organização das nações unidas (ONU) ter alertado para a necessidade de se tomarem medidas contra o uso de sacolas plásticas, como parte do desafio global para reduzir e acabar com a poluição dos oceanos (pedido feito na véspera do dia mundial do meio ambiente, em Nova Iorque, a 5 de junho de 2018). Por outro lado, a administração de fármacos com sucesso, constitui um desafio nos nossos dias, devido aos problemas relacionados com o acesso difícil aos respetivos locais de ação, nomeadamente devido aos tempos de sem-vida biológica curtos que apresentam. Isto vem demonstrando a reduzida eficácia das formas farmacêuticas convencionais, na qual, são requeridas várias doses para produzir um efeito clínico. Estes fatores requerem um tratamento minucioso dos tipos de materiais capazes de proporcionar vantagens. Desta forma, os biopolímeros, devido as suas propriedades como, a versatilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, são um ótimo recurso para a minimização das situações do mundo ecológico e medicinal. A escolha recaiu na celulose proveniente da madeira de *Eucalyptus globulus* pois é abundante e muito utilizada em Portugal, e noutros países tais como como o Brasil e a Austrália, na produção de pastas celulósicas. É a partir destas pastas que são produzidos a CMF e CNF, para produção dos SEF. A partir desta base matricial na escala micro e nano, serão incorporadas moléculas terapêuticas, para o transporte e libertação no trato gastrointestinal (pH 6,6), evitando a sua libertação no pH ácido do estômago (pH 2), devido aos efeitos secundários adversos que estes provocam na mucosa gástrica.

Desta feita, pretende-se com este trabalho, produzir e caracterizar sistemas de transportes (SEF) à base de celulose microfibrilada (MFC) e celulose nanofibrilada (CNF) para o transporte e libertação do Diclofenac e do Etoricoxib com vista a conseguir a sua libertação controlada no intestino (pH 6,6).

Para o cumprimento deste objetivo definiram-se os seguintes procedimentos:

1. Produzir em laboratório a CMF por desintegração e tratamento mecânico de refinação a partir de pastas Kraft branqueadas de Eucalipto (a CNF foi produzida a partir da mesma pasta, em trabalhos anteriores, sob orientação da Professora Joana Curto);
2. Caracterizar as fibras e as estruturas produzidas a partir de fibras de celulose não refinada, CMF e CNF que se irão utilizar nos SEF;
3. Produzir em laboratório os sistemas de entrega de fármacos (SEF) utilizando a CMF e a CNF, o alginato e as moléculas incorporadas;
4. Caracterizar os SEF com CMF e estudar a porosidade das estruturas para conseguir a incorporação das moléculas terapêuticas nas estruturas matriciais, o seu transporte e libertação dirigida;
5. Modelar computacionalmente as estruturas poliméricas porosas utilizando um simulador em Matlab previamente validado (Curto et al, 2011) e estudar a influência das dimensões das fibras à escala micro e nano
6. Comparar a cinética de libertação dos fármacos escolhidos a partir dos SEF produzidos contendo CMF e Celulose não refinada, e compará-los com os dos SEF contendo celulose nanofibrilada (CNF).

O trabalho está estruturado em seis capítulos. O primeiro contém a introdução e descrição dos objetivos, o segundo a revisão bibliográfica e os conceitos importantes para o desenvolvimento de sistema de entrega controlada de fármacos, tais como os polímeros utilizados para formação das estruturas de transporte e as técnicas para sua caracterização, determinação da cinética de libertação dos fármacos e a simulação computacional das estruturas. No capítulo três encontra-se informação sobre os reagentes e materiais utilizados, os diferentes procedimentos e equipamentos. No capítulo quatro apresentam-se e comentam-se os resultados obtidos com as diferentes experiências. No capítulo das conclusões e perspectivas, são apresentadas as principais conclusões com base aos resultados e propõe-se ideias para pesquisas futuras. Por fim, no último capítulo apresentam-se as referências bibliográficas que sustentam o desenvolvimento do trabalho.

CAPÍTULO II:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo são explorados os conceitos relacionados com os sistemas de libertação de fármacos, os polímeros naturais, as moléculas terapêuticas (Diclofenac e o Etoricoxib) bem como as técnicas para sua caracterização.

2.1. Sistema de libertação de fármacos

A administração de fármacos¹ com sucesso, é um desafio, por quanto se verificam problemas relacionados com o difícil acesso aos respetivos locais de ação. Isto deve-se em muitos casos, a diversos fatores como, tempos de semivida biológica curtos, dificuldades em atravessarem as mucosas, biodegradação rápida pelas enzimas digestivas, poder antigénio, entre outros (Bodor *et al.* 1987; Rosen and Aribat 2005). Com vista a solucionar tais situações, é necessário associar os fármacos aos sistemas transportadores com propriedades de libertação controlada, permitindo com que estes atuem nos locais de ação desejados, na quantidade desejada e durante o tempo clinicamente necessário. Isto permitirá um aumento do índice terapêutico do fármaco, ou seja, aumentará a razão entre a dose eficaz média e a dose tóxica média, refletindo a eficácia, a seletividade e a segurança do fármaco (Bodor *et al.* 1987).

A necessidade dum sistema de transporte de fármaco, pressupõe controlar a capacidade e o tempo de libertação do fármaco em áreas específicas do organismo, de modos que o benefício clínico da administração destes, seja aumentado, diminuindo desta forma os efeitos adversos (Safari and Zarnegar, 2014).

2.1.1. Definição de Sistema de libertação de fármaco

Por definição, *Sistema de Libertação de Fármaco (SLF)* ou *Drug Delivery System (DDS)* é uma forma de administração desenvolvido para prolongar o tempo de libertação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos (Swarbrick J.,2007; Villanova *et al.*, 2010).

¹ Fármaco, é uma substância química de constituição definida com aplicações como agente preventivo, curativo ou de diagnóstico, que engloba todos os compostos bioativos com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético (Rosen and Aribat 2005).

Utilizando SEF as alterações cíclicas na concentração são eliminadas e a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada. Pode conseguir-se a redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas diariamente (Aulton, and Gennaro, 2005).

2.1.2. Sistema de libertação convencional e controlada

O conceito de formas de libertação prolongada surgiu na década de sessenta do século XX, representando uma evolução relativamente às formas clássicas, ditas de libertação convencional de fármacos. Sendo que as últimas constituem ainda hoje, a maioria dos medicamentos e são caracterizadas por libertarem 80-100% do seu conteúdo em fármaco em menos de uma hora. Por outro lado, os sistemas terapêuticos de libertação não convencional, são designados por sistemas de libertação controlada, definições por vezes pouco precisa, pois a libertação controlada de fármacos pode ser encarada sob perspectivas diferentes. Por se revestirem de carácter oficial, transcrevem-se aqui as definições que constam da legislação da União Europeia² (Cruz *et al*, 2003).

2.1.2.1. Sistema de libertação convencional

As formas farmacêuticas convencionais de fármacos permitem uma libertação rápida e indiscriminada da substância ativa (Hillery, 2001). Este tipo de libertação fornece um aumento simples e transiente do fármaco no sangue, sendo atingido um pico plasmático seguido de uma diminuição da concentração numa forma exponencial. Quando a concentração plasmática se encontra acima da concentração mínima eficaz (dose terapêutica), o fármaco exerce a sua ação farmacológica. E, quando a concentração desce abaixo desse limite, o fármaco torna-se ineficaz no organismo. No entanto, quando a concentração do fármaco se encontra acima do limite superior da

² *Note for Guidance on Quality of Modified Release Products. Section II (Quality).* (CPMP/QWP/604/96). **Sistemas de Libertação Retardada** são medicamentos que libertam os fármacos de modo retardado através de processos de formulação e/ou método de produção. Isto resulta da existência de um período de retenção do fármaco a partir do qual este é libertado, como em qualquer sistema de libertação convencional. **Sistema de libertação Modificada** são medicamentos que libertam o fármaco em local e/ou a velocidade diferente dos sistemas de libertação convencional administrados pela mesma via, o que pode ser obtido através de processos de formulação e/ou método da produção. O conceito inclui a libertação prolongada, retardada, pulsada e acelerada. **Sistema de libertação prolongada** são medicamentos que libertam os fármacos a menor velocidade que os sistemas de libertação convencional administrados pela mesma via, o que pode ser obtido através de processos de formulação e/ou método de produção.

dose terapêutica torna-se tóxico (concentração mínima tóxica). Neste caso, para que a concentração do fármaco seja eficaz e não tóxica, ou seja, se localize dentro do intervalo terapêutico de forma continuada, é necessário administrá-lo várias vezes ao dia, originando variações expressivas dos níveis de fármaco no organismo (Chien, 1992;). Devido a eficácia reduzida apresentada pelas formas farmacêuticas clássicas ou convencionais, sendo necessário administração regular de várias doses para produzir o efeito terapêutico pretendido, surgiu a necessidade de se desenvolverem sistemas não convencionais de libertação de fármacos (Chien, 1992; Li *et al*,1987).

2.1.2.2. Sistema de libertação controlada

Os sistemas de libertação de fármacos são caracterizados por possuírem comportamentos previsíveis e reprodutíveis (Chien, 1992). Estes pressupõem: a obtenção de níveis terapêuticos do fármaco no organismo, através de um mecanismo de libertação a velocidade constante; o direcionamento específico do fármaco para tecidos ou órgãos alvos, não reagindo com tecidos ou órgãos adjacentes; a redução de efeitos secundários; a diminuição da quantidade de fármaco utilizada para valores que correspondam ao estritamento necessário e a consequente diminuição do número de administrações.

Abaixo apresenta-se a figura 2.1.2.2. que mostra o comportamento da quantidade de um fármaco no organismo administrado de três formas distintas: uma forma farmacêutica de libertação imediata convencional (IR), uma forma de dosagem de libertação sustentada (SR) e uma forma de dosagem idealizada de libertação controlada de ordem zero (ZOCR) (em combinação com uma dose inicial) (Remington, 2000).

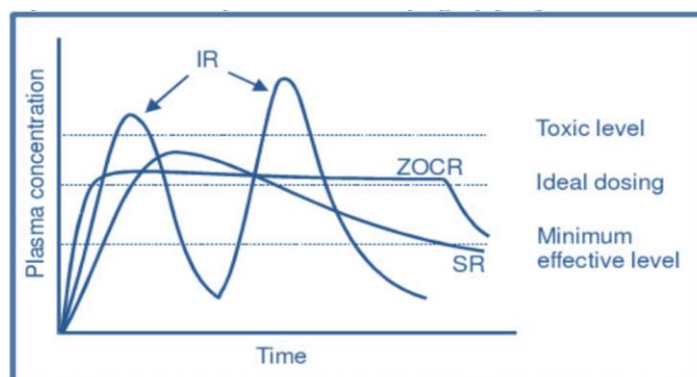


Figura 2.1.2.2. Representação característica de concentrações no plasma da quantidade de um fármaco no organismo administrado de três formas distintas: convencional (IR), libertação sustentada (SR) e libertação controlada de ordem zero (ZOCR) (Adaptado de Remington, 2000 citado por Ummadi *et al*,2013).

No entanto, quando as doses não são administradas dentro do cronograma, os picos e vales resultantes refletem menos do que a terapia medicamentosa ideal. Por exemplo, se doses são administradas com muita frequência, a concentração tóxica mínima (MTC) da droga pode ser alcançada com efeitos colaterais tóxicos. Se as doses forem perdidas, podem ocorrer períodos de níveis sanguíneos de drogas sob-terapêuticas ou abaixo da concentração mínima efetiva (MEC), sem benefício para o paciente (Ansel, 2000). Comprimidos e cápsulas de liberação prolongada são normalmente tomados apenas uma ou duas vezes por dia, comparativamente com formas convencionais que podem necessitar de ser tomadas três a quatro vezes por dia para obter o mesmo efeito terapêutico (Ansel, 2000).

Portanto, os sistemas de liberação controlada, diferentemente dos sistemas convencionais, apresentam características que controlam a velocidade de liberação dos fármacos e que os direcionam para o tecido alvo, mantendo a atividade terapêutica durante o período desejável ou orientando o fármaco especificamente para o alvo pretendido (Chien, 1992; Li *et al*,1987).

2.1.2.2.1. Formas de abordagens dos sistemas de liberação Controlada

Existem diversas formas de abordagem durante o desenvolvimento de Sistema de Liberação Controlada (SLC). As direcionadas para o tipo de material suporte ou para a tecnologia utilizada nos sistemas de liberação controlada: ligação/associação entre o sistema e o material transportado, mecanismo de liberação, via de administração e finalidade. Assim, a classificação usual dos SLC é feita de acordo com os tipos de materiais, com as tecnologias utilizadas na formulação dos mesmos e com os modelos de liberação de fármacos (Cruz *et al.*,2003).

Destas abordagens, a dissertação em causa vai centra-se na vertente Bioquímica e Biotecnológica, naqual são utilizados materiais biológicos e/ou biocompatíveis tais como: macromoléculas de origem natural, células e ainda sistemas coloidais lipídicos e poliméricos (lipossomas, microesferas, nano partículas). A inovação destes sistemas reside nos componentes utilizados na sua formulação, por serem de origem natural, têm a vantagem de não provocarem reações imunológicas indesejáveis, e possuem características que os tornam veículos eficazes no transporte de fármacos instáveis, como, os de natureza proteica e outros de origem biotecnológica (Juliano R. L., 1987).

Para além da natureza do suporte do fármaco, também o seu mecanismo de liberação é uma característica que permite diferenciar os sistemas de liberação controlada. Existem sistemas com liberação controlada pela difusão, pela erosão, osmoticamente e sistemas pusáteis (Chein, 2002).

Os mais comumente utilizados e que vão de encontro aos objetivos definidos nesta dissertação, são os sistemas controlados por difusão.

2.1.2.2.1.1. Sistemas controlados pela difusão

Os sistemas controlados por difusão consistem num dispositivo constituído por um fármaco (podendo estar nos estados sólido, líquido ou ainda gasoso), rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável. Existem dois tipos de sistemas de libertação controlado pela difusão: os sistemas reservatórios e os matriciais. (Sousa *et al*, 1999; Leon L.; Herbert L., 2002). Em teoria são controlados pela lei de difusão de Fick, mas em termos cinéticos possuem mecanismos diferentes.

Num sistema controlado pela difusão em reservatório, o fármaco está revestido por uma membrana polimérica ou incorporado numa matriz polimérica. De um modo geral, os fenómenos ocorrem com a seguinte sequência:

1. A água difunde-se para a membrana ou para a matriz;
2. O fármaco dissolve-se e difunde-se para fora do polímero, conforme se pode observar na figura abaixo.

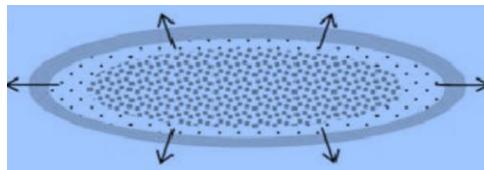


Figura 2.1.2.2.1.1. Esquema de dispositivos projetados para libertação controlada por difusão de membrana. (Adaptado por Ansel *et al*, 2000, citado por Ummadi *et al.*, 2013).

O fármaco no núcleo (padrão granulado) dissolve-se para formar uma solução saturada (pontos diluídos). De seguida, o fármaco se difunde através da membrana para o fluido gastrointestinal (setas com pontas finas). Portanto, as propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, naturalmente, a taxa de libertação do fármaco (Pezzini, Silva and Ferraz 2007; Li and Mooney, 2016).

A lei de Fick (equação 1) permite quantificar o processo de difusão através de uma expressão que traduz a velocidade de transferência, por unidade de superfície, da substância a difundir num meio isotrópico através de uma seção do polímero (Chein, 2002).

$$(1) \frac{dQ}{dt} = -D \frac{dC}{dX} \quad \text{Onde:}$$

dQ/dt traduz a velocidade de difusão, Q é a massa de fármaco transportado no tempo, D é o coeficiente de difusão, C é a concentração de fármacos que difunde e X a direção da difusão do fármaco. Devido a difusão ocorrer na direção oposta à do

aumento de concentração, o segundo termo aparece com sinal negativo. Analisado a equação podemos constatar que, à medida que X aumenta, a massa do fármaco transportada diminui. Para soluções diluídas, o coeficiente de difusão pode ser considerado constante. Porém, quando o SLC é composto por membranas ou matrizes poliméricas, o coeficiente de difusão depende, não só, da concentração do fármaco, mas também, de outros factores, como a densidade de reticulação, o grau de ramificação, o grau de cristalinidade e o tamanho das zonas cristalinas (Sousa *et al*, 1999).

Os sistemas matriciais permitem a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos, podendo ser definido como um sistema que controla a libertação da substância ativa, molecularmente dispersa ou dissolvida num suporte resistente à desintegração (Moraes *et al.*, 2014).

2.2. Polímeros no desenvolvimento de sistemas de libertação fármacos

Os polímeros naturais (ou biopolímeros) são uma das classes de materiais mais versáteis e têm mudado o quotidiano por várias décadas com importantes aplicações na área médica, principalmente em terapias de libertação controlada de fármacos (Pillai; Panchagnula, 2001). Devido as suas propriedades de superfície (hidrofilicidade, lubrificidade, uniformidade e energia de superfície) e físicas (durabilidade, permeabilidade e degradabilidade), são aplicados para se conseguir um controlo temporal ou espacial da libertação de fármacos (Li, 1999), libertando-o em uma taxa controlada do trato gastrointestinal (Zhu, 2002).

A interação de excipientes e fármacos influencia no mecanismo de desintegração, libertação, absorção e biodisponibilidade do fármaco (Jackson *et al.*, 2000). Dependendo do mecanismo de libertação, o pH do polímero também pode ser uma importante propriedade. Quando o fármaco deve ser libertado em um pH específico (ou seja, no trato gastrointestinal ou no colon), polímeros não iónicos não podem ser usados porque eles são pH-independentes. Para alguns comprimidos revestidos o pH é neutro para evitar a interação entre o polímero e o fármaco (Rios, 2005).

Tal como já descrito anteriormente, os polímeros apresentam uma vasta variedade de propriedades como a difusidade, a permeabilidade, a sua natureza elástica, a biocompatibilidade, a fácil biodegradabilidade e a solubilidade, que podem ser combinadas de forma a atingir o tipo desejado de libertação do fármaco (Zhang *et al.* 2015; Oliveira *et al*, 2006; Lopes *et al*, 2005; Ummadi *et al*, 2013). O mecanismo pelo

qual ocorre a libertação deste é também influenciado pela estrutura do polímero utilizado nos SEF. O grau de porosidade do polímero prevalece na taxa de libertação do fármaco. Quanto maior a porosidade, maior a taxa de libertação (Hansen 2013). Os polímeros naturais, comparativamente aos sintéticos, têm sido objeto de investigação na área biomédica e farmacêutica, devido aos fatores acima descritos, que levam a inúmeros benefícios. Entre os polímeros naturais, com maior abundância em organismos naturais e objetos deste trabalho destacam-se o alginato e a celulose (Petersen and Gatenholm 2011; Liechty *et al*, 2010).

2.2.1. Alginato

O alginato é um polímero natural com aplicações ideais no transporte de fármacos, devido as características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada disponibilidade. (Jain and Bar-Shalom, 2014). É isolado de algas castanhas (*Phaeophyceae*), as quais são extraídas com uma solução alcalina diluída que solubiliza o ácido algínico presente, podendo ser convertido num sal do qual o alginato é a forma principal atualmente utilizada (Tønnesen and Karlsen, 2002).

A aplicação de células no interior das esferas de alginato de cálcio, tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para a imobilização de células vivas. (Jain and Bar-Shalom, 2014). As esferas com forma e tamanhos regulares, podem ser obtidas por adição gota a gota de uma solução aquosa de alginato de sódio à solução aquosa de cloreto de cálcio. Estas esferas apresentam elevada estabilidade à mudanças de pH, o que dá vantagem para uma administração oral do fármaco no trato intestinal. Desta forma, os Sistemas de libertação controlada podem ser retidos no estômago durante muito tempo, o que pode melhorar a biodisponibilidade assim como a eficácia terapêutica utilizados para doenças associadas ao estômago.

2.2.1.1. Estrutura química do Alginato

Quimicamente, o Alginato é um polissacarídeo de ocorrência natural, detém um grande potencial no que respeita ao seu uso em SEF pela sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Hua *et al*. 2010).

Sua estrutura consiste em cadeias lineares de monómeros de ácido β -D- manurónico (M) e de ácido α -L-gulurónico (G), unidos por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) em várias proporções. Estas moléculas estão arrançadas na forma de blocos de ácidos manurónico (M) ou gulurónico (G), ligados de forma que a sequência seja alternada (Islam e Karim, 2010).

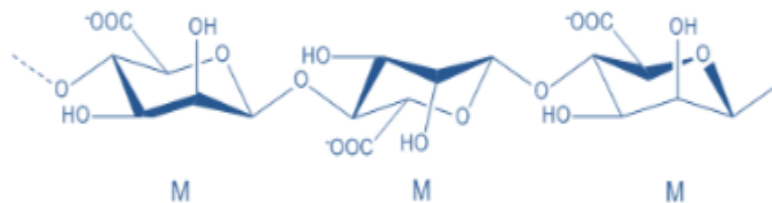


Figura 2.3.1.1. Estrutura molecular do Alginato com cadeias lineares de monómeros de ácido β -D manurónico (blocos homopoliméricos MM), unidos por ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4. (Adaptado por Islam and Karim 2010).

2.2.2. Celulose

A celulose, é um dos polímeros mais abundantes do planeta. Pode ser sintetizada por bactérias sob condições de cultura específicas, produzida e distribuída por fontes como animais marinhos, plantas e fontes bacterianas (Eichhorn *et al.* 2010). A fórmula empírica do polímero da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde “n” corresponde o grau de polimerização. Este polímero é linear, resistente e fibroso, constituído por unidades de glicose, interligadas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), apresentando pontos reativos representados pelas funções dos grupos hidroxilo (Mousa, Dong and Davies, 2016).

2.2.2.1. Estrutura molecular da celulose

A apresentação da estrutura polimérica da celulose surgiu, em 1920, graças a Hermann Staudinger, pelo seu notável domínio em Química macromolecular (Staudinger H.,1920). Através de reações de acetilação e desacetilação da celulose, este investigador reconheceu que a sua estrutura não consistia meramente numa agregação de unidades D-glucose, mas que estas se encontravam ligadas covalentemente entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), formando longas cadeias homopoliméricas. A ligação β implica um desfasamento de 180°C entre um anel piranosídico de glucose em relação ao anterior na cadeia molecular, o que permite considerar a celulose como um β (1 \rightarrow 4) poliacetal de celobiose (Sjostrom E. and Krassing H.A.,1993; Klemm *et al*,1998, citado por Fernandes T.F.,2008).

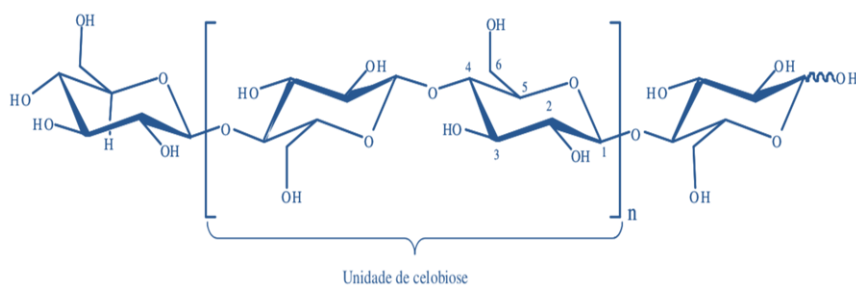


Figura 2.3.2.1. Estrutura molecular da celulose ($n = GP$, grau de polimerização). (Adaptado de Sjotrom E. and Krassing H.A., 1993; Klemm *et al*, 1998, citado por Fernandes T.F., 2008).

O grau de polimerização de uma cadeia de celulose é definido como o número de unidades de anidroglicose ($C_6H_{10}O_5$, massa molecular = 162 g mol^{-1}), ligadas entre si por ligações glicosídicas. A celulose na madeira tem um grau de polimerização entre 5000 e 10000, mas dependendo do método de isolamento, o grau de polimerização pode diminuir, atingindo valores entre 1000 e 3000 nas pastas celulósicas (Sjostrom, 1993; Neto *et al*, 2004 (citado por Fernandes, 2008)). Cada unidade de anidroglicose possui três grupos hidroxilo, nas posições C(2), C(3) e C(6), que atuam como centros reativos, podendo interagir entre si, através da formação de ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares, entre grupos hidroxilo da mesma molécula ou, intermoleculares, entre grupos hidroxilo de moléculas de celulose diferentes. Análises espectroscópicas demonstram que as pontes de hidrogénio intramoleculares ocorrem entre o grupo hidroxilo do C(3) de uma unidade de glucose e o oxigénio do anel piranosídico da unidade de glucose adjacente na cadeia, e entre o grupo hidroxilo do C(6) e o grupo hidroxilo do C(2') de uma unidade de glucose vizinha.

As ligações de hidrogénio estabelecidas entre cadeias de celulose são responsáveis pela formação de fibrilas elementares, considerados os elementos básicos da estrutura supramolecular das fibras de celulose. Estas fibrilas elementares, nas quais zonas cristalinas (cristalitos) alternam com zonas amorfas, formam microfibrilas e macrofibrilas que, por sua vez, se ligam e constituem a fibra celulósica (Sjostrom E. and Krassing H. A., 1993; Neto *et al.*, 2004).

2.2.2.2. Geometria das fibras de celulose

As fibras caracterizam-se pelo seu comprimento L ser superior à dimensão da sua seção transversal (ou diâmetro d) e esta relação comprimento/diâmetro, também conhecida por razão aspecto, pode variar consideravelmente consoante o tipo de fibra. A razão aspecto é uma medida de resistência da fibra, sendo que quanto maior L/d , mais resistente é a fibra e, conseqüentemente, maior será a resistência mecânica do

compósito onde se insere (Agarwal B. D. and Ashbee K.H.G,1990).

A celulose e seus derivados têm sido objeto de intensa pesquisa devido à sua sustentabilidade, biocompatibilidade e biossegurança. (Jorfi and Foster, 2015). Este polímero natural pode também ser reticulado em hidrogéis, devido à sua afinidade com a água. De igual modo, a celulose e seus derivados passam através do corpo humano com segurança e alguns podem ser quebrados por enzimas digestivas, resultando em metabólicos naturais no trato gastrointestinais (Ferreira *et al.*, 2016).

2.2.2.3. Derivados da Celulose

Os derivados de celulose, tiveram um grande impacto no desenvolvimento de várias tecnologias e formas de dosagem farmacêuticas, sendo por isso muito utilizados na indústria, como aglutinantes, no revestimento de comprimidos e como moduladores na preparação de fármacos de liberação controlada (Kamel *et al.*, 2008).

2.2.2.3.1. Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é um éter derivado da celulose, comercializado na forma sólida como sal de carboximetilcelulose de sódio (CMC). É um polímero natural, que possui a estrutura baseado no polímero do β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopirranose da celulose. É atóxico, não carcinogêneo e biocompatível. Tem sido utilizada em processos de encapsulamento e liberação controlada de princípios ativos (Nóbrega e Amorim 2015). Apresenta a fórmula empírica $[C_6H_{10-x}O_5(CH_2CO_2)_x]_n$, onde “x” corresponde o grau de substituição e “n”, o grau de polimerização, sendo o fator que afeta a viscosidade. Este polímero tem estabilidade química elevada, é seguro, biodegradável e solúvel em água com grupos carboxilato e hidroxilo, uma vez que permite interações com partículas metálicas (Butun *et al.* 2011, citado por Morais F.P.,2017).

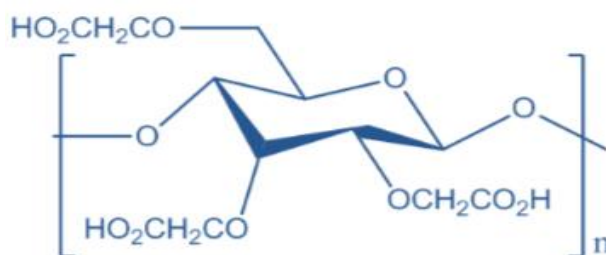


Figura 2.2.2.3.1. Estrutura molecular de uma unidade de carboximetilcelulose (CMC) (desenhada no programa Chemdraw ultra 12.0.2 por Morais F.P.,2017).

2.2.2.3.2. Celulose microfibrilada (CMF)

A CMF pode ser visto como um material celulósico, composto por celulose expandida, de alto volume, moderadamente degradada e amplamente expandida na área superficial, e obtida por um processo de homogeneização (Herrick *et al.*, 1983 e Snyder *et al.*, 1985). A CMF consiste em agregados de microfibrilas de celulose. Seu diâmetro está na faixa de 20-60 nm e tem um comprimento de vários micrômetros. Se considerarmos que as microfibrilas possuem uma estrutura de celulose fibrosa de 2 a 10 nm de espessura e um comprimento de várias dezenas de microns (Siró and Plackett, 2010), a CMF é composto de 10 a 50 microfibrilas e estas dimensões variam de acordo com as diferentes fontes vegetais. A definição mais usada atualmente estipula que uma partícula se encontra em escala nano quando, pelo menos, uma de suas dimensões encontra-se entre 1 e 100 nanômetros.

São obtidas pela desintegração da celulose submetida a um processo mecânico de homogeneização. Esta nano estrutura pode ser obtida por meio de um fibrilador denominado PFI, cujo mecanismo exerce a força de cisalhamento sobre a celulose, ocasionando a quebra de ligações de hidrogênio, individualizando os feixes de microfibrilas da estrutura da parede celular (Siró and Plackett, 2010). A celulose microfibrilada é gerada então por fibrilação onde suas suspensões aquosas resultantes, consistem de redes entrelaçadas e desordenadas de CMF.

A CMF apresenta valiosas propriedades como por exemplo a alta resistência, proveniente do aumento da área de contacto, melhorando as ligações entre as microfibrilas e assim conferindo o aumento das propriedades de resistência (Tonoli, 2012), flexibilidade e razão de aspecto. Por isso, muitos pesquisadores têm direcionado sua atenção para o uso desse material como reforço em compósitos (Lavoine *et al.*, 2012 and Butun *et al.*, 2011).

A figura 2.2.2.3.2. ilustra uma estrutura com os seus diferentes elementos estruturais, desde as microfibrilas à cadeia da estrutura química da celulose.

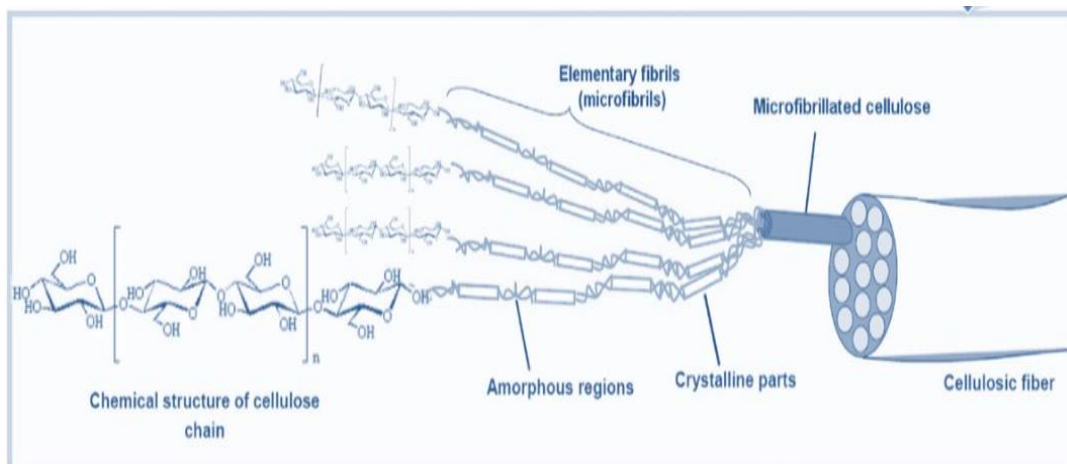


Figura 2.2.2.3.2. Ilustração da CMF (Adaptado de Lavoine *et al.*, 2012)

2.2.2.3.3. Celulose nanofibrilada (CNF)

A celulose nanofibrilada (CNF) é considerada como um nano material celulósico longo e flexível, obtido a partir de fibras de celulose por desintegração mecânica (Missoum, Belgacem and Bras 2013). Consiste em nano fibras de celulose longas, flexíveis e emaranhadas, com aspeto visual de um gel viscoso, de coloração esbranquiçada). Este gel forma-se devido ao forte aumento da área superficial específica e, conseqüentemente, ao maior número de ligações de hidrogénio (provenientes dos grupos hidroxilo) para o mesmo volume em comparação com fibras celulósicas nativas (Missoum, Belgacem, Khalil *et al*, 2014; Safari and Zarnegar, 2012; Lin and Dufresne, 2014; Zimmermann *et al*, 2009). Suas dimensões são variam de acordo com as diferentes fontes vegetais. A tabela 2.3.2.1.2. permite a comparação dos dois tipos de nano celuloses quanto as suas dimensões (Osong, Norgren and Engstrand 2016; Lin N.; Dufresne, 2014).

Tabela 2.2.2.3.3. Dimensões de nano materiais celulósicos (Adaptado de Song, Norgren e Engstrand)

Materiais celulósicos (m/v)	Largura (nm)	Comprimento (nm)	Aspect ratio (comprim/largura)
CMF	10-100	500-10000	50-100
CNF	2-10	>10000	> 1000

2.3. Moléculas terapêuticas incorporadas nos Sistemas de entrega de Fármacos (SEF)

Os SEF foram produzidos laboratorialmente na forma de esferas e incorporados três moléculas terapêuticas, sendo uma pura e duas outras comerciais respectivamente. As moléculas terapêuticas pertencem a família dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), amplamente prescritos e usados como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios.

2.3.1. Abordagem das moléculas incorporadas. Seu mecanismo de ação

As moléculas em abordagem para incorporação nestes sistemas, tratam-se de Diclofenac e Etoricoxib, ambas pertencentes a família dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE).

Todos os AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrointestinais que podem variar de dispepsia até ao sangramento de estômago, podem ativar doenças inflamatórias intestinais aquiescentes e causar dano tecidual (como úlceras) no trato gastrointestinal baixo, geralmente, após um longo período de uso (Breno *et al.*, 2000). As prostaglandinas (PG) são produtos originados do ácido aracdônico, o qual é obtido da dieta ou do ácido linléico, encontrando-se presente em todos os tecidos animais exercendo várias funções.

Quimicamente são parte de um grupo denominado eicosanódes, derivados do ácido aracdônico e lertado de fosfolípideos de membrana de células lesadas, por ação catalítica da fosfolipase A2. As cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e a hidroperoxidase catalisam as etapas sequenciais de síntese dos prostanóides (prostaglandinas clássicas e tromboxanos) e as lipoxigenases transformam o ácido aracdônico em leucotrienos e outros compostos (Breno *et al.*, 2000).

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição específica da COX e consequente redução da conversão do ácido aracdônico ou araquidônico (AA) em prostaglandinas (Júnior *et al.*, 2007 and Breno *et al.*, 2000).

Existem pelo menos duas isoformas de COX que apresentam diferenças na sua regulação e expressão. A atividade de ambas as isoformas são inibidas por todos os AINEs em graus variáveis. A COX-1 e COX-2 possuem 60% de homologia na sua sequência de aminoácidos expressa em muitos tecidos (Figura 2.3.1). As COX-1, ditas como constitutivas, auxiliam na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal (Klippel *et al.*, 2001).

A COX-2 é uma enzima indutível, geralmente indetetável na maioria dos tecidos, sua expressão é aumentada em processos inflamatórios. Sua atividade é importante na modulação do fluxo sanguíneo glomerular e balanço hidroeletrolítico. Sua expressão é inibida pelos glicocorticóides, o que explicaria os seus efeitos anti-inflamatórios (Solomons DH, 2007 and Klippel *at al.*, 2001).

A figura 2.3.1., ilustra imagem das duas COXs diferenciados pelos aminoácidos valina e isoleucina, sendo cada uma com sua atividade específica.

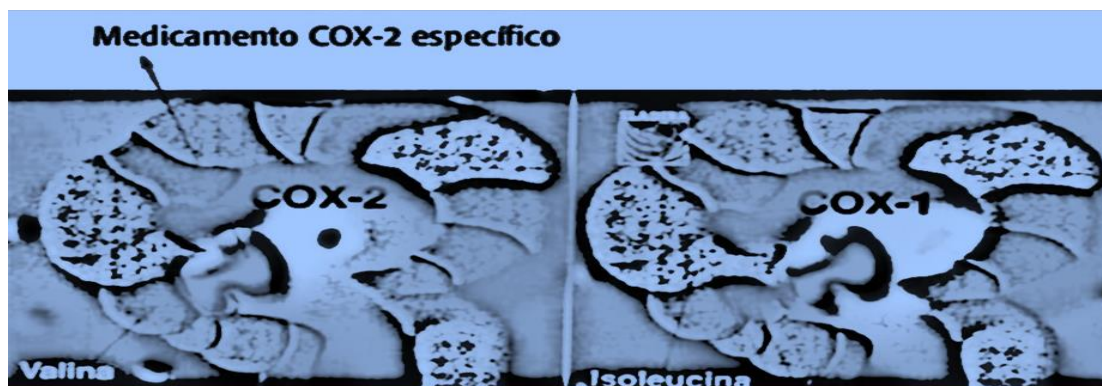


Figura 2.3.1. Enzimas cicloxigenases 2 e 1 (diferenciadas pelos aminoácidos valina e isoleucina, respectivamente) (Adaptado de Solomons DH, 2007 and Klippel *at al.*, 2001).

2.3.1.1. Etoricoxib, um AINE

Farmacologicamente, o Etoricoxib, é uma molécula pertencente à família de analgésicos chamados anti-inflamatórios não esteroides (AINE) de administração oral, cuja substância ativa é o Etoricoxib Alter, sendo comercialmente denominado EXXIV. Quanto as suas propriedades, a Etoricoxib ajuda a reduzir a dor e inchaço (inflamação) nas articulações e nos músculos de pessoas com idade igual ou superior a 16 anos, comosteoartrose, artrite reumatoide, espondilite anquilosante e a gota (INFARMED, aprovado a 01.07.2013). Apresenta efeitos secundários como: dor de estômago forte ou persistente ou se as fezes se tornarem negras. Pode apresentar reações alérgicas que podem incluir problemas na pele, como, úlceras ou vesículas ou inchaço face, lábios, língua ou garganta, que podem causar dificuldades em respirar. Quimicamente, o Etoricoxib (ETX) é 5-cloro-3-(4-metanossulfonilfenil)-2-(6-metilpiridin-3-il) piridina, com fórmula molecular $C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$ (Feng *et al.*, 2018; Kuchana *et al.*, 2014; Singh., *et al.*, 2012). De acordo as literaturas consultadas, o Etoricoxib, pode apresentar comprimentos de onda com máximo de absorvância de 233nm e 284nm. Neste trabalho, considerou-se a absorvância de 233nm, por apresentar valores semelhantes ao experimental no Espectrofotômetro de UV_vis. Quanto ao mecanismo de ação, o Etoricoxib é um inibidor da isoforma 2 da enzima ciclooxigenase (COX-2).

Tem uma seletividade de aproximadamente 106 vezes para a inibição da COX-2 relativamente à COX-1. Isso reduz a geração de prostaglandinas (PG) a partir do ácido araquidônico. Entre as diferentes funções exercidas pelos PG, deve-se destacar seu papel na cascata da inflamação. Os inibidores seletivos da COX-2 mostram menos atividade na COX-1 em comparação com os anti-inflamatórios não-esteroides tradicionais (AINE). Esta atividade reduzida é a causa da redução dos efeitos colaterais gastrointestinais (Feng *et al.*, 2018; Kuchana *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2012). Apresenta os seguintes excipientes: no núcleo: hidróxido de cálcio (anidro), croscarmellose sódica, estearato de magnésio, celulose microcristalina. E, no revestimento do comprimido: hipromelose, dióxido de titânio (E171) e triacetina. Os comprimidos de 30, 60 e 120 mg, contêm também óxido de ferro amarelo (corante E 172) e indigotina (corante E 132) (Feng *et al.*, 2018; Kuchana *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2012).

A figura 2.3.1.1, apresenta a estrutura química do Etoricoxib.

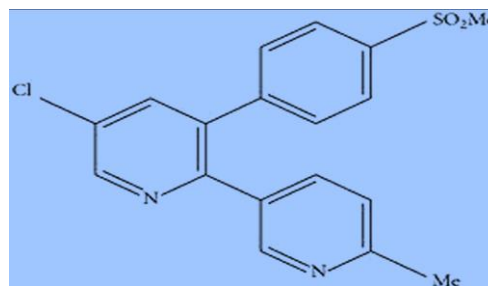


Figura 2.3.1.1. Estrutura química do Etoricoxib (Adaptado de Singh *et al.*, 2012).

2.3.1.2. Diclofenac Alter, um AINE

Farmacologicamente, é uma molécula pertencente à família de analgésicos chamados anti-inflamatórios não esteroides (AINE) de administração oral, cuja substância ativa é o Diclofenac sódico, sendo comercialmente denominado Voltaren. É derivado do ácido fenilacético, que diminui a permeabilidade capilar dos tecidos inflamados (Palomo, Ballesteros and Frutos, 1999).

Apresenta propriedade como Anti-inflamatória, Antirreumática, Analgésica e Antipirética. Provoca efeitos secundários no trato gastrointestinal que em casos isolados provoca estomatite aftosa, glossite, lesões esofágicas, estenoses intestinais, perfurações do intestino grosso. E, no sistema nervosa central, pode causar alterações sensoriais, incluindo parestesias, perturbações da memória, desorientação, depressão, ansiedade etc (INFARMED, aprovado a 11.11.2014)

A inibição da formação de prostaglandinas pela inibição da Ciclooxigenase (COX) é o principal mecanismo de ação (Palomo, Ballesteros and Frutos,1999). Apresenta os

excipientes seguintes: Carboximetilamido sódico, lactose mono-hidratada, povidona K 30, celulose microcristalina, Sílica coloidal anidra, Estearato de Magnésio, Amido de Milho, Hipromelose, Macrogol, Dióxido de Titânio (E172), Óxido de Ferro amarelo (E172), Eudragit L 30 D e Triacetina (INFARMED, aprovado a 11.11.2014).

Quimicamente, o Diclofenac, é ácido [2-(2,6-diclorofenil) amino] fenilacético, apresentando a fórmula molecular $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, com um máximo de absorvância de 276 nm (Palomo, Ballesteros and Frutos, 1999).

Do ponto de vista da sua estrutura, é um híbrido entre derivados da classe do ácido fenâmico e do ácido acético. A sua característica é a presença de um grupo amino secundário (N-H) em ponte com dois anéis aromáticos, representando a fonte de uma série de pontes de hidrogénio intramoleculares em direção a um átomo de cloro e a um grupo carboxílico do outro anel aromático desta molécula. Apresenta ainda, outras pontes de hidrogénio entre grupos carboxílicos de duas moléculas diferentes do fármaco, formando, assim, um dímero. A forma de dímero representa uma unidade estrutural do estado sólido do Diclofenac, como a da maioria dos ácidos carboxílicos. Todas estas ligações envolvem grupos hidrofílicos no interior do dímero inter e intramolecularmente e, portanto, torna o fármaco menos disponível para interações intermoleculares com o meio ambiente, como as moléculas de água do solvente (Fini, Cavallari and Ospitali, 2010).

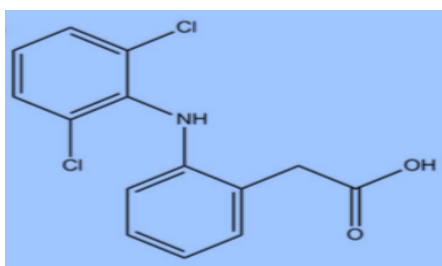


Figura 2.3.1.2. Estrutura química do Diclofenac (Elaborado por Maelano B.J.P.; Curto J.M.R e Mariti H.N., 13.04.2018; sala 4.18; 9h)

A tabela 2.3.1. apresenta o resumo comparativo entre as duas moléculas terapêuticas.

Tabela 2.3.1.Resumo comparativo entre as duas moléculas terapêuticas

Moléculas terapéut.	Nome comercial	IUPAC	Princípio Ativo	Prop. terap	Efeitos Sec	Excipientes	Mec. ação
Etoricoxib	Exxiv	*1	Etoricoxib	Anti-Inflamatório	Dor de estômago e Úlcera	Celulose microcristalina	Inibição cox-2
Diclofenac	Voltaren	*2	Diclofenac Sódico	Anti-Inflamatório	Estomatite e aftosa	Celulose microcristalina	Inibição cox-2

*1_ 5-cloro-3- (4-metanossulfonilfenil) -2- (6-metilpiridin-3-il) piridina. Apresenta fórmula molecular $C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$.

*2_ ácido [2-(2,6-diclorofenil) amino] fenilacético. Apresenta fórmula molecular $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$

2.4. Técnicas de caracterização dos materiais fibrosos poliméricos

No desenvolvimento deste trabalho, algumas técnicas serão utilizadas com o fim de caracterizar os materiais produzidos. Assim, para além das técnicas microscópicas que obedecem a norma ISO, outras consideradas macroscópicas como, o Microscópio electrónico de Varrimento (SEM), o ângulo de contacto e a Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) serão determinantes nesta caracterização. De igual modo, o programa ChemSketch será importante na modelação estrutural das moléculas.

2.4.1. Método de caracterização pelo Morfi

O MORFI (Morphological Fibre) acoplado ao computador, é um equipamento de medição biométricas das fibras, por análise de imagem que permite através do software, obter o comprimento (ponderado em comprimento), o diâmetro médio das fibras e percentagem de finos presentes. De acordo este software, os finos são todas as partículas analisadas com comprimento inferior a 200µm.

2.4.2. Método de caracterização pelo SEM

O microscópio eletrónico de varrimento (em Inglês SEM), é uma técnica capaz de produzir imagens de alta definição da amostra. Para imagens SEM convencionais, as amostras devem ser eletricamente condutoras e ligadas ao suporte para evitar a acumulação de cargas eletrostáticas na superfície. A interação do feixe com a superfície da amostra provoca a emissão de elétrons que são detetados num detetor de alta resolução e a partir desse sinal é realizada a imagem superficial da amostra. A partir das imagens obtidas por SEM é possível retirar informação sobre a rugosidade, porosidade (ou agregados de partículas) e diâmetro das partículas da amostra em causa (Soccio *et al*, 2007). No mesmo equipamento é ainda possível efetuar uma análise Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) que é uma técnica analítica usada para determinar a composição química duma amostra.

2.4.3. Método de caracterização pelo ângulo de contacto

A afinidade do líquido com a superfície sólida denominado por “molhabilidade” pode ser aferida pelo ângulo de contato entre o contorno da superfície da gota e a interface líquido/sólido, que se denomina ângulo de contacto. Esta é uma técnica de superfície que permite determinar o carácter hidrofóbico e hidrofílico da estrutura matricial com a água. Sobre a superfície de cada amostra sólida, é depositada uma gota e é captada uma imagem da gota por uma câmara digital. Os ângulos de contacto são medidos com recurso a um programa existente no mesmo equipamento. Esse programa faz o ajuste do perfil da gota tendo em conta a equação de Young ($\gamma_s - \gamma_{sl} - \gamma_l \cos\theta = 0$), e traça uma tangente ao perfil da mesma, a partir da qual se determina o ângulo de contacto entre o líquido e a amostra (Stay, 2009).

2.4.4. Método de caracterização pelo grau Schopper-Riegler

O grau *Schopper-Riegler* ou grau de drenabilidade, é um método relacionado com a velocidade de perda de água da folha em formação. Consiste em drenar uma suspensão de 2g fibras a 20°C diluída a 1 litro através de uma malha (Norma ISO 5267).

2.4.5. Método de análise pelo Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada à técnica de reflexão total (FTIR-ATR)

A técnica de FTIR-ATR é utilizada para determinar os compostos presentes nas amostras. Permite obter espectros de absorção associados à vibração das ligações químicas dos constituintes da amostra (Zorba *et al*, 2007; Umare *et al*, 2007). O princípio físico baseia-se na interação de um feixe de radiação electromagnética com a amostra na região do infravermelho. Quando a frequência da radiação incidente se aproxima de uma das frequências da vibração de um determinado grupo molecular, a amostra absorve energia o que origina um pico de absorção no espectro. Desta forma, possibilita identificar espécies, grupos funcionais e ligações entre os elementos que constituem o material. Existem vários tipos de vibrações possíveis, identificáveis através da frequência de vibração dada pelo número de onda característico, e desta forma é possível identificar qual o grupo funcional das moléculas da amostra (Zorba *et al*, 2007; Umare *et al*, 2007). A transformada de Fourier apresenta vantagens como: maior velocidade e maior sensibilidade, podendo coletar dezenas de amostras e guardá-las na memória de um computador. Quando se realiza uma transformada de Fourier na soma dos interferograma guardadas, pode-se obter um espectro com uma razão melhor de sinal/ruído (Solomons, 2001).

2.5. Representação 3D estrutural das moléculas

Na Química, as representações estruturais são consideradas fundamentais na natureza do conhecimento químico, por estar ligado à interpretações de imagens utilizadas para representar conceitos. Na Química orgânica em particular, programas de estruturação molecular são capazes de virtualizar estruturas planas e tridimensionais, através de vários softwares. Entre os softwares, é utilizado o Chemskech, para desenhar estruturas, incluindo compostos poliméricos (Gonçalves *et al.*, 2014).

As representações lineares (2D) dos diferentes materiais, apenas ilustram os átomos ligados entre si. Ao passo que as tridimensionais (3D), fornecem inclusive as posições espaciais destes átomos. Por esta representação, as moléculas assumem uma conformação de mais baixa energia, permitindo a boa compressão dos processos biológicos a nível atómico (Curto *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2016).

2.5. Simulação computacional e Modelação 3D de redes de Materiais poliméricos das estruturas

No desenvolvimento e caracterização de SEF na área de Química Medicinal, a otimização das propriedades estruturais para alcançar funcionalidades pretendidas é fundamental. Para tal, a utilização de modelos computacionais 3D demonstrou ser uma ferramenta de elevado potencial para melhorar a eficácia dos sistemas de entrega. A estrutura 3D e a porosidade de SEF poliméricos são determinantes para otimizar a função de transporte e libertação de fármacos a partir destes sistemas (Bhardwaj *et al.* 2013).

A simulação computacional apresenta algumas vantagens, quando comparado com os sistemas produzidos laboratorialmente como: a economia do tempo e dos recursos experimentais, para além de permitir a compreensão das interações entre os SEF e os fármacos, na medida em que estes fármacos se encontram neste formato 3D (Curto *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos (SEF) ou Drug Delivery Systems (DDS) é uma área atual e que conjuga investigações na área da Química Medicinal na qual se destacam os seguintes artigos de revisão (Khalil *et al.*, 2013; Dufresn, A. and Lin N., 2014; Butun *et al.*, 2011; Ummadi *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2009; Lavoine *et al.*, 2012; Shaik *et al.*, 2012; Liechty *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Bhardwaj *et al.*, 2013).

CAPÍTULO III:

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1 Materiais Fibrosos

- Pasta de *Eucalyptus globulus* branqueada obtida pelo processo Kraft não refinada,
- celulose nanofibrilada (CNF),
- celulose microfibrilada (CMF),
- carboximetilcelulose (CMC).

3.1.2 Reagentes

- alginato Sódico,
- Cloreto de Cálcio (CaCl_2),
- Diclofenac
- Eterocoxib

A CMF foi produzida a partir de pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*, utilizou-se um tratamento mecânico designado por refinação, com a pasta a uma consistência de 10%, num refinador PFI, de acordo com a norma ISSO, fazendo uma refinação com 9000 revoluções. As fibras foram colocadas em suspensão utilizando um processo designado por desintegração, utilizando-se a água desmineralizada. A desintegração das pastas fez-se segundo a norma ISO 5269, um desintegrador, marca Karl Frank GMBH-BIRKNAU. Utilizou-se um agitador contínuo com velocidade regulada para manter as fibras em suspensão da marca Heidolph. Utilizou-se água desmineralizada ou água destilada em todas as experiências. Para incorporação nos SEF, foram usados o Diclofenac puro para a reta de calibração, o Diclofenac e Etoricoxib na forma de comprimido (adquiridos numa Farmácia e aprovados pelo INFARMED), ambos pertencentes à família dos anti-inflamatórios não esteroides. A caracterização biométrica das fibras fez-se por análise de imagem das fibras em suspensão no equipamento Morfi da TechPAP versão 7,95. O Grau Schopper-Riegler determinou-se utilizando um dispositivo da marca AB Lorentzen e Wettre, para medição do grau de drenabilidade das pastas e assim acompanhar a refinação das fibras. O Microscópio Eletrónico de varrimento (MEV) ou em Inglês SEM

tem marca Hitachi (Tokyo, Japan, modelo S-2700, Quorum Technologies, United Kingdom e utilizou-se para caracterização morfológica das fibras de celulose. O ângulo de contacto foi medido num equipamento da marca OCAH 200, para a caracterização da superfície das estruturas em folha. O Micrómetro, marca Adamel Lhomargy-CASSEL, utilizou-se para determinação das propriedades estruturais das folhas de papel. Com exceção do SEM que é pertença do Laboratório Ótico da faculdade de Ciências da Saúde, todos os outros equipamentos são do laboratório de Investigação de Fibras do Departamento de Química, Unidade FibEnTech da Universidade da Beira Interior.

Para a elaboração das soluções tampão utilizadas nos estudos cinéticos de libertação, utilizaram-se os seguintes produtos químicos: o Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4), o Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4), a água destilada e o Ácido Clorídrico (HCl). Todos os reagentes se encontram no laboratório referido, com grau de pureza e fornecedor indicados nas fichas técnica dos reagentes. Neste estudo, utilizou-se também uma placa de aquecimento e agitação, com velocidade controlada, marca Heidolph, modelo MR3001K, pertencentes ao laboratório de Investigação de Fibras do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

Quanto a análise da absorvância das moléculas terapêuticas utilizou-se o espectrofotómetro, marca Helios Omega UV- Vis Thermo Scientific, pertencente ao laboratório dos materiais fibrosos e Tecnologia Ambiental da Unidade de investigação FibEnTech da Universidade da Beira Interior. Também foi usada uma célula de quartzo QS-10,00 μ m, fornecida pela professora Joana Curto. Para análise química dos grupos funcionais no infravermelho, foi utilizado o espectrofotómetro FTIR-ATR, marca Nicolet IS 10 Thermo Scientific, do departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

Utilizaram-se ainda outros equipamentos como a balança analítica marca Mettler, modelo Toledo AG104, para determinação das massas; o medidor Metrohm, modelo 827 pH lab, para a determinação dos valores de pH e a balança de infravermelhos, marca Mettler, modelo LJ16 Moisture Analyzer, para determinação do TMS.

Para a modelação molecular das estruturas, utilizou-se o programa ChemsSketch, versão 12.0, disponível na sala de Informática 4.18, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior. Foi igualmente usado Microsoft Office Excel 2010, para análise estatística. Para a simulação das mesmas utilizou-se um simulador de materiais fibrosos desenvolvido e validado (Curto et al.,2011) em MATLAB® versão 7.9.

3.2. Métodos

Neste capítulo, são apresentados os procedimentos para o alcance dos objetivos estabelecidos, seguindo a metodologia apresentada na figura 3.1.



Figura 3.1 Esquema resumos da metodologia adotada no trabalho

3.2.1. Determinação do teor de massa seca (TMS)

O conhecimento do teor de massa seca é fundamental para que se possa utilizar a fibra, pois permite que se obtenha com exatidão a quantidade seca de celulose na amostra. Aplica-se a materiais húmidos, ou higroscópicos como a celulose, sujeitos a aquecimento em condições controladas de laboratório, extraíndo toda a água possível, afim de se obter um material completamente seco. Utilizou-se uma balança de infravermelhos, marca Mettler para determinar a percentagem do material celulósico seco. A figura 3.2 apresenta uma fotografia da balança de infravermelhos, que permitiu a determinação do teor de massa seca.



Figura 3.2. Medidor de Teor de Massa Seca

3.2.2. Tratamento por desintegração das fibras de *Eucalyptus globulus*

Após a determinação do TMS, uma quantidade de pasta seca de 30g de um lote selecionado de Pasta de celulose Kraft foi sujeita a desintegração, para que fosse possível separar as fibras, e obter uma suspensão de fibras, ou pasta. Para tal, efetuou-

Os procedimentos relativos da desintegração foi realizada segundo a norma ISO 5263, que se encontra no anexo B. As imagens da figura 3.3 ilustram os principais elementos usados na desintegração, desde o desintegrador, onde as fibras de celuloses são colocadas em suspensão; o agitador contínuo acoplado ao balde, que faz com que as fibras não se aglomeram; o formador dinâmico, onde as folhas são produzidas até a consequente formação das folhas.



Figura 3.3. Principais equipamentos usados para a formação das folhas em papel.

- a) Desintegrador; b) Agitador contínuo acoplado ao balde; c) Formador dinâmico; d) Folhas em papel formadas a partir do formador dinâmico.

3.2.3 Produção laboratorial da CMF a partir da Pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*

A celulose microfibrilada (CMF), foi obtida por método mecânico, designado de Refinação, a 10% de consistência, antecedido de desintegração segundo as normas 5263 e 5264 e 5269 (as normas utilizadas nas etapas de produção laboratorial da CMF encontram-se no anexo B). A refinação é uma ação mecânica que permite a obtenção de fibras mais flexíveis e homogeneizadas e posteriormente a obtenção de estruturas com poros mais reduzidos (Chinga-Carraco, 2011). Por este processo, são quebradas algumas ligações de pontes de Hidrogénio entre as fibras, bem como a fibrilação da parede celular, podendo ocorrer a produção de finos devido às fortes forças de cisalhamento, que podem por vezes conduzir à rutura da fibra e diminuição do seu comprimento. A refinação foi efetuada em laboratório num refinador PFI (Figura 3.4), segundo a norma ISO 5264, usando-se em cada ensaio 30 gramas de pasta com consistência de 10% e durante 9000 revoluções. Os procedimentos desta operação, estão descritas no anexo B3. A figura 3.4 é uma fotografia do Refinador (PFI Mill-Elnor) do laboratório 1, da Unidade FibEnTech da Universidade da Beira Interior, que se utilizou para a fibrilação das fibras de celulose.



Figura 3.4. Refinador (PFI Mill-Elnor)

3.2.4. Formação das Estruturas

A partir da Pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*, foram produzidas as estruturas em folha utilizando pasta não refinada e pasta refinada (CMF), que serviu de base para produção dos SEF. A formação das estruturas obedeceu a norma ISO 5269 (ver anexo B).

Na figura 3.5. encontram-se fotos da pasta seca se celulose e da pasta de CMF (10% consistência) obtida laboratorialmente a partir de pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*.



Figura 3.5.a) Imagens das folhas de Pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*; b) Pasta de Celulose microfibrilada (CMF) obtida a partir de Pasta Kraft de *Eucalyptus globulus*

3.2.5 Produção de uma estrutura em filme de dupla camada com CMF e CNF

Foi desenvolvido um método para produção de uma estrutura contendo CMF e CNF que consistiu na associação da celulose micro e nanofibrilada em folha de dupla camada. Para o efeito prepararam-se suspensões de CNF e CMF com 0,01% de CMC. Numa primeira etapa, foi despejada a suspensão de CMF num Buchner com papel de filtro e numa segunda etapa a suspensão de CNF, numa quantidade de 50mL para ambas. O tempo de duração da drenagem do filme foi de 52 minutos. Seguidamente, a folha foi colocada no disco e no empilhador e conservada no laboratório condicionado (50% de

humidade relativa e temperatura de 22°C, de acordo com a norma ISO 5269) de forma a manter as mesmas condições de humidade e temperatura.

Nota: As folhas produzidas e utilizadas no âmbito deste trabalho para a caracterização e comparação da celulose não refinada e CMF não foram prensadas, sendo esta uma modificação da norma que se justifica para se poderem obter estruturas mais porosas (menos compactadas por prensagem).

3.2.6. Caraterização biométrica das fibras de *Eucalyptus globulus* utilizando o Morfi

A caraterização morfológica da suspensão de fibras foi realizada através do equipamento de medição por análise de imagem denominado, MORFI (Morphological Fibre) acoplado a um computador, como mostra a Figura 3.5.6 A determinação de tamanhos das fibras e quantidade de finos foi realizada de acordo com o manual do equipamento.

A figura 3.6. inclui uma fotografia do equipamento MORFI (aberto e desligado) e uma imagem dos resultados obtidos no ecrã do computador durante uma análise. Nesta imagem em tempo real podemos observar as fibras e os finos presentes na amostra analisada.

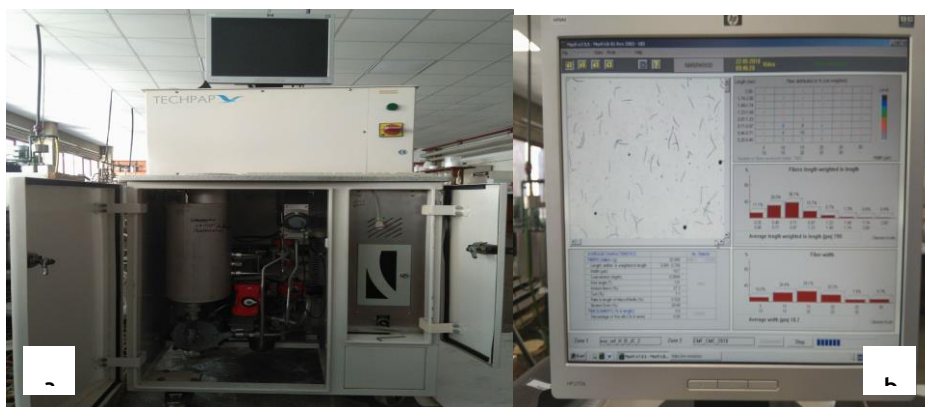


Figura 3.6. Equipamento MORFI para caraterização biométrica das fibras.

Foram analisadas duas amostras de pasta, sendo uma não refinada e a outra refinada (CMF), ambas com CMC a 0,01%.

3.2.7. Caracterização da drenagem das pastas de fibras de *Eucalyptus globulus* utilizando o grau Schopper-Rieder (SR)

O grau SR é uma propriedade que indica o grau de dificuldade na drenagem das pastas e que está relacionada com as características químicas e morfológicas das fibras. Consiste em drenar uma suspensão de 2g fibras a 20°C diluída a 1 litro através de uma malha. A água vai drenar para um funil que contém duas aberturas com diâmetros diferentes e a alturas diferentes. Se a drenagem for muito rápida, a água acumula no cone e sai maioritariamente pela abertura superior e de maior diâmetro, caso contrário, a água escoo pela abertura inferior. A água que escoo pela abertura superior cai num copo graduado de 100 a 0, base para o topo, de tal forma que, se a drenagem for muito fácil, a estrutura será mais aberta e o grau Schopper-Riegler será mais baixo. Caso contrário, a estrutura será mais fechada e consequentemente, maior será o grau Schopper-Riegler. O método para determinação do grau Schopper-Riegler (°SR) foi realizado segundo os procedimentos da norma ISO 5267 (anexo B7) para a pasta não refinada e refinada (CMF).

A figura 3.1.2.5.2. Apresenta a imagem do equipamento que permitiu a determinação do grau Schopper-Riegler das estruturas.



Figura 3.7. Medidor Grau Schopper-Riegler

3.2.8. Caracterização morfológica das fibras de celulose de *Eucalyptus globulus* provenientes de pastas Kraft utilizando Microscópio Electrónico de Varrimento (MEV)

Para análise neste trabalho, foram utilizadas fibras de celulose de *Eucalyptus globulus* provenientes de pastas Kraft. Estas pastas foram desintegradas e refinadas de forma a obter fibras de celulose microfibrilada (CMF).

O procedimento de preparação da amostra para o MEV (ou SEM em Inglês) consistiu no corte da amostra em na sua colocação num suporte de alumínio com ajuda de uma fita adesiva, em dois planos, o xy da face da folha e o z da espessura da folha. Em seguida as amostras foram revestidas de ouro de modos a torna-las condutoras, usando um sputter Quorum Q 15 OR ES, e por fim colocadas no microscópio eletrónico.

A figura 3.8. ilustra o equipamento SEM da Faculdade de Ciências de Saúde da UBI utilizado para a análise das amostras, com a assistêncda Doutora Ana Paula Gomes.



Figura 3.8. Equipamento SEM da FCS da UBI

3.2.9. Caraterização superficial das estruturas em folhas utilizando o ângulo de contacto

A determinação do ângulo de contacto entre uma estrutura em folha (ou filme) e a gota de água colocada, é uma técnica de caracterização da superfície que permite determinar o carácter hidrofóbico ou hidrofílico da estrutura em que se coloca a água. Foram analisadas várias amostras de folhas não refinadas e folhas refinadas (CMF) com o aditivo CMC com diferentes concentrações (0,1%, 0,01% e 0,001%), tendo sido realizados três ensaios para cada tipo de folha.

Para a análise das amostras, usou-se os procedimentos descritos por Stay, 2009 e o manual do equipamento. Sobre a superfície de cada amostra foi depositada uma gota. Posteriormente é captada uma imagem da gota por uma câmara digital e os ângulos de contacto são medidos com recurso a um programa existente no mesmo equipamento. Esse programa faz o ajuste do perfil da gota tendo em conta a equação de Young ($\gamma_s - \gamma_{sl} - \gamma_l \cos\theta = 0$), e traça uma tangente ao perfil da mesma, a partir da qual se determina o ângulo de contacto entre o líquido e a amostra.

A imagem 3.1.2.5.4. ilustra o equipamento de ângulo de contacto e o resultado da gota sobre uma superfície.

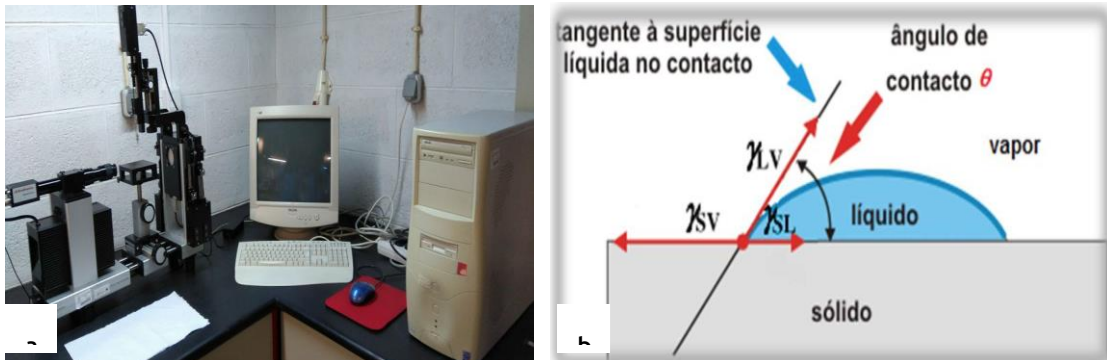


Figura 3.9. a) Equipamento de ângulo de contacto (b) esquema da gota sobre a superfície (Adaptado de Feng L. *et al.*, 2002).

Se o espalhamento da gota for completo, o ângulo de contacto tende a zero, correspondendo a materiais hidrofílicos. Quanto menor é o valor mais afinidade o material tem com a água. Se o ângulo de for maior que 90° o material é hidrofóbico.

3.2.10. Caraterização das Estruturas

Após serem produzidas, as folhas de pasta Kraft de *Eucalyptus globulus* não refinadas e refinadas (CMF) caraterizaram-se com base nas suas propriedades físicas estruturais determinando-se a espessura, gramagem e porosidade.

3.2.10.1 Espessura

A Espessura refere-se à distância entre as duas faces da estrutura em folha e mede-se em milímetros (mm). Para determinação da Espessura, utilizou-se o equipamento de medição denominado Micrómetro. Para este ensaio foram efetuadas três leituras por cada folha. A figura 3.10 apresenta o equipamento utilizado para medição da Espessura das estruturas de folha em papel.



Figura 3.10. Micrómetro, medidor da Espessura das folhas de papel

3.2.10.2 Gramagem

A gramagem consiste na massa da estrutura por unidade de área e expressa-se em g/m². Para este ensaio produziram-se folhas com 60 g/m², segundo a Norma ISO 536. Como se pretendia produzir folhas com uma gramagem de 60±2,0 g/m² e as folhas são circulares e de 20 cm de diâmetro. Apresenta-se um exemplo dos cálculos que se utilizaram para determinar o volume da suspensão a utilizar para obter a massa pretendida para as folhas, em base seca, segundo a norma ISO 5269.

Área da folha isotrópica $\cong 0,02138 \text{ m}^2$

1 m² de papel \leftrightarrow 60 gramas o.d.

0,02138 m² de papel \leftrightarrow X gramas o.d. ; X= 1,28g

Determina-se a consistência da pasta no recipiente de 6l tirando uma amostra de volume conhecido e determinado a massa seca. Para uma amostra tirada do reservatório com a suspensão da pasta em agitação contínua de 400 mL de suspensão de fibras e uma massa de 1,55g seca (o.d. ou “oven dried” ou “seca em estufa”) de fibras (exemplo de consistência determinada através da folha teste)

Calculam-se o volume (ml) de suspensão de fibras que tem 1,28 g de pasta seca.

3.10.3. Porosidade

A porosidade é definida como sendo a razão em percentagem entre o volume dos poros do papel e seu volume total e determinou-se utilizando os valores da massa e espessura utilizando uma folha de cálculo em excel

$\rho = \text{volume total} - \text{volume vazio} / \text{volume total} * 100$, onde:

- *Volume total da folha* = Área de base*altura. A área da base = $\pi * r^2$ e $r^2 = d/2$
 - *Volume vazio (volume da celulose)* $\rightarrow \rho = m/v$ (volume do vazio) e $v = m / \rho$
- Utilizou-se um valor de densidade da celulose de 1,5 e um valor de raio da folha de 8,305 cm. Os valores de espessura e massa das folhas foram determinados para dez folhas e utilizadas suas médias ponderadas.

3.11. Caracterização das estruturas de folha utilizando Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ATR

A técnica de FTIR-ATR foi utilizada para determinar quais grupos funcionais presentes e os os compostos presentes nas amostras. Para análise das amostras foi usado o Espectrofotómetro, marca Nicolet IS 10.

3.12. Produção dos Sistemas de Entrega de Fármacos

Os sistemas de entrega de fármacos, foram produzidos em laboratório, na forma de esferas, seguindo procedimentos adaptados da literatura (Vijayalakshmi, Gomathi, and Sudha 2014). Produziram-se SEF na forma de esferas, e procedeu-se a incorporação nos sistemas poliméricos das moléculas terapêuticas: o Diclofenac e o Etoricoxib. Ambas as moléculas pertencem à mesma família dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE) com propriedades medicinais similares. Utilizaram-se as moléculas contidas nas formas comerciais e o Diclofenac de pureza analítica para a determinação da reta de calibração. As esferas foram preparadas por mistura da solução de Alginato 2% (m/v) com a matriz refinada de CMF em suspensão e com as moléculas terapêuticas na mesma proporção, com homogeneização a 1000 rpm, durante cerca de 30 minutos. Após este processo, a mistura preparada foi em seguida adicionada gota a gota a uma solução de CaCl_2 0,02M, com o auxílio de uma pipeta graduada, de forma a obter os SEF na forma de esferas. Estas esferas foram deixadas nesta solução durante 24 h. Por fim, as esferas foram filtradas e enxaguadas e lavadas com água destilada, seguindo-se a sua de secagem, sendo o total de esferas produzidas cerca de 120, e a sua massa determinada.

A imagem da figura 3.1.2.6. ilustra os sistemas produzidos em laboratório e conservado para posterior análise.



Figura 3.11. a) Sistemas de entrega de fármaco (SEF) produzidos em laboratório; b) conservação dos SEF na solução de CaCl_2 .

Produziram-se de sistemas de transporte com o Diclofenac puro para se poderem comparar com os sistemas produzidos com as moléculas terapêuticas contidas nos comprimidos comerciais aprovados pelo INFARMED com dosagem conhecida. Utilizou-se Diclofenac de pureza analítica incorporado com uma suspensão de CMF refinada (0,01% CMC) e seguiram-se os procedimentos já descritos para a produção dos sistemas de transportes.

3.13. Estudos cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas

Os Estudos Cinéticos, consistiram na retirada de amostras ao longo dum determinado tempo e analisadas às suas absorvâncias, através do Espectrofotómetro de Uv-vis. Os estudos realizaram-se em laboratório seguindo procedimentos descritos por Vijayalakshmi, Gomathi, and Sudha 2014 (ver anexo C1).

Os ensaios envolveram as esferas produzidas em laboratório com incorporação de três moléculas terapêuticas, sendo uma pura (Diclofenac) e outras duas de formulações comerciais (Diclofenac e Etoricoxib). Foram preparadas três soluções, sendo a solução tampão HCl, para igualar o pH do estômago (2), a solução tampão fosfato, para igualar o pH do intestino (6,6) e outra solução tampão fosfato, para igualar o pH da corrente sanguínea (7,4). A figura 3.1.2.7. ilustra o fenómeno da desintegração do fármaco de Diclofenac a partir dos sistemas nos minutos 20 e 60 do ensaio, bem como o Espectrofotómetro que serviu de análise das absorvância.



Figura 3.12. Estudos cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas. a) Esferas em solução tampão nos minutos 20 e 60 dos ensaios; b) Desintegração completa dos SEF; c) Espectrofotómetro Uv-vis, que serviu para a análise da absorvância das amostras.

3.3. Caracterização estrutural e simulação computacional das estruturas

Utilizaram-se simulações computacionais para obter as representações estruturais das moléculas 3D a das estruturas das matrizes formadas com as fibras utilizados.

3.3.1. Representação das moléculas em 3D

Utilizou-se o software ChemSketch, para a representação estrutural das moléculas em estudo. As representações lineares (2D) das diferentes moléculas ilustram os átomos ligados entre si e as representações tridimensionais (3D), fornecem as posições espaciais destes átomos. Fizeram-se as estruturas 3D da moléculas mais importante dos SEF, para se visualizarem os grupos funcionais dos monómeros dos materiais poliméricos como o alginato de sódio, a celulose e seus derivados (CMC) bem como dos fármacos incorporados (Diclofenac e Etoricoxib).

3.2.1.2. Simulação computacional das estruturas

Produziram-se estruturas no simulador computacional implementado e validado em MATLAB® (Curto *et al*, 2011), que permitiu a modelação computacional das fibras celulósicas porosas de acordo com as suas dimensões e flexibilidades. Utilizou-se o simulador com o propósito de comparar as simulações com as estruturas produzidas em laboratório e prever que pode acontecer com a mistura de fibras.

No simulador as fibras são posicionadas aleatoriamente e orientadas no plano xy para simular a formação das estruturas 3D produzidas no laboratório. O simulador permitiu obter diversas imagens computacionais, que foram analisadas de forma a compreender como seria possível com os mesmos elementos fibrosos obter várias possibilidades para a porosidade, dimensão e variabilidade dos poros da matriz polimérica.

CAPÍTULO IV:

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4. Apresentação e discussão dos resultados

Neste capítulo, são apresentados, analisados e discutidos os resultados obtidos seguindo a metodologia apresentada na figura 4.1.

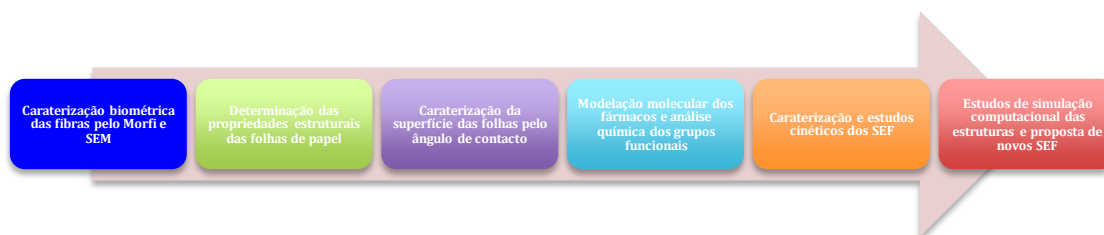


Figura 4.1. Esquema resumo exemplificativo da metodologia seguida

4.1. Caracterização biométrica das fibras de *Eucalyptus globulus* utilizando o MORFI

Caraterizaram-se as pastas de celulose não refinadas e refinadas (celulose microfibrilada) obtidas a partir de pasta Kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. Utilizou-se a CMC como aditivo com o valor de referência de 0,01%. Na tabela 4.1 apresentam-se os resultados da análise biométrica das pastas não refinadas e das refinadas.

Tabela 4.1. Caracterização biométrica das fibras utilizando o MORFI

Materiais (Pasta m/v)	Comprimento* (mm)	Largura (μm)	Curvatura (%)	Massa linear(mg/m)
Não refinada	0,8	19,3	7,4	0,07
Refinada	0,8	18,6	7,2	0,07

*comprimento pesado em comprimento

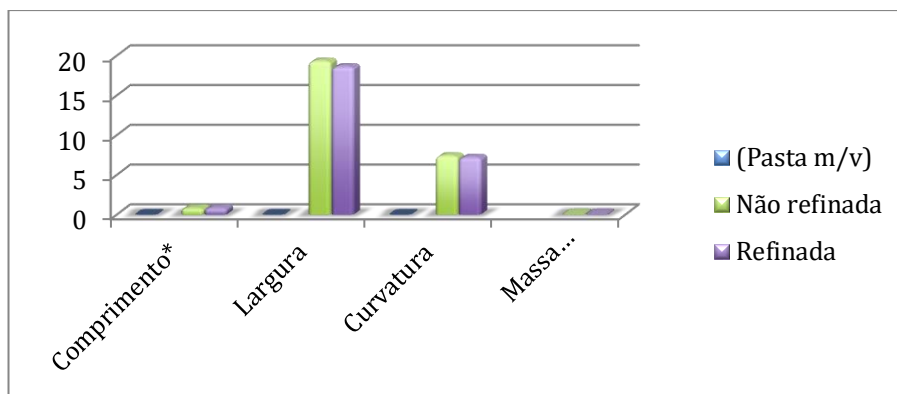


Figura 4.1. Caraterização biométrica das fibras pelo MORFI

Observa-se que as fibras de ambas as amostras apresentam dimensões aproximadas quanto ao comprimento, largura, curvatura e massa linear. A diminuição na largura para as fibras de pasta refinada é consistente com a perda de parte da parede da fibra por fibrilação. A percentagem de finos também foi avaliada, no entanto os valores obtidos precisam de confirmação.

4.2. Caraterização das folhas utilizando o SEM

Neste trabalho produziram-se e caracterizaram-se folhas de pasta de celulose não refinada e refinada.

Na figura 4.2.a) apresenta-se a imagem das folhas obtidas a partir de pastas de fibras não refinadas. Na figura 4.2.b) as imagens são da mesma pasta após refinação e nesta visualizam-se microfibrilas, isto é fibrilas com tamanhos na escala micro, podendo concluir-se que é celulose micro fibrilada (CMF)

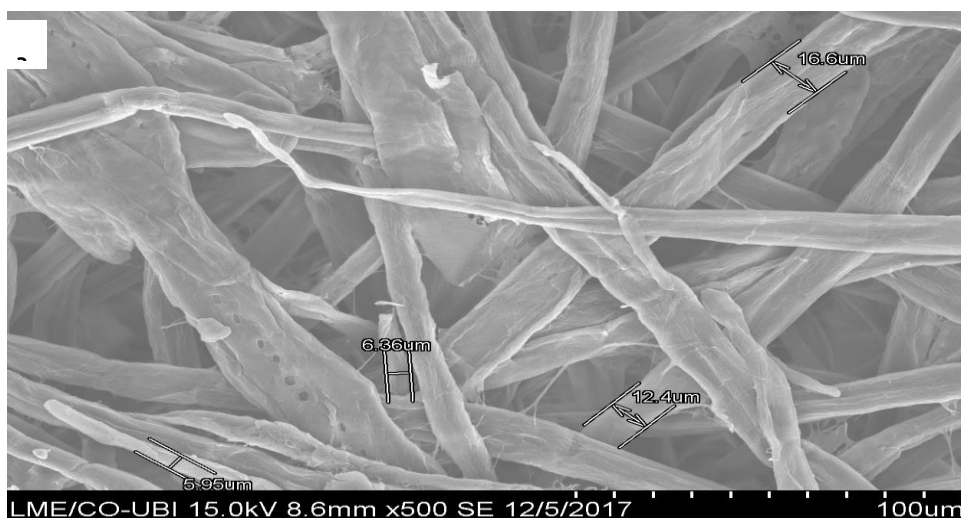




Figura 4.2.a) Imagem obtida no Microscópio Eletrónico de Varrimento de pasta não refinada e b) pasta refinada (ampliação de 500x).

Na figura 4.2 podem visualizar-se as microfibrilas com tamanhos na escala micro, resultantes da refinação das pastas.

A tabela 4.2. apresenta as dimensões retiradas de diferentes pontos duma folha, com uma ampliação de 500 vezes.

Tabela 4.2. Caracterização biométrica das fibras celulósicas utilizando SEM

Material (Pasta m/v)	CMC (%)	Médias biométricas das fibras (µm)
Não refinada	—	16,6
		12,4
		5,95
		total: 34,95
Refinada	0,01	4,44
		6,46
		8,52
		total: 19,42

4.3. Determinação das propriedades estruturais das folhas de papel

Determinaram-se as propriedades das de folhas de papel provenientes de pastas Kraft de *Eucalyptus globulus*, para além das características biométricas e estruturais já descritas, foram também determinadas a espessura, a gramagem e a porosidade das folhas.

A tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para as propriedades das folhas de papel: espessura, massa e porosidade. Estes resultados médios obtiveram-se a partir da medição de dez folhas, e os valores da média aritmética determinaram-se utilizando o programa Microsoft Excel. A porosidade obteve-se a partir dos valores da espessura e da massa, utilizando os valores para a densidade da celulose e do raio conhecidos.

Tabela 4.3. Resultados da determinação das propriedades estruturais das folhas de papel

Materiais (Pastas m/v)	CMC %	Espessura (mm)	Massa (g)	Porosidade (%)
Não refinada	0,1	0,194	1,3622	74
Não refinada	0,01	0,202	1,4053	76
Não refinada	0,001	0,205	1,417	76
Refinada	0,1	0,146	1,391	56
Refinada	0,01	0,144	1,43	66
Refinada	0,001	0,146	1,397	66

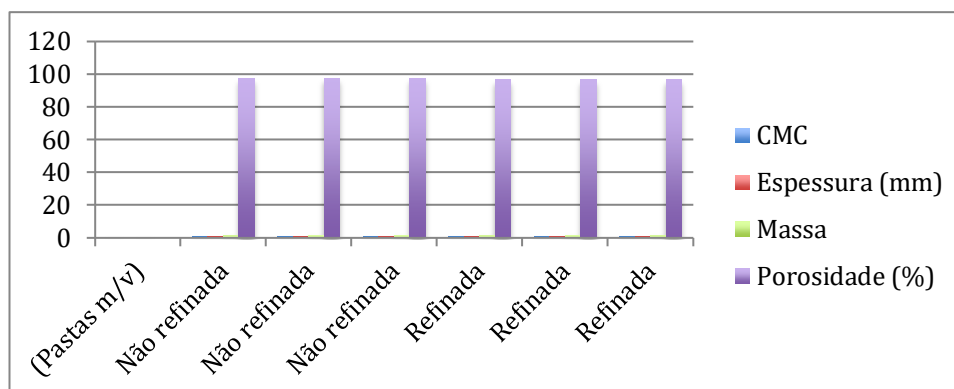


Figura 4.3. Determinação das propriedades estruturais das folhas de papel

A porosidade é importante nos sistemas de entrega de fármacos, na medida em que os

poros são necessários para reter as moléculas. As dimensões dos poros também são importantes para retardar a sua libertação. Pela análise dos resultados, pode-se concluir que o tratamento por refinação diminui a porosidade comparativamente às fibras não refinadas.

4.4. Caracterização superficial das estruturas em folhas

As folhas foram caracterizadas medindo o ângulo de contacto. Este permite obter informação sobre a superfície, afim de determinar-se sua afinidade com a água, ou seja, o carácter hidrofóbico ou hidrofílico da folha que se está a analisar.

Foram analisadas seis amostras, das quais, três de folhas não refinadas e outras com folhas refinadas, contendo o aditivo CMC em diferentes concentrações (0,1%, 0,01% e 0,001%). Das análises, resultaram as respetivas médias que estão apresentadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4. caracterização superficial das estruturas e respetivos valores dos ângulos de contacto

Materiais (Pasta m/v)	Nº pontos	CMC %	Média dos ângulos de contacto (θ)
Não refinada	3	0,1	30-35
Não refinada	3	0,01	30-35
Não refinada	3	0,001	53 (não tem significado)
Refinada	3	0,1	41
Refinada	3	0,01	45
Refinada	3	0,001	45

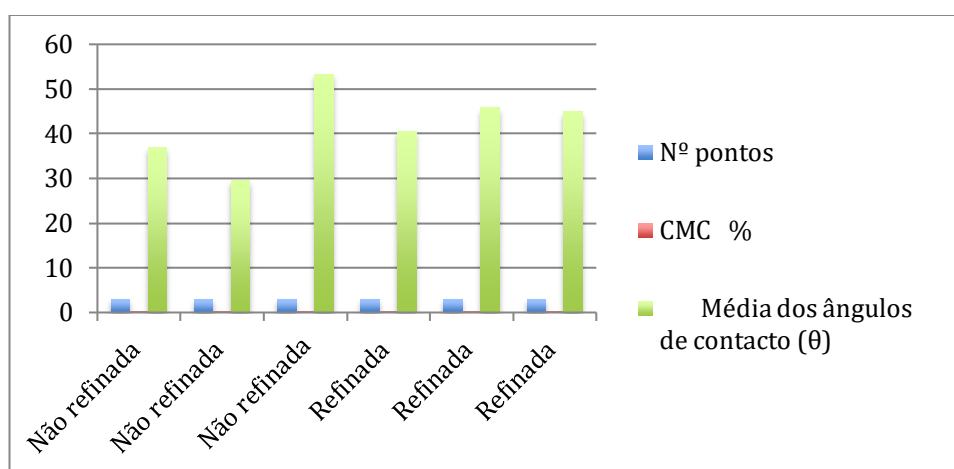


Figura 4.4. caracterização superficial das estruturas e respetivos valores dos ângulos de contacto.

Os valores do ângulo de contacto inferior a 90 graus indicam o carácter hidrofílicos dos materiais em estudo. Pode verificar-se que na pasta Kraft refinada a adição de CMC origina estruturas mais hidrofílicas, com valores de ângulo de contato inferiores. O valor do ângulo de contato da pasta Kraft não refinada traduz o fato de serem estruturas muito porosas, em que há absorção da gota, o que origina valores na medição do ângulo de contato irregulares, o que significa que valor de 53 não tem significado efetivo.

4.5. Modelação e análise química das estruturas e moléculas terapêuticas

A figura 4.5, apresenta as estruturas de Alginato, Celulose, CMC, Diclofenac comercial e Etoricoxib desenhadas através do programa ChemSketch 12.0 da sala 04.18 da UBI. Estão apresentados na forma linear (2D) e em 3D.

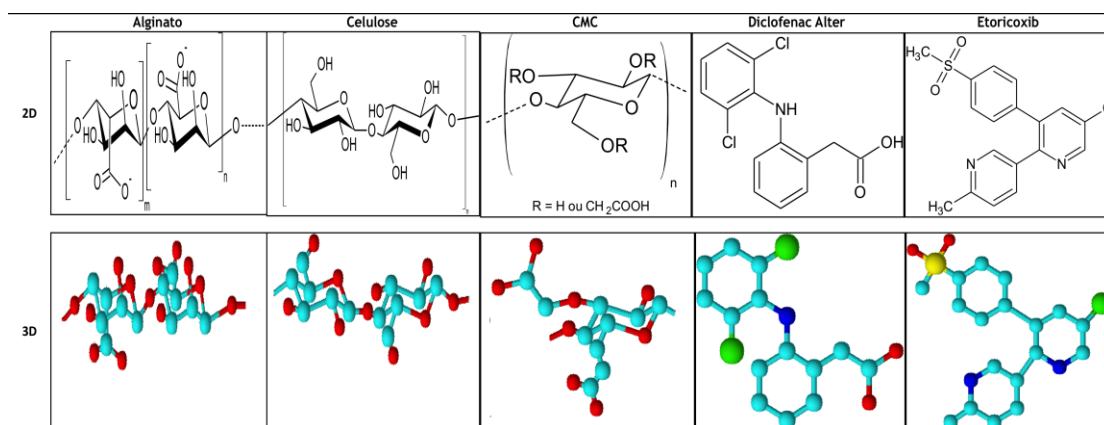


Figura 4.5. Estruturas dos materiais desenhadas através do programa Chemsketch 12.0 na forma linear (2D) e 3D. (Elaborado por Maielano B.J.P.; Curto J.M.R e Mariti H.N., 13.04.2018; sala 4.18; 9h).

As representações em 3D permitiram uma melhor visualização da disposição no espaço dos átomos de cada molécula, mostrando deste modo as respetivas flexibilidades conformacionais. De igual modo, permitiram a visualização dos volumes que ocupam as nuvens electrónicas das respetivas moléculas, além de serem visualizadas os diferentes grupos expostos, que permitam a ligação intra e intermolecular. Quanto as moléculas terapêuticas, as representações 3D permitiram uma melhor visualização da estrutura molecular, sendo que a do Etoricoxib é mais complexa que a do Diclofenac.

4.6. Curva de Calibração do Diclofenac

A figura 4.6 apresenta o gráfico que relaciona a concentração do Diclofenac com os valores de Absorvância, para um comprimento de onda de 276nm (Morais, 2017). Pode verificar-se que a molécula do Diclofenac apresenta uma relação linear entre a concentração e a Absorvância ($r=0,9993$), e que de acordo com a lei de Lambert-Beer, pode utilizar-se a reta apresentada para calcular a concentração desta molécula nos estudos cinéticos.

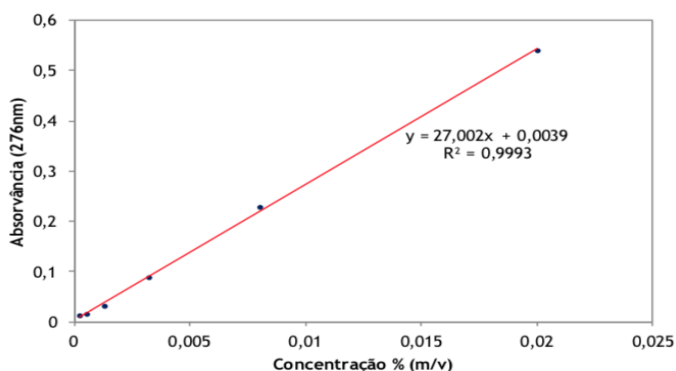


Figura 4.6. - Curva de calibração do Diclofenac (Morais,2017).

4.7. Estudos cinéticos dos SEF

Os resultados dos estudos cinéticos apresentam-se nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9 e 4.10.

4.7.1. Estudo cinético de libertação do Diclofenac do SEF com CMF

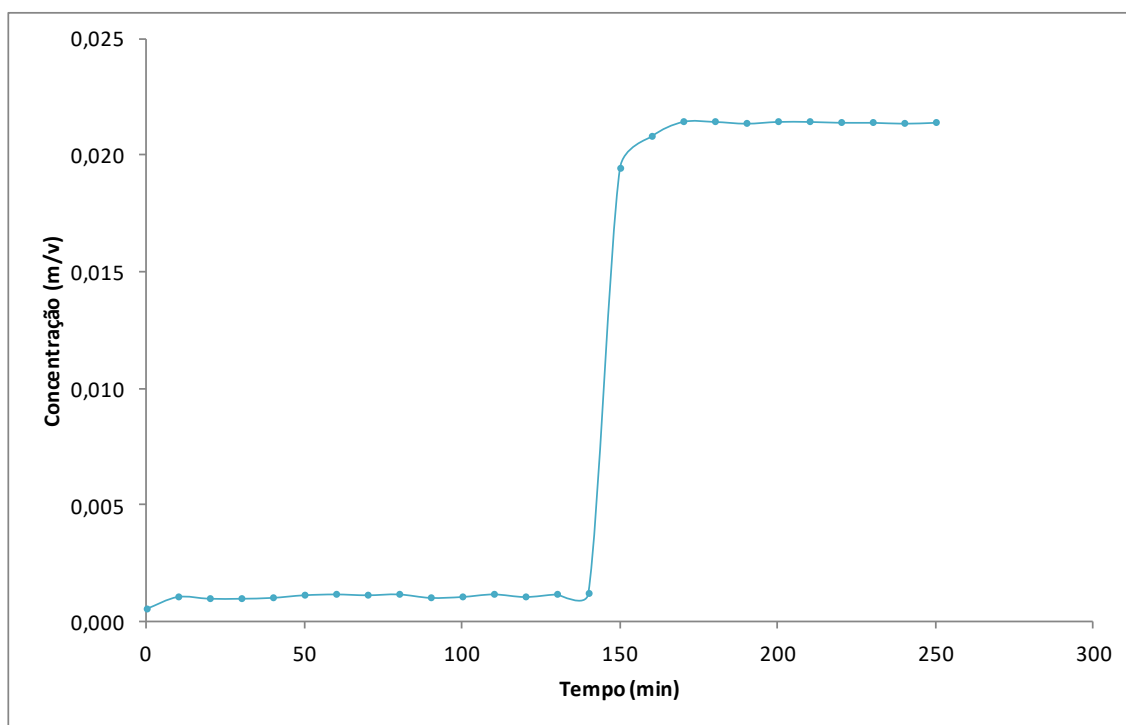


Figura 4.7 - Estudo cinético de libertação da molécula terapêutica Diclofenac (fármaco comercial) do SEF com CMF

4.7.2. Estudo cinético de libertação do Etoricoxib do SEF com CMF

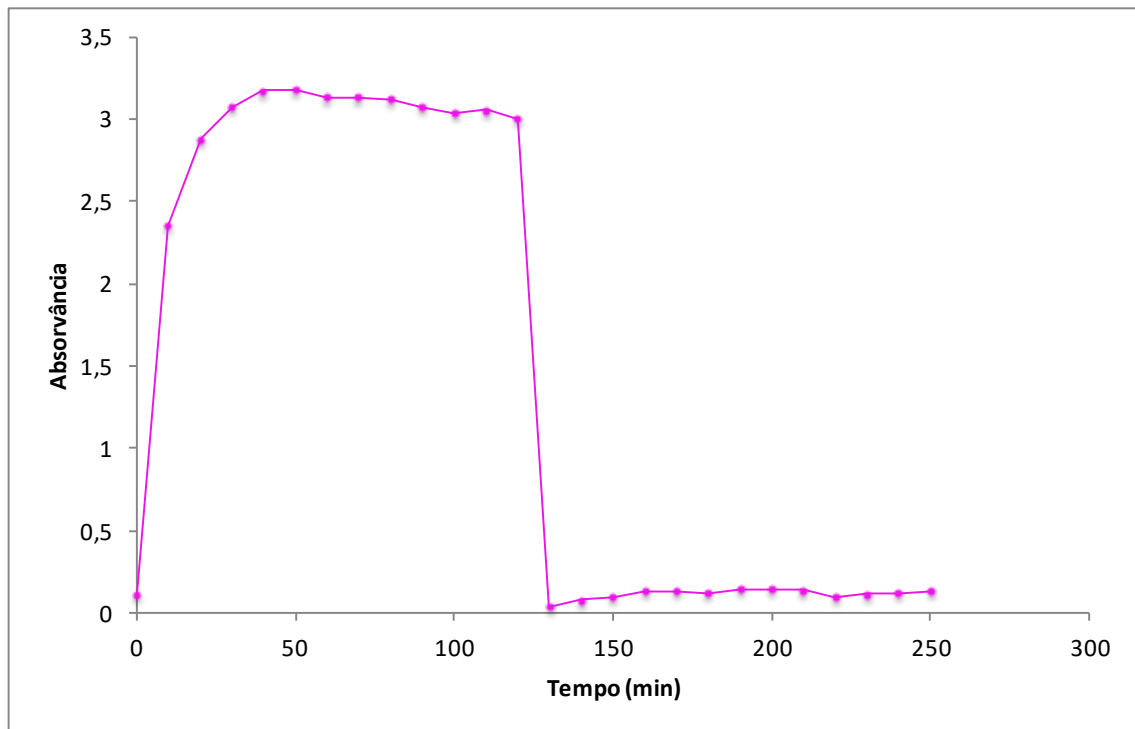


Figura 4.8 - Estudo cinético de libertação da molécula terapêutica Etoricoxib (fármaco comercial) do SEF com CMF

4.7.3 Estudos comparativos

O gráfico da figura 4.9 apresenta o estudo comparativo dos SEF de CMF para os dois anti-inflamatórios em estudo.

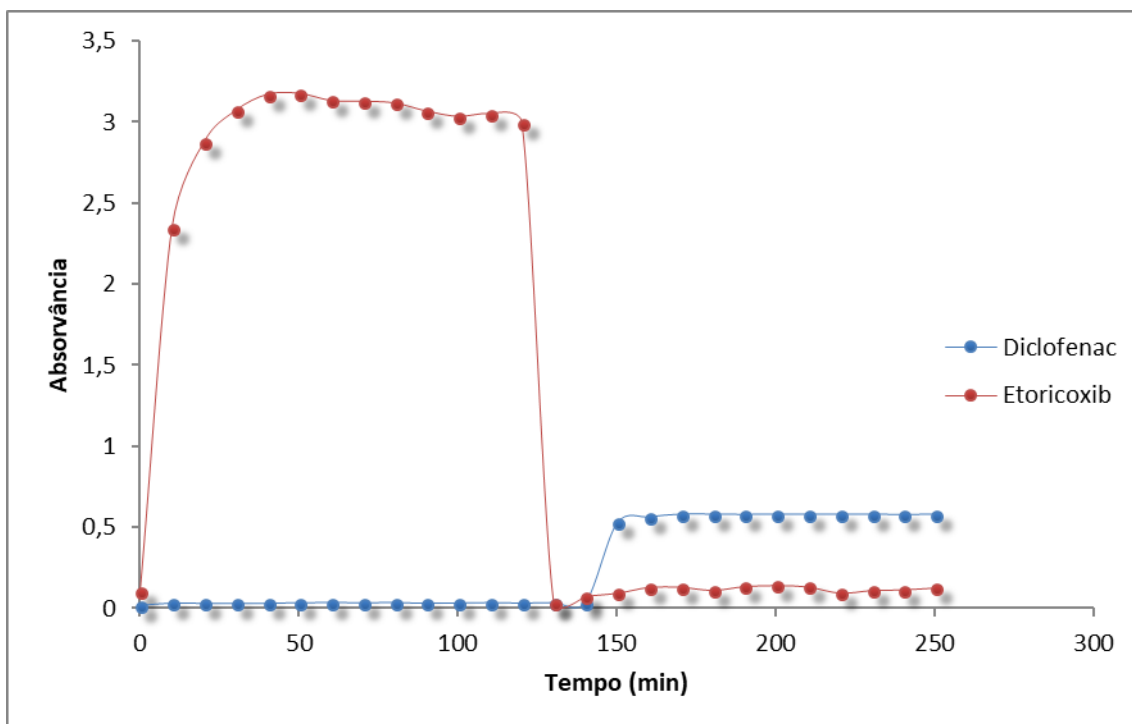


Figura 4.9 - Gráfico comparativo com o estudo cinético de libertação dos anti-inflamatórios de fármacos comerciais dos SEF com CMF

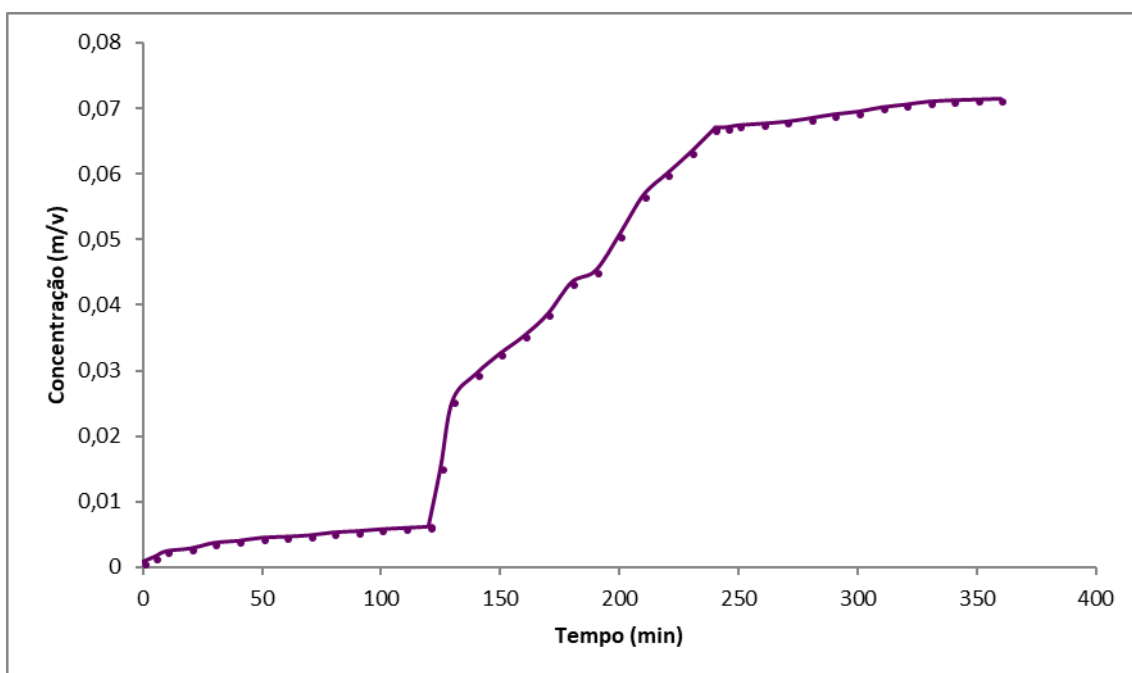


Figura 4.10 - Gráfico com o estudo cinético de libertação das moléculas terapêutica Diclofenac de pureza analítica do SEF com CMF e CMC 0,01%

Os gráficos da cinética apresentam o perfil de liberação das moléculas em função do tempo. Os gráficos 4.7 e 4.10 permitem concluir que, durante o pH ácido, não se libertou Diclofenac. Já no pH do intestino, com o passar do tempo ocorreu uma liberação mais abrupta, quando comparando com a liberação da CNF, tendo o fármaco sido libertado completamente e com uma certa rapidez. A liberação abrupta pode justificar-se com a dimensão dos poros da estrutura formada com celulose refinada (CMF) por esta ser mais aberta que a estrutura formada com CNF, pois as fibras de CMF são maiores com dimensões de comprimento e largura na escala dos micrómetros (comprimento de 800 μ m e largura de 19 μ m) enquanto que as fibras de CNF têm dimensões de largura da ordem dos 40nm. Depois de atingir o pico máximo, a concentração -se parece diminuir no entanto pelo princípio da conservação da massa sabemos que esta se mantém constante no copo do ensaio, sendo que as oscilações se podem justificar com os erros experimentais associados à reposição do líquido que se faz quando se tiram amostras de volume para a análise por espectroscopia.

Na figura 4.9 encontra-se um gráfico comparativo dos SEF de CMF a partir do qual se pode concluir que o com SEF de CMF contendo o Diclofenac consegue-se evitar a sua liberação no estômago, enquanto que com o SEF de CMF que contem o Etoricoxib ocorre liberação no estômago, logo a retenção do Etoricoxib não é eficaz pois as estruturas libertam a molécula terapêutica no pH do estomago (120 minutos).

O gráfico da figura 4.10 representa o perfil de liberação com um sistema similar ao do gráfico 4.7 mas neste último utilizou-se Diclofenac de pureza analítica, enquanto que nos outros SEF se utilizaram as moléculas de fármacos comerciais com a mesma concentração de princípio ativo. Quando se utilizam fármacos comerciais estes têm outros constituintes que se encontram identificados nos folhetos informativos. Neste caso essa informação foi analisada sendo estes outros componentes inertes. O perfil de liberação do Diclofenac de pureza analítica com CMF é similar, podendo concluir-se que a liberação é mínima no pH do estômago (pH 2 até aos 120 minutos) e controlada no pH do duodoneo.

4.8. Estudos comparativos entre as matrizes de CNF e CMF no SEF

As matrizes de CMF e CNF registaram um comportamento similar de libertação controlada no pH do estômago, para o Diclofenac em que não se registou nenhuma libertação do fármaco.

A CMF apresenta como vantagem a libertação completa do fármaco no pH do intestino delgado (Duodeno). Isto revela uma certa eficiência dos sistemas na libertação do fármaco, até a corrente sanguínea. Diferentemente das CNF, as fibras de CMF separam-se completamente em água e suas redes são mais abertas. Este comportamento permite concluir que, com este sistema, existe um maior aproveitamento clínico do fármaco no organismo. Quando se dá a libertação completa do fármaco, o sistema de entrega formado por alginato é biocompatível, ou seja, não provoca qualquer problema ao organismo. No caso o alginato este provem das algas. Por outro lado, estes sistemas são reais, ou seja, foram desenvolvidos com moléculas comerciais disponíveis em medicamentos nas farmácias.

Apesar destas vantagens, a CMF apresenta algumas limitações, pois, a libertação controlada no pH do intestino, faz-se numa forma rápida, se comparado com a CNF. Isto faz com que o efeito clínico, também seja mais rápido.

No gráfico da figura 4.10b) encontra-se a cinética de libertação da CNF obtida nos estudos de Morais 2017. A CNF apresenta vantagens tais como a libertação controlada do fármaco mais lenta no pH do estômago. Em contrapartida, apesar desta libertação lenta, constata-se que cerca da metade deste fármaco fica retido nos sistemas que depois são eliminados através do trato gastrointestinal. Isto acontece porque os poros obtidos com a CNF são menores, pois estas também são menores, e as ligações entre grupos OH das nanofibrilas dão origem a uma matriz mais fechada, reduzindo assim o tamanho dos poros da matriz. Verifica-se também que libertação controlada no pH do intestino delgado ocorre de forma mais lenta com a CNF. Outras limitações podem ser o elevado custo, relacionado com a dificuldade de obtenção de nanofibrilas, bem como as dificuldades de análise das dimensões na escala nano.

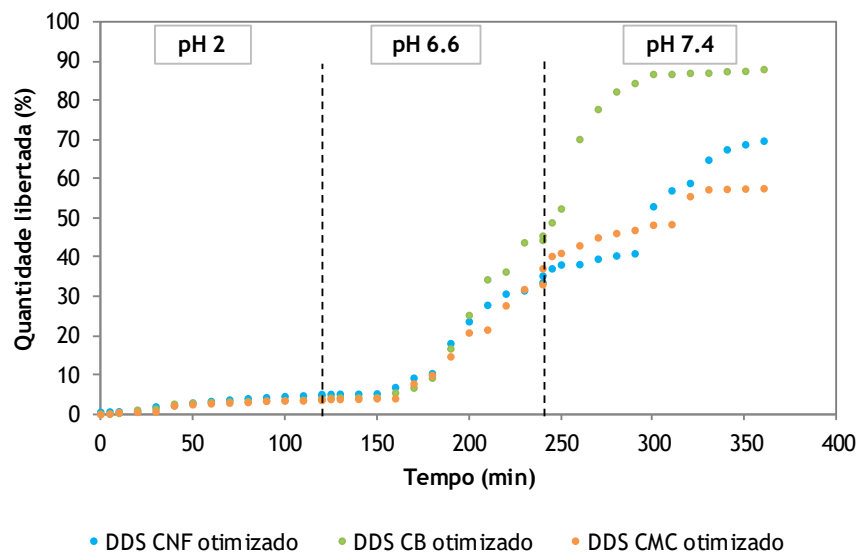


Figura 4.10.b) - Perfil da cinética de liberação do Diclofenac em diferentes DDS poliméricos otimizados através de simulação computacional, em meios com pH diferentes (Morais, 2017).

4.9. Caraterização da drenagem das pastas de *Eucalyptus globulus* utilizando o grau Schopper-Riegler

Produziram-se várias amostras de celulose microfibrilada a partir de pasta Kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. Utilizou-se a CMC como aditivo com o valor de referência de 0,01%. Na tabela 4.9 apresentam-se os resultados da análise biométrica das pastas originais e das pastas refinadas.

Tabela 4.9. Caraterização da drenagem das pastas utilizando o grau Schopper-Riegler

Materiais (Pasta m/v)	Temperatura (°C)	GrauSchop (°SR)
Não refinada	20	20
Refinada	20	38

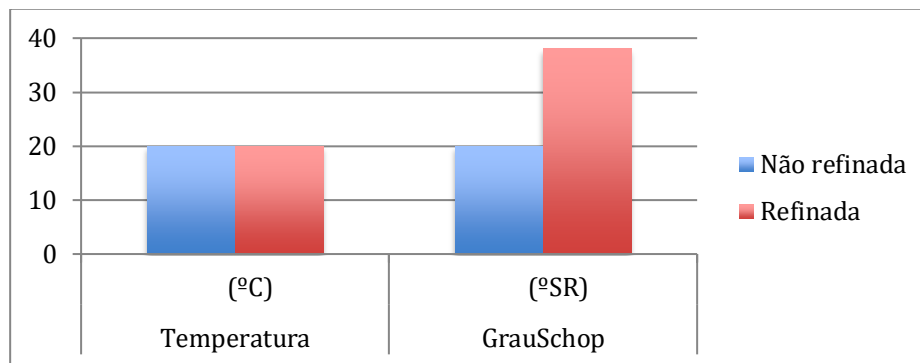


Figura 4.9. caraterização morfológica das fibras utilizando o grau Schopper-Riegler

Os resultados da tabela 4.9 e do gráfico 4.9. indicam que o grau Schopper-Riegler das fibras celulósicas refinadas, é maior que o das não refinadas. Isto significa que a estrutura refinada é mais fechada. Os resultados permitem concluir que quanto maior o grau Schopper-Riegler mais compactas e fechadas serão as estruturas e mais difícil é a drenagem da água, resultando num °SR superior (°SR de 38 para a CMF e °SR de 20 para a pasta não refinada).

4.10. Caraterização por espectrofotometria na região do infravermelho (FTIR-ATR)

Pela técnica do FT-IR, foi possível a determinação química dos grupos funcionais no infravermelho das estruturas que constituem a matriz para a produção das esferas.

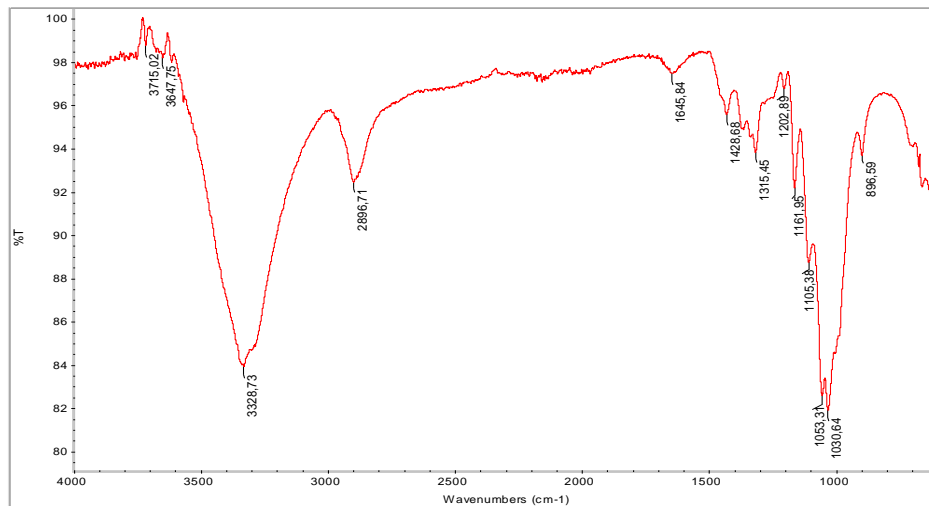


Figura 4.10. Espectro resultante da Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho (FTIR-ATR)

Analisando o espectro, nota-se a presença de um pico largo entre 3500 a 3000 cm^{-1} , que geralmente é banda larga por ponte de Hidrogénio. Esse pico, tenciona a presença de moléculas com radical OH.

Nota-se ainda a presença de dois picos, um largo (2800 cm^{-1}) e outro agudo (1600 cm^{-1}) ambos abaixo de 3000 cm^{-1} . Esses picos, geralmente estão sempre presentes em moléculas com radical CH_3 .

Pode-se assim concluir, que a molécula tem dois radicais, CH_3 e OH, e que estes radicais estão ligados. Neste caso, o Espectro é de uma amostra de metanol.

4.11. Estudos de simulação computacional das estruturas e proposta de novos SEF

A figura 4.11 apresenta um exemplo de um material fibrosos porosos de Celulose simulado computacionalmente utilizando o simulador de materiais (Curto *et al*, 2011). As simulações computacionais permitem testar várias possibilidades e prever a porosidade resultante. Efetuaram-se estudos de simulação juntando a CMF com a CNF e estes indicam que se pode variar a porosidade das estruturas com estas duas celulosas. Será interessante em trabalho futuro produzir estruturas com CMF e CNF e estudar a fazer a sua caracterização.

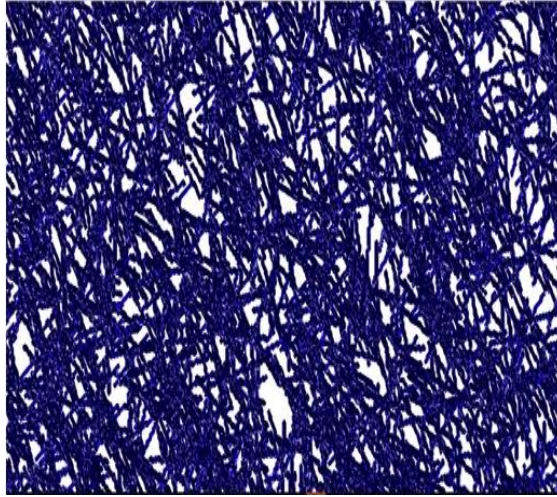


Figura 4.11. Exemplo de um material celulósico poroso obtido utilizando o simulador validado por (Curto *et al*, 2011)

Os resultados permitiram concluir que, é possível obter a partir de um simulador computacional, os mesmos resultados obtidos com estruturas experimentais ou seja, é possível garantir que as estruturas computacionais são similares às reais produzidas em laboratório, apresentando a mesma porosidade e distribuição de poros (figura 4.12).

CAPÍTULO V:

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

5. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

As estruturas produzidas a partir de pastas refinadas (CMC) são hidrofílicas e apresentaram porosidades diferentes das obtidas sem refinação, ou com CNF. A caracterização de superfícies dos sistemas, feita pelo ângulo de contato, indica que a CMC, quando usada como aditivo, aumenta a hidrofobicidade das estruturas. A refinação é fundamental para a obtenção de estruturas porosas com poros de dimensões mais regulares, e tanto a porosidade como as dimensões dos poros são importantes na cinética de liberação controlada do fármaco. Com o processo de refinação, a porosidade diminui, pois, as estruturas de CMF refinada apresentaram *menor porosidade* que as estruturas não refinadas, permitindo que o fármaco fica retido nesta matriz. Verificou-se que a refinação alterou sobretudo a morfologia das paredes das fibras, fazendo diminuir a largura, pois ocorreu microfibrilação. O grau Schopper-Riegler mede a drenabilidade da pasta e permitiu confirmar que as pastas refinadas apresentam maior valor do grau Schopper-Riegler, pois as fibras celulósicas refinadas formam uma estrutura mais fechada e menos porosa que a pasta não refinada. Foi possível produzir através de fibras celulósicas Microfibrilada, SEF que evitam a liberação do Diclofenac comercial no estômago, libertando-o no trato gastrointestinal, evitando os efeitos colaterais na mucosa do estômago. O perfil de liberação controlado e completa do fármaco sem liberação a pH do estômago, revelou a eficiência dos sistemas no direcionamento do fármaco até a corrente sanguínea, permitindo um maior aproveitamento clínico do fármaco pelo organismo assim como a sua funcionalidade inovadora. Os materiais celulósicos apresentaram uma grande influência na cinética de liberação do Diclofenac, permitindo que este não ficasse retido no sistema de transporte. Verificou-se pelos estudos cinéticos realizados que os SEF das moléculas terapêuticas selecionadas não apresentam o mesmo perfil de liberação para o Diclofenac e o Etoricoxib. Os resultados de simulação computacional permitiram concluir que é possível obter a partir de um simulador computacional, os mesmos resultados de dados experimentais e assim conseguir uma otimização da estrutura sem ter que realizar tantas experiências. O simulador apresenta algumas vantagens como, a economia do tempo e dos recursos experimentais, para além de permitir a compreensão e previsão das misturas de fibras para a produção dos SEF.

Em trabalhos futuros pretende-se desenvolver sistemas de entrega de fármacos nos quais se combine a CMF com a CNF, para um resultado mais controlado e eficaz. Pretende-se também desenvolver sistemas em que seja incorporado um óleo natural na matriz. Outra perspetiva que merecerá a nossa atenção, será testar estes sistemas em modelos *in vivo*. A investigação desenvolvida e a sua continuação podem constituir contributos importantes para o desenvolvimento de sistemas de entrega dirigida de moléculas com diferentes matrizes de celulose 3D.

CAPÍTULO VI:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências bibliográficas

Agarwal, B. D. and Broutman, L. J., Analysis and performance of fiber composites, wiley interscience, New York. 1990. [11] [SEP]

Angelova, N., Hunkeler, D., Rationalizing the design of polymeric biomaterials. trends biotechnol., amsterdam , v. 17, p. 409-421. 1999.

Ansel, H.C., Allen, L.V., Popovich N.G. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 7th ed; 230. 2000. [11] [SEP]

Aulton, M., E., “Delineamento de formas farmacêuticas”, artmed, porto alegre. 2005.

Bahardwaj, Y.R., Pareek, A., Jain, V., Kishore, D., “Chemical delivery systems and soft drugs: Retrometabolic approaches of drug design”, May, 2013.

Bodor, N., Loftsson, T., “ Novel chemical approaches for sustained drug delivery”, in robinson, lee, *controlled drug delivery: fundamentals and applications*. cap. 8, 2^a ed., marcel dekker, inc., new york, pp.337-371. 1987.

Breno, J.C.T, Xavier, R.M and Marasca, J., Anti-inflamatórios não hormonais convencionais. rev bras med; 57. 2000.

Butun, S., Ince, F.G., Erdugan, H. and Sahiner, N., One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems, May. 2011.

Chein, Y.W., Oral drug delivery and delivery systems. in: *novel drug delivery systems*. Marcel dekker, inc., new york, 50; 3rd edition: 139-96. 2002. [11] [SEP]

Chien, Y. W., Novel drug delivery systems. 2^a.ed., Marcel dekker, inc., new york. 1992.

Cruz, M. E. M., Almeida, A. J., Corvo, M. L., “Sistema de libertação controlado de fármacos”, biotecnologia-fundamentos e aplicações; cap. xvii, lidel pp.359-361. 2003.

Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation, materialwiss. werkst. 42, 370-374. 2011.

Curto, J.M.R., Costa, A.P., Amaral, M.E., Ferreira, J.S., Costa, V.L.D., Martins, N.V., Videira, P.E.M., Morais, F.P., Sousa, A.R.L., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Silva, M.J.S., The importance of optimizing the 3d structure when developing cellulosic materials for medical applications: *the case of drug delivery*

systems (dds), in: xxiii tecnicelpa - conferência internacional da floresta, pasta e papel, 12-14 de outubro, porto, portugal. 2016.

Curto, J.M.R., Simões, R.M.S.; Santos S.M.J., Videira, P.E.M., Optimization of polymeric nanomaterials for biomedical applications using computational simulation, in: *1st symposium of the fibentech-fibrous materials and environmental technologies research unit*, university of beira interior, covilhã, portugal, pp. 99-102. 2016.

Eichhorn, S.J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N.E., Capadona, J.R., Rowan, S.J., Wedwe, C., Thielemans, W., Roman, m., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Keckes, J., Vano, H., Abe, K. Nogi, M., Nakagaito, A.N., Mangalam, A., Simonsen, J., Benight, A.S., Bismarck, A., Berglund, L.A., Peijs, T., review: *Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites*, j. mater. sci. 45,1-33. 2010.

Feng, L., Li, S., Li, Y., Li, H., Zhang, L., Zhai, J., Song, Y., Liu, B., Jiang, L. and Zhu D., "Super- hydrophobic surfaces: *from natural to artificial*," advanced materials, vol. 14, no. 24, pp. 1857-1860, dec. 2002.

Feng, X., Tian, M., Zhang, W. and Mei, H., Gastrointestinal safety of etoricoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: *a meta-analysis*, january 10. 2018.

Fernandes T.F., "Preparação e caracterização de novos materiais compósitos baseados em fibras de celulose": Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro, 2008.

Ferreira, J.S., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S., Santos S., M.J., 3D computational simulation of drug delivery systems (dds) made from carboxymethyl cellulose (cmc), in: *1st symposium of fibentech-fibrous materials and environmental technologies research unit*, Universidade da beira interior, Covilhã, Portugal, pp.91-94. 2016.

Fini, A., Cavallari, C., Ospitali, F., Diclofenac Salts. V. Examples of Polymorphism among Diclofenac Salts with Alkyl-Hydroxy Amines Studied by DSC and HSM, *Pharmaceutics* 2.136-58. 2010.

Galaev, I.Y., Mattiasson, B., "Smart" polymers and what they could do in biotechnology and medicine, *trends biotechnol.*, 17,335-340. 1999.

Gernnar, A., R., "Remington: *the science and practice of pharmacy*", lippincott williams e wilkins philadelphian. 2005.

Gonçalves, R.O., Stomos, C., Marinho L.C.S., Castro, M.M., Marinho, R.R., Estudo in silico da molécula do ácido (2s)-1-[(2s)-2-metil-3 - sulfanilpropanoil] pirrolidina-2-

carboxílico (captopril). xx encontro de iniciação à pesquisa universidade de fortaleza, 20 a 24 de outubro. 2014.

Hansen, C.M., Hansen solubility parameters a user's handbook, second ed., crc press. 2013.

Herrick, F. W., Casebier, R. L., Hamilton, J. K., & Sandberg, K. R. Microfibril- lated cellulose: morphology and accessibility. In Presented at the Conference: 9. Cellulose conference (Vol. 37) Syracuse, NY, USA, (pp. 797-813).1983.

Hillery, A. M., “ Drug delivery: *the basic concepts*”, in hillery, lloyal, swarbrick, *drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*. taylor e francis, london, pp.1-48. 2001.

Hua, S., Ma, H., Li, X., Yang, H., Wang, A., Ph-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium, int. j. biol. macromol. 46,517-523. 2010.

Infarmed, 01.07.2013.

Islam, M.S. and Karim, M.R., Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method, colloid. surface. a 366,135-140. 2010.

Jackson, k., Young, D., Pant, S. Drug-excipient interactions and their affect on absorption. pstt, v. 3, n. 10, p. 336-345. 2000.

Jain, D. and Bar-shalom, D.,“Alginate drug delivery systems: *application in context of pharmaceutical and biomedical research*”. drug development and industrial pharmacy, 40 (12), pp. 1576-84. 2014.

Jorfi, M., Foster, E.J., Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, j. appl. polym. sci. 132 ,41719. 2015.

Juliano, R. L., “Microparticulate drug carriers: *liposomes, microspheres and cells*”, in robinson, lee, controlled drug delivery: fundamentals and applications. cap. 13, 2ª. ed., marcel dekker, inc., new york, pp. 555-580. 1987.

Júnior, Lol, Serrano, S.C., Teodoro, A.L and Dana, B.A., Os anti-inflamatórios não hormonais. prática hospitalar; 51: 173-8. 2007.

Kamel, S., Ali, N., Jahangir, K., Shah, S.M., El-Gendy, A.A., Pharmaceutical Significance of Cellulose: A Review, *Express Polym. Lett.* 2.758-778. 2008.

Klemm D., Philipp B., Heinze T., Heinze U. and Wagenknecht, W., *Comprehensive cellulose chemistry: fundamentals and analytical methods*, vol. 1, wiley-vch, weinheim. 1998.

Klippel, J.H; Weyand, C.M and Wortamann, R.L., *Primer in the rheumatic diseases*. ed arthritis foudation, georgia. p.583-91. 2001.

Krassig, H. A., *Cellulose: structure, acessibility and reactivity*, gordon and breach science publishers, yverdon. 1993.

Kuchana, V., Polupongu, S., Kumar, Ch.N. and Sunitha, P., “A new validated rp-hplc method for estimation of etoricoxib in its bulk and pharmaceutical dosage forms”. *journal of scientific research in pharmacy* 3(4) .2014.

Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A. and Bras, J., *Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review* ,june 2012

Leon, L., Herbert L. A. *Compression coated and layer tablets*. in: *pharmaceutical dosage forms: tablets*. marcel dekker, inc., new york; vol 1; 2nd edition: 247- 84. 2002.

Li, J., Mooney, D.J., *Designing Hydrogels for Controlled Drug Delivery*, *Nat. Mater.* 1.1-17. 2016.

Li, L.,Rossoni G.,Sparatore A., Lee L.C.,Soldato P.D. and Moore P.K., “Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative”, 12 December 2006.

Li, S., Vert, M. *Biodegradable polymers: polyesters*. in *encyclopaedia of controlled drug delivery*. edited by mathowitz e. new york: john wiley and sons; v. 1, p. 71-93. 1999.

Li, V. H. K., Lee V. H. L.,“ Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems”, in robinson, lee, *controlled drug delivery: fundamentals and aplications*. cap. 1, 2^a ed., marcel dekker, inc., new york, pp. 3-94. 1987.

Liechty, W.B., Kryscio D.R., slaughter b.v., and peppas n.a., *polymers for drug delivery*

systems. 2010.

Lin, N. and Dufresne, A., Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect, *Eur. Polym. J.* 59.302-325. 2014.

Lopes, C.M., Lobo, J.M.S., Costa, P., Formas farmacêuticas de liberação modificada: *polímeros hidrofílicos.*” *rev. bras. cienc. farm.* 41,143-154. 2005.

Missoum, K., Belgacem, M.N., Bras, J., Nanofibrillated cellulose surface modification: *a review*, *materials* 6,1745-1766. 2013.

Moraes, M.T., Debiasi, H., Carlesso, R., Franchini, J.C., Silva, V.R., Critical limits of soil penetration resistance in a rhodic eutrudox, *rev. bras. cienc. solo* 38,288-98. 2014.

Morais, F.P., Desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos inovadores utilizando materiais poliméricos porosos contendo nanocelulose, medicinal chemistry master's thesis, university of beira interior, covilhã, portugal. 2017.

Mousa, M.H., Dong, Y., Davies, I.J., Recent advances in bionanocomposites: *preparation, properties, and applications*, *int. j. polym. mater. po.* 65 ,225-254. 2016.

Neto, C. P.and Evtuguin, D., In química de polímeros, melo j. s. s., moreno m. j., burrows h. d., gil (eds.) m. h., imprensa da universidade, coimbra. 2004.^[1]_[SEP]

Nóbrega, K.C., Amorim, L.V., Influence of the Molar Mass of CMC in the Rheological Behavior and Filtration of Clay Suspensions, *Cerâmica* 61.399-408. 2015.

Oliveira, R. B., Lima, E. M., Polymers in drug delivery systems. *revista eletrônica de farmácia* vol 3 (1), 29-35. 2006.

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

Palomo, M.E., Ballesteros, M.P., Frutos, P. Analysis of Diclofenac Sodium and Derivatives.” *J. Pharm. Biomed.* 21.83-94. 1999

Petersen, N., Gatenholm, P., Bacterial cellulose-based materials and medical devices: *current state and perspectives*, *appl. microbiol. biot.* 91 ,1277-1286. 2011.

Pezzini, B.R., Silva, M.A.S., Ferraz, H.G., Formas farmacêuticas sólidas orais de

libertação prolongada: *sistemas monolíticos e multiparticulados*, rev. bras. cienc. farm. 43 ,491-502. 2007.

Pillai, O., Panchagnula, R., Polymers in drug delivery, current opinion in chemical biology, london, v. 5, p. 447-451, 2001.

Remington. The science and practice of pharmacy. 20th ed; vol.1; 903. 2000.

Rios, M. Polymers for controlled release: *formulation follows function*. pharm. technol., new york, v. 29, n. 6, p. 42-50. 2005.


Rosen, H., Abribat, T., The Rise and Rise of Drug Delivery, Nat. Rev. Drug Discov. 4.381-385. 2005.

Safari, J., Zarnegar, Z., Advanced drug delivery systems: *nanotechnology of health design a review*, J. Saudi chem. soc. 18 ,85-99. 2014.

Singh, S., Mishra, A., Verma, A., Ghosh A.K. and mishra ak., a simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of etoricoxib in dosage formulations. j adv pharm tech res;3:237-40. 2012.

Siró, I. and Plackett, D., Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: *a review*. cellulose, oxford, v. 17, n. 3, p. 459-494, june 2010.

Sjostrom, E., Wood Chemistry: *fundamentals and applications*, academic press inc, london. 1993.

Soccio, M., Lotti, N., Finelli, L., Gazzano M., and Munari A., Polymer, 48, 3125. 2007. 

Solomon, D.H., Nsaids: Mechanism of action. uptodate, june 2007.

Solomons, G., Fryhle C., Química orgânica. 7^a ed. vol. 1. rio de janeiro: ltc. 2001.

Sousa, L.J., Costa P., Formas farmacêuticas de libertação modificada-revista portuguesa de farmácia, vol xlix, n°4, out/nov/dez. 1999.

Staudinger, H., Ber. dtsch. chem. ges. 53, 1073. 1920.

Swarbrick, J.-Encyclopedia of pharmaceutical technology, informa healthcare, England. 2007.

Tønnesen, H.H. and Karlsen, J., Alginate in drug delivery systems, drug dev. ind. pharm. 28 621-630. 2002.

Tonoli, G. H. D., Cellulose micro/nanofibres from eucalyptus kraft pulp: preparation and properties. *carbohydrate polymers*, oxford, v. 89, n. 1, p. 8- 88, june 2012.

Umare, S. S., Chandure, A. S. and Pandey R. A., *Poly. degrad. stab.*, 92, 464. 2007.

Ummadi, S., Shravani, B., Rao N. G. R., Reddy M. S., Nayak B. S., Overview on controlled release dosage form ,july 2013.

Vijayalakshmi, K., Gomathi T., Sudha, P .N, Preparation and characterization of nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads, *der pharmacia lettre* 6 65-77. 2014.

Villanova, J.C.O., Oréfice, R.L., Cunha, A.S., *Aplicações farmacêuticas de polímeros*, polímeros 20 51-64. 2010.

Yang, L., Fassihi, R., Modulation of diclofenac release from a totally soluble controlled release drug delivery system, *J. Control. release*, 44 135-140. 1997.

Zhang, Y., Chan, J.W., Moretti, A., Uhrich, K.E., Designing polymers with sugar-based advantages for bioactive delivery applications, *J. Control. release* 219 355-368. 2015.

Zhu, Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion. 2002. tese (doutorado)- faculty of the graduate school of the university of texas, austin. 2002.

Zimmermann, T., Bordeanu, N. and Strub E., Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential, 16 October 2009.

Zorba, T., Chrissafis K. and Bikiaris D. N., *Polym. degrad. stab.* 92, 222. 2007.

ANEXOS

Anexos A_ Publicações

Comunicação 1

Characterization of Microfibrillated Cellulose (MFC) structures for the transport of analgesic drugs allowing their controlled release in the gastrointestinal tract

Maíelano, B.J.P.^{a,b.}, Mariti, H.N.^{a,b.}, Morais, F.P.^{b.}, Curto, J.M.R.^{b,c.}

^a Master's student in Medicinal Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

^b FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Portugal

^{b,c} CIEPQPF - Chemical Process Engineering and Forest Products Research Unit, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Email: benjamim.maielano@ubi.pt; joana.curto@ubi.pt; flavia.morais@ubi.pt

Abstract


The controlled release of drugs is important so that a suitable concentration of the drug is maintained in the body for the clinically necessary time and directed at a specific site of action to avoid side effects. In this work we intend to avoid the release of Diclofenac in the acidic pH of the stomach (pH of 2) because it is known that has negative effect on the gastric mucosa. The objective consisted of producing Drug Delivery Systems (DDS) made from Microfibrillated Cellulose (MFC) for the transport of Diclofenac, allowing its controlled release in the first part of the intestine, the duodena (pH 6.6). The DDS have been produced using natural polymeric materials, like alginate, and cellulose derivatives such as Carboxyl methylcellulose (CMC) and Microfibrillated cellulose (CMF). The Diclofenac will be compared with other therapeutic molecules to be incorporated in the innovative DDS. The methods to obtain CMF were based on the disintegration and refining of the cellulose fibers of Eucalyptus Kraft pulp. The characterization of the structures included the quantification of the fiber and pore dimensions using the scanning electron microscope (SEM). The affinity with water was quantified using contact angle technique. It was found that the refining process decreases the porosity and that, the pore distribution, is fundamental in the kinetics of controlled release of the drug.

Key words: Microfibrillated cellulose (MFC), Diclofenac, Drug Delivery System, Gastric side effects, pH controlled release

Acknowledgments: This work is supported by FibEnTech Research Unit, Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior

References

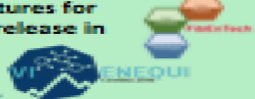
1. Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, second ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
2. Galaev, I.Y., Mattiasson, B., "Smart" polymers and what they could do in biotechnology and medicine, *Trends Biotechnol.*, 17 (335-340). 1999
3. Siró, I., Plackett, D., Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a new review, *Cellulose*, 17 .459-494. 2010
4. Feng, L., Li, S., Li, Y., Li, H., Zhang, L., Zhai, J., Song, Y., Liu, B., Jiang, L., Zhu, D., Super- Hydrophobic Surfaces: From Natural to Artificial, *Adv. Mater.*, 14. 1857–1860. 1997
5. Morais F.P., *Desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos Inovadores utilizando Materiais Poliméricos Porosos contendo Nanocelulose*, Medicinal Chemistry Master's Thesis, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2017.
6. Yang, L., Fassihi R., Modulation of Diclofenac Release from a Totally Soluble Controlled Release Drug Delivery System, *J. Control. Release*, 44 135–140. 1997



Characterization of Microfibrillated Cellulose (MFC) structures for the transport of analgesic drugs allowing their controlled release in the gastrointestinal tract

Maielano, B.J.P.¹, Martins, R.N.P.¹, Moraes, F.P.T., Curcio, J.M.R.²

¹Universidade da Beira Interior, Faculdade de Ciências, Departamento de Engenharia Química, Rua das Marceiras, 6634-909, Castelo Branco, Portugal; ²Universidade da Beira Interior, Faculdade de Ciências, Departamento de Engenharia Química, Rua das Marceiras, 6634-909, Castelo Branco, Portugal




Abstract

The controlled release of drugs is important so that a suitable concentration of the drug is maintained in the body for the clinically necessary time and directed at a specific site of action to avoid side effects. In this work we intend to avoid the release of Diclofenac in the acidic pH of the stomach (pH of 1) because it is known that has negative effect on the gastric mucosa. The objective consisted of producing drug delivery systems (DDS) made from Microfibrillated Cellulose (MFC) for the transport of Diclofenac, allowing its controlled release in the first part of the intestine, the duodenum (pH 6.4). The DDS have been produced using natural polymeric materials, like alginate, and cellulose derivatives such as Carboxymethylcellulose (CMC) and microfibrillated cellulose (MFC). The Diclofenac will be compared with other therapeutic molecules to be incorporated in the innovative DDS. The methods to obtain CMC were based on the deacetylation and refining of the cellulose fibers of *Daucylgloss leaf* pulp. The characterization of the structures included the quantification of the fiber and pore dimensions using the scanning electron microscope (SEM). The affinity with water was quantified using contact angle technique. It was found that the refining process decreases the porosity and that, the pore distribution, is fundamental in the kinetics of controlled release of the drug.

Introdução

Devido a propriedades como a versatilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, as polímeros naturais apresentam boas condições para serem aplicadas a sistemas de entrega, permitindo que o fármaco seja libertado controladamente [1,2]. A Celulose microfibrilada (MFC), devido à sua reticulação e rigidez, além para a biodegradabilidade, tem sido usada em aplicações médicas e biomédicas [3]. A libertação controlada ou a libertação progressiva de fármacos, numa concentração adequada, direccionada para um local alvo, a um tempo clinicamente necessário, num sistema de entrega, a molécula terapêutica encontra-se incorporada numa matriz [1,4]. O Diclofenac, um anti-inflamatório não-esteróide, é o fármaco incorporado neste sistema. Para além das propriedades anti-doríficas e analgésicas, o Diclofenac é inativo no ambiente ácido do estômago, estando associado a efeitos gastrointestinais como ulcerações e hemorragias [5,6]. Tem sido proposta para o tratamento de doenças inflamatórias e doenças músculo-esqueléticas.



Materiais

- Alginato
- Extrato Alveolar de Celulose
- Celulose Microfibrilada (MFC)
- Carboximetilcelulose (CMC)
- Diclofenaco


Métodos

- Obtenção e Refinação de Celulose
- Obtenção de CMC
- Caracterização
- Preparação de DDS
- Caracterização
- Estudo de libertação
- Estudo de libertação
- Estudo de libertação

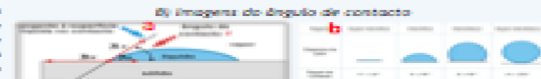
Resultados e Discussões

Parte I:

A) Caracterização estrutural de CMC com CAC 0,01%




B) Imagens do ângulo de contacto



C) Caracterização física dos sistemas

Materiais (mV)	Espessura (mm)	Massa (g)	Porosidade (%)	Ângulo de contacto (°)
Polímero (Gelatina)-CMC 0,01%	1,78	1,963	67,89	93,07
Polímero (Gelatina)-CMC 0,01%	1,23	1,953	67,82	93,44
Polímero (Gelatina)-CMC 0,01%	1,23	1,487	67,89	92,23
MFC + MFC 0,01%	1,74	1,38	66,94	88,07
MFC + MFC 0,01%	1,74	1,26	66,87	88,07
MFC + MFC 0,01%	1,74	1,38	66,94	88,07

DI: Cinética de um sistema inovador de libertação controlada do Diclofenac em diferentes pH [12]



Parte II:

Simulação computacional

Construção de estruturas de libertação (sistema CMC)

Comparação dos sistemas produzidos com outros já existentes

Conclusões

- As estruturas produzidas apresentam porosidade diferente, sendo isto confirmado pela caracterização estrutural e física dos sistemas.
- O processo de deacetylação é fundamental para a formação de poros, já que a sua distribuição é consequentemente importante na cinética de libertação controlada do fármaco.
- Com o processo de refinação, a porosidade diminui pois, as estruturas de CMC apresentam menor porosidade que as estruturas de gelatina de celulose bruta.
- Técnicas anteriores permitiram desenvolver um sistema de libertação inovador com materiais celulósicos, que evita a libertação do Diclofenac no estômago (pH 1), libertando-o assim, no duodeno (pH 6,4) [12]. Assim, a construção desta investigação é um importante contributo para o desenvolvimento de sistemas com diferentes matrizes de celulose 3D.

Agradecimentos

ao Físico Rui Costa, Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior

Referências

[1] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47111-47121.

[2] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47122-47131.

[3] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47132-47141.

[4] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47142-47151.

[5] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47152-47161.

[6] J. P. Maielano, B. J. P. Maielano, R. N. P. Martins, F. P. T. Moraes, J. M. R. Curcio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 143, 47162-47171.

Comunicação 2

Development of 3D Porous Polymeric Systems of Eucalyptus Pulp

Mariti, H.N.^{a,b}, Maielano B.J.P.^{a,b}, Morais, F.P.^b, Curto, J.M.R.^{b,c}

^aMaster Student in Medicinal Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal^[SEP] ^bFibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

^cCIEPQPF - Chemical Process Engineering and Forest Products Research Unit, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.^[SEP]

Email: henrique.mariti@ubi.pt; benjamim.maielano@ubi.pt ; flavia.morais@ubi.pt; joana.curto@ubi.p

Abstract

The Microfibrillated cellulose (CMF) can be used as a controlled release system due to its high surface area, biodegradability, high strength and rigidity. The objective consists in developing 3D porous molecule transport systems made from microfibrillated cellulose (CMF) of eucalyptus globulus for dermal applications. Kraft cellulose pulp and its derivatives, CMF and carboxymethylcellulose (CMC) were used as materials. The methodology consisted on the disintegration and beating of the Kraft cellulose pulp fibers to obtain microfibrillated cellulose fibres and the use of different concentrations of CMC (0.1, 0.01 and 0.001 % m / v). The characterization of the structures was done by measuring the weight, thickness, porosity and pore size using ISO Standards and the Scanning Electron Microscope (SEM). The molecule chosen to be introduced in this transport system is the essential oil of eucalyptus due to its medicinal properties. The analysis of the results shows that the porosity of the 3D structures obtained by disintegration is superior to the porosity of the structures obtained by disintegration followed by refining the fibers. The 3D structures obtained have porosity and pore sizes that can be optimized for the development of new drug systems containing therapeutic molecules derived from eucalyptus.

Key words: Microfibrillated cellulose (CMF), *Eucalyptus globulus*, Drug Delivery System, Oil essences, Porosity.

Acknowledgements: This work is supported by FibEnTech, Research Unit, Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior.

References:

- [1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Efeitos biológicos dos óleos essenciais - uma revisão, *Food Chem. Toxicol.*, 46 (2008) 446 - 475.
- [2] Burt S., Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e aplicações potenciais em alimentos - uma revisão, *Int. J. Food Microbiol.*, 94 (2004) 223 - 253
- [3] Chik, T.K., Chooi, W.H., Li, Y.Y., Ho, F.C., Cheng, H.W., Choy, T.H., Sze, K.Y., Luk, K.K., Cheung, K.M., Chan, B.P., Bioengineering a multicomponent spinal motion segment construct - A 3D model for complex tissue engineering, *Adv. Healthc. Mater.*, 4 (2015) 99-112.
- [4] 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., 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)*, International Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal, February 16-19, 2016.
- [5] Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S., Three Dimensional Modelling of Fibrous Materials and Experimental Validation, *Materialwiss. Werkst.*, 42 (2011) 370-374.



Development of 3D Porous Polymeric Systems of Eucalyptus Pulp

Marié, H.N.^{1,2}, Maelano B.J.P.^{1,2}, Morais, F.P.², Curto, J.M.R.^{2,3}

¹ Master Student in Medicinal Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal
² FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal
³ CIEPQPF - Chemical Process Engineering and Forest Products Research Unit, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Coimbra, Portugal



Abstract

The microfibrillated cellulose (CMF) can be used as a controlled release system due to its high surface area, biodegradability, high strength and rigidity. The objective consists in developing 3D porous molecule transport systems made from microfibrillated cellulose (CMF) of eucalyptus globulus for dermal applications. Kraft cellulose pulp and its derivatives, CMF and carboxymethylcellulose (CMC) were used as materials. The methodology consisted on the disintegration and beating of the Kraft cellulose pulp fibers to obtain microfibrillated cellulose fibres and the use of different concentrations of CMC (0.1, 0.01 and 0.001 % m/v). The characterization of the structures was done by measuring the weight, thickness, porosity and pore size using ISO Standards and the Scanning Electron Microscope (SEM). The molecule chosen to be introduced in this transport system is the essential oil of eucalyptus due to its medicinal properties. The analysis of the results shows that the porosity of the 3D structures obtained by disintegration is superior to the porosity of the structures obtained by disintegration followed by refining the fibers. The 3D structures obtained have porosity and pore sizes that can be optimized for the development of new drug systems containing therapeutic molecules derived from eucalyptus.

Introdução

O desenvolvimento de sistemas entrega de fármacos tem a finalidade de fornecer um maior direccionamento das moléculas e prolongar o tempo de acção (Kreuter,2014; Jorfi e Foster,2014; Chik et al.,2014). As vantagens do uso de SEF poliméricos à base de celulose, proveniente do eucalipto, são elevadas em comparação com as formas convencionais de dosagem, tornando-os eficazes e, por sua vez, mais seguros (Curto et al.,2016; Jorfi e Foster,2015). Os métodos convencionais de administração de fármacos, embora amplamente utilizados, demonstram várias limitações, como baixa eficácia, agregação ou transporte difícil, baixa controlabilidade, meia vida curta, elevada toxicidade e fraca estabilidade (Martins et al.,2016; Tiwari et al.,2012). Estas limitações podem ser potencialmente superadas por sistemas de libertação controlada de moléculas terapêuticas (Liu et al.,2014). O óleo essencial de eucalipto, rico em 1,8-cineol (eucaliptol), nomeadamente *Eucalyptus globulus*, é de relevância para a indústria farmacêutica e cosmética devido a propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacteriana, anti-diabéticas, antivirais, anticancerígenas, antimutagénicas, antimicrobianas, imunomoduladoras e antiprotosoárias (Burt, 2004; Hussain et al., 2008; Teixeira et al., 2013; Bakkali et al., 2008).

Materiais e Métodos

a) Pasta de celulose Kraft de Eucalipto

b) Carboximetilcelulose (CMC)

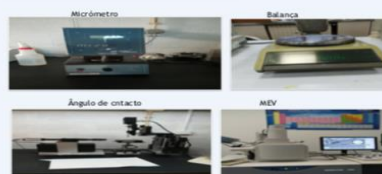
c) Óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

d) Celulose microfibrilada (CMF)

A metodologia para a obtenção das estruturas, seguiu as normas ISO 5269 e 5264.



Caracterização das estruturas



Equipamentos usados para a caracterização física das estruturas

Resultados

A tabela existe as características morfológicas da estrutura da CMF.

Material	Espessura (mm)	Massa (g)	Porosidade (%)	Ângulo de contacto (°)
Celulose + CMC 0,1 m/v	0,194	1,3622	97,379	36,87
Celulose + CMC 0,01 m/v	0,203	1,4053	97,572	29,63
Celulose + CMC 0,001 m/v	0,206	1,417	97,816	53,23
CMF	0,111	1,414	93,567	44,8
CMF + CMC 0,1 m/v	0,146	1,391	96,39	40,77
CMF + CMC 0,01 m/v	0,144	1,43	97,067	45,77
CMF + CMC 0,001 m/v	0,146	1,397	96,604	45,03

Na figura 4: Observam-se imagens obtidas por microscópio electrónico varrimento, referente a diferentes ampliações.

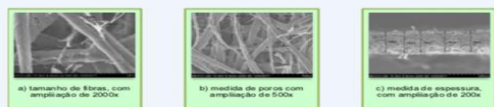


Figura 4: a) Tamanho de fibras, com ampliação de 2000x; b) medida de poros com ampliação de 500x; c) medida de espessuras, com ampliação de 500x.

Conclusão

- As estruturas 3D obtidas apresentam porosidade e tamanhos de poros que podem ser otimizados para o desenvolver novos sistemas de fármacos contendo moléculas terapêuticas provenientes do eucalipto.
- O desenvolvimento de sistemas de entrega dérmica que apresentem uma matriz 3D de celulose é essencial para incorporar óleos essenciais de eucalipto para aplicações farmacêuticas.

Agradecimento

Ao FibEnTech Research Unit, Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior

Referências

[1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Besmer, M. Eucalyptus Globulus: Uma revisão, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 448 - 475.
[2] Burt, S. Ovos essenciais: usos e propriedades em aplicações terapêuticas em aromaterapia - uma revisão, Int. J. Food Microbiol. 94 (2005) 253 - 258.
[3] Chik, T.K., Chou, W.H., Li, Y.T., Ho, F.C., Cheng, H.W., Chou, T.H., Su, K.Y., Liu, K.K., Chang, K.M., Chen, B.P. Bioengineering a multi-component signal network construct: A model for complex tissue engineering, Adv. Healthc. Mater. 4 (2015) 18-32.
[4] Curto, J.M.R., Marié, H., PFI, F. Morais, F.P., Teixeira, F.M., Gonçalves, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. The Challenge of using 3D-Compositional Structure to Develop 3D drug delivery systems in skin from nano-Polymeric Particles in Proceedings of Nanoscience and Nanotechnology International Conference (Nanoscience and Nanotechnology Laboratory (N3)), Braga, Portugal, February 19-20, 2016.
[5] Curto, J.M.R., Gonçalves, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. Three Dimensional Modeling of Porous Materials and Experimental Validation, Materials, 14 (2011) 335-354.
[6] Hossain, A., Ameer, F., Hassan, S.T., Pringshu, K. Composites quaternas: estruturas multicamadas: administração de morfina (Doxon Quatern) desde venozas de depósito de 3D, Int. J. Pharm. 512 (2016) 186 - 196.
[7] Liu, M., Fisher, E.J. Microfabricated membranes for biomedical applications, J. Appl. Polym. Sci. 130 (2015) 417-18.
[8] Nogueira, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? Adv. Drug Deliv. Rev. 71 (2014) 2-14.
[9] Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Sun, A., Jin, S., Wang, A., Jiang, F. J. 3D Scaffolded Systems for Drug Delivery in Cancer Therapy, Biotechnology, 33 (2015) 465-570.
[10] Martins, S.C.P., Curto, J.M.R., Simões, R.M.S. and Silva, M.A. Development of 3D Cellular Polymers (CPs) Based on Polyurethane, in: Proc. Symposium of FibEnTech: Fibre Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, January 26-28, 2016, pp.35-38.
[11] Muelken, S.E., Mielke, G.O. Laboratory 3D: National polymer-based drug delivery systems, J. Control. Release. 169 (2014) 21-24.
[12] Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Nogueira, J.M., Barata, J.A., Nunes, M.L. Comportamento e propriedades antibacterianas e antifúngicas de bio-fibras de celulose com óleo essencial de eucalipto, 42 (2011) 157-165.
[13] Tavares, D., Tavares, B., Marques, A., Ramos, C., Nogueira, J.M., Barata, J.A., Nunes, M.L. Drug delivery systems: An antibacterial effect of 3D porous matrices, 21 (2012) 2-11.
[14] Tavares, D., Tavares, B., Marques, A., Ramos, C., Nunes, J.M., Calais, L.A., Faria-de-Sousa, M.A., Mendes, L.N.C. Cellulose nanocrystals from *Buddleja juba*: preparation and properties, Carbohydr. Polym. 99 (2013) 90-98.

Anexos B - Procedimentos experimentais

Anexo B1. TMS (Norma ISO 638)

1. Ligar o equipamento e aguardar aproximadamente 30 minutos para aquecer a resistência;
2. Abrir o equipamento, colocar um prato limpo na balança e tarar;
3. Adicionar cerca de 2 gramas de amostra no prato. A amostra deve ser homogénea e representativa do todo;
4. Fechar o equipamento, aquecer a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período suficientemente longo até massa constante (não diferindo mais do que 0,1% da massa) e aguardar até atingir paralisação dos sinais que indica o final do ensaio (quando o peso da amostra é constante por não haver mais perda de água).

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

$$X = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

Onde:

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

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

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

Anexo B2. Desintegração mecânica (Norma ISO 5269)

1. A partir de um lote selecionado de Pasta de celulose Kraft pesar 30 gramas e hidratar durante a noite em água destilada ou desmineralizada.
2. Perfazer um volume de 2 litros de água desmineralizada e adicionar no desintegrador. Nesta etapa, foi adicionado a CMC em diferentes concentrações (0,1%; 0,01% e 0,001%);
3. Fechar o equipamento e aplicar 30000 revoluções.
4. Colocar num balde adicionando 6 litros de água e colocar num agitador contínuo, de modo que a suspensão não se aglomere.
5. Colocar num formador estático, constituído por um cilindro e uma válvula de contacto de escoamento de água. O cilindro possui na base uma teia, onde se depositam as fibras, que de seguida dão origem às estruturas fibrosas (folhas).
6. Refinar a pasta com 10% de consistência utilizando um refinador de pasta PFI a 9000 revoluções.
7. Desintegrar a 10.000 rev., adicionar a concentração de CMC e voltar a desintegrar a 30000 rev.
8. Após a obtenção das folhas, estas foram colocadas num empilhador e de seguida secas no laboratório de testes físicos com humidade de 50% e Temperatura de 22°C.

Anexo B4. Formação das folhas (Norma ISO 5269)

1. A partir de um lote selecionado de Pasta de celulose Kraft pesar 30 gramas e hidratar durante a noite a uma solução aquosa a pH 12.
2. Perfazer um volume de 2 litros de água desmineralizada e adicionar no desintegrador.
3. Fechar o equipamento e programar 30000 revoluções;
4. Colocar num balde adicionando 6 litros de água e com agitação, de modos que a suspensão não se aglomere;
5. Lavar a tela de aço, localizada na base da coluna cilíndrica de formação, fornecendo água em abundância (alavanca inferior, à esquerda);
6. Descer com cuidado a coluna de formação e fechá-la utilizando a alavanca apropriada;
7. Permitir a entrada da água, até a primeira marcação interna da coluna de formação, fazendo-se uso da mesma alavanca a que se referiu o passo quinto;
8. Despejar a suspensão de fibras, no volume previamente calculado, para obtenção da gramagem desejada. Cuidar para que a proveta medidora do volume da suspensão de fibras seja sempre lavada e o resultado dessa lavagem seja utilizado no decorrer da formação das respetivas folhas isotrópicas;
9. Permitir a entrada de água até a segunda marcação interna da coluna de formação;
10. Agitar cerca de 6 vezes (movimento de subir e descer), com o agitador/homogeneizador disponível para o efeito;
11. Escoar a água da coluna formadora, por drenagem e sucção, fazendo-se uso da alavanca inferior, localizada à direita;
12. Abrir o compartimento superior (coluna de formação) e colocar um papel mata-borrão circular sobre as fibras que ficaram retidas na malha circular de aço inoxidável. Em seguida, sobre o mata-borrão, centrar e colocar mais 3 mata-borrões quadrados;
13. Passar um rolo metálico (~10kg) cerca de 4 vezes, num movimento de “vaivém”, sobre os papéis mata-borrões. De seguida, retirar os 3 mata-borrões quadrados, separar a folha da tela e colocá-la, ainda aderida ao papel mata-borrão circular e voltada para cima, sobre 2 mata-borrões quadrados secos;
14. Colocar sobre a folha num disco metálico circular, perfeitamente limpo e seco com auxílio de um guardanapo de papel.
15. Secá-la através do secador rápido e de seguida pesá-la. Com o valor resultante desta pesagem, relacionar com a quantidade da suspensão requerida para o valor de gramagem de 60g/m², o que corresponde a uma massa de 1,28 g em cada folha.
16. Secar e guardas as folhas no laboratório condicionado seguindo a norma ISO à temperatura de 22°C e humidade de 50% .

Anexo B5. Formação da estrutura de CMF e CNF

Foram preparadas suspensões de CNF e CMF com 0,01% de CMC. Na primeira etapa, foi despejada a suspensão de CMF e seguida da suspensão de CNF, numa quantidade de 50mL para ambas. O tempo de formação da estrutura foi de cerca de 50 minutos. Seguidamente, a folha foi colocada no disco no empilhador e conservada no laboratório condicionado (50% de humidade relativa e 22°C) para a manter as condições de humidade e temperatura constantes. Na segunda etapa, fez-se o mesmo procedimento com as celulose não refinada e CNF nas mesmas condições e com as mesmas quantidades, tendo a formação do filme durado cerca de 50 minutos. De igual modo, a folha foi colocada no disco e conservada no laboratório condicionado, de forma a manter as condições de humidade e temperatura.

Nota: As folhas produzidas neste trabalho, não foram prensadas. Isto porque o objetivo era obtê-las mais abertas sem serem comprimidas durante a prensagem.

Folha teste para determinação da consistência da pasta

Retira-se um volume conhecido, por exemplo 400 mL da suspensão de fibras que se encontra no recipiente de 6l. Coloca-se a folha obtida no formador na secadora. Depois de totalmente seca, pesa-se a folha (dentro de um copo) numa balança analítica, obtendo-se a massa seca de fibras.

Como se pretende produzir folhas com uma gramagem de $60 \pm 2,0 \text{ g/m}^2$ e as folhas são circulares e de 20 cm de diâmetro, fazem-se os cálculos para determinar o volume de suspensão que se deve retirar para obter folhas com a massa de 1,28g.

Anexo B6. Análise das dimensões das fibras e quantidades de finos pelo MORFI

1. Para análise de fibra curta, dilui-se 2,5 gramas de fibra em 1 litro de água desmineralizada obtendo-se uma concentração de 2500 mg/l;
2. Colocam-se a suspensão no MORFI;
3. Programa-se o equipamento para analisar a amostra;
4. Aguarda-se pelo fim da análise e analisam-se os resultados.

Anexo B7. Análise do grau de refinação pelo método Schopper-Riegler (Norma ISO 5267

1. Preparar uma suspensão com 2 gramas secos de matéria, nas percentagens semelhantes à de uma folha. Diluir para 1 litro com adição de água desmineralizada. A temperatura é controlada com a adição de água mais ou menos fria, devendo estar à 20 °C;
2. Fechar a base do aparelho onde será colocada a suspensão;
3. Transferir a suspensão de copo promovendo a agitação e garantir a homogeneidade;
4. Verter a suspensão para dentro do aparato, aguardar 5 segundos e abrir a base deste. Fazer a leitura do grau Schopper-Riegler quando não houver mais água a cair no copo;
5. Remover a folha formada e secá-la. Pesar a folha e fazer a correção do respetivo grau Schopper-Riegler caso tenha um peso diferente de 2 gramas.

Anexos C_ Procedimentos

Anexo C1_ Estudos cinéticos de libertação das moléculas terapêuticas_ Vijayalakshmi, Gomathi, and Sudha 2014.

1. Os estudos foram realizados em duplicado por 4h, aproximadamente, com o termopar acoplado à placa de aquecimento a 37°C e 100 rpm. Nas primeiras 2h, foram adicionadas as esferas produzidas à solução tampão (pH 2) e retirado uma amostra de 5ml, nos segundos iniciais do tempo zero, e foi-se restaurando por cada intervalo de tempo, igual quantidade do volume de líquido retirado, de forma a manter mesma quantidade da solução.
2. Retirar amostras de 5ml em intervalos de 10 em 10 minutos até atingir o minuto 120.
3. Filtrar as esferas da solução tampão e prosseguir com o tampão seguinte sem paragem.
4. Adicionar as esferas filtradas para solução tampão fosfato (pH 6,6) por mais 2h e ir retirando amostras de 5ml em intervalos de 10 em 10 minutos, conforme os procedimentos anteriores.
5. No final ou em cada intervalo de tempo, analisar as amostras retiradas ao longo do tempo, pelo método de espectroscopia UV-Vis, a 276 nm (máximo de absorvância para o Diclofenac).