



Manuela Adriana Mendes Ferreira

# PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA COMPÓSITO PARA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE UM FÁRMACO PARA APLICAÇÃO EM ORTOPEDIA E MEDICINA DENTÁRIA

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, orientada pela Doutora  
Patrícia Manuela Almeida Coimbra e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da  
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Julho, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Manuela Adriana Mendes Ferreira

# PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA COMPÓSITO PARA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE UM FÁRMACO PARA APLICAÇÃO EM ORTOPEDIA E MEDICINA DENTÁRIA

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, orientada pela Doutora Patrícia Manuela Almeida Coimbra e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho, 2016





*“Believe you can and you're halfway there.”*

**Theodore Roosevelt**



Aos meus pais e à minha avó...



# Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, diretamente ou indiretamente os meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de manifestar o meu agradecimento à Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Gil e ao Dr. Jorge Guiomar por todo o conhecimento que me transmitiram e por toda a ajuda, disponibilidade e orientação que me prestaram ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à Dr.<sup>a</sup> Patrícia Coimbra, por toda a ajuda, e formação que me deu no laboratório. Além disso, quero agradecer pelo fato de ter sido o meu apoio durante estes meses, pela ajuda incansável e inteira disponibilidade. Obrigada ainda, pela simpatia, simplicidade, força e otimismo que sempre me transmitiu.

Gostaria de agradecer à Altakitin SA. por ter fornecido a “matéria-prima” para o desenvolvimento deste projeto. Ao investigador Carlos Patacas, queria agradecer a disponibilidade que demonstrou em relação aos equipamentos de SEM e SEM/EDS e à concretização das análises.

Queria agradecer aos meus colegas e amigos de curso que me acompanharam ao longo do meu percurso académico, em particular à Luiza Lima e à Vanessa Almeida por toda a amizade, companheirismo, paciência e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês tudo isto não teria o mesmo significado.

Um eterno obrigada ao David, pelo amor, compreensão, paciência e força que sempre me deu nos momentos em que tudo parecia correr mal e o pânico falava mais alto. Obrigada!

E por último, gostaria de agradecer aos meus pais, pilares fundamentais na minha vida, por todo o amor que me deram e pelo esforço que fizeram durante todos estes anos para que eu pudesse chegar onde cheguei. Não quero deixar de agradecer ao meu irmão, por ter sido aquela pessoa que sempre me fez sonhar alto mas mantendo os pés assentes na Terra. Gostaria de agradecer à minha avó Lola, por me dar tanto carinho e por todas as “velinhas” que acende por mim.

A todos, um grande Obrigada!





# Resumo

O recurso a matrizes tridimensionais (*scaffolds*), desenvolvidas com base na Engenharia de Tecidos para aplicação em tecidos duros na área da Ortopedia e Medicina Dentária, tem vindo a ser cada vez mais recorrente, estando já disponível no mercado uma vasta gama de produtos destinados a estas aplicações. A utilização destas matrizes tridimensionais vem substituir o uso de implantes e enxertos. É possível, através de cirurgia, colmatar danos no tecido ósseo, utilizando-se matrizes tridimensionais que servem de suporte para a regeneração óssea. Contudo, a estes processos cirúrgicos estão associadas respostas inflamatórias, sendo necessário que o paciente faça um tratamento com medicamentos de ação anti-inflamatória.

O objetivo deste trabalho foi modificar um dispositivo médico que já se encontra no mercado – k-IBS<sup>®</sup>, produzido pela Altakitin, SA. –, no sentido de lhe conferir atividade anti-inflamatória, através da incorporação de diclofenac sódico, um anti-inflamatório, pretendia-se que o produto final libertasse o fármaco durante 8 a 10 dias e exibisse uma libertação mais rápida nas primeiras horas. Era desejável, também, obter-se um material sólido que pudesse ser cortado. Para isso foram preparados dois sistemas poliméricos para encapsulação de fármaco: fibras de PLA produzidas por electrofiação e partículas de PHBV produzidas pelo método de emulsão e extração/evaporação do solvente. Na matriz k-IBS<sup>®</sup> foram incorporados estes sistemas poliméricos contendo fármaco, de modo a obterem-se matrizes tridimensionais com forma cilíndrica, tendo sido estudada a cinética de libertação do fármaco. Foi também testada a influência da esterilização por radiação gama, com doses de radiação de 15 e 25 kGy, em matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica, para verificar qual o seu efeito na libertação do fármaco.

Conclui-se que o sistema de encapsulamento que melhor foi ao encontro do objetivo pretendido foram as partículas de PHBV, uma vez que, quando incorporadas na matriz, obtinham-se perfis de libertação de fármaco com uma libertação rápida nas primeiras horas de ensaio e um período de libertação superior a 10 dias. No entanto, os resultados obtidos para este sistema poderão estar associados a erros devido à possível saída das partículas de pequena dimensão para a solução, contribuindo para a quantificação de fármaco efetuada. Nas matrizes k-IBS<sup>®</sup> com fibras de PLA obtiveram-se perfis que libertavam o fármaco mais rapidamente, não conseguindo atingir o período de tempo de libertação pretendido. Para além disso, em ambos os tipos de sistemas e tal como desejado, obteve-se um material sólido que pode ser cortado. Relativamente ao estudo da esterilização de matrizes k-IBS<sup>®</sup> com radiação gama, não se observou nenhuma diferença nos perfis de libertação entre a utilização de 15 e 25 kGy e verificou-se que a presença da fase inorgânica na matriz atenua o tempo de libertação do fármaco.



# Abstract

The use of three-dimensional matrices (scaffolds) developed based on the application for Tissue Engineering to be used in hard tissue for of orthopedics and dentistry has been increasing considerably, and there's already available on the market a wide range of products with such applicability. The use of such three-dimensional arrays replaces the use of implants and grafts. It is possible, through surgery, treating bone damage using three-dimensional matrices that are used as support for bone regeneration. However, these surgical procedures are associated with inflammatory responses, requiring the patient to be treated with anti-inflammatory drugs.

The aim of this study was to modify a medical device that is already on the market and consists of a composite matrix - k-IBS<sup>®</sup> produced by Altakitin, SA. - In order to impart anti-inflammatory activity by incorporation of diclofenac sodium. It was intended that the final product would be able to release the drug for 8 to 10 days, exhibiting a more rapid release in the first hours. It was also important to get a solid material that could be cut. Therefore it took the preparation of two polymeric systems for drug encapsulation: PLA fiber produced by electrospinning and PHBV particles produced by the emulsion method and extraction / solvent evaporation. These polymer systems were incorporated in the matrix k-IBS<sup>®</sup>, in order to obtain three-dimensional arrays with cylindrical shape, and drug release studies took place. The effect of gamma radiation was also tested, with 15 and 25 kGy in k-IBS<sup>®</sup> matrix without inorganic phase to check their effect on drug release. The cytotoxicity of K-IBS<sup>®</sup> matrices with PLA fibers and particles PHBV was also evaluated.

This study has shown that the encapsulation system which would meet the desired goal, were particles PHBV, since when incorporated in the scaffold, the drug release profiles obtained had a rapid release in the first hour test period and a continuous release up to more than 10 days. However, the results obtained for this system may be associated with errors due to the possible exit of the small particle into the solution, contributing to drug quantitation performed. In the K-IBS<sup>®</sup> matrices with PLA fibers the profiles obtained released the drug more slowly, failing to achieve the desired release period. For the study of sterilization of k-IBS<sup>®</sup> matrices no differences were found between the use of 15 and 25 kGy in release profiles. Additionally, as desired, a solid material that can be cut was produced and it was found that the presence of the inorganic phase in the matrix attenuates the release time of the drug.



# Índice

Motivação e Objetivos.....	1
Capítulo 1 - Introdução.....	3
1.1. Engenharia de Tecidos e Biomateriais.....	3
1.1.1. Matrizes para regeneração de tecidos.....	5
1.2. Tecido ósseo .....	6
1.2.1 Regeneração do tecido ósseo.....	8
1.2.2 Matrizes para regeneração de tecido ósseo.....	9
1.3. Sistemas de libertação controlada de fármaco .....	10
1.3.1. Mecanismos de libertação controlada de um fármaco a partir de sistemas poliméricos.....	12
1.3.2. Modelos que descrevem a cinética de libertação de um fármaco .....	13
1.4. Fibras e partículas como veículos de sistemas de libertação de fármacos.....	21
1.4.1. Fibras produzidas pelo método de electrofiação .....	21
1.4.2. Partículas produzidas pelo método de emulsão e extração/evaporação do solvente.....	26
1.5. Preparação de uma matriz para libertação controlada de um fármaco .....	29
1.5.1. Fármaco utilizado.....	29
1.5.2. Matriz compósita: k-IBS® .....	30
1.6. Matrizes tridimensionais como sistemas de libertação controlada de fármacos .....	31
1.7. Esterilização de matrizes .....	31
1.7.1. Esterilização com radiação ionizante: radiação gama.....	32
1.8. Caracterização de materiais: Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e espectroscopia de raio-X por dispersão de energia (EDS) .....	32
1.8.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	33
1.8.2. Microscopia eletrónica de varrimento associada a Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (SEM/EDS).....	33
Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....	35
2.1. Materiais e reagentes .....	35
2.2. Produção de sistemas de libertação controlada a partir da matriz de k-IBS® .....	35
2.2.1. Produção de fibras de poli(ácido láctico).....	36
2.2.2. Preparação de um sistema de libertação controlada de diclofenac sódico a partir da matriz k-IBS® e de fibras de poli(ácido láctico) .....	37
2.2.3. Preparação de partículas de PHBV .....	39
2.2.4. Preparação do sistema de libertação controlada de diclofenac sódico a partir da matriz k-IBS® e de partículas de PHBV.....	41
2.3. Esterilização de matrizes k-IBS® sem fase inorgânica com fármaco incorporado....	42

2.4.	Estudo da libertação de diclofenac sódico .....	42
2.5.	Caracterização das matrizes e do sistema de libertação controlada .....	43
2.5.1.	Caracterização morfológica e química por microscopia eletrónica.....	43
Capítulo 3 – Resultados e discussão .....		45
3.1.	Sistemas de libertação de diclofenac sódico baseados em fibras.....	45
3.1.1.	Fibras de PLA produzidas .....	45
3.1.2.	Sistemas de libertação de diclofenac sódico contendo fibras de PLA incorporadas na matriz k-IBS® .....	48
3.1.3.	Análise da cinética de libertação .....	54
3.2.	Sistemas de libertação de diclofenac sódico baseados em partículas .....	59
3.2.1.	Fibras de PLA produzidas .....	59
3.2.2.	Sistemas de libertação baseados em partículas de PHBV contendo diclofenac sódico.....	60
3.2.3.	Análise da cinética de libertação .....	65
3.3.	Comparação entre os perfis de libertação de DF não encapsulado, encapsulado em fibras e partículas e incorporado na matriz k-IBS® .....	68
3.4.	Efeito da esterilização com radiação gama na libertação de fármaco.....	72
3.5.	Caracterização morfológica das matrizes de k-IBS® .....	73
3.6.	Análise com SEM/EDS.....	76
Capítulo 4 – Conclusões e perspetivas futuras.....		81
Capítulo 5 - Referências Bibliográficas .....		85
Anexos .....		i
Anexo A – Perfis de libertação obtidos pelo ensaio 1 de electrofiação .....		i
Anexo B - Ajuste dos perfis de libertação do fármaco aos modelos matemáticos: Amostras com Fibras de PLA obtidas pelo ensaio 2. ....		ii
Anexo C - Ajuste dos perfis de libertação do fármaco aos modelos matemáticos: Partículas de PHBV (Ensaio 1).....		viii

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - (A) Estrutura do osso compacto e do osso esponjoso; (B) Matriz óssea e células que a constituem. (Adaptado de [11]).	8
<b>Figura 2</b> - Variação da concentração de fármaco no corpo em função do tempo, para dois modos de administração: convencional e por libertação controlada. (Adaptado de [82] ).	11
<b>Figura 3</b> - Tipos de bioerosão: Bioerosão superficial (esquerda) e bioerosão na massa (direita)	12
<b>Figura 4</b> - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas.	16
<b>Figura 5</b> - Representação gráfica do modelo de ordem zero em que a regressão linear obtida é do tipo $f(t) = bt + a$	17
<b>Figura 6</b> - Representação gráfica do modelo de primeira ordem com um declive de $-k/2,303$	18
<b>Figura 7</b> - Representação gráfica do modelo de Higuchi em que as curvas obtidas são do tipo $f(t) = a + bt^{0,5}$	19
<b>Figura 8</b> - Representação gráfica do modelo de Hixson Crowell em que as curvas obtidas são do tipo $f(t) = bt + a$	19
<b>Figura 9</b> - Representação gráfica do modelo de Baker- Lonsdale.	20
<b>Figura 10</b> - Representação gráfica do modelo de "dessorção limitante" através de um ajuste não-linear do tipo $ft = a * (1 - exp - b * x$	21
<b>Figura 11</b> - Esquema de montagem típica para o método de electrofiação. (Adaptado de [45]).	22
<b>Figura 12</b> - Etapas de formação das nanofibras (Adaptado de [46])	22
<b>Figura 13</b> - Estrutura química do PLA	25
<b>Figura 14</b> - Preparação de partículas contendo um fármaco, pelo método da emulsão O/W (Adaptado de[59]).	27
<b>Figura 15</b> – Estrutura molecular do PHBV.	29
<b>Figura 16</b> - Estrutura química do diclofenac sódico.	30
<b>Figura 17</b> - Dispositivo médico k-IBS <sup>®</sup>	30
<b>Figura 18</b> - Apresentação do k-IBS <sup>®</sup> sob a forma como se encontra no mercado.	30
<b>Figura 19</b> - Montagem experimental do ensaio de electrofiação. (A) Seringa com solução de polímero, fármaco e solventes; (B) Bomba doseadora; (C) Saída do capilar onde ocorre a formação de fibras; (D) Coletor de fibras (folha de alumínio); (E) Fonte de alta tensão.	37
<b>Figura 20</b> - Discos antes da liofilização (A) e após liofilização (B)	39
<b>Figura 21</b> - (A) Partículas obtidas antes da secagem; (B) partículas obtidas após secagem	40
<b>Figura 22</b> - Imagens de SEM de fibras de PLA com 10% de DF produzidas a partir da solução 10,5:4,5 CLF/DMF por electrofiação, em diferentes ampliações e respetivo histograma com distribuição de diâmetros. Ampliação: A -1000x; B -5000x; C -10000x; D -10000x. As setas a vermelho indicam possíveis partículas de DF.	46
<b>Figura 23</b> - Imagens de SEM de fibras de PLA com 10% de fármaco produzidas a partir da solução 13,5:1,5 CLF/DMF por electrofiação, em diferentes ampliações e respetivo histograma com distribuição de diâmetros. Ampliação: A -1000x; B -5000x; C -10000x.	47
<b>Figura 24</b> – Perfis de libertação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra (fibras ou matriz k-IBS <sup>®</sup> ) e percentagem de DF libertado em relação ao	



- introduzido na matriz k-IBS<sup>®</sup>/ fibras. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis..... 50
- Figura 25-** Ampliação da Figura 24 somente para o caso dos perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes k-IBS<sup>®</sup>. Os gráficos menores são a ampliação dos gráficos de maior dimensão para as primeiras 6 h de libertação, onde os eixos das abcissas e ordenadas têm o mesmo significado dos respectivos gráficos maiores. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. .. 51
- Figura 26** – Imagens de SEM de partículas de PHBV com 10% de fármaco produzidas pela técnica de emulsão e EES (Ensaio1), em diferentes ampliações: A -500x; B -1000x; C -2500x; D -2500x..... 60
- Figura 27** – Perfis de libertação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra (matriz k-IBS<sup>®</sup>/partículas) e percentagem de DF libertado em relação ao introduzido na matriz ou partículas de PHBV obtidas no ensaio 1. Barras de erro: desvio padrão (n=3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. .... 62
- Figura 28** - Ampliação da Figura 27 somente para o caso dos perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes k-IBS<sup>®</sup> com partículas de PHBV (ensaio 1) incorporadas. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. .... 63
- Figura 29** - Perfis de libertação de DF a partir de fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); e partículas de PHBV obtidas pelo ensaio 1. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. .... 68
- Figura 30** - Perfis de libertação de DF encapsulado (em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF); fibras 13,5:1,5 (CLF/DMF); partículas de PHBV (ensaio 1)) e DF não encapsulado a partir de matrizes k-IBS<sup>®</sup> (perfil 1, 2, A, 3, respetivamente). Os gráficos menores são uma ampliação sem a representação do perfil A, com os eixos das abcissas e ordenadas com o mesmo significado dos gráficos de maior dimensão. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis..... 70
- Figura 31** - Representação de todos os perfis estudados que envolvam a utilização da matriz k-IBS<sup>®</sup> com DF encapsulado em fibras de PLA e partículas de PHBV e DF não encapsulado, disperso diretamente na matriz (perfis 1, 2 3, 6, 7 A e C), em termos de massa acumulada de DF por massa de amostra (esquerda) e fração de DF libertada (%) (direita). Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. .... 71
- Figura 32** - Libertação de DF a partir de matrizes poliméricas (quitosano, ácido láctico e PEG) com 0,15% de DF esterilizadas com 15 e 25 KGy e matriz k-IBS<sup>®</sup> com 0,77% de DF não encapsulado não esterilizado. No gráfico à esquerda (massa acumulada de DF por massa de amostra) os perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes esterilizadas encontram-se sobrepostos., assim como no gráfico da direita (Fração de DF libertada (%)).As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis. 72
- Figura 33** - Imagem obtida por SEM da Matriz k-IBS<sup>®</sup> sem DF. Ampliação: A -5000x; B-500x ..... 74
- Figura 34** – Imagens obtidas por SEM da Matriz k-IBS<sup>®</sup> com fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) com 0,77% de DF encapsulado. Ampliação: A – 500x ; B – 5000 x; C – 500x. .... 74

- Figura 35** - Imagens obtidas por SEM da matriz k-IBS® com fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 0,39% de DF encapsulado + 0,39% de DF não encapsulado Ampliação: A -500x; B- 500x; C -5000x ..... 75
- Figura 36** - Imagens obtidas por SEM da matriz k-IBS® com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV. Ampliação: A -500x; B- 5000x; C -500x. As setas a vermelho indicam possíveis cristais de DF. .... 76
- Figura 37** - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivo mapa de distribuição dos átomos que constituem partículas de PHBV com 1,8% de DF encapsulado (ensaio 1). Átomos detetados: C (vermelho), O (verde) e Cl (azul). .... 77
- Figura 38** - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivo mapa de distribuição dos átomos que constituem as fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 10% de DF encapsulado. Átomos detetados: C (a vermelho), O (a verde), Na (azul) e Cl (amarelo). .... 78
- Figura 39** - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivos mapas de distribuição dos átomos que constituem matrizes k-IBS® com 0,77% de DF encapsulado em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF). Átomos detetados: C (a vermelho), O (a verde), Ca (a roxo), P (azul), Na (laranja) e Cl (amarelo). .... 79
- Figura 40** - Perfil de libertação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra e percentagem de DF libertado em relação ao introduzido na matriz. As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis ..... i
- Figura 41** - Representação gráfica do modelo de ordem zero para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado ..... ii
- Figura 42** - Representação gráfica do modelo de 1ª ordem para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado ..... iii
- Figura 43** - Representação gráfica do modelo de Higuchi para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado. .... iv
- Figura 44** - Representação gráfica do modelo de Hixson-Crowell para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de

DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado;  
7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39%  
de DF não encapsulado. .... v

**Figura 45** - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer -Peppas para as amostras: 1-  
Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz  
com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com  
0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)  
isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com  
0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não  
encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5  
(CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado ..... vi

**Figura 46** - Representação gráfica do modelo de “dessorção limitante” para as amostras: 1-  
Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz  
com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 4 - 10% de DF em  
fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5- 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5  
(CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5  
(CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado  
em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado. O modelo não  
foi aplicado à amostra 3 porque essa amostra não possuía fibras..... vii

**Figura 47**- Representação gráfica do modelo de ordem zero para as amostras: A- Matriz com  
1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em  
partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF  
encapsulado em partículas de PHBV ..... viii

**Figura 48** - Representação gráfica do modelo de 1ª ordem para as amostras: A- Matriz com  
1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em  
partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF  
encapsulado em partículas de PHBV ..... ix

**Figura 49** - Representação gráfica do modelo de Higuchi para as amostras: A- Matriz com  
1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em  
partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF  
encapsulado em partículas de PHBV ..... x

**Figura 50** - Representação gráfica do modelo de Hixson-Crowell para as amostras: A- Matriz  
com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em  
partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF  
encapsulado em partículas de PHBV ..... xi

**Figura 51** - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas para as amostras: A-  
Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado  
em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de  
DF encapsulado em partículas de PHBV ..... xii

**Figura 52**- Representação gráfica do modelo de Baker-Lonsdale para as amostras: A- Matriz  
com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em  
partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF  
encapsulado em partículas de PHBV ..... xiii

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Interpretação dos mecanismos de libertação tendo em conta o expoente de libertação $n$ do modelo de Korsmeyer- Peppas e a geometria da matriz. ....	16
<b>Tabela 2</b> -Condições experimentais no ensaio de electrofiação. As concentrações de DF apresentam-se em % (m/m).....	36
<b>Tabela 3</b> - Tempo para se atingir o plateau nos perfis estudados que envolvem fibras de PLA, e respetiva fração percentual de DF libertado em relação à massa de DF incorporada inicialmente na amostra. Os valores obtidos são aproximados à unidade e basearam-se nas Figuras 24e 25. ....	52
<b>Tabela 4</b> - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido através da aplicação dos modelos matemáticos aos perfis de libertação de DF dos vários sistemas preparados baseados em fibras de PLA. ....	55
<b>Tabela 5</b> - Valores do parâmetro $n$ e mecanismo de transporte obtidos do modelo Korsmeyer-Peppas, para os perfis 1,2, 3, 6 e 7, relativos à incorporação de DF em fibras de PLA e DF não encapsulado em matrizes k-IBS®. ....	56
<b>Tabela 6</b> - Constante cinética, $k$ , espessura das matrizes e coeficiente de difusão aparente, determinados através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS® com incorporação de fibras de PLA e fármaco não encapsulado (perfil 1, 2, 3, 6 e 7) .....	57
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros do modelo de "dessorção limitante" para o perfil 4,relativo à libertação de fibras preparadas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas, não incorporadas na matriz k-IBS®. ....	58
<b>Tabela 8</b> - Verificação do momento em que se atinge o plateau ( $h$ ) em todos os perfis estudados que envolvem partículas de PHBV, e respetiva fração percentual de DF libertado em relação à massa de DF incorporada inicialmente na amostra. Os valores obtidos são aproximados à unidade.....	64
<b>Tabela 9</b> - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido através da aplicação dos modelos matemáticos aos perfis de libertação de DF dos vários sistemas preparados baseados em partículas de PHBV obtidas no ensaio 1. ....	65
<b>Tabela 10</b> - Constantes de Higuchi relativas à libertação de DF a partir partículas de PHBV (obtidas pelo ensaio 1) incorporadas na matriz k-IBS® (perfil A); partículas isoladas (perfil B); e matriz k-IBS® com partículas com DF encapsulado e não encapsulado (perfil C)..	66
<b>Tabela 11</b> – Mecanismos de transporte determinados a partir do valor do expoente $n$ do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS® com partículas de PHBV incorporadas (perfil A); partículas de PHBV isoladas (perfil B); e matriz k-IBS® com partículas PHBV e DF não encapsulado (perfil C). ....	67
<b>Tabela 12</b> - Constante cinética, $k$ , espessura das matrizes e coeficiente de difusão aparente, determinados através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS® com incorporação de partículas de PHBV (obtidas pelo ensaio 1) e fármaco não encapsulado (perfil A e C) .....	67



# Lista de Abreviaturas

- CLF** – Clorofórmio
- DF** – Diclofenac sódico
- DMF** – Dimetilformamida
- ECM** – Matriz extracelular
- EDS** – Espectroscopia de raio-X por dispersão de energia
- EES** – Extração/evaporação do solvente
- GAG** – Glicosaminoglicano
- HV** – Hidroxivalerato
- NSAID** – Anti-inflamatório não-esteróide
- O/W** – Emulsão óleo/água
- PBS** – *Phosphate Buffered Saline*
- PCL** – Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
- PEG** – Polietilenoglicol
- PHA** – Polihidroxialcanoatos
- PHB** – Poli(hidroxibutirato)
- PHBV** – Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)
- PHV** – Poli(3-hidroxivalerato)
- PLA** – Poli(ácido-D,L-lático)
- PLGA** – Poli(lactídeo-*co*-glicolídeo)
- PLLA** - Poli(ácido-L-lático)
- PUR** - Poliuretano
- PVA** – Poli(álcool vinílico)
- RGD** – Arg-Gly-Asp
- SEM** - Microscopia eletrônica de varrimento
- SEM/EDS** - Microscopia eletrônica de varrimento associada a espectroscopia de raio-X por dispersão de energia
- SLC** – Sistema de libertação controlada
- UV** – Ultravioleta
- Vis** – Visível
- W/O/W** – Emulsão água/óleo/água



# Motivação e Objetivos

De um modo geral, na área de Ortopedia, os danos do tecido ósseo podem ocorrer devido a doenças, malformações congênitas, acidentes ou devido ao envelhecimento. Em Medicina Dentária, a perda de massa óssea localiza-se essencialmente na zona alveolar e pode advir de doenças dentárias crónicas e perdas de dentes, que conduzem ao decréscimo de tecido duro na mandíbula [1]. A resolução destas situações normalmente exige cirurgias que envolvem a aplicação de implantes ou enxertos ósseos. Atualmente, o procedimento mais utilizado é o transplante do próprio paciente (enxerto autogénico) ou de um dador compatível (enxerto alogénico). No entanto, este procedimento apresenta como problemas a falta de dadores, riscos de transmissão de doenças e rejeição imunológica do enxerto. De modo a colmatar as limitações das soluções apresentadas, surge a Engenharia de Tecidos [2]. Este campo interdisciplinar, constitui uma área promissora na reparação/reconstrução de lesões ósseas, através do desenvolvimento de matrizes tridimensionais (*scaffolds*). À utilização dessas estruturas tridimensionais estão associadas a utilização de células e de fatores de crescimento, que conduzem à formação de tecido novo, permitindo a regeneração do tecido. No entanto, este tipo de solução requer cirurgia e continua associada a respostas inflamatórias. Dependendo do estado de saúde do paciente e da própria extensão da reconstrução, o período de toma de medicamentos com ação anti-inflamatória varia.

Existe no mercado uma vasta gama de matrizes e cimentos que podem ser aplicados em Ortopedia e Medicina Dentária, constituídos por materiais compósitos, metálicos ou poliméricos. O presente trabalho tem como objetivo modificar um dispositivo médico que já se encontra no mercado – k-IBS<sup>®</sup>, produzido pela Altakitin, SA.–, um compósito constituído por quitosano, fosfato tricálcio e hidroxiapatite, de modo a conferir-lhe atividade anti-inflamatória. Para isso, ir-se-á introduzir na matriz compósita um fármaco anti-inflamatório – diclofenac sódico –, de modo a que este seja libertado de forma controlada e localizada, combatendo respostas inflamatórias que possam ocorrer no local após a cirurgia. Pretende-se que o período de libertação seja de 8 a 10 dias, sendo necessário que nas primeiras horas ocorra uma libertação de fármaco mais rápida, de modo a combater de imediato as respostas inflamatórias, e que depois se mantenha a libertação de fármaco até 8 a 10 dias, de uma forma menos acentuada. O fármaco será incorporado diretamente na matriz compósita e será testada também a sua encapsulação em fibras e partículas poliméricas e subsequente incorporação na matriz compósita. Pretende-se, ainda, obter-se um material sólido e seco, que possa ser cortado conforme a zona onde se pretende aplicar.





# Capítulo I - Introdução

## I.1. Engenharia de Tecidos e Biomateriais

Engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e de ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de um tecido ou órgão, estando diretamente associada à regeneração de tecidos duros e moles. Assim sendo, pode afirmar-se que a engenharia de tecidos envolve um conhecimento multidisciplinar que envolve células, biotecnologia, biomateriais, engenharia química e biomédica, entre outras [3].

Atualmente existem três abordagens que podem ser tidas em conta em relação ao recurso a engenharia de tecidos: (i) utilização de células segregadas e isoladas para substituição de células danificadas ou com perda de propriedades fundamentais ao seu bom funcionamento; (ii) utilização de substâncias de indução de tecidos-alvo (fatores de crescimento/diferenciação ou citocinas); (iii) utilização de células incorporadas no interior de matrizes tridimensionais que imitem a matriz extracelular [4]. Esta área disciplinar está fortemente dependente de fenómenos de compatibilidade, questões éticas e da escassez de doadores de células.

É entendido como biomaterial, um material que esteja em contacto com fluídos ou tecidos biológicos e que tenha a função de constituir parcialmente ou totalmente uma estrutura viva ou um dispositivo médico. O uso de biomateriais tem o objetivo de melhorar ou substituir uma função natural de um sistema biológico, podendo ser aplicado, tanto na área de medicina humana como veterinária [5]. A maioria dos biomateriais são sólidos ou semissólidos, podendo também ser líquidos. Existe, nesta área, uma vertente que considera a sua utilização/aplicação tendo por base a ética, legislação e cuidados de saúde [6]. Os biomateriais são maioritariamente aplicados na área da medicina e farmacêutica, nomeadamente na combinação com implantes e em desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos. Estes podem servir de veículo para transporte de fármacos através de vários tipos de formulações: fibras ocas, apósitos, lipossomas, micro-/nanopartículas, fibras, hidrogéis, espumas e micro-nanocápsulas, dendrímeros, entre outras.

Há várias propriedades intrínsecas que um biomaterial deve possuir para se tornar plausível a sua aplicação. Em primeiro lugar é requerido que os materiais sejam biocompatíveis, ou seja, tenham a capacidade de reagir de forma adequada a uma situação específica. Apesar de esta definição ser vaga, veio indicar que um biomaterial não deve ser inerte, ao contrário

daquilo que era definido anteriormente [7]. O biomaterial, para além de fornecer algum tipo de função, deve ser reconhecido pela interface no local onde é aplicado, desencadeando uma resposta biológica adequada à função para que foi concebido. Além disso, a biocompatibilidade está relacionada com a interação do biomaterial com as células e tecidos adjacentes, assim como dos fenómenos, interações e propriedades químicas, mecânicas, farmacológicas e de superfície dos biomateriais (corrosão, degradação, deposição proteica, lise celular, reações sistémicas, etc.). Os biomateriais não devem possuir toxicidade e ser esterilizáveis. Relativamente à toxicidade, geralmente não é conveniente que estes sejam tóxicos, a não ser que essa propriedade seja requerida (por exemplo: um sistema "*smart bomb*" para destruição de células cancerígenas). Em relação à esterilização, estes devem ser resistentes a, pelo menos, um dos tipos de esterilização, não se degradando ou perdendo propriedades [8]. Desta forma, estes dois conceitos – engenharia de tecidos e biomateriais – complementam-se, no sentido de que se torna possível estabelecer uma ligação entre estes dois campos interdisciplinares e assim desenvolver estruturas que melhorem ou reparem tecidos ou órgãos com malformações ou desempenho, como por exemplo através de matrizes tridimensionais (*scaffolds*) e sistemas de libertação controlada de agentes terapêuticos, entre outros.

As matrizes para regeneração de tecidos podem ser construídas por vários tipos de materiais (polímeros, cerâmicos, metais e compósitos). Para regeneração de tecidos duros, são mais utilizados os materiais cerâmicos, compósitos e metálicos; para tecidos moles, normalmente recorre-se a biomateriais poliméricos. De seguida, apresenta-se uma breve descrição sobre cada um dos biomateriais referidos relativamente à sua aplicação, vantagens e desvantagens:

Cerâmicos: são materiais muito utilizados no fabrico de *scaffolds* para aplicação em ortopedia, medicina dentária e dispositivos cardiovasculares. A sua aplicação torna-se vantajosa na medida em que possuem boa biocompatibilidade, são resistentes a fenómenos corrosivos e são inertes. Porém, são quebradiços, não resilientes, densos e a capacidade de processamento torna-se limitada pelas elevadas pressões e temperatura necessárias. Os materiais cerâmicos mais utilizados são a alumina, zircónia, fosfatos de cálcio, hidroxiapatite e os chamados vidros e vitro-cerâmicos bioativos, materiais cerâmicos desenvolvidos propositadamente para aplicações biomédicas).

Metálicos: São materiais utilizados na produção de matrizes para regeneração de tecidos duros. A maioria das matrizes metálicas são aplicadas para reconstrução da anca, vértebras, mandíbula, crânio e joelho. Têm a vantagem de possuir elevada resistência mecânica, condutividade elétrica, força de tensão e serem dúcteis. Porém, são suscetíveis de sofrer

corrosão, muito densos, difíceis de manusear e pouco biocompatíveis. Os materiais desta natureza mais utilizados são as ligas de cobalto, aço inoxidável e ligas de titânio.

Poliméricos: Estes materiais são fáceis de produzir, possuem baixa densidade, poderão ser elásticos e caracterizam-se por uma resistência elétrica e química variável. Contudo, as propriedades mecânicas são fracas, deformam-se ao longo do tempo, e possuem baixa condutividade. Estes são muitas vezes utilizados na produção de próteses endovasculares (*stents*), próteses vasculares e ligamentos artificiais.

Compósitos: São materiais que têm a capacidade de exibir propriedades intermédias entre vários tipos de materiais, pois resultam da combinação de materiais poliméricos, metálicos e/ou cerâmicos. Porém, normalmente estão associados a um elevado custo de produção e difícil processamento. São normalmente utilizados em cimentos dentários, válvulas do coração e implantes de articulações e reconstrução óssea.

### 1.1.1. Matrizes para regeneração de tecidos

Matrizes para regeneração de tecidos (*scaffolds*) são estruturas tridimensionais que funcionam como suportes para o crescimento de tecidos, envolvendo a adesão, proliferação, diferenciação e migração celulares. Pretende-se que esta estrutura imite a matriz extracelular e oriente a formação do novo tecido nas três dimensões. A matriz extracelular (ECM) é uma entidade estrutural natural do corpo que serve de suporte celular. Esta é constituída essencialmente por três tipos de moléculas: proteínas estruturais (colagénio e elastina), proteínas especializadas (fibrina, fibronectina e laminina, que influenciam a diferenciação, migração e adesão celulares) e proteoglicanos. Os proteoglicanos são compostos por um núcleo proteico ao qual estão ligadas covalentemente cadeias de glicosaminoglicanos (GAG), formando assim uma estrutura de elevado peso molecular. Os GAGs contêm sacarídeos carregados negativamente, pelo que facilmente se ligam de modo não-específico a moléculas com carga elétrica oposta, incluindo fatores de crescimento. São, ainda, fortemente hidratados, permitindo manter a hidratação da matriz [4]. A aplicabilidade das matrizes para regeneração de tecido é vasta, atendendo tanto a necessidades de regeneração em tecidos moles (pele, tendões, músculos, entre outros), como em tecidos duros (tecido ósseo e cartilagem). A sua utilização e desenvolvimento surge da necessidade de colmatar e corrigir a ausência de tecido, defeitos congénitos, deformações e traumatismos que possam surgir. Para tal, a zona danificada poderá ser substituída por uma matriz, permitindo o crescimento e desenvolvimento de um novo tecido, com função e propriedades idênticas ao tecido vizinho [1].

Em geral, é requerido que as matrizes para regeneração de tecidos possuam as seguintes propriedades:

- As propriedades mecânicas devem ser semelhantes às do tecido do local de implantação ou suficientemente superiores a forças de tração ou compressão a que possam ser sujeitos, na medida em que devem “proteger” as células aderidas;
- Possuir perfis de biocompatibilidade e toxicidade aceitáveis, mitigando possíveis respostas inflamatórias. Além de que os produtos de degradação da matriz devem ser possíveis de metabolizar pelo organismo.
- Imitar a EMC nativa;
- Ser altamente poroso e existir interconectividade entre os poros. Regra geral, exige-se uma porosidade próxima dos 90% com diâmetro mínimo de poro entre os 100 e 500  $\mu\text{m}$ , de modo a possibilitar a neovascularização (formação de capilares sanguíneos). Além disso, a interconectividade dos poros permite a comunicação celular, assim como a difusão de nutrientes;
- A matriz deve suportar a adesão e proliferação celular das células, facilitando simultaneamente a sua migração;
- Taxa de degradação adequada: se a matriz é biodegradável, este deve ser bioabsorvido/biodegradado num determinado período de tempo equivalente ao tempo necessário a que o espaço ocupado anteriormente pela matriz seja substituído por tecido “novo”.
- A morfologia da superfície deve ser apropriada: existir permeabilidade, elevada rugosidade e porosidade, conduzindo ao aumento da área específica e, conseqüentemente, a uma maior adesão celular [9], [10].

Desta forma, conclui-se que, para o desenvolvimento de uma matriz, é necessário ter em conta múltiplas variáveis, de modo a que ocorra uma interação adequada com as células numa escala temporal e espacial pretendida. A compreensão dos processos celulares, assim como a sua interação com as matrizes para regeneração de tecido, torna-se fulcral nestes estudos.

## 1.2. Tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto. Este é formado por 206 ossos e tem a função de suportar os tecidos moles, proteger os órgãos vitais, permitir o movimento, armazenar iões (cálcio, fosfato, bicarbonato, magnésio, entre outros) e permitir a formação, desenvolvimento e maturação dos componentes celulares do sangue. Este tecido duro é um tipo

especializado do tecido conjuntivo, é formado por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e pela matriz óssea [11].

### **Matriz óssea**

A matriz óssea é constituída fundamentalmente por duas partes: parte orgânica e parte inorgânica. A parte orgânica é constituída, maioritariamente, por fibras de colagénio do tipo I (95%), que lhe confere flexibilidade, glicoproteínas (responsáveis pela calcificação, reabsorção e metabolismo do osso) e proteoglicanos. Por outro lado, a parte inorgânica, que confere a resistência do osso, é composta predominantemente por iões fosfato e cálcio que se ligam e formam a hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). A hidroxiapatite, o principal componente inorgânico do tecido ósseo, resulta da mineralização e da formação de cristais de cálcio e de fosfato. A mineralização óssea é a etapa final no processo de formação do tecido ósseo [12].

### **Células do tecido ósseo**

O osso é formado por dois tipos de estruturas: osso cortical e osso esponjoso. Tanto uma estrutura como a outra são sintetizadas e reabsorvidas continuamente de forma natural, sendo os agentes responsáveis por esse processo os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos localizam-se em cavidades ou lacunas da matriz óssea, onde se formam canais que permitem a comunicação entre osteócitos diferentes, tornando possível a difusão de nutrientes. Estes têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea. Os osteoblastos têm a capacidade de sintetizar a parte orgânica da matriz. Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos. O novo osso é formado à medida que os osteoblastos produzem osteoide (porção orgânica de matriz não mineralizada do tecido ósseo) e mineralizam a matriz óssea. Os osteoclastos são células móveis, de grande dimensão e ramificadas. Estas participam nos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo [11]–[13]. O osso possui uma capacidade intrínseca de se regenerar, assim como a capacidade de se autorreparar em resposta a uma lesão. Neste mecanismo de regeneração estão implicadas as ações de múltiplas células que permitem o crescimento do novo tecido. Na Figura 1, apresenta-se a estrutura esponjosa e compacta do osso assim como as células que o constituem.

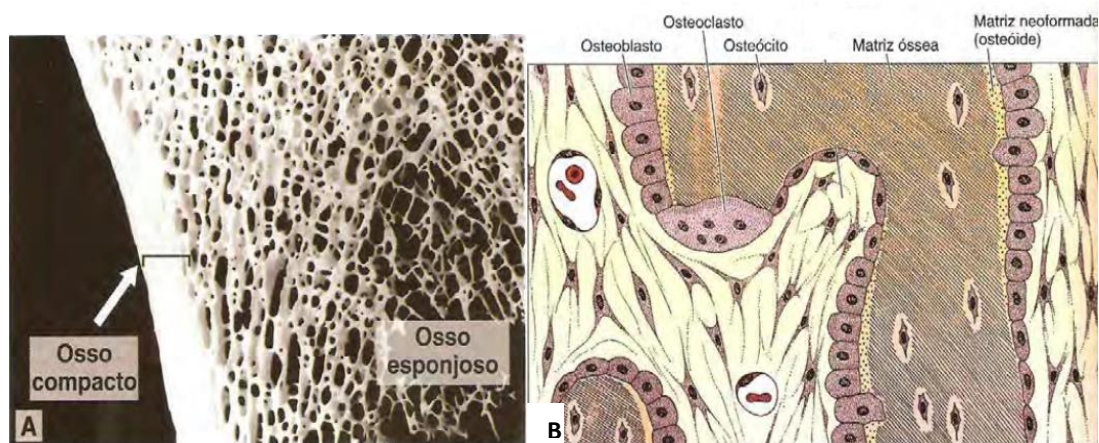


Figura 1 - (A) Estrutura do osso compacto e do osso esponjoso; (B) Matriz óssea e células que a constituem. (Adaptado de [11]).

É de extrema importância o equilíbrio entre a formação de tecido e a reabsorção óssea, todo o mecanismo está interdependente das condições de suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica e a presença de uma estrutura tridimensional que sirva de apoio ao processo de neoformação óssea – enxertos ou matrizes para regeneração de tecidos [14].

## 1.2.1 Regeneração do tecido ósseo

O processo de regeneração do tecido ósseo tem por base os seguintes processos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese é a etapa relativa à formação de tecido novo e ocorre por ação dos osteoblastos e células precursoras de osteoblastos viáveis. Por outro lado, a osteoindução traduz o mecanismo de indução de formação de tecido através de células osteogênicas e fatores de crescimento [15]. Os materiais osteocondutores têm a capacidade de recrutar os precursores de osteoblastos para o interior da matriz tridimensional que serve de suporte à regeneração de tecido e induzir a proliferação e diferenciação celular, desta forma, esta matriz serve como guia para a neovascularização e crescimento de tecidos no local do defeito/deformação, levando à formação de um tecido novo, num processo mediado por uma cascata de sinais, que envolve a regulação do metabolismo ósseo e a ação de moléculas sinalizadoras. De um modo geral, são necessárias as seguintes condições para que ocorra o processo de regeneração: (i) presença das células que formam o tecido ósseo ou células suas precursoras; (ii) existência de um estímulo osteoindutor que promova a diferenciação celular; (iii) existência de um meio osteocondutor, que permita a proliferação das células e a diferenciação de osteoblastos.

A porosidade é uma propriedade fundamental da matriz na regeneração de tecido ósseo, o diâmetro mínimo para que ocorra o crescimento de células ósseas é de 100 - 500  $\mu\text{m}$  para que

seja possível a neovascularização, i.e., para que se formem capilares sanguíneos que se penetrem no interior da matriz, permitindo o transporte de nutrientes para as regiões internas onde ocorrerá o crescimento do tecido novo. Para poros menores entre 10 – 75 µm existe a penetração apenas de tecido fibroso, o que ajuda na fixação mecânica da matriz tridimensional [16], [17].

## 1.2.2 Matrizes para regeneração de tecido ósseo

Em alternativa a enxertos ósseos, a regeneração de tecido ósseo é de extrema importância na reconstrução óssea em Medicina Dentária e Ortopedia, bem como a utilização de matrizes para regeneração de tecidos associados. Existe uma variedade extensa de cimentos<sup>1</sup> e matrizes no mercado, dirigidos especificamente para a reconstrução óssea, de origem metálica, cerâmica ou compósita [18]. As propriedades da matriz podem influenciar bastante o processo de neoformação óssea. Além das propriedades referidas na secção 1.1.1, a matriz deve possibilitar a condução de células responsáveis pela formação de tecido, bem como de fatores de regulatórios, para o local da lesão/defeito, assim como o crescimento celular (osteocondutividade e osteoindução, respetivamente) [19], [20]. Adicionalmente, o grau de rugosidade e porosidade determinam a área de superfície e, conseqüentemente, a adesão celular. As proteínas presentes no plasma e nos fluídos intersticiais adsorvem à superfície do material e as células ligam-se a essas proteínas através das integrinas, que se encontram na membrana celular. As proteínas que se ligaram à superfície do material possuem o tripeptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) responsável pela interação específica com os recetores das integrinas, ocorrendo, assim, a adesão da célula à superfície do material. As propriedades da superfície do material que mais afetam este processo de adesão celular são a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, topografia e existência de grupos funcionais à superfície do material que promova a adesão celular, como por exemplo grupos amina ou carboxilo [21].

A classe de biomateriais que apresenta uma composição e propriedades mecânicas mais semelhantes à parte inorgânica do tecido ósseo é a classe dos materiais cerâmicos, sendo a hidroxiapatite e o fosfato de cálcio os mais adequados. Para além disso, são estruturalmente semelhantes aos componentes inorgânicos do tecido ósseo, são biocompatíveis e osteocondutivos, afastando respostas imunológicas devido à ausência de proteínas, além de que a hidroxiapatite é estável ao pH fisiológico e participa ativamente nas ligações ósseas, formando

---

<sup>1</sup> Cimentos ósseos: materiais sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, utilizados para preencher lacunas no tecido ósseo. É comum utilizarem-se cimentos para preencher espaços vazios entre o osso e implantes. Também são considerados cimentos, os materiais utilizados em Odontologia no preenchimento da dentina. O material mais utilizado como cimento é o PMMA, poli(metacrilato de metilo)[81].



uma forte ligação química com o tecido ósseo [16]. Os biomateriais cerâmicos possuem, um tempo de degradação *in vivo* elevado (existindo exceções, como o fosfato de tricálcico, que é um material cerâmico absorvível) o que permite estabelecer um equilíbrio entre o tempo de degradação da matriz e a neoformação óssea [22]. Porém, este tipo de materiais também pode mostrar algumas limitações, nomeadamente, fragilidade, o que impede a sua utilização em zonas que são submetidas a grandes esforços mecânicos, comparativamente às matrizes metálicas e poliméricas. Poderão ser combinados com materiais poliméricos, formando compósitos, que são criados de modo a possuírem as características necessárias a uma aplicação em regeneração do tecido ósseo.

### **1.3. Sistemas de libertação controlada de fármacos**

A maioria dos fármacos pode ser administrada através de diferentes vias definidas, de uma forma geral, como locais ou sistémicas. No entanto, apenas uma diminuta fração da dose administrada atinge o tecido-alvo, sendo a restante parte distribuída por outros tecidos e/ou metabolizada antes de atingir o local pretendido. Os sistemas de entrega de fármacos estão muitas vezes associados ao conceito de “libertação controlada”, o que significa que o fármaco é libertado ao longo de um período de tempo pré-determinado. Na administração convencional sistémica de apenas uma única dose, o fármaco atinge a corrente sanguínea e acaba por ser distribuído através do sistema circulatório. A concentração de fármaco começa por aumentar até atingir um pico máximo e, finalmente, diminui até ser nula. Este comportamento pode tornar-se problemático, na medida em que se torna difícil manter a concentração terapêutica constante ao longo do tempo. Para que a concentração de fármaco se consiga manter entre os dois limites terapêuticos de concentração de fármaco que se devem respeitar – o limite de concentração máxima de fármaco, a partir do qual exhibe toxicidade, e o limite de concentração mínima eficaz (Figura 2) – durante um intervalo de tempo alargado, é necessário uma administração repetida. Nestes dois casos, a biodisponibilidade do fármaco é reduzida. De modo a conseguir-se uma concentração de fármaco que se situe entre os dois limites terapêuticos, durante um período alargado de tempo, é necessário que o fármaco seja libertado de forma gradual e controlada. É possível obter este tipo de libertação utilizando os chamados sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos.

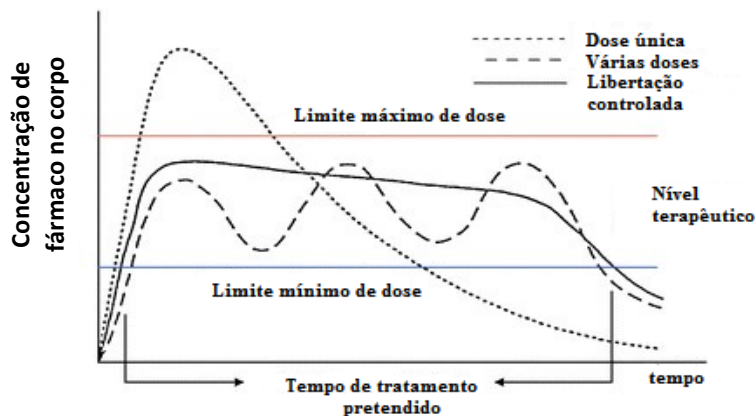


Figura 2 - Variação da concentração de fármaco no corpo em função do tempo, para dois modos de administração: convencional e por liberação controlada. (Adaptado de [82])

Estes sistemas são aplicados uma só vez e libertam o fármaco próximo ou no local-alvo, permitindo não só uma maior eficácia, como também a diminuição da toxicidade, devido à diminuição de possíveis efeitos secundários sistêmicos, além de proporcionarem uma maior comodidade ao paciente. Os SLC estão associados à interação química ou física entre fármacos e materiais biocompatíveis que têm a capacidade de controlar a entrega/libertação do fármaco. Os SLC podem ser constituídos por vários tipos de materiais, porém os mais estudados são os sistemas de liberação controlada de base polimérica [23]–[25].

Para o desenvolvimento de um SLC, torna-se necessário um conhecimento aprofundado acerca das propriedades físico-químicas do fármaco, farmacocinética e farmacodinâmica, as barreiras fisiológicas e de absorção do mesmo por parte do organismo, as propriedades dos materiais utilizados para a construção deste mesmo sistema (biocompatibilidade, interações com o fármaco e propriedades físico-químicas) e conhecimento sobre as tecnologias requeridas para a sua produção.

Existem diversos sistemas que podem ser produzidos para liberação controlada de fármacos, destacando-se as microcápsulas, microesferas, fibras ocas, filmes finos, lipossomas, dendrímeros, entre outros. Existem também estruturas de natureza compósita (orgânica-inorgânica) que podem constituir sistemas de liberação de fármacos, designados materiais híbridos, obtidos por exemplo por tecnologia sol-gel. Ao longo do projeto serão descritas em maior detalhe dois tipos de estrutura de base polimérica, mais concretamente a produção de fibras e partículas [26]–[28].

### 1.3.1. Mecanismos de libertação controlada de um fármaco a partir de sistemas poliméricos

Existe uma grande variedade de polímeros que podem ser usados na preparação de SLCs. Devem ser biocompatíveis e os seus produtos de degradação não devem ser tóxicos. Para além disso, é necessário ter em consideração o seu grau de hidrofílicidade/hidrofobicidade, assim como o seu grau de biodegradabilidade *in vivo*. Se o polímero for biodegradável, os fenómenos de degradação associados ocorrem maioritariamente por hidrólise, com possibilidade de catálise enzimática, tendo de dar origem a produtos não tóxicos, biocompatíveis e metabolizáveis pelo organismo. No caso dos polímeros bioerodíveis, ou seja, em que apesar de também poderem sofrer degradação hidrolítica, sofrem perda de massa por dissolução, a bioerosão pode ocorrer à sua superfície ou na massa. Na bioerosão superficial, a amostra vai sofrendo diminuição do seu tamanho, não alterando a sua estrutura interna e o processo de libertação de fármaco ocorre a velocidade constante. Na bioerosão na massa, toda amostra é afetada e vai mantendo as suas dimensões ao longo do processo de libertação de fármaco, até se desintegrar (Figura 3).

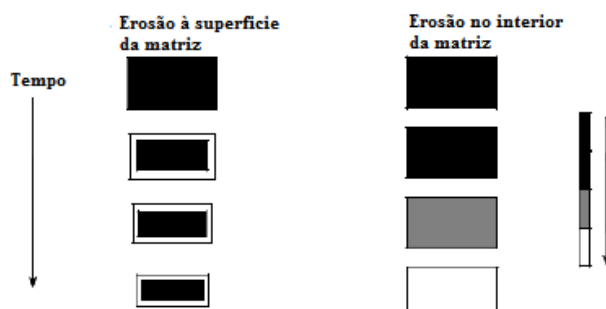


Figura 3 - Tipos de bioerosão: Bioerosão superficial (esquerda) e bioerosão na massa (direita)

A libertação do fármaco a partir de uma matriz polimérica, pode ocorrer por três mecanismos diferentes: (i) controlo pelo solvente (sistemas osmóticos e sistemas controlados por absorção de água); (ii) controlo químico (sistemas monolíticos e sistemas de cadeia pendente); e (iii) controlo por difusão (sistemas de reservatório e sistemas monolíticos ou matriciais). A taxa de libertação do fármaco ao longo do tempo, pode ser controlada por um misto dos sistemas referidos ou por fenómenos físicos como a dessorção [29].

Os sistemas controlados pelo solvente podem ser de dois tipos: sistemas de libertação controlados pela pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água. Nos sistemas de libertação controlados pela pressão osmótica, existe um reservatório de volume constante com um orifício. Este é revestido por uma membrana semipermeável que apenas permite a

passagem de solvente e não de soluto (fármaco). No interior do reservatório encontra-se fármaco no estado sólido e uma solução de fármaco. A pressão osmótica que se forma devido à diferença de concentrações do fármaco no exterior e no interior da membrana com permeabilidade específica, origina um fluxo de água do exterior para o interior do reservatório, forçando a solução saturada em fármaco que se encontra no interior saia pelo orifício. Por outro lado, nos sistemas mediados por absorção de água, o fármaco que se encontra disperso na matriz polimérica é libertado conforme o aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, devido ao intumescimento da matriz em consequência da absorção de água. O aumento da mobilidade resulta numa maior flexibilidade e liberdade de movimento das cadeias poliméricas, levando assim à libertação do fármaco por difusão.

Nos sistemas controlados por ação química o processo de libertação pode ser dividido em dois tipos: sistemas de cadeia pendente e sistemas monolíticos. Nos sistemas de cadeia pendente, o fármaco está ligado covalentemente às cadeias poliméricas, sendo libertado à medida que ocorre hidrólise da ligação fármaco-polímero. Nos sistemas monolíticos, o fármaco, inicialmente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, liberta-se, a conforme a taxa de biodegradação ou bioerosão da matriz da polimérica [30].

Nos sistemas de libertação controlados por difusão, existem dois tipos de sistemas que podem ser preparados: sistemas de reservatório e sistemas matriciais/monolíticos. Nos sistemas de reservatório, existe uma membrana polimérica não biodegradável que reveste um núcleo onde o fármaco se encontra. Este tipo de estruturas promove a difusão lenta do fármaco através da membrana, que está dependente quer das propriedades do fármaco, quer do polímero que constitui a membrana. Em sistemas matriciais, o fármaco fica uniformemente dissolvido ou, disperso na matriz polimérica. Neste caso, a taxa de libertação é apenas controlada pela difusão do fármaco ao longo da matriz.

### **1.3.2. Modelos que descrevem a cinética de libertação de um fármaco**

A difusão é um mecanismo baseado na transferência de massa entre dois sistemas devido à existência de um gradiente de concentração, ou seja, é o transporte de uma substância de um meio de maior de concentração para um meio com concentração mais baixa [31]. Em 1855, Adolf Eugen Fick propôs uma lei para descrever o fenómeno de difusão em estado estacionário, não levando em conta o tempo em que o processo ocorre, designada primeira lei de Fick. Segundo esta lei, a massa de uma dada substância que é transferida através de uma secção numa dada direção, por unidade de tempo, é proporcional ao gradiente de concentração nessa direção. A proporcionalidade entre o fluxo de massa e o gradiente de concentração é

expressa através da Equação (1), onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $J$  o fluxo de massa por unidade de tempo,  $C$  a concentração de fármaco e  $x$  a direção da difusão. O facto da multiplicação entre o coeficiente de difusão e a derivada da concentração em ordem à direção a que o fenómeno ocorre ser negativa, significa que a difusão do fármaco ocorre de meios de concentração superior para meios de concentração inferior. Nos SLCs de fármacos do tipo matriz polimérica, o coeficiente de difusão depende da concentração de fármaco em causa, da densidade de reticulação do polímero e do seu grau de ramificação e cristalinidade, do tamanho das zonas cristalina e da força iónica do meio de libertação [32].

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (1)$$

Como a maioria dos processos que envolvem difusão não decorrem em estado estacionário, a primeira lei de Fick deixa de ser válida. Deste modo, Fick propôs uma segunda lei que descreve o fenómeno de transferência de massa em estado não-estacionário (Equação 2), com as condições iniciais e fronteira aí apresentadas, onde  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco no sistema,  $C_1$  a concentração do fármaco na superfície e  $l$  a espessura da matriz onde o fármaco se encontra. Integrando a Equação 2, obtém-se uma expressão matemática relativa à difusão do fármaco (Equação 3) sendo que  $l$  é a espessura da matriz onde o fármaco se encontra imobilizado,  $M_t$  designa a quantidade de fármaco libertada no tempo  $t$  e  $M_\infty$  a quantidade de fármaco libertada quando o tempo tende para infinito.

$$\begin{aligned} \frac{\partial C}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} & (2) \\ t = 0 \quad -\frac{l}{2} < x < \frac{l}{2} \quad C &= C_0 \\ t > 0 \quad x = \pm \frac{l}{2} \quad C &= C_1 \end{aligned}$$

Porém, esta equação é apenas válida para  $M_t/M_\infty \leq 0,6$ , pois é quando o perfil de libertação é praticamente linear quando representado em função da raiz quadrada do tempo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left( \frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Quando ocorre absorção do solvente e há intumescimento, devido aos fenómenos de relaxação polimérica, a difusão em muitos polímeros nem sempre é descrita de forma adequada

pelas leis de Fick, para condições fronteira constantes. Desta forma, Alfrey, Gurnee e Lloyd, em 1966 descreveram três casos que podem ocorrer tendo por base o fenômeno de difusão e o da relaxação da matriz polimérica:

- Caso I (difusão Fickiana) - a taxa de difusão é mais baixa que o relaxamento da matriz polimérica;
- Caso II - a taxa de difusão é mais alta que o processo de relaxamento da matriz;
- Difusão anômala (não-fickiana) – as taxas de difusão e de relaxamento são semelhantes.

Tendo por base estes mecanismos, existem vários modelos matemáticos que tentam descrever os perfis de libertação controlada de fármacos a partir de matrizes com as mais diversas geometrias, morfologias e fenômenos de interação que possam existir entre a forma farmacêutica e o fármaco a ser libertado. Neste trabalho, foram considerados os modelos matemáticos que melhor podem descrever a libertação de fármacos encapsulados ou dispersos em sistemas poliméricos com diferentes geometrias (esférica, cilíndrica e planar). Nenhum dos modelos aplicados serve para descrever especificamente sistemas compósitos para libertação de fármacos. Porém, neste projeto, será feita essa aproximação pois, apesar dos modelos selecionados se destinarem apenas à descrição da libertação de fármaco a partir sistemas poliméricos, na maioria das amostras o fármaco encontra-se encapsulado em sistemas dessa natureza. De entre os modelos existentes na literatura e habitualmente utilizados para descrever os perfis de libertação, foram selecionados os seguintes: modelos de Korsmeyer- Peppas, ordem zero, primeira ordem, de Higuchi, de Hixson-Crowell, de Baker-Lonsdale e de “dessorção limitante” [29], [33]–[36]. O critério de seleção foi a geometria do SLC e o mecanismo de libertação do fármaco que se espera ser o predominante (difusão). Existem, ainda, outros modelos, mas referem-se a SCLs de geometria diferente ou controlados por outros mecanismos.

### **Modelo de Korsmeyer-Peppas**

Este modelo, também designado de “*power law*”, é dos mais genéricos para descrever a libertação de um fármaco tendo em conta mecanismos que envolvem controlo por difusão e por relaxamento polimérico. Para além dos três casos descritos acima, também leva em conta o caso de difusão designada quase-fickiana (caso em que a taxa de difusão é muito mais baixa que a dos fenômenos de relaxamento polimérico) e o caso do chamado transporte Super Caso II (onde ocorre um retardamento inicial da libertação e, posteriormente, uma libertação mais acentuada). A expressão genérica utilizada por este modelo está representada na Equação 4, em que

$k = 4\left(\frac{D}{\pi l^2}\right)^{1/2}$  e  $n$  é o expoente de libertação, que permite identificar o mecanismo de libertação, tendo em conta a geometria da matriz polimérica que contém o fármaco. A determinação do expoente  $n$  efetua-se através da representação gráfica de  $M_t/M_\infty$  (até ao valor de 0,6) em função do logaritmo do tempo (Figura 4), sendo  $n$  igual ao declive da reta de regressão linear.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4)$$

Sabendo o valor do expoente  $n$  e tendo em conta a geometria da matriz, torna-se possível caracterizar o mecanismo de transporte, consultando a Tabela 1 [33].

Tabela 1 – Interpretação dos mecanismos de libertação tendo em conta o expoente de libertação  $n$  do modelo de Korsmeyer- Peppas e a geometria da matriz.

$n$			Mecanismo de transporte
Geometria esférica	Geometria planar	Geometria cilíndrica	
< 0,43	< 0,5	< 0,45	Difusão <i>quase</i> -fickiana
0,43	0,5	0,45	Difusão fickiana (Caso I)
0,43 < n < 0,85	0,5 < n < 1,0	0,45 < n < 0,89	Transporte anómalo (não fickiano)
0,85	1,0	0,89	Transporte Caso II
> 0,85	> 1,0	> 0,89	Transporte Super Caso II

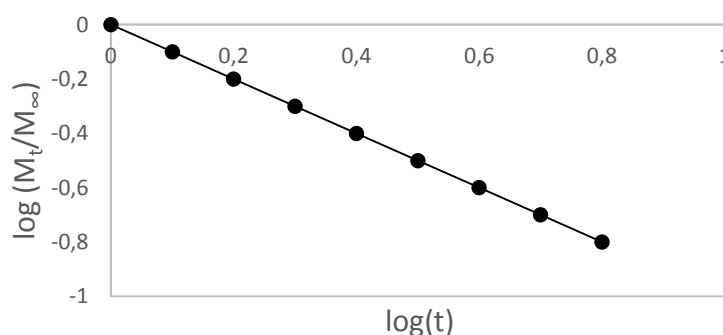


Figura 4 - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas.

### Modelo de Ordem Zero

No caso em que ocorre dissolução do fármaco a partir de uma matriz de geometria diversa que não sofra degradação ou desagregação, o fármaco é libertado lentamente e a uma taxa constante, sendo a sua cinética de saída descrita pelo modelo de ordem zero, sendo o

mesmo mecanismo que o Caso II do modelo de Korsmeyer-Peppas ( $n = 1$ ). A Equação 5 descreve o modelo de ordem zero, onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ,  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco na solução (normalmente  $Q_0 = 0$ ) e  $K_0$  a constante de libertação de ordem zero expressa em unidades de concentração por unidade de tempo. Se dividirmos a Equação 5 por  $Q_0$  obtém-se a Equação 6. Sendo que  $f_t = 1 - (Q_t/Q_0)$  representa a quantidade de fármaco libertado no tempo  $t$ . Para verificar a aplicabilidade deste modelo deve-se representar graficamente  $f_t$  em função do tempo (Figura 5) [34].

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (5)$$

$$f_t = k_0 t \quad (6)$$

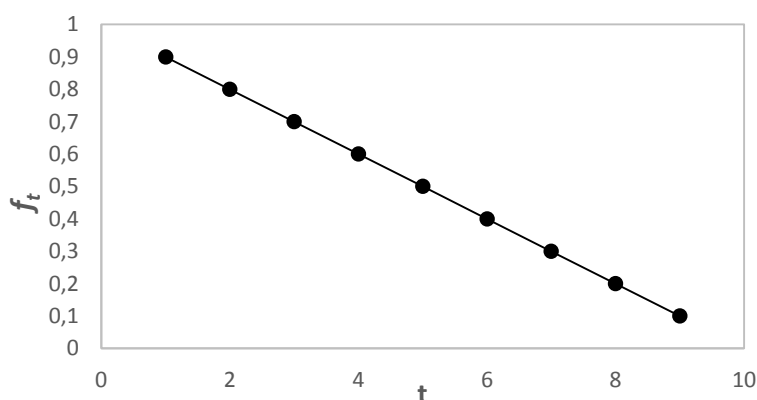


Figura 5 - Representação gráfica do modelo de ordem zero em que a regressão linear obtida é do tipo  $f(t) = bt + a$

### Modelo de Primeira Ordem

Neste modelo, a velocidade de saída do fármaco diminui exponencialmente com o tempo, sendo representado pela Equação 7, onde  $k$  é a constante de velocidade de primeira ordem e  $C$  é a concentração de fármaco no tempo  $t$ . Logaritmizando a Equação 7, obtém-se a Equação 8, onde  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco,  $k$  é a constante de libertação de primeira ordem e  $t$  o tempo. Para verificar se este modelo se adapta aos dados experimentais, deve representar-se o logaritmo decimal da quantidade libertada em função do tempo (Figura 6). Este modelo tem sido usado com sucesso para descrever a dissolução de um fármaco a partir de formas farmacêuticas hidrofílicas e porosas [37].

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (7)$$

$$\log C = \log C_0 - \frac{kt}{2,303} \quad (8)$$



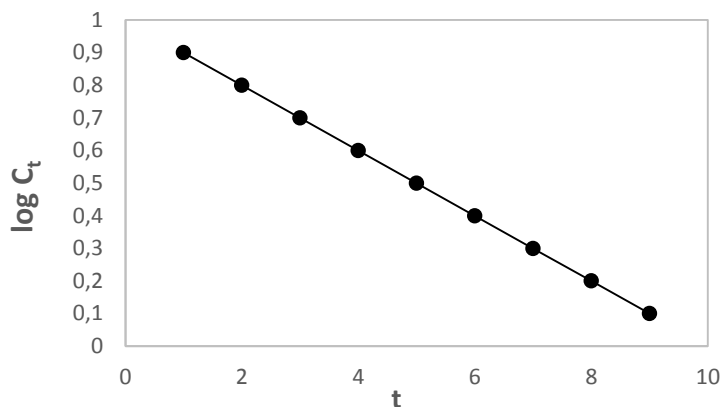


Figura 6 - Representação gráfica do modelo de primeira ordem com um declive de  $-k/2,303$

### Modelo de Higuchi

Em 1961, Higuchi descreveu a libertação de um fármaco a partir de uma matriz de geometria planar. Porém, com o decorrer dos anos, o modelo proposto foi sofrendo alteração, de modo a dar resposta também a sistemas porosos com diferentes geometrias. Esse modelo é baseado nos seguintes pressupostos: (i) a concentração inicial de fármaco no interior da matriz é muito superior à solubilidade do mesmo no exterior da matriz; (ii) a difusão do fármaco ocorre apenas numa direção; (iii) o tamanho do fármaco é muito menor que a espessura da matriz na qual se encontra contido; (iv) a dissolução e intumescimento da matriz polimérica são desprezáveis; (v) o coeficiente de difusão é constante e (vi) no meio de libertação, a condição de submersão total da matriz é assegurada. O modelo proposto para matrizes de geometria planar apresenta-se na Equação 9, onde  $Q$  é a quantidade de fármaco libertada no tempo  $t$  por unidade de área  $A$ ,  $C$  é a concentração inicial de fármaco,  $C_s$  a solubilidade do fármaco na matriz e  $D$  o coeficiente de difusão. Simplificando o modelo, obtêm-se a Equação 10. Sendo  $K_H$  a constante de dissolução de Higuchi, que leva em conta a porosidade, tortuosidade e o volume livre criado pela interconectividade dos poros da matriz. Esta equação simplificada do modelo de Higuchi aplica-se a matrizes com outras geometrias para além da planar. Para determinar os parâmetros do modelo através dos dados experimentais, deve proceder-se a um ajuste linear do perfil  $M_t/M_\infty$  até 0,6 versus raiz quadrada do tempo (Figura 7).

$$Q = A \times \sqrt{D(2C - C_s)t} \quad (9)$$

$$Q = K_H \times t^{1/2} \quad (10)$$

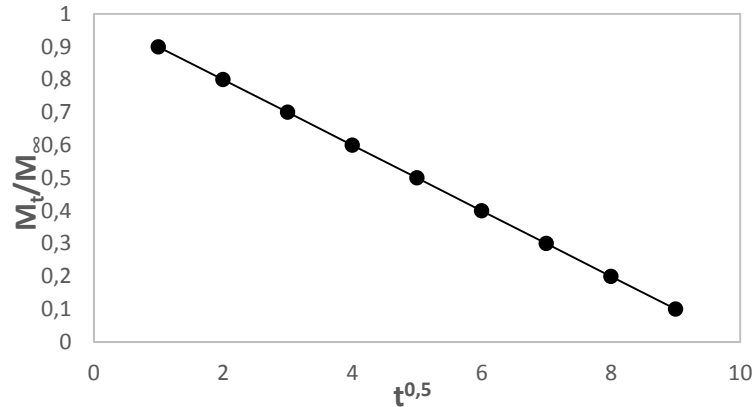


Figura 7 - Representação gráfica do modelo de Higuchi em que as curvas obtidas são do tipo  $f(t) = a + bt^{0,5}$

### Modelo de Hixson-Crowell

Em meados de 1930, Hixson e Crowell reconheceram que a área da superfície das matrizes era proporcional à raiz cúbica do seu volume. Deste modo, derivaram a Equação 11, onde  $W_0$  é a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica,  $W_t$  é o fármaco retido na matriz no tempo  $t$  e  $\kappa$  a constante que leva em conta a razão superfície-volume. A Equação 11 descreve a liberação de um fármaco a partir de um sistema que sofre alterações de área e diâmetro durante a liberação do fármaco, mas mantendo a geometria inicial. Para avaliar a adequabilidade do modelo aos resultados obtidos, é necessário representar graficamente a raiz cúbica da massa retida na matriz em função do tempo de liberação (Figura 8).

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = \kappa t \quad (11)$$

O modelo aplica-se a formas de dosagem com geometria de disco e esférica, caso as suas dimensões diminuam proporcionalmente, i.e., não se alterando a sua forma geométrica inicial [34].

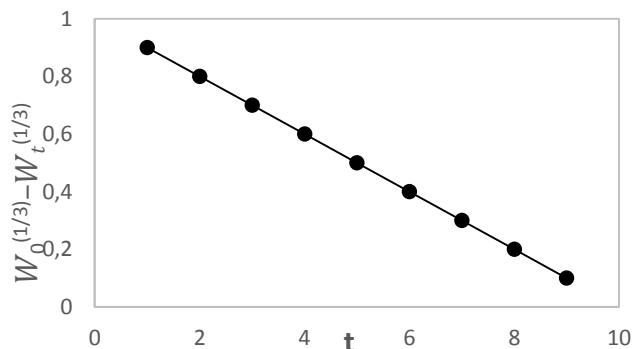


Figura 8 - Representação gráfica do modelo de Hixson Crowell em que as curvas obtidas são do tipo  $f(t) = bt + a$

### Modelo de Baker-Lonsdale

Em 1974, Baker e Lonsdale desenvolveram um modelo específico para descrever a libertação a partir de matrizes esféricas. Para isso, apoiaram-se no modelo de Higuchi anteriormente descrito, desenvolvendo a expressão matemática apresentada pela Equação 12, onde  $k$  é a constante de libertação. O estudo da cinética da libertação pode ser obtida através da representação gráfica do primeiro membro da Equação 12 em função do tempo (Figura 9).

$$f_t = \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (12)$$

O modelo de Baker-Lonsdale tem sido aplicado com sucesso a microcápsulas e microesferas [34], [35], [37].

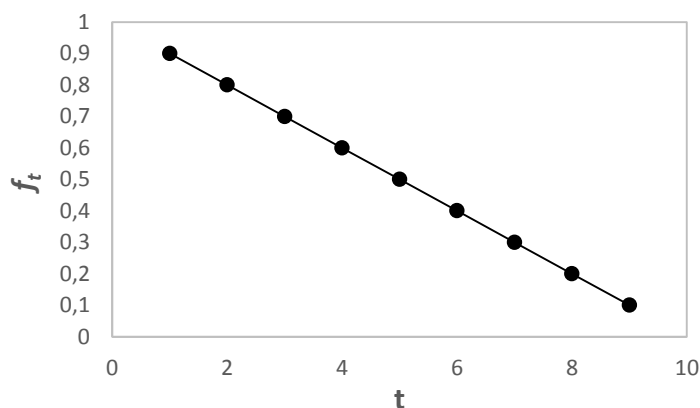


Figura 9 - Representação gráfica do modelo de Baker- Lonsdale

### Mecanismo de “dessorção limitante”

No caso de incorporação de fármacos em fibras produzidas por electrofiação, tem-se vindo a verificar que a libertação do fármaco não é controlada pelo mecanismo de difusão mas sim por dessorção a partir da superfície das fibras ou dos seus poros. Isto é, o fármaco que se liberta provém da superfície das fibras e dos seus poros, sendo a dessorção do fármaco que determina o processo de libertação. A Equação 13 baseia-se num modelo que leva em conta a porosidade das fibras ( $\alpha$ ), o coeficiente de difusão efetivo<sup>2</sup>  $D_{eff}$  e  $D$  o coeficiente de difusão (com  $\frac{D_{eff}}{D} \ll 1$ ), uma vez que o fenómeno de dessorção é o passo limitante do processo de libertação), sendo que o fator  $\alpha = \frac{m_{s0}}{m_{s0} + m_{b0}} < 1$ , sendo  $m_{s0}$  e  $m_{b0}$  a quantidade inicial de fármaco à superfície da fibra e a quantidade inicial na massa, respetivamente. Por outro lado,

<sup>2</sup> O coeficiente de difusão efetivo é um coeficiente de difusão que tem em conta a concentração inicial de fármaco aderido à superfície da matriz.

$\tau_r$  é o tempo característico do processo de libertação. Sabendo  $\tau_r$  e  $L$  (comprimento das fibras) pode calcular-se  $D_{eff}$  uma vez que  $D_{eff} = L^2/\tau_r$ . Na prática, para aplicação do modelo faz-se a aproximação de que  $L$  é igual ao diâmetro das fibras [29]. O estudo da cinética da libertação pode ser obtida através da representação gráfica do primeiro membro da Equação 13 em função do tempo, através de um ajuste não linear (Figura 10) [37], [38].

$$f_t = \frac{M_t}{M_{tot}} = \alpha \left[ 1 - \exp\left(-\frac{\pi^2 t}{8 \tau_r}\right) \right] \quad (13)$$

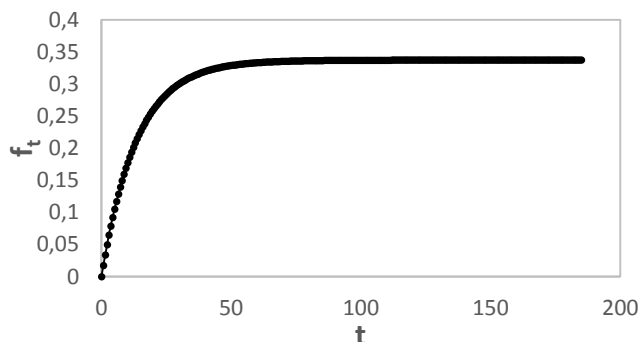


Figura 10 - Representação gráfica do modelo de "dessorção limitante" através de um ajuste não-linear do tipo  $f_t = a * (1 - \exp(-b * x))$

A escolha do modelo que melhor se adequa aos perfis de libertação, será feita tendo em conta o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mais elevado [39].

## 1.4. Fibras e partículas como veículos de sistemas de libertação de fármacos

### 1.4.1. Fibras produzidas pelo método de electrofiação

Uma nanofibra geralmente refere-se a uma fibra com um diâmetro inferior a 100 nm [40]. O método de electrofiação (do Inglês *electrospinning*), com o decorrer dos anos, tem vindo a ser um dos mais utilizados na produção de nanofibras e fibras, encontrando-se na vanguarda dos métodos de produção deste tipo de estruturas, devido às suas inúmeras vantagens [41], [42]. Para além de atingir elevados rendimentos, é muito versátil e proporciona materiais com uma elevada área de superfície. Além disso, é muito utilizado em engenharia de tecidos, pois a estrutura das nanofibras mimetiza as estruturas que compõem a ECM [43]. Electrofiação é um método que, através da aplicação de uma tensão elétrica a uma solução de um ou mais

polímeros, permite a obtenção de fibras com diâmetro à escala dos nanómetros [44]. Os elementos necessários para a electrofiação incluem uma fonte de alta tensão, um coletor e uma solução (Figura 11).

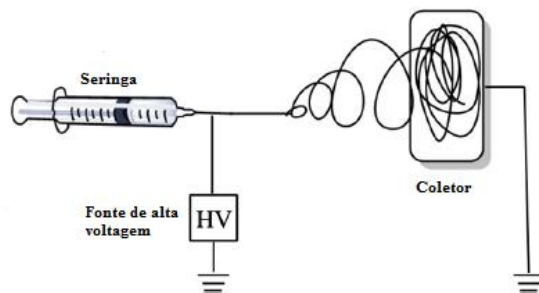


Figura 11- Esquema de montagem típica para o método de electrofiação. (Adaptado de [45]).

Neste método, uma solução de polímero é forçada a passar através de uma agulha de uma seringa, recorrendo ao uso de uma bomba doseadora. A agulha está ligada a uma fonte de alta tensão e, quando a força elétrica se torna maior do que a tensão superficial da solução, forma-se uma estrutura cada vez mais fina à saída da agulha, o cone de Taylor, dando origem a uma fibra. A fibra fica ligada da extremidade da agulha até ao coletor onde ocorre a sua deposição. O termo “cone de Taylor” foi descrito por Geoffrey Taylor (1964) referindo-se a uma gota que, ao ser submetida a um estiramento devido à aplicação de uma determinada voltagem, vai adotando, a dado momento, uma forma aproximadamente cónica. Seguidamente, o vértice do cone de Taylor é prolongado, apresentando-se sob a forma de um segmento linear que, posteriormente, forma a fibra – zona de espalhamento. As etapas do processo podem ser observadas na Figura 12 [45].

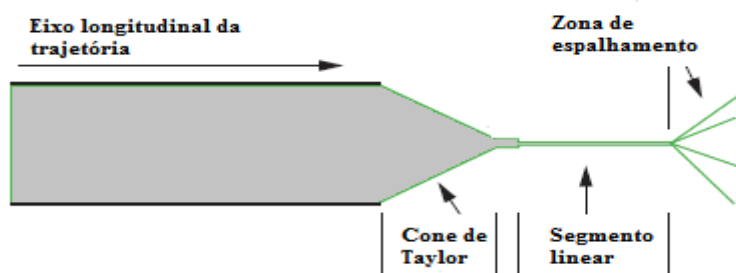


Figura 12- Etapas de formação das nanofibras (Adaptado de [46])

Os parâmetros que influenciam o processo de electrofiação e consequentemente as fibras obtidas são: as características da solução, a razão polímero/solvente, a tensão elétrica aplicada na solução, o caudal de alimentação, a distância entre a extremidade da agulha e coletor e a presença de sal na solução, entre outras. Há, assim, vários parâmetros operacionais que podem ser manipulados.

### **Parâmetros da solução**

Para tornar possível a produção de fibras, é necessário que a solução de polímero e fármaco possuam uma viscosidade adequada. Com um aumento da concentração de polímero e fármaco, aumenta a viscosidade da solução, resultando fibras de maior diâmetro. Se a concentração de polímero em solução for muito baixa, ao invés de se formarem fibras, formar-se-ão nanofibras com grânulos (*beads*). Deste modo, a viscosidade da solução e, conseqüentemente, a tensão superficial, são dos parâmetros da solução que mais afetam e determinam as características morfológicas das fibras [40], [47]. Para além disso, também o peso molecular do polímero utilizado é determinante relativamente às propriedades reológicas e elétricas da solução. Geralmente, soluções com polímeros de elevado peso molecular promovem a formação de fibras com um diâmetro adequado mas, se por outro lado, o peso molecular for baixo, a propensão é para que se formem nanofibras com grânulos. A viscosidade é dos parâmetros que mais influencia a morfologia e diâmetro da fibra final. Para tal, é necessário encontrar um valor ótimo pois, para baixas viscosidades, não é possível a formação de uma fibra contínua. Por outro lado, para viscosidades demasiado elevadas, há dificuldades a nível de ejeção da solução polimérica. Relativamente à tensão superficial, esta é função da composição da solução e desempenha um papel crítico no processo de electrofiação. Em geral, uma tensão de superfície elevada de uma solução inibe o processo de electrofiação por causa da instabilidade do jato e a geração de gotículas [47]. Um outro parâmetro que influencia o processo de ejeção da solução a partir da agulha, é a condutividade da solução. Esta é normalmente determinada pelo tipo de polímero e solventes utilizados e pela presença de sais ionizáveis. A escolha dos solventes é normalmente feita tendo por base a sua constante dielétrica, a solubilidade do polímero e a do fármaco, assim como a sua volatilidade. Uma constante dielétrica elevada, promove a formação de fibras mais finas e mitiga a formação de grânulos, tal como referido anteriormente [47][40]. Por outro lado, um solvente com elevada volatilidade permite a obtenção das estruturas fibrosas praticamente isentas de solvente, o que facilita o processo de secagem posterior, para além de que mitiga a compactação das fibras.

### **Parâmetros operacionais**

Tal como já referido, os parâmetros operacionais que mais influenciam as fibras produzidas são: a distância entre o capilar e o coletor, a voltagem aplicada, o tipo de coletor e o caudal de ejeção. O coletor é a superfície onde ocorre a deposição das fibras. Geralmente, o tipo de coletor utilizado são folhas de alumínio, líquidos não-solventes, telas de arame, barras paralelas ou outro tipo de estruturas condutoras, com ou sem rotação. A distância entre a agulha

e o coletor irá influenciar também o diâmetro das fibras, assim como a sua estrutura morfológica. Quanto maior a distância entre a agulha e o coletor, mais provável é a formação de grânulos. Para além disso, deve utilizar-se uma distância que permita a evaporação do solvente e a obtenção de fibras mais secas. A voltagem aplicada é um outro fator a considerar. Esta tem de ser suficientemente elevada para promover a formação do cone de Taylor. Para um caudal de ejeção constante, se a voltagem for menor que a tensão superficial da solução de polímero ocorre um gotejamento da mesma e não ocorre a formação de fibras. Contudo, se a voltagem for demasiado elevada, não se formam fibras, ocorrendo pulverização (*spray*) [48]. O caudal de ejeção também é um parâmetro muito importante pois, quanto menor é o caudal, maior será a evaporação do solvente. Para além disso, verifica-se que existe uma relação de proporcionalidade direta entre o caudal e o diâmetro e porosidade das fibras. Isto é, para caudais de ejeção superiores, verifica-se que as fibras obtidas normalmente possuem maiores diâmetros e porosidades [40].

### **Condições ambientais**

As condições ambientais a que ocorre o ensaio de electrofiação também influenciam as estruturas fibrosas que se obtêm, nomeadamente, a humidade e a temperatura. Em condições operacionais que utilizam elevadas temperaturas (25 – 60 °C), o diâmetro das fibras diminuiu, uma vez que com o aumento da temperatura, a viscosidade da solução também diminuiu [49]. Em relação às condições de humidade, quando se opera sob condições de humidade elevada, as fibras tendem a apresentar pequenos poros na sua superfície. Para além de que aparentam também um diâmetro de poro superior, devido à coalescência dos mesmos. Por outro lado, em ambientes muito secos, a propensão do solvente evaporar é maior, criando por vezes problemas operacionais e impossibilitando a formação de fibras [50].

### **Escolha de polímero e solventes**

A escolha do polímero deve ser efetuada tendo por base a aplicação final das fibras e as suas propriedades reológicas e elétricas, tal como referido. Para o caso da sua incorporação em matrizes e libertação controlada, é desejável a biocompatibilidade assim com a biodegradabilidade. Em sistemas de libertação controlada de fármaco, a degradação do polímero afetará o tempo de libertação do fármaco. Adicionalmente, deverá ser considerada a compatibilidade fármaco-polímero-solvente. Como referido anteriormente, com a utilização de fármacos sob a forma de sal pode ocorrer a sua deposição à superfície das fibras, ou seja, a libertação controlada é fortemente dependente da dissolução do fármaco na solução polímero-

solvente [51]. Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente para a produção de fibras para libertação controlada de fármacos e em engenharia de tecidos são: poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli(ácido-L-lático) (PLLA), poli(ácido-D,L-lático) (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poliuretano (PUR) e polifosfazenos, entre outros [52]. Deste modo, foi selecionado como polímero mais adequado o PLA (Figura 13), por ser extensivamente utilizado em ensaios de electrofiação, na medida em que a taxa de degradação da fibra torna-se mais lenta controlando assim a libertação do fármaco encapsulado e por ser biocompatível, dando origem a produtos de degradação não tóxicos para o organismo (ácido lático, água e dióxido de carbono) [53].

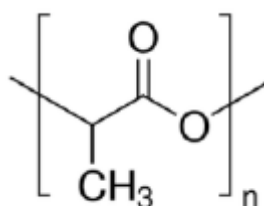


Figura 13 - Estrutura química do PLA

Por outro lado existem vários solventes e/ou misturas de solventes que podem ser usados em ensaios de electrofiação. A sua escolha irá depender da afinidade para com o polímero e fármaco, ponto de ebulição e volatilidade, constante dielétrica e toxicidade. Foram selecionados dois solventes considerados como mais adequados, na medida em que um permite a melhor dissolução do fármaco e outro permite a dissolução do polímero. Selecionou-se o clorofórmio devido ao seu baixo ponto de ebulição (61 °C a 1 atm), o que permite uma maior evaporação durante o processo de electrofiação e porque este dissolve facilmente o PLA. Por outro lado, a dimetilformamida foi também escolhida pois dissolve o fármaco permitindo a sua dissolução e evitando a formação de grânulos de fibras. Além disso, a sua constante dielétrica é elevada (37 a 20 °C) [54]. É expectável que a condutividade da solução polimérica com fármaco na forma de sal também aumente, uma vez que aumenta a concentração iões depois de dissolvido [53].

### **Nanofibras para sistemas de libertação de fármacos**

As nanofibras, podem ser utilizadas como sistemas libertação de fármacos. Têm o papel de transportador do fármaco. As maiores vantagens em usar fibras produzidas por electrofiação para libertação de fármacos são: (i) o facto de ser possível a incorporação de elevadas quantidades de fármaco no polímero (até 60%), (ii) a eficiência da encapsulação chegar até aos 100%, (iii) existir uma grande diversidade de polímeros que podem ser utilizados para incorporar fármacos de modo compatível e com propriedades físico-químicas distintas, (iv) a



capacidade para modular a liberação através da manipulação de parâmetros operacionais e (v) por ser um processo simples que não envolve elevados custos e condições de temperatura e pressão extremas [51].

No caso de serem incorporados fármacos na forma de sal, devido às forças envolvidas nas ligações iônicas, existe a possibilidade do fármaco se concentrar mais à superfície da fibra resultando, posteriormente, numa liberação mais rápida e abrupta [42]. A escolha de um polímero biodegradável para a produção de fibras permite o controle da taxa de liberação de fármaco através de mecanismos hidrolíticos ou enzimáticos, para além de que a escolha de um solvente com afinidade para com o fármaco influencia a sua dissolução e, conseqüentemente, a taxa de liberação. Um outro fator que também deve ser levado em conta é a interação fármaco-polímero-solvente. A existência de interações entre o fármaco e o polímero/solvente garante uma elevada incorporação do fármaco no interior das fibras ou à sua superfície. Além disso, a interação entre o polímero e o fármaco pode dificultar a saída do fármaco, p. ex., através da sua ligação por ligações de hidrogénio, podendo resultar uma liberação mais sustentada [55].

#### **1.4.2. Partículas produzidas pelo método de emulsão e extração/evaporação do solvente**

As micropartículas de base polimérica têm sido extensamente investigadas para atuar como sistemas de liberação de fármacos, tendo sido as micropartículas de base polimérica biodegradável as que despertam maior interesse. Não existe uma definição consensual do que é realmente uma micropartícula, no entanto, a definição mais aceite é aquela que define micropartícula como uma partícula com diâmetro compreendido de 1–1000  $\mu\text{m}$ . Porém, no caso das partículas possuírem um diâmetro compreendido entre 1–100 nm estas são designadas por nanopartículas [56], [57]. Devido às pequenas dimensões, têm a capacidade de ultrapassar algumas barreiras do organismo, nomeadamente atingir os organelos celulares passando através dos capilares sanguíneos (diâmetro típico de 8–10  $\mu\text{m}$ ), barreira hematoencefálica e placentária [11]. Dependendo da técnica experimental adotada, uma micropartícula pode ser vista como uma microcápsula (quando atua como reservatório de um fármaco) ou uma microesfera (quando o fármaco se encontra disperso ou dissolvido na matriz polimérica, podendo também estar adsorvido à sua superfície). Para se produzirem partículas que atuem como SLC de fármacos é necessário ter em conta a taxa de liberação pretendida, a escolha do polímero e solventes, assim com as interações que possam existir entre fármaco-polímero-solvente.

A técnica de emulsão para produção de partículas, assim como a de extração/evaporação do solvente (EES), são extensivamente utilizadas na indústria farmacêutica para a imobilização de agentes terapêuticos [58]. Estas técnicas são amplamente utilizadas em contexto de libertação controlada de fármacos, onde o fármaco é encapsulado na micropartícula, sendo libertado ao longo do tempo com ou sem ocorrência de degradação da matriz polimérica. Há vários modos de proceder à encapsulação do fármaco, que diferem consoante a solubilidade do fármaco [59]. Para fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água, é normalmente utilizado o método da emulsão de óleo em água (O/W), que consiste nas seguintes fases (Figura 14):

1. Preparação da fase aquosa ou contínua, que contém um tensoativo dissolvido em água ou numa solução aquosa.
2. Preparação da fase orgânica ou dispersa, que contém um polímero e o agente ativo (fármaco) dissolvidos num solvente orgânico.
3. Preparação da emulsão, adicionando a fase orgânica à fase aquosa, recorrendo a agitação. Nesta fase, formam-se complexos polímero-fármaco estabilizados pelo tensoativo.
4. Formação de partículas: extração do solvente orgânico da fase dispersa para a fase contínua, com posterior evaporação do mesmo. Consequentemente, ocorre a precipitação do complexo polímero-fármaco sob a forma de micro/nanopartículas no estado sólido.
5. Isolamento das partículas através de centrifugação ou filtração e sua secagem.

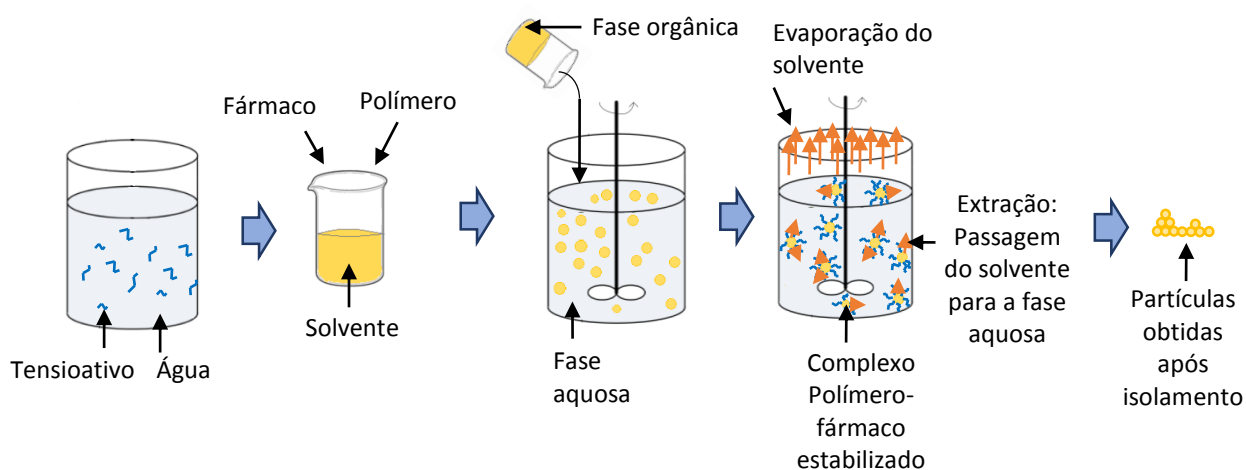


Figura 14- Preparação de partículas contendo um fármaco, pelo método da emulsão O/W (Adaptado de[59]).

Na emulsão O/W, quando o fármaco é pouco solúvel na fase orgânica, por vezes são utilizados co-solventes. No entanto, pode ocorrer miscibilidade destes com a fase aquosa, obtendo-se uma eficiência de encapsulação menor, para além de que a morfologia das partículas é afetada.

Para fármacos hidrofílicos, normalmente usa-se um tipo de emulsão diferente, pois o fármaco não se dissolve na fase orgânica e terá tendência para migrar para a fase aquosa,

resultando em eficiências de encapsulação muito baixas [60]. Existe a opção de se efetuar uma dupla emulsão água-óleo-água (W/O/W) ou uma emulsão de dispersão de óleo em água (O/W). No processo (W/O/W), o fármaco dissolvido na fase aquosa é emulsionado na fase orgânica. Posteriormente, a emulsão resultante é novamente dispersa numa segunda fase aquosa [59], [61]. O processo de dispersão de óleo-água (O/W) tem o mesmo princípio da técnica apresentada na Figura 14 porém, o fármaco fica em suspensão na fase orgânica e não se dissolve. É possível manipular o pH da fase aquosa para evitar a migração de fármacos cuja solubilidade depende do valor de pH, que é o caso do fármaco utilizado neste trabalho e que será descrito em maior detalhe na secção 1.5.1 [62]. Ao longo deste trabalho foi adotado o método de O/W com o fármaco disperso na fase orgânica.

Relativamente ao solvente, a escolha é efetuada tendo em conta que tem de ser bom solvente do polímero e, em simultâneo, ter uma fraca solubilidade na fase aquosa. Para além disso, é necessário que tenha um baixo ponto de ebulição (elevada volatilidade) e, preferencialmente, uma baixa toxicidade. Dentro dos solventes mais utilizados encontra-se o clorofórmio, o diclorometano, o acetato de etilo e o formato de etilo. Neste trabalho, selecionou-se o clorofórmio como o mais adequado [59].

A utilização de tensoativo na fase contínua tem o intuito de estabilizar as gotículas da fase orgânica na fase contínua. Os tensoativos são compostos de baixo peso molecular e tem a capacidade de minimizar a tensão superficial da fase contínua, mitigando assim a coalescência e aglomeração das gotículas. A sua presença no processo de emulsão permite a formação de micelas por mecanismos de auto-estruturação (*self-assembly*), resultando um sistema em que as fases contínua e descontínua se encontram em equilíbrio [63]. Os tensoativos mais utilizados são: poli(álcool vinílico) parcialmente hidrolizado (PVA), um tensoativo não-iónico, o sulfato de dodecilo sódico, um tensoativo aniónico, e o cetiltrimetilamónio de bromo, um tensoativo catiónico. No entanto, dado que no caso deste trabalho se trata de uma emulsão O/W, o tensoativo mais adequado é o PVA [59]. O PVA é, habitualmente utilizado numa forma parcialmente hidrolisada; quanto menor é o grau de hidrólise, mais higroscópico e mais solúvel se torna [64].

Em relação à escolha do polímero, dado o âmbito do projeto, é conveniente a seleção de um polímero biocompatível e biodegradável. Os polímeros deste tipo mais utilizados são PLGA, PLA, poli(hidroxibutirato) (PHB) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Utilizou-se o PHBV pois, para além de ser um dos mais biocompatíveis da classe dos polihidroxialcanoatos (PHA), é dos mais estudado para aplicações biomédicas. O PHBV é um copolímero derivado do poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e do poli(3-hidroxivalerato) (PHV) que, devido à presença do grupo hidroxivalerato (HV), possui maior elasticidade e resistência do

que o PHB. Para além disso, o PHBV é um polímero piezoelétrico, o que lhe confere um grande potencial para aplicação em reconstrução e regeneração óssea, no sentido em que se sabe que a estimulação elétrica promove a neoformação do osso. Adicionalmente, sabe-se que o PHBV (Figura 15) é um polímero de origem natural e que um dos seus produtos de degradação, o D-3-hidroxi-butarato, é um componente normal do sangue [65].

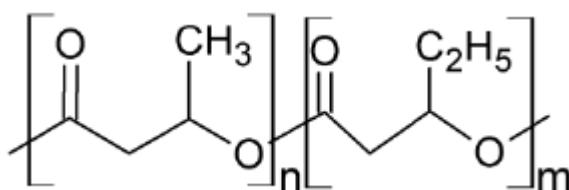


Figura 15 – Estrutura molecular do PHBV.

Existem vários fatores que influenciam as propriedades das partículas produzidas pelo método de EES em emulsões O/W e, conseqüentemente, o processo de libertação do fármaco. A viscosidade da fase dispersa, a razão entre a quantidade de fase dispersa e fase contínua, a quantidade de fármaco disperso e a concentração de tensioativo são dos parâmetros mais críticos e que mais influenciam a eficiência de encapsulação e tamanho de partícula. Se a viscosidade da fase dispersa é elevada, maior será o diâmetro da partícula e a quantidade de fármaco encapsulado. Por outro lado, quanto mais fármaco for utilizado durante a sua dispersão, mais porosas e irregulares serão as partículas obtidas. Todavia, uma maior quantidade de tensioativo promove a formação de partículas de menor tamanho [59].

## 1.5. Preparação de uma matriz para libertação controlada de um fármaco

### 1.5.1. Fármaco utilizado

O diclofenac sódico (DF) é um anti-inflamatório não-esteróide (NSAID) com atividade farmacológica analgésica, anti-inflamatória e ligeiramente antipirética. É indicado para o tratamento de formas degenerativas e inflamatórias de reumatismo, dores pós-traumáticas e pós-operatórias e outras condições inflamatórias [66]. O fármaco é ligeiramente higroscópico e apresenta-se sob a forma de um pó cristalino, branco ou levemente amarelado. Por se encontrar sob a forma de sal sódico, a sua solubilidade em água a pH próximos da neutralidade é de aproximadamente 50 mg/mL a 25 °C. Porém, a sua solubilidade varia com o pH, tornando-se mais solúvel em meio alcalino e muito pouco solúvel em meio ácido [67], [68]. Sabe-se que o

DF também é solúvel em etanol, metanol e dimetilformamida, porém é praticamente insolúvel em clorofórmio e éter [69], [70]. A sua estrutura molecular encontra-se apresentada na Figura 16.

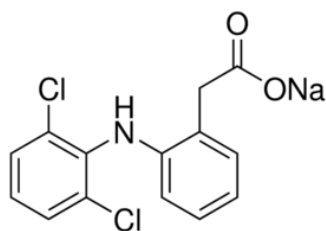


Figura 16 - Estrutura química do diclofenac sódico.

Verifica-se que a molécula possui grupos funcionais, como um grupo carboxílico e uma amina secundária, que podem interagir com diferentes solventes, afetando a sua solubilidade. O DF e outros derivados do diclofenac encontram-se atualmente incorporados em diversas formulações que podem ser administradas via parenteral, enteral e tópica, sendo que a sua biodisponibilidade varia conforme a via de administração. Estudos indicam que através da administração oral, cerca de 50-60 % do diclofenac sódico é metabolizado antes de atingir a corrente sanguínea [71].

### 1.5.2. Matriz compósita: k-IBS<sup>®</sup>

k-IBS<sup>®</sup> é um substituto ósseo injetável utilizado em Medicina Dentária e Ortopedia, nomeadamente, na reconstrução de tecido ósseo que sofreu lesões traumáticas, no enchimento de defeitos periodontais, no enchimento cistectómico, enchimento do osso alveolar, em osteometria, enchimento de vértebras que sofram deformação óssea, reconstrução do acetábulo e fraturas metafísicas. É produzido e comercializado pela Altakitin, S.A. (São Julião do Tojal, Portugal) e apresenta-se sob a forma de uma seringa que contém uma matriz compósita com aspeto esbranquiçado e pastoso (Figura 17 e 18).



Figura 17- Dispositivo médico k-IBS<sup>®</sup>



Figura 18- Apresentação do k-IBS<sup>®</sup> sob a forma como se encontra no mercado

Esta matriz é constituída fundamentalmente por uma parte cerâmica (inorgânica) e outra parte polimérica (orgânica). A parte inorgânica é essencialmente constituída por hidroxiapatite

e fosfato de tricálcio. A parte orgânica é constituída por quitosano, PEG (polietilenoglicol) e ácido láctico. A matriz compósita apresenta uma composição que tenta simular a constituição do osso humano. Deste modo, o *scaffold* adapta-se mais facilmente ao processo de neoformação óssea, atuando como osteocondutor, para além de que a sua elevada porosidade lhe confere mais facilidade para a vascularização. Por outro lado, a conectividade entre os poros permite uma melhor comunicação celular e distribuição de nutrientes.

Algumas das vantagens que o k-IBS<sup>®</sup> apresenta são: biocompatibilidade, radiopacidade, evita o uso de enxertos autólogos, tempo de operação mais curto, os grupos amina do quitosano promovem a adesão celular e permitem o suporte dos grânulos facilitando a sua aplicação e preenchendo os defeitos ósseos por completo. A consistência pastosa e seringável simplifica o seu manuseamento [72], [73].

## **1.6. Matrizes tridimensionais como sistemas de libertação controlada de fármacos**

Com o intuito de promover a regeneração de tecidos e/ou combater respostas inflamatórias que possam surgir na sequência de uma cirurgia de reconstrução óssea, as matrizes tridimensionais podem ser utilizadas para entregar agentes bioativos, designadamente, fármacos, enzimas, proteínas e fatores de crescimento. No caso da entrega de fármacos, é necessário ter em conta alguns fatores fundamentais para que a sua entrega ocorra eficazmente. É necessário conhecer-se a quantidade de fármaco que é possível incorporar na matriz, assegurar uma dispersão homogénea do fármaco na matriz, a afinidade do fármaco para a matriz ou sistema de libertação que o suporta, a cinética de libertação tem de ser controlada para permitir que a dose apropriada atinja as células-alvo ao longo de um determinado período de tempo pré-definido e, finalmente, é requerido que a função do fármaco não seja alterada após o seu contacto com os materiais que constituem a matriz [74].

## **1.7. Esterilização de matrizes**

A esterilização é a eliminação total da atividade microbológica. Esta necessidade surge no contexto de dispositivos médicos e quando se manipulam e produzem culturas de células. A motivação para uso da esterilização é a de garantir a esterilidade do produto e níveis de segurança e desempenho elevados [75]. Existem vários tipos de esterilização que podem ser

aplicados em matrizes para regeneração de tecidos, no entanto é necessário ter em atenção o tipo de material que constitui a matriz. Os tipos de esterilização mais comuns para matrizes que possuem na sua constituição compostos poliméricos são: calor seco, autoclavagem, radiação, e gás óxido de etileno.

### **1.7.1. Esterilização com radiação ionizante: radiação gama**

A utilização de radiação como método de esterilização foi demonstrada pela primeira vez em 1896, através da utilização de raios-X. As grandes vantagens deste tipo de esterilização é o facto de possuir uma excelente capacidade de penetração nos materiais, utiliza baixas temperaturas e é simples de aplicar. Porém, o custo associado a este tipo de esterilização é elevado e existem alguns materiais que não podem ser submetidos a este tipo de esterilização [76]. Radiação ionizante é a radiação que possui energia suficiente para ionizar átomos e moléculas. Para fins de esterilização industrial são utilizadas fontes de raios beta e gama, nomeadamente cobalto 60; feixes de eletrões e raios-X. A incidência de radiação ionizante sobre os ácidos nucleicos dos microrganismos provoca a sua ionização e destruição [77]. Neste trabalho, a esterilização com radiação gama foi usada para esterilizar matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica, i.e., esterilizaram-se matrizes poliméricas com fármaco incorporado.

## **1.8. Caracterização de materiais: Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e espectroscopia de raio-X por dispersão de energia (EDS)**

A análise da superfície das matrizes torna-se fundamental, na medida em que permite verificar como os sistemas poliméricos de encapsulação de fármaco se dispõem ao longo da superfície das matrizes, para isso pode recorrer-se à análise das amostras por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Para obter informação sobre a distribuição da molécula de fármaco ao longo das matrizes pode recorrer-se à tecnologia de microscopia eletrónica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (SEM/EDS).

### **1.8.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

A microscopia eletrónica de varrimento é uma das técnicas mais utilizadas para a observação de superfícies de diversos tipos de materiais (metálicos, poliméricos, biológicos, cerâmicos, etc.). Utiliza um feixe de eletrões com uma determinada energia para bombardear a superfície do material a analisar, permitindo desta forma obter imagens a elevadas ampliações. O princípio de funcionamento baseia-se num feixe de eletrões que incide sobre um ponto da superfície da amostra. As amostras são percorridas sequencialmente pelo feixe finamente focado através de um sistema de lentes eletromagnéticas. Da interação do feixe eletrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e eletrões, entre os quais, os eletrões secundários utilizados na formulação da imagem. Ou seja, a imagem é formada pelos eletrões libertados pela amostra, que são coletados num detetor, originando uma imagem topográfica da amostra, não dando informação sobre a sua estrutura interna, uma vez que o feixe de eletrões não atravessa toda a amostra, apenas incide sobre a superfície. Um dos requisitos deste método é que as amostras sejam condutoras de eletrões; no caso de isso não acontecer, é efetuado um revestimento prévio através da deposição de um filme fino de um metal [78].

### **1.8.2. Microscopia eletrónica de varrimento associada a Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (SEM/EDS)**

A microscopia eletrónica de varrimento, quando associada a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS), possibilita a caracterização da composição atómica das regiões observadas. Após o feixe de eletrões incidir sobre a amostra, vai provocar a excitação dos eletrões das camadas internas da amostra. Seguidamente, estes voltam ao seu estado fundamental, emitindo raios-X. Como a energia dos raios-X depende do elemento químico presente na amostra, é possível quantificar a sua composição medindo as energias emitidas pelos eletrões [79].





## Capítulo 2 — Materiais e Métodos

### 2.1. Materiais e reagentes

O fármaco utilizado nos estudos de libertação foi o diclofenac sódico (DF) com pureza superior a 98%, provido pela *Alfa Aesar*, Alemanha, e a matriz compósita utilizada foi o substituto ósseo injetável k-IBS<sup>®</sup>, fornecida pela *Altakitin, S.A*, Portugal. Ambos os materiais foram descritos em melhor detalhe na secção 1.5.1 e 1.5.2

Para produzir fibras para posterior incorporação na matriz k-IBS<sup>®</sup>, utilizadas como veículo para a libertação controlada de fármaco, utilizaram-se os seguintes reagentes: Poli(ácido láctico) (PLA) com peso molecular de 120 kDa fornecido pela *NatureWorks*<sup>®</sup>, Alemanha; clorofórmio (CLF) com um grau de pureza superior a 99,0% estabilizado com 6% de etanol, adquirido à *VWR Chemicals*, França; dimetilformamida (DMF) de grau de pureza superior a 99%, fornecido pela *Acros Organics*, França.

Para produzir partículas poliméricas para encapsulação do fármaco e incorporação na matriz compósita, foram utilizados os seguintes reagentes: o clorofórmio anteriormente referido; poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV com 6% HV) com peso molecular de 222,7 kDa, com grau de pureza igual a 99,8% fornecido pela *PHB Industrial SA*, Brasil; Solução de ácido sulfúrico 1 M, sendo que o ácido sulfúrico com 99% de pureza foi fornecido pela *VWR Chemicals*, França; Poli(álcool vinílico) (PVA) com peso molecular entre 13 a 23 kDa, 98% hidrolisado, adquirido à *Sigma-Aldrich*, Portugal.

O meio de libertação para o estudo de libertação controlada foi PBS (*Phosphate Buffered Saline*), com pH igual a 7,4, preparado com os seguintes reagentes e com as seguintes concentrações: dihidrogeno fosfato de potássio (0,38 g/L), hidrogenofosfato disódico dihidratado (1,26 g/L), cloreto de potássio (0,2 g/L) e cloreto de sódio (8,0 g/L) e água MiliQ.

### 2.2. Produção de sistemas de libertação controlada a partir da matriz de k-IBS<sup>®</sup>

Com o intuito de criar um sistema de libertação controlada de DF a partir da matriz de k-IBS<sup>®</sup>, optou-se por utilizar três vias distintas: (i) DF disperso (não encapsulado) diretamente na

matriz de k-IBS<sup>®</sup>; (ii) DF encapsulado em fibras, que foram dispersas na matriz de k-IBS<sup>®</sup>; e (iii) DF encapsulado em partículas poliméricas, dispersas na matriz de k-IBS<sup>®</sup>. Para além disso, também foi feito o estudo da libertação do fármaco incorporado em matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem o componente inorgânico. O método utilizado para a preparação de fibras foi o electrofiação e as partículas foram preparadas pelo método de emulsão por extração/evaporação do solvente (EES).

### 2.2.1. Produção de fibras de poli(ácido láctico)

Para produzir fibras poliméricas utilizou-se o método de electrofiação. O polímero utilizado foi o PLA e os solventes foram o CLF e DMF. Foram testadas duas formulações distintas, onde o parâmetro que variou foi a razão CLF/DMF, de modo a possibilitar o estudo da influência do fato do fármaco se encontrar totalmente dissolvido ou não na solução polimérica, uma vez que uma maior concentração de DMF possibilita a dissolução total do fármaco. As proporções utilizadas foram de 10,5:4,5 e na outra 13,5:1,5. As fibras produzidas foram incorporadas posteriormente na matriz compósita k-IBS<sup>®</sup>. Em ambas as soluções foi dissolvido 1,5 g de PLA e 150 mg de diclofenac sódico, com auxílio de agitação magnética. Depois do polímero se dissolver adicionou-se o DF que apenas se dissolveu numa das soluções (CLF/DMF 10,5:4,5), ficando em suspensão na outra solução e procedeu-se à electrofiação. Para isso utilizaram-se as condições experimentais apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições experimentais no ensaio de electrofiação. As concentrações de DF apresentam-se em % (m/m).

Ensaio	Solução	Voltagem (kV)	Diâmetro interno da seringa (mm)	Diâmetro interno da agulha (mm)	Caudal (mL/h)	Distância agulha-coletor (cm)
1	CLF/DMF 10,5:4,5; 1,5 g PLA; 10% DF	14,5	15,8	1	4	15
2	CLF/DMF 13,5:1,5; 1,5 g PLA; 10% DF	16	15,8	1	3	20

Através da Tabela 2 verifica-se que existem parâmetros operacionais diferentes entre os dois ensaios devido à natureza da solução utilizada, nomeadamente a voltagem, distância agulha-coletor e caudal. Na Figura 19 pode ser observada a montagem experimental do ensaio.

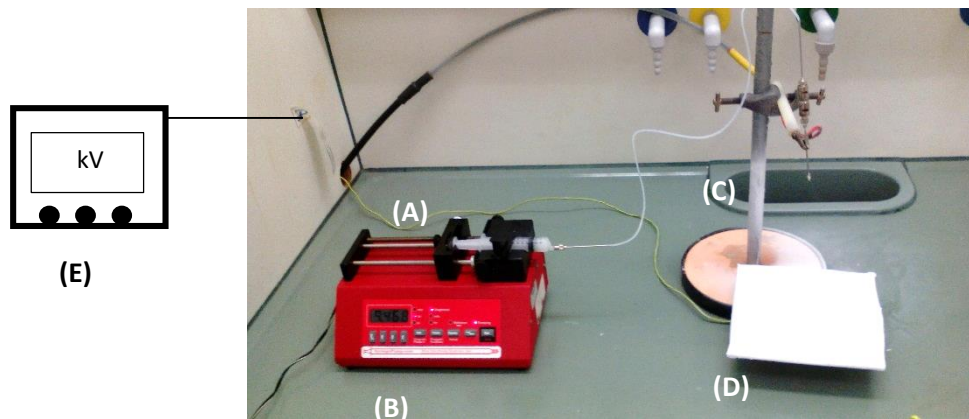


Figura 19- Montagem experimental do ensaio de electrofiação. (A) Seringa com solução de polímero, fármaco e solventes; (B) Bomba doseadora; (C) Saída do capilar onde ocorre a formação de fibras; (D) Coletor de fibras (folha de alumínio); (E) Fonte de alta tensão.

A solução resultante foi colocada numa seringa e, utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2 e a montagem experimental da Figura 19, procedeu-se à electrofiação no interior de uma *hotte*. No final, obtiveram-se fibras depositadas sobre uma folha de alumínio, que foi usada como coletor. As fibras obtidas foram deixadas secar durante 24/48 h, de modo a garantir que todo o solvente se evaporasse.

### 2.2.2. Preparação de um sistema de libertação controlada de diclofenac sódico a partir da matriz k-IBS<sup>®</sup> e de fibras de poli(ácido láctico)

Para incorporar na matriz compósita de k-IBS<sup>®</sup> as fibras produzidas, primeiramente calcularam-se as quantidades de fibras, fármaco e matriz k-IBS<sup>®</sup> necessárias para se obter a percentagem de incorporação de fármaco desejada. De realçar que todas as concentrações de DF apresentadas a seguir são em % (m/m). Depois de se conhecer estas quantidades, as fibras foram misturadas pouco-a-pouco na matriz k-IBS<sup>®</sup>, tentando que ficassem o mais dispersas possível, de um modo homogéneo. O processo foi bastante moroso e difícil, uma vez que o aglomerado de fibras que se produz não se dispersa facilmente e as fibras não se misturam uniformemente na matriz. Com a finalidade de verificar a influência das fibras na cinética de libertação do fármaco, foram delineadas formulações e efetuados dois ensaios distintos:

Ensaio 1:

- Amostra 1.1 - Incorporação de 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 1.2 - Incorporação de 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 1.3 - Incorporação de 0,39% de DF não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>;

- Amostra 1.4 - Incorporação de 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0.39% de DF não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 1.5 - Incorporação de 0,77 % de DF não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 1.6 - Matriz k-IBS<sup>®</sup> sem DF incorporado.

#### Ensaio 2:

- Amostra 2.1 - Incorporação de 0,77 % de DF encapsulado em fibras de PLA a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.2 - Incorporação de 0,77 % de DF em fibras de PLA a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.3 - Incorporação de 0,77 % de DF não encapsulado;
- Amostra 2.4 - 10 % de DF em fibras de PLA a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) sem incorporação na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.5 - 10 % de DF em fibras de PLA a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) sem incorporação na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.6 - Incorporação de 0,39 % de DF em fibras de PLA a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0.39 % de DF não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.7 - Incorporação de 0,39 % de diclofenac sódico em fibras de PLA a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0.385% fármaco não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>;
- Amostra 2.8 - Matriz k-IBS<sup>®</sup> sem fibras e sem DF.

Os dois ensaios distinguem-se pela quantidade de fármaco incorporada na matriz e pelo molde utilizado na preparação das amostras. O ensaio 1 serviu como base para o ensaio 2, no que diz respeito à escolha do tipo de molde mais adequado para preparar amostras, tendo também servido para obter informação sobre a facilidade de manuseamento da matriz k-IBS<sup>®</sup>, pelo que não foram efetuadas réplicas de cada amostra. Foram utilizados dois tipos de moldes: (i) uma seringa que, depois de todo o processo, foi aberta e, a partir do material compósito no seu interior, foram cortados discos com ~ 8 mm de espessura e ~ 15 mm de diâmetro, e (ii) moldes de material sintético desconhecido (Fig. 20 (A)), que permitiam criar pequenos discos com uma espessura de 3,5 mm e um diâmetro de 15 mm, depositando e compactando material compósito no seu interior.

As amostras do ensaio 1 foram preparadas conforme o descrito de modo a obterem-se as concentrações percentuais de DF pretendidas. Depois de preparadas, as amostras foram armazenadas no interior de seringas de 8 mL, congeladas, e num liofilizador (Snijders Scientific, Holanda), foram liofilizadas durante 48 horas, a - 40 °C e 2 mbar, de modo a que o produto final pudesse ser cortado na forma de discos com um X-ato.

Para o ensaio 2, todas as amostras foram preparadas em quadruplicado. As amostras do ensaio 2 foram preparadas conforme descrito acima (amostras 2.1 a 2.8), de modo a obterem-

se as concentrações percentuais de DF pretendidas. As amostras 2.1, 2.2, 2.3, 2.6, 2.7 e 2.8 acima referidas foram distribuídas por quatro moldes para se obterem amostras na forma de disco. Seguidamente, as amostras foram congeladas, e liofilizadas durante 24 horas no mesmo liofilizador utilizado no ensaio 1 com as mesmas condições de pressão e temperatura. Na Figura 20 apresenta-se o aspeto final dos discos com as fibras incorporadas, antes e depois de liofilizados.

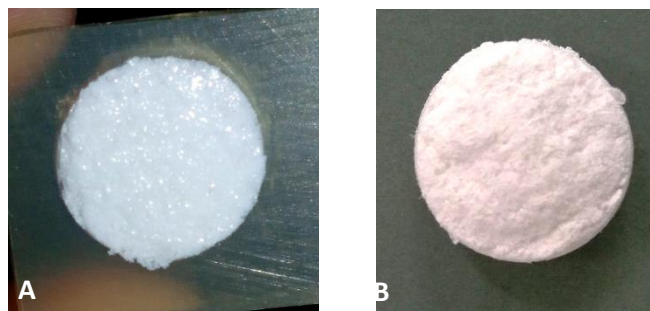


Figura 20 - Discos antes da liofilização (A) e após liofilização (B)

### 2.2.3. Preparação de partículas de PHBV

O desenvolvimento de um sistema de libertação controlada através da encapsulação de DF em partículas foi efetuado através da produção de partículas de PHBV, na presença de DF e posterior incorporação na matriz compósita k-IBS<sup>®</sup>. Para isso, foram preparadas partículas de PHBV com DF nelas encapsulado pela técnica de extração/evaporação do solvente (EES) numa emulsão óleo/água (O/W).

Uma vez que a pH baixo o DF é muito pouco solúvel em água, utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico 1 M para acidificar a fase aquosa com PVA dissolvido, saturando-se também esta fase com fármaco, de modo a garantir que este não migrava de fase. O objetivo é que o fármaco não se dissolva na fase contínua e se mantenha na fase dispersa. Foram efetuados dois ensaios, onde o único parâmetro que diferiu foi a quantidade de fármaco utilizada na saturação da fase aquosa. No ensaio 1, utilizaram-se aproximadamente 100 mg de fármaco; no ensaio 2, a quantidade de fármaco utilizada foi 60 mg. Para a preparação da fase orgânica, dissolveu-se 1 g de PHBV em 33 mL de clorofórmio, com auxílio de agitação magnética a 700 rpm e temperatura de ~ 30 °C. Depois do polímero se dissolver, adicionou-se 100 mg de DF que ficou em suspensão, obtendo-se uma suspensão com aproximadamente 10% (m/m) de DF em relação à massa de polímero. A fase aquosa foi preparada dissolvendo-se 6 g de PVA em 300 mL de água MiliQ. Para que este dissolvesse totalmente, foi necessário elevar a temperatura até 80–85° C, sob agitação magnética (600 rpm). Depois do PVA dissolver totalmente, o meio foi

acidificado com ácido sulfúrico concentrado até se atingir um valor de pH igual a 3. Seguidamente, adicionou-se DF à solução aquosa de modo a que esta ficasse saturada e o DF não se dissolvesse. Sob condições de agitação mecânica a 6000 rpm, (Polytron®, Kinematica, Suíça), adicionou-se a fase orgânica gota-a-gota à fase aquosa. Posteriormente, colocou-se a emulsão com agitação magnética (500 – 600 rpm) na *hotte* durante 24 h, para promover a evaporação total do solvente. Depois do solvente evaporar completamente, as partículas que se formaram foram recolhidas após terem sido centrifugadas 3 vezes ( $1878 \times g$ , 4 minutos) e lavadas 3 vezes com água MiliQ. A centrifugadora usada foi a Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen. Seguidamente, foram colocadas na estufa a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Na Figura 21 podem ser observadas as partículas obtidas após centrifugação antes e após secagem. Seguidamente estas foram devidamente armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente.

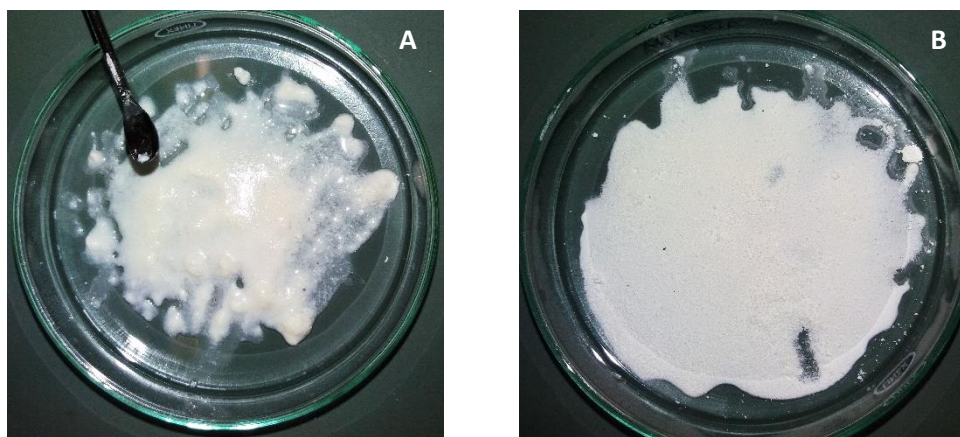


Figura 21 - (A) Partículas obtidas antes da secagem; (B) partículas obtidas após secagem

### **Determinação do rendimento e da eficiência de encapsulação de fármaco**

Para determinação da quantidade de DF encapsulado nas partículas de PHBV, por espectroscopia de UV/VIS, dissolveu-se uma quantidade conhecida de partículas de PHBV com fármaco encapsulado ( $\sim 10 \text{ mg}$ ) no solvente utilizado no processo de emulsão (0,5 mL de clorofórmio) e, de seguida, adicionou-se 5 mL de PBS para que ocorresse a precipitação do polímero, isolando-o por centrifugação ( $1057 \times g$  durante 5 min). O sobrenadante resultante foi recolhido e repetiu-se o procedimento até se atingir um volume de sobrenadante de  $\sim 10 \text{ mL}$ . O ensaio foi efetuado em quadruplicado. Determinou-se a absorvância das quatro amostras a 276 nm, tendo sido convertida em concentração através de uma curva de calibração. Para calcular a percentagem de fármaco encapsulado relativamente à massa de partículas com fármaco, utilizou-se a equação 14. Calculou-se, ainda, a percentagem teórica de fármaco

encapsulado (equação 15), a eficiência de encapsulação (equação 16) e o rendimento de encapsulação (equação 17).

$$\begin{aligned} \text{Quantidade de farmaco encapsulado experimentalmente (\%)} &= \\ &= \frac{\text{massa de fármaco presente nas partículas}}{\text{massa de partículas com fármaco encapsulado}} \times 100 \end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \text{Quantidade teórica de farmaco encapsulado (\%)} &= \\ &= \frac{\text{massa de fármaco adicionada}}{\text{massa de fármaco adicionada} + \text{massa de PHBV adicionada}} \times 100 \end{aligned} \quad (15)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulado experimentalmente}}{\text{Quantidade teórica de farmaco encapsulado}} \times 100 \quad (16)$$

$$\% \text{ rendimento de EES} = \frac{\text{massa total de partículas obtidas}}{\text{massa de polímero inicial} + \text{massa de fármaco}} \times 100 \quad (17)$$

#### 2.2.4. Preparação do sistema de libertação controlada de diclofenac sódico a partir da matriz k-IBS<sup>®</sup> e de partículas de PHBV

As partículas contendo DF encapsulado preparadas no ensaio 1 acima referido, foram incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup> de modo a obter-se um conteúdo de DF de 0,77% em massa de fármaco por massa de matriz. Para incorporar as partículas na matriz k-IBS<sup>®</sup>, misturaram-se lentamente as partículas na matriz, de modo a que estas ficassem uniformemente dispersas. O mesmo se fez com o fármaco não encapsulado. Prepararam-se as seguintes amostras:

- Amostra A- matriz k-IBS<sup>®</sup> contendo 0,77 % de DF encapsulado em partículas de PHBV;
- Amostra B - 10 % de DF em partículas de PHBV sem incorporação na matriz k-IBS<sup>®</sup> (isoladas);
- Amostra C - matriz k-IBS<sup>®</sup> contendo 0,39% de DF encapsulado em partículas de PHBV + 0,39% de DF não encapsulado;



Depois das amostras preparadas (Amostras A e C), estas foram colocadas em moldes de modo a formar-se um disco, tal como referido na secção 2.2.2. Seguidamente, as amostras foram congeladas e liofilizadas a cerca de  $-40^{\circ}\text{C}$  e 2 mbar durante 24 horas, no mesmo liofilizador dos ensaios com fibras de PLA.

### 2.3. Esterilização de matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica com fármaco incorporado

Foram preparadas duas amostras onde foi incorporado fármaco não encapsulado em matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica, ou seja, matrizes constituídas por quitosano, PEG, ácido láctico e DF. Ambas as amostras possuíam a mesma composição e concentração de fármaco (0,15% m/m). Seguidamente, foram liofilizadas seguindo os procedimentos do fabricante da matriz k-IBS<sup>®</sup> e esterilizadas numa instalação que utiliza uma fonte de radiação de  $\text{Co}^{60}$ . O procedimento utilizado durante o processo de esterilização não foi revelado, sabe-se apenas que uma das amostras foi irradiada com uma dose de radiação gama de 15 kGy e a outra com uma dose de 25 kGy, durante 4 e 7 horas, respetivamente. O processo de esterilização ocorreu na UTR (Unidade Tecnológica Radioesterilização), no Campus Tecnológico Nuclear, Lisboa.

### 2.4. Estudo da libertação de diclofenac sódico

Dada a aplicação final da matriz k-IBS<sup>®</sup>, procurou utilizar-se condições e um meio de libertação que se aproximem das condições do corpo humano. Assim, utilizou-se a solução salina PBS, uma solução comumente utilizada em testes *in vitro* por possuir uma pressão osmótica similar à dos fluidos biológicos e um pH semelhante ao fisiológico (7,4) e usou-se uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Em todos os ensaios de libertação o procedimento efetuado foi o mesmo. Porém, nos ensaios de libertação de fármaco com partículas de PHBV, houve necessidade de se centrifugar a amostra B ( $1878 \times g$  durante 4 minutos) devido ao facto das partículas não se encontrarem incorporadas numa matriz mas estarem em suspensão no meio de PBS. Para os ensaios de libertação com fibras e partículas, cada amostra liofilizada foi colocada em frascos de vidro com 5 mL de PBS, que foram colocados numa estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  sem agitação. Repetidamente, para tempos pré-determinados, retiraram-se alíquotas de 2,5 mL de cada frasco, e repuseram-se 2,5 mL de PBS fresco, de modo a manter o volume de libertação

constante e assegurar condições *sink*. No ensaio de libertação com matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica, as amostras foram colocadas em frascos de vidro com 2,5 mL de PBS, que foram colocados na estufa a 37 °C sem agitação. Foram-se retirando alíquotas de 1,25 mL de cada frasco, e repuseram-se 1,25 mL de PBS fresco. Todas as alíquotas foram armazenadas em tubos *Eppendorf* e guardadas à temperatura ambiente, para posterior quantificação de DF libertado.

A avaliação e quantificação de DF libertado ao longo do tempo foi efetuada através da medição de absorvância a 276 nm das alíquotas anteriormente armazenadas, recorrendo a um espectrofotómetro UV-Vis V-530 (*Jasco*, EUA). Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em concentração utilizando uma curva de calibração preparada com triplicados de soluções de DF em PBS, na gama 2,5 – 25,4 µg/mL.

## 2.5. Caracterização das matrizes e do sistema de libertação controlada

Para a caracterização morfológica e química dos sistemas de libertação anteriormente mencionados e das matrizes produzidas, recorreu-se ao SEM e SEM/EDS. Foi feita a análise das fibras de PLA produzidas por electrofiação e das partículas de PHBV, de modo a determinar as dimensões das mesmas, assim como verificar a distribuição do DF.

### 2.5.1. Caracterização morfológica e química por microscopia eletrónica

Os sistemas estudados foram caracterizados recorrendo a microscopia eletrónica de varrimento (SEM), quer por si só, quer associada a Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (SEM/EDS). Foram analisadas as fibras e as partículas (ensaio 1) isoladamente e as matrizes k-IBS<sup>®</sup> com fibras/partículas incorporadas. Foi analisada também uma matriz k-IBS<sup>®</sup> sem fármaco e sem nenhum dos sistemas poliméricos (branco). Para isso, as amostras foram montadas num suporte com fita adesiva de carbono e foram colocadas no interior de um pulverizador de plasma (BOC Edwards EXC120, Inglaterra, acoplado a uma fonte PFG 15000C, Trumpf Hutterling, Alemanha) e revestidas com um filme de ouro durante 10 s. Em seguida, o suporte com as amostras foi colocado no interior do SEM (Zeiss Merlin Gemini 2, Carl Zeiss, EUA) e iniciou-se a visualização das amostras, utilizando uma voltagem constante de 1 kV. As imagens das fibras e partículas isoladas, obtidas através de SEM foram analisadas utilizando o programa *ImageJ* de modo a medirem-se os diâmetros de cada fibra/partícula

apresentadas nas várias imagens. Esta medição ocorreu tendo em conta a escala apresentada em cada imagem. No caso das fibras produzidas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) efetuaram-se 80 medições; para as fibras produzidas a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) efetuaram-se 40 medições; e para as imagens relativas às partículas só se conseguiram efetuar 5 medições. O programa *SigmaPlot 10.0* (Systat Software, Inc., EUA) foi utilizado para construção de dois histogramas de distribuição de diâmetros, representando-se nas abcissas uma gama de diâmetro das fibras e nas ordenadas a frequência com que uma determinada gama de diâmetros ocorre. O mesmo não foi feito para os diâmetros das partículas, uma vez que não foi possível efetuar um número significativo de medições pelo *ImageJ*.

Algumas das amostras foram analisadas por EDS, procurando identificar os elementos químicos presentes nas amostras e procurando obter informação sobre a distribuição do fármaco nas amostras, através da deteção de cloro e sódio presentes na estrutura molecular do fármaco. Para realizar a análise, foram guardadas as coordenadas das imagens de SEM e, seguidamente, recorrendo a EDS (X Max N20, Oxford Instruments, Inglaterra) obtiveram-se mapas onde, com cores diferentes, foram identificadas as zonas da amostra onde se encontravam os elementos que a constituíam.

## Capítulo 3 – Resultados e discussão

### 3.1. Sistemas de libertação de diclofenac sódico baseados em fibras

#### 3.1.1. Fibras de PLA produzidas

Como mencionado na secção 2.2,1, foram preparadas fibras de PLA pelo método de electrofiação, utilizando soluções com dois solventes distintos. Numa das soluções, utilizou-se uma razão de 10,5:4,5 (CLF/DMF) e, na outra, a razão foi de 13,5:1,5 (CLF/DMF). Verificou-se que na solução que continha uma maior quantidade de DMF, o fármaco dissolveu-se totalmente, obtendo-se uma solução límpida. Porém, na solução com uma menor fração de DMF, uma grande parte do fármaco manteve-se em suspensão, uma vez que o DF é praticamente insolúvel em CLF [80]. De realçar que ambas as soluções estiveram sob agitação magnética até o PLA se dissolver totalmente. Esta observação vai de encontro ao facto do fármaco ser mais solúvel em DMF, permitindo a sua dissolução total [53], [80]. Durante os ensaios de electrofiação, devido às propriedades físico-químicas de cada solução, as condições operacionais manipuláveis (caudal, voltagem e distância agulha-coletor) foram ajustadas de modo a ser possível a formação de fibras de uma forma contínua e sem gotejamento ou pulverização. Deste modo, dado que a constante dielétrica da DMF é muito superior à do CLF, significa que na solução com uma maior fração de DMF a capacidade de reduzir a intensidade do campo elétrico existente em torno das partículas na solução é maior, logo foi necessário aplicar uma menor voltagem. Verificou-se que as fibras de PLA produzidas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) ficavam mais compactadas no coletor do que as fibras produzidas a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF), que formavam “novelos”, de aspeto mais volumoso e menos compacto. Contudo, no ensaio em que se utilizou a solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) eram visíveis a olho nú alguns grãos formados devido à precipitação do polímero e fármaco durante o ensaio. Nas Figuras 22 e 23 podem ser observadas as imagens obtidas por SEM das fibras preparadas com as diferentes razões de CLF e DMF durante o processo de electrofiação, assim como a sua distribuição de diâmetros. A distribuição de diâmetros apresenta-se nos histogramas.

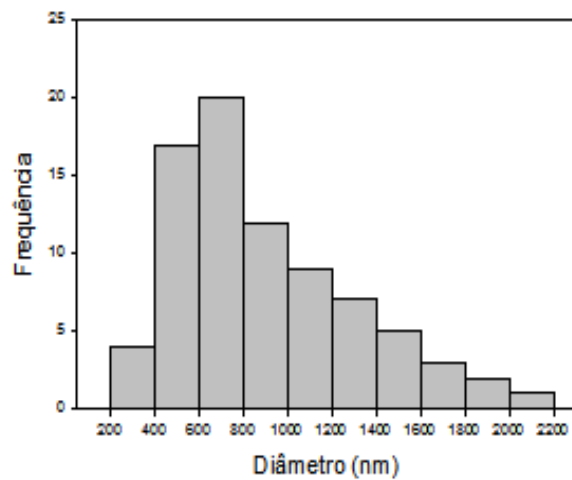
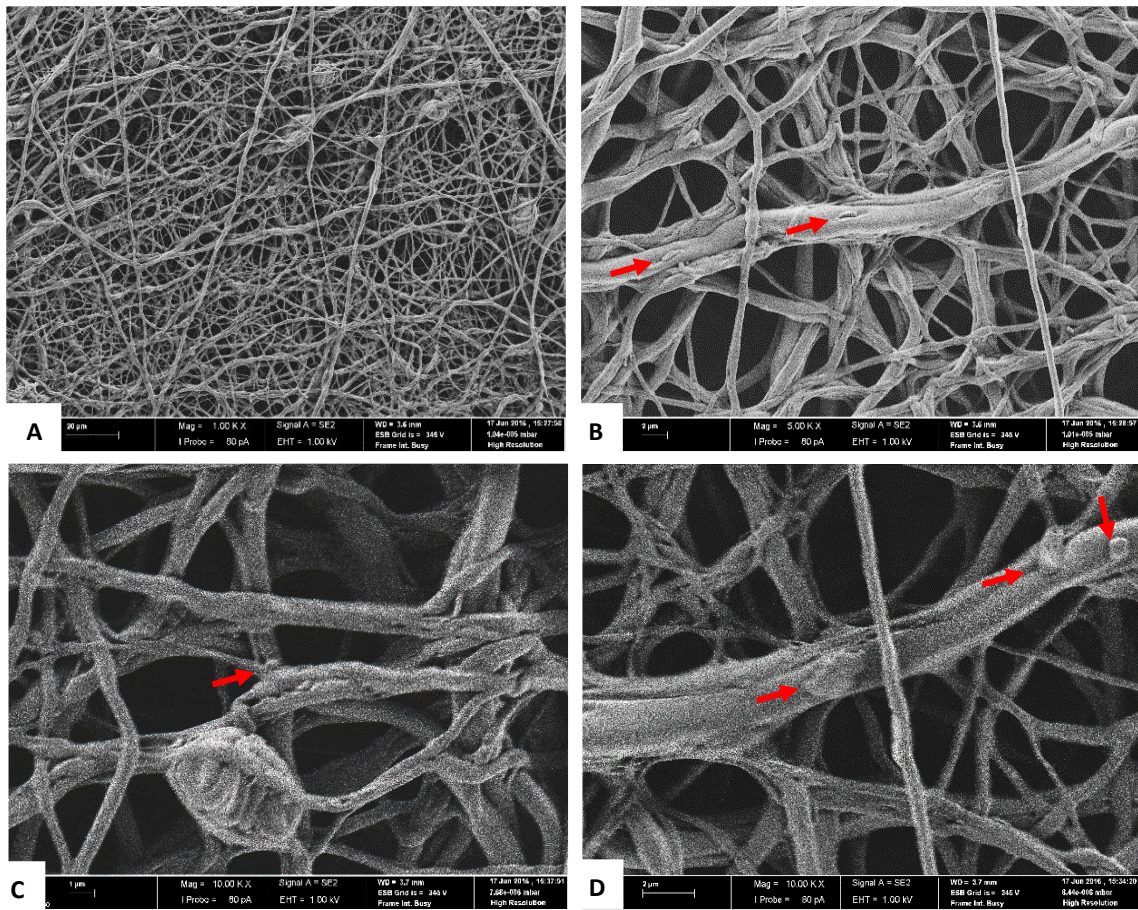


Figura 22 - Imagens de SEM de fibras de PLA com 10% de DF produzidas a partir da solução 10,5:4,5 CLF/DMF por electrofiação, em diferentes ampliações e respetivo histograma com distribuição de diâmetros. Ampliação: A -1000x; B -5000x; C -10000x; D -100000x. As setas a vermelho indicam possíveis partículas de DF.

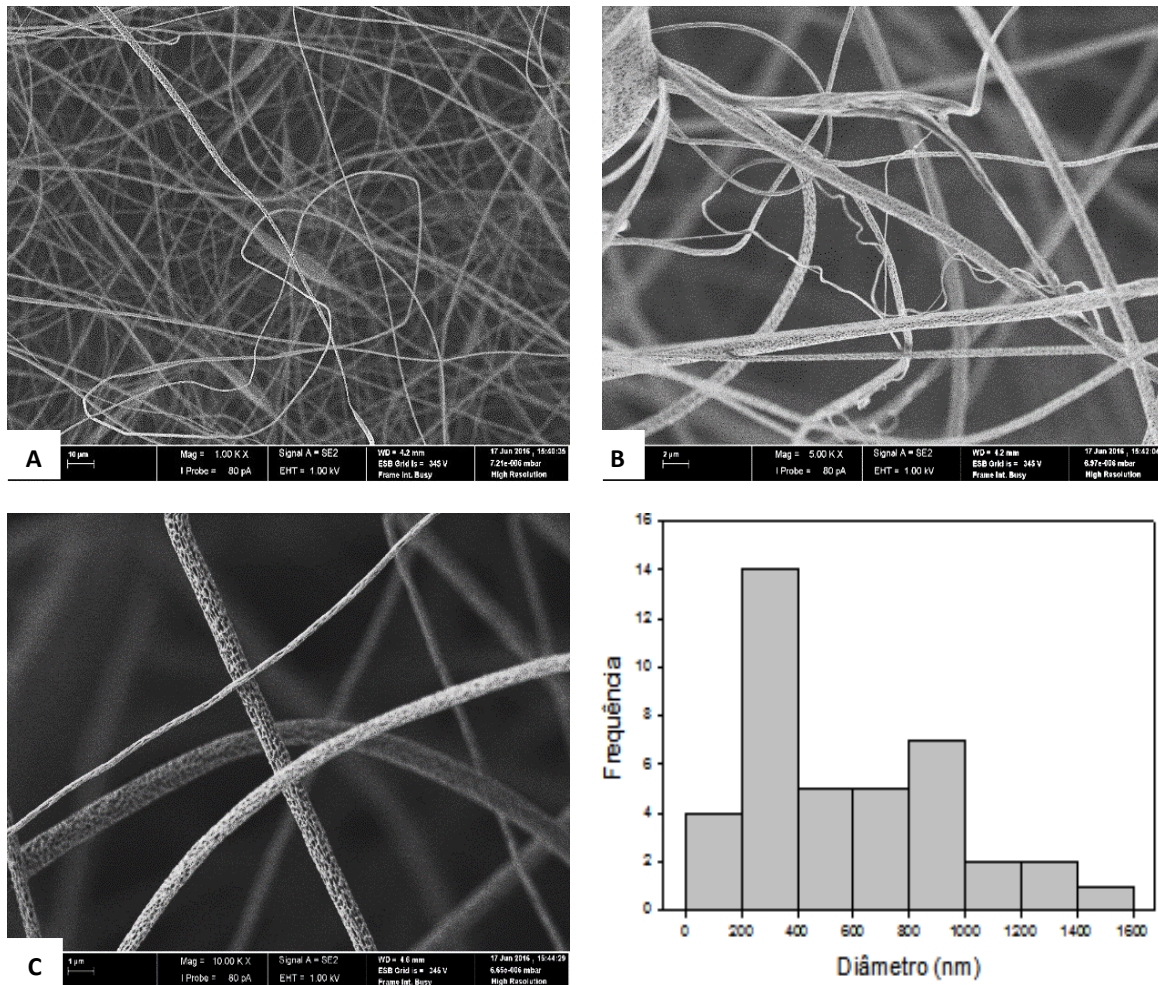


Figura 23- Imagens de SEM de fibras de PLA com 10% de fármaco produzidas a partir da solução 13,5:1,5 CLF/DMF por electrofiação, em diferentes ampliações e respetivo histograma com distribuição de diâmetros. Ampliação: A -1000x; B - 5000x; C -10000x.

Na Figura 22, é possível visualizar à superfície das fibras possíveis partículas de DF (setas a vermelho), que não ficaram encapsuladas no seu interior. Por outro lado, as fibras aparentam uma maior compactação e maior entrelaçamento do que as fibras apresentadas na Figura 23, assim como a existência de grânulos. Isso deve-se ao fato de a distância utilizada entre a agulha e o coletor ser apenas de 15 cm e ter-se utilizado uma maior concentração de DMF na solução. Desta forma, o ponto de ebulição da solução é mais elevado, provocando uma evaporação de solvente mais lenta. Ou seja, a deposição das fibras no coletor ocorre quando o solvente ainda não evaporou totalmente, i.e., as fibras obtidas no coletor ainda contêm solvente, conduzindo assim à sua compactação durante a secagem. Porém, apesar das fibras apresentadas na Figura 22 possuírem ainda solvente quando se depositam no coletor, a quantidade de DMF pode não ser suficiente para dissolver todas as partículas de DF que ficam à superfície da fibra, visualizando-se assim algum DF à superfície das mesmas após a secagem. Em relação aos diâmetros obtidos, comparando o histograma da Figura 22 com o histograma da Figura 23,

como seria expectável, obtiveram-se fibras com maiores diâmetros na Figura 22, uma vez que se utilizou um caudal mais elevado. Atendendo ao histograma da Figura 22 e da Figura 23, verifica-se que os diâmetros das fibras não se encaixam na definição consensual de nanofibras, isto é, abaixo de 100 nm [40]. Em relação à porosidade, nas imagens obtidas por SEM das fibras produzidas a partir da solução com uma maior quantidade de DMF (Figura 22) não se observou porosidade nas fibras. Porém, é possível que existam micro ou mesoporos, que não são visíveis com as ampliações usadas. Na Figura 23, podem observar-se as fibras produzidas a partir da solução com uma proporção de CLF para DMF de 13,5:1,5. Comparando estas com as fibras apresentadas na Figura 22, verifica-se que se obtiveram fibras mais finas, porosas e sem grânulos. Além disso, a distribuição de diâmetros apresentada no histograma da Figura 23, é mais uniforme. O fato de no procedimento experimental se ter utilizado um menor caudal e uma distância maior entre a agulha e o coletor provocou, como esperado, um maior alongamento das fibras, proporcionando diâmetros menores, maior porosidade e uma menor compactação no coletor, devido a uma mais rápida evaporação do solvente. Para além disso, não se consegue observar cristais ou partículas de DF na superfície das fibras. Assim, ao contrário do esperado, as fibras preparadas com uma solução mais concentrada em DMF (CLF/DMF 10,5:4,5) (Fig.22), solvente no qual o DF é solúvel, apresentaram mais grânulos e partículas de fármaco à sua superfície. Por outro lado, nas fibras obtidas a partir de uma solução mais concentrada em CLF (CLF/DMF 13,5:1,5) (Fig.23), solvente no qual o DF não é solúvel, não se conseguiu visualizar fármaco não encapsulado, nem grânulos, provavelmente, devido ao fato do fármaco e o polímero terem precipitado em simultâneo, e apenas uma parte ficar encapsulado no interior das fibras.

### **3.1.2. Sistemas de libertação de diclofenac sódico contendo fibras de PLA incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup>**

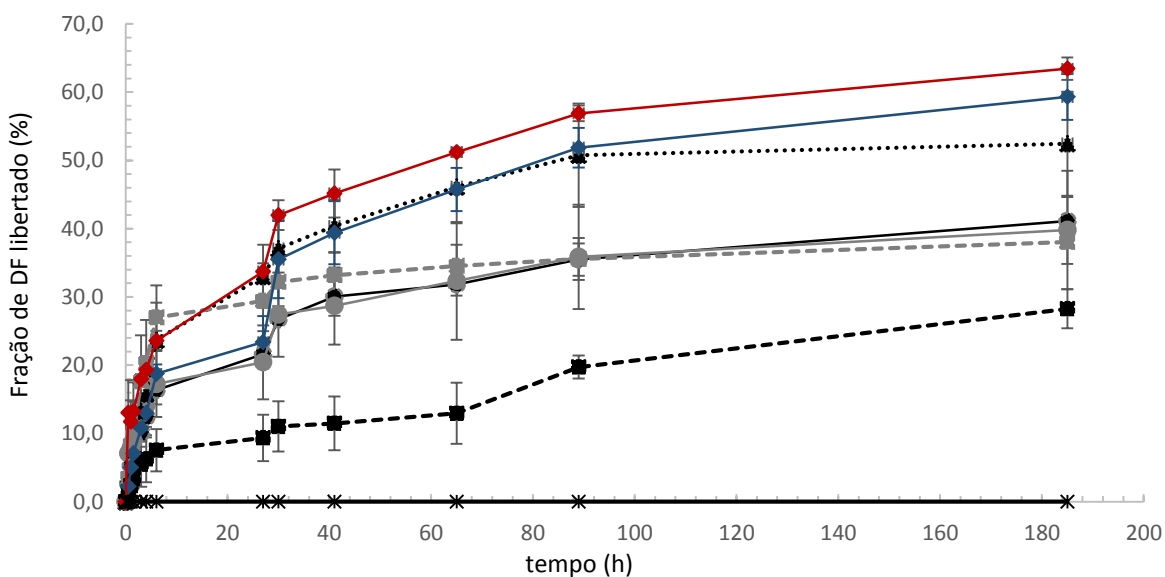
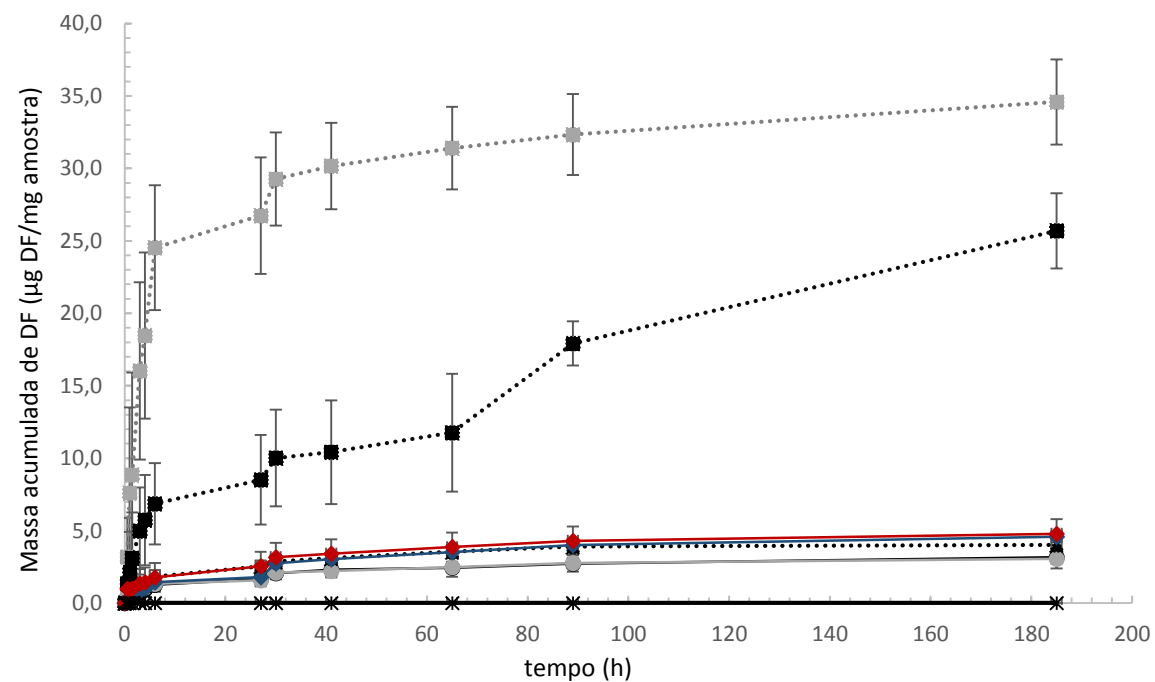
As fibras preparadas por electrofiação, contendo DF, destinaram-se a serem misturadas na matriz compósita k-IBS<sup>®</sup>. Esta mistura foi feita de dois modos (ensaio 1 e ensaio 2, secção 2.2.1). Os dois modos distinguem-se pela quantidade de fármaco incorporada na matriz e pelo molde utilizado na preparação de amostras cilíndricas, tendo o ensaio 1 servido de base ao ensaio 2, no que diz respeito à escolha do tipo de molde mais adequado e à obtenção de informação sobre o manuseamento da matriz k-IBS<sup>®</sup>. Desta forma, seleccionou-se como molde mais adequado uma estrutura que permitia a formação de cilindros/discos com espessura de 3,5 mm e 15 mm de diâmetro, que não necessitavam ser cortados após liofilização. Em relação ao manuseamento da matriz k-IBS<sup>®</sup>, apesar de esta poder ser seringada e de fácil manipulação,

durante a incorporação das fibras esta tornou-se cada vez menos maleável, tendendo a desagregar-se, dificultando a incorporação de fibras e a obtenção de uma mistura homogénea, resultando num procedimento de incorporação de fibras muito moroso. Porém, quando se tratou de incorporar apenas fármaco, o processo foi mais rápido e simples. Os perfis de libertação de DF do ensaio 1 revelaram-se inconclusivos na medida em que não se conseguiu estabelecer uma relação entre o facto de se utilizarem fibras ou não, pois os perfis eram muito semelhantes. Os resultados do ensaio 1 podem ser consultados no Anexo A. Desta forma, os resultados e discussão a seguir apresentada referem-se exclusivamente ao ensaio 2. Em relação à libertação de DF encapsulado em fibras incorporadas em matrizes e DF não encapsulado, i.e., DF disperso diretamente na matriz, e libertação de DF a partir de fibras isoladas não incorporadas na matriz, obtiveram-se os perfis apresentados na Figura 24 e 25.

As representações gráficas foram feitas atendendo à razão entre massa de DF libertada acumulada e a massa da amostra (fibras ou matriz k-IBS<sup>®</sup>) e em termos de percentagem DF libertado em relação à massa de DF incorporada nas fibras ou na matriz, em função do tempo.

No caso dos perfis 4 e 5 da Figura 24, relativos a fibras isoladas contendo DF, a massa de amostra considerada foi a massa das fibras pesadas. De um modo geral, a libertação do fármaco nas primeiras horas é rápida, tornando-se cada vez mais lenta com o passar do tempo, atingindo-se o equilíbrio, i.e., o *plateau* em alguns dos perfis. A Tabela 3 resume em que momento foi atingido o *plateau* ou não e a fração percentual de DF libertado em relação à massa incorporada na amostra, até esse momento.





- 1 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)
- 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF)
- 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado
- 4 - 10% de DF em fibras PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas
- 5 - 10% de DF em fibras PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas
- ◆ 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado
- ◆ 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado
- ✱ 8 - Branco: Matriz sem DF

Figura 24 – Perfis de libertação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra (fibras ou matriz k-IBS<sup>®</sup>) e percentagem de DF libertado em relação ao introduzido na matriz k-IBS<sup>®</sup>/ fibras. Barras de erro: desvio padrão ( $n = 3$ ). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

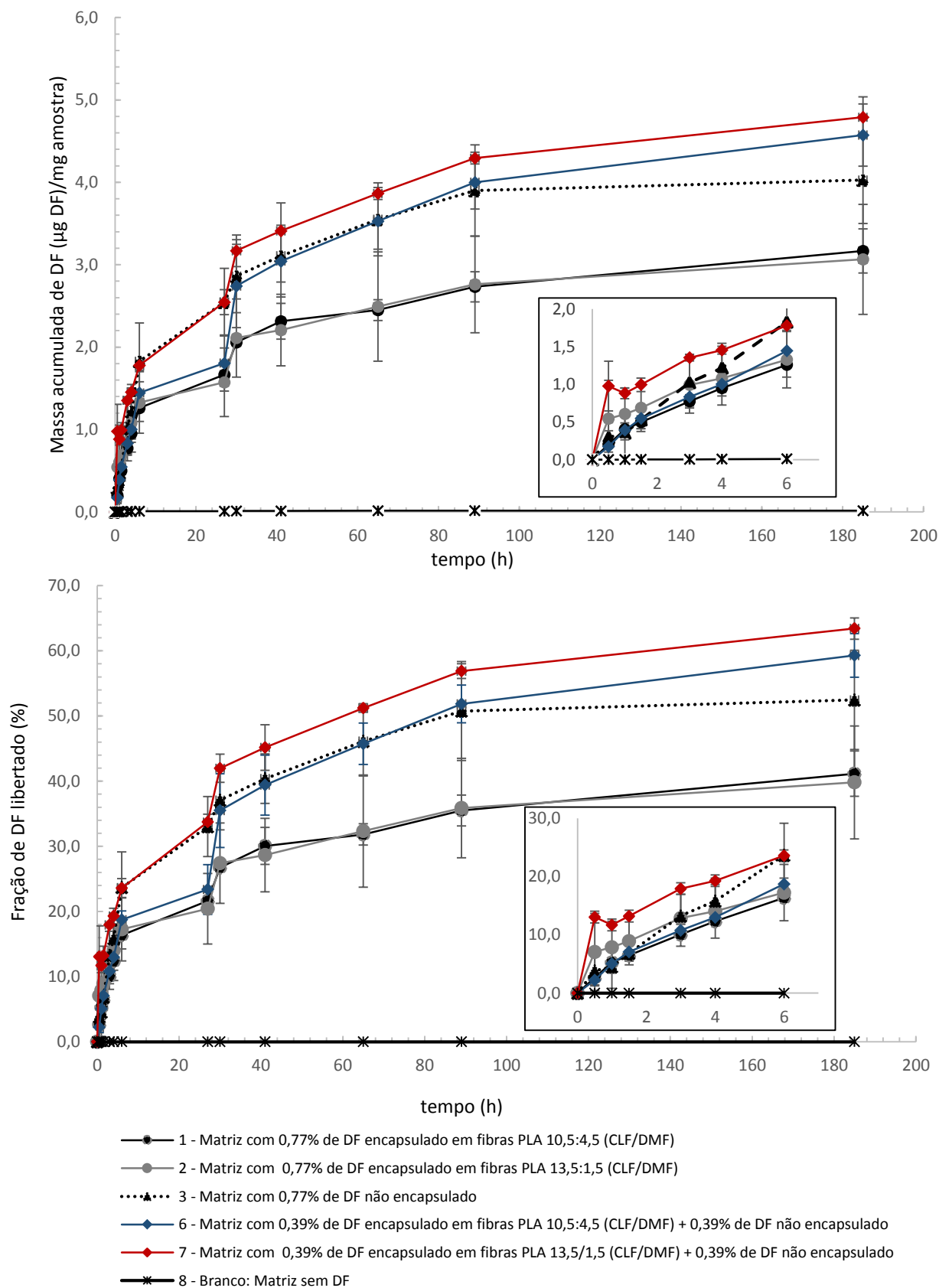


Figura 25- Ampliação da Figura 24 somente para o caso dos perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes k-IBS®. Os gráficos menores são a ampliação dos gráficos de maior dimensão para as primeiras 6 h de libertação, onde os eixos das abcissas e ordenadas têm o mesmo significado dos respetivos gráficos maiores. Barras de erro: desvio padrão ( $n = 3$ ). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

Tabela 3 - Tempo para se atingir o *plateau* nos perfis estudados que envolvem fibras de PLA, e respetiva fração percentual de DF libertado em relação à massa de DF incorporada inicialmente na amostra. Os valores obtidos são aproximados à unidade e basearam-se nas Figuras 24e 25.

<b>Perfil</b>	<b>Tempo em que o <i>plateau</i> é atingido (h)</b>	<b>Fração de DF libertada (%)</b>
1 – Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)	~89	~36
2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF)	~89	~36
3 – Matriz com 0,77% de DF não encapsulado	~89	~51
4 – 10 % de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas	~30	~30
5 – 10 % de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas	*	*
6 – Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	*	*
7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	*	*

\* O *plateau* não foi atingido no tempo de libertação estudado.

Atendendo à Tabela 3 verifica-se que existem perfis (5, 6 e 7) que não atingiram o *plateau* durante o tempo de libertação considerado, sendo este atingido em tempos de libertação superiores ao estudado. Porém, os perfis 6 e 7 (matrizes com DF em fibras e DF não encapsulado) da Figura 25 sugerem que o *plateau* será atingido mais rapidamente do que o perfil 5 da Figura 24 (fibras 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas). Nos perfis 1, 2 e 3 (matriz com DF em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF), matriz com DF em fibras 13,5:1,5 (CLF/DMF) e matriz com DF não encapsulado, respetivamente) verifica-se que o equilíbrio foi atingido ao fim de 89 h, exibindo frações percentuais de DF libertado iguais para o perfil 1 e 2 (36%) e para o perfil 3 de 51%. Relativamente ao perfil 4 (DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)) verificou-se que o *plateau* foi atingido ao fim de 30 h exibindo uma fração de DF libertado de 30%. As fibras com maior concentração de DMF (perfil 4, Fig. 24) libertam mais DF e mais rapidamente do que as fibras com menor concentração de DMF (perfil 5, Fig.24). Este comportamento pode ser justificado pela possível presença de partículas de DF à superfície das fibras, tal como referido anteriormente, que em contacto com o meio de libertação (pH ~ 7,4), como o DF é facilmente solúvel a pH neutro, as partículas de DF dissolvem-se rapidamente, dando origem a um perfil de libertação de DF mais acelerado nas primeiras horas de libertação, atingindo-se o

*plateau* ao fim de 30 h, como referido. O perfil relativo à libertação de DF encapsulado em fibras produzidas a partir de uma menor concentração de DMF (perfil 5, Fig. 24), aparenta uma libertação mais demorada comparativamente ao perfil 4, libertando menos fármaco. Porém, passadas cerca de 65 h, parece haver nova libertação. No entanto esse ponto encontra-se associado a uma barra de erro com magnitude elevada. Para verificar se ocorre uma nova libertação a partir das 65 h (perfil 5 – Fig.24), foi necessário recorrer a um teste *t* de *student* para averiguar se a diferença entre a média da massa libertada de DF por massa de amostra no ponto correspondente às 65 h e o ponto seguinte (89 h) era estatisticamente significativa ou não. Verificou-se que essa diferença não era considerada muito significativa uma vez que o valor de *p* obtido ( $p = 0,0701$ ) é superior a 0,05, para um grau de confiança de 95%. Desta forma, conclui-se que não há diferença significativa entre as duas médias, logo não se pode afirmar que a partir das 65 h para o perfil 5 (Figura 24) ocorra uma nova libertação. Relativamente às percentagens de libertação, no perfil 4 e 5 (Figura 24), ao longo de todo o tempo de ensaio, apenas se libertou cerca de 30 e 40% de DF, respetivamente. No perfil 4 da Figura 24 (fibras produzidas a partir de 10,5:4,5 (CLF/DMF)), para verificar se o fármaco não se libertava mais devido ao meio de libertação estar saturado, comparou-se a concentração de DF no último ponto do ensaio de libertação com a solubilidade do DF em meio tampão com pH igual a 7 à temperatura de 37 °C ( $9,19 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) [67]. Verificou-se que a concentração é inferior à solubilidade, isto é, verifica-se a existência da chamada condição *sink*, logo conclui-se que o meio não está saturado e não é essa a razão pela qual a percentagem de libertação não é próxima de 100%. Assim sendo, é possível que o restante fármaco seja libertado quando o polímero se degrade. O mesmo não se pode afirmar para o perfil 5 da Figura 24 (fibras produzidas a partir de 13,5:1,5 (CLF/DMF)), pois este indica que o equilíbrio ainda não foi atingido, tal como indicado anteriormente.

Atendendo à Figura 25, que corresponde a uma ampliação dos perfis relativos à libertação de fármaco a partir da matriz k-IBS<sup>®</sup>, verificou-se que as matrizes compósitas constituídas por uma parte de DF não encapsulado e outra parte de DF encapsulado em fibras (perfil 6 e 7), libertam uma maior quantidade de DF e mais rapidamente que as restantes matrizes. Nas matrizes relativas ao perfil 6 e 7 (Fig.25), a quantidade de DF não encapsulado nas fibras liberta-se da matriz mais rapidamente, tal como ocorre na matriz compósita com DF incorporado não encapsulado (perfil 3 – Fig. 25), que apresenta um comportamento idêntico. No entanto, o perfil 3 estabiliza mais cedo (ao fim de 89 h), enquanto que os perfis 6 e 7, por possuírem uma parte de DF encapsulado em fibras, não atingem o *plateau*, estabilizando em tempos posteriores. Seria expectável que o perfil 3 (matriz com DF não encapsulado) exibisse uma percentagem de libertação próxima dos 100%, porém, este atinge apenas os 51% de

libertação de DF, aproximadamente. Desta forma, do mesmo modo que se procedeu para o perfil 4 da Figura 24 (DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)) verificou-se que a concentração de DF no último ponto do ensaio para o perfil 3 (matriz com DF não encapsulado) era inferior à solubilidade do DF, no entanto, por ter atingido o *plateau*, existe a possibilidade de o DF ter afinidade com algum dos constituintes da matriz k-IBS<sup>®</sup> ocorrendo a libertação do restante fármaco somente aquando a degradação da mesma. Os perfis 1 e 2 da Figura 25 (matrizes com fibras 10,5;4,5 (CLF/DMF) e matriz com fibras 10,5;4,5 (CLF/DMF), respetivamente), embora sejam constituídos por fibras com diferentes propriedades, não apresentaram comportamentos significativamente distintos relativamente à libertação do fármaco, o que leva a crer que se torna indiferente o tipo de solução utilizada na produção de fibras. No entanto, seria expectável que o perfil 1 estivesse acima do perfil 2 e libertasse o DF mais rapidamente, uma vez que as fibras produzidas com uma maior concentração de DMF (fibras 10,5:4,5 CLF/DMF), quando não se encontram incorporadas na matriz (perfil 4 – Fig. 24) libertam o DF de modo mais rápido do que as fibras produzidas com menor concentração de DMF (fibras 13,5:1,5 CLF/DMF - perfil 5 da Fig. 24). É provável que a composição da matriz compósita tenha afinidade para com o DF ou afete significativamente a cinética de libertação, na medida em que atenua a libertação do fármaco, tal como se verificou com o perfil 3 (matriz com DF incorporado não encapsulado). O perfil 8, relativo à matriz de k-IBS<sup>®</sup> sem DF, representa um branco. Foi estudado com o objetivo de verificar se existia algum componente da matriz que fosse detetado por espectrofotometria na mesma gama de comprimento de onda do DF. Através das Figuras 24 e 25 (perfil 8) pode concluir-se que não existe nenhum composto da matriz k-IBS<sup>®</sup> que esteja a ser libertado e detetado por espectroscopia UV/Vis a 276 nm.

### 3.1.3. Análise da cinética de libertação

Para a análise da cinética de libertação do DF foram testados alguns modelos matemáticos de modo a verificar qual melhor se adequava ao perfil de libertação do fármaco durante o tempo de ensaio *in vitro* e assim inferir qual o mecanismo de libertação. A sua adequabilidade baseou-se na análise dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos, tal como anteriormente foi referido (secção 1.3.2). Para os sistemas estudados – sistemas contendo DF encapsulado em fibras e incorporado em matrizes k-IBS<sup>®</sup>, sistemas com parte de DF encapsulado em fibras e outra parte de DF disperso diretamente na matriz (não encapsulado), e fibras não incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup> –, foram testados os modelos de ordem zero, de primeira ordem, de Higuchi, de Hixson-Crowell, de Korsmeyer-Peppas e o modelo da

“dessorção limitante”. As representações gráficas de todos os modelos para cada amostra podem ser consultados no Anexo B. De realçar que no modelo de Korsmeyer-Peppas e no modelo de Higuchi foi considerado como  $M_{\infty}$  a massa libertada acumulada de DF no último ponto do ensaio de libertação. A Tabela 4 resume os coeficientes de determinação obtidos para cada amostra (matriz com fibras/fibras isoladas) e para cada modelo.

Tabela 4 - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido através da aplicação dos modelos matemáticos aos perfis de libertação de DF dos vários sistemas preparados baseados em fibras de PLA.

Amostras	Valor de $R^2$ para os diferentes modelos					
	Ordem Zero	1ª Ordem	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	“Dessorção limitante”
1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF)	0,706	0,475	0,902	0,743	<b>0,919</b>	0,912
2- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF)	0,701	0,576	0,819	0,735	<b>0,935</b>	0,856
3- Matriz com 0,77% de DF não encapsulado	0,639	0,436	0,934	0,684	<b>0,969</b>	*
4- 10 % de DF encapsulado em fibras PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas	0,474	0,439	0,960	0,504	0,973	<b>0,978</b>
5- 10 % de DF encapsulado em fibras PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas	0,915	0,469	<b>0,918</b>	0,931	0,917	0,860
6- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	0,758	0,532	0,916	0,813	<b>0,924</b>	0,941
7- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	0,722	0,538	0,898	0,787	<b>0,919</b>	0,859

\* Modelo não aplicado a este sistema por não conter fibras.

Analisando os  $R^2$  apresentados na Tabela 4 e tendo em conta as características de cada modelo, os perfis 1, 2, 3, 6 e 7 são descritos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Deve-se realçar o fato de o modelo de “dessorção limitante” também apresentar um coeficiente de determinação elevado para o perfil 1 (matriz com DF encapsulado em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF)), isso pode significar que, embora o modelo seja indicado para libertação de fármaco a partir de fibras, no caso da matriz compósita correspondente ao perfil 1, a libertação do fármaco pode estar fortemente dependente do fenómeno de dessorção do DF a partir das fibras, apesar de estar estarem incluídas na matriz compósita. O mesmo se aplica à matriz relativa ao perfil 6 (matriz com DF encapsulado em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF) e DF não encapsulado), onde coeficiente de determinação é superior ao de Korsmeyer-Peppas. Verifica-se ainda que os perfis onde o valor de  $R^2$  do modelo de “dessorção limitante” apresenta valores próximos dos valores do modelo que melhor se ajusta aos diferentes sistemas de libertação, são os sistemas que possuem na sua composição fibras de PLA preparadas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF), ou seja,

as fibras que possivelmente possuem partículas de fármaco à sua superfície, tal como referido na secção 3.1.1.

Para o perfil 4 (fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com DF encapsulado) o modelo que melhor se adaptou foi o de “dessorção limitante”, estando de acordo com o que acabou de ser referido. No entanto, o coeficiente de determinação obtido, aproxima-se do  $R^2$  para o modelo de Korsmeyer-Peppas, não podendo afirmar-se categoricamente que o modelo de “dessorção limitante” é o que de facto descreve o mecanismo de transporte. Para o perfil 5 (fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) com DF encapsulado) o modelo mais adequado segundo o coeficiente de determinação, seria o de Hixson-Crowell, no entanto esse modelo não se aplica à libertação de fármaco a partir de fibras, mas sim, a partir de formas farmacêuticas que sofram variação de volume mantendo-se a forma geométrica (cilíndrica ou esférica) inalterada. Deste modo, para o perfil 5 foi selecionado o modelo de Higuchi, pois era o que possuía o segundo maior  $R^2$ , no entanto como o modelo de Korsmeyer-Peppas apresenta um coeficiente de determinação bastante próximo, será feita uma comparação entre ambos. Tal como descrito na secção 1.3.2, torna-se possível calcular os parâmetros de cada modelo através das suas representações gráficas e ajustes lineares ou não lineares. Para os perfis 1, 2, 3, 6 e 7, tendo em conta a geometria cilíndrica das matrizes, foram determinados os valores do expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas de modo a identificar o mecanismo de transporte do fármaco (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores do parâmetro  $n$  e mecanismo de transporte obtidos do modelo Korsmeyer-Peppas, para os perfis 1,2, 3, 6 e 7, relativos à incorporação de DF em fibras de PLA e DF não encapsulado em matrizes k-IBS®.

<b>Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação</b>	<b>Valor do expoente <math>n</math></b>	<b>Mecanismo de transporte</b>
1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5/4,5 (CLF/DMF)	0,53	Transporte anómalo (não fickiano)
2- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5/1,5 (CLF/DMF)	0,30	Difusão quase-fickiana
3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado	0,77	Transporte anómalo (não fickiano)
6- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 10,5/4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	0,58	Transporte anómalo (não fickiano)
7- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 13,5/1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	0,28	Difusão quase-fickiana

Através da Tabela 5, conclui-se que nas amostras relativas aos perfis 2 e 7 a difusão é quase-fickiana, o que significa que a taxa de difusão do fármaco é muito mais baixa que a relaxação da matriz polimérica, porém não o suficiente para ser considerada difusão fickiana.

Para as amostras relativas aos perfis 1, 3 e 6, o transporte é anômalo (não fickiano), ou seja, as taxas de difusão do fármaco e de relaxação das cadeias do polímero são semelhantes. Logo, a cinética de transporte do DF resulta de uma combinação do mecanismo de difusão do fármaco e da relaxação da matriz polimérica (transporte do tipo Caso II). Tendo em conta a espessura das matrizes, determinou-se a constante de libertação  $k$  do modelo de Korsmeyer-Peppas, assim como os coeficientes de difusão aparente. A designação “aparente” surge na medida em que nenhum dos mecanismos que controla a libertação do DF é a difusão fickiana. Os resultados obtidos podem ser consultados na Tabela 6.

Tabela 6 - Constante cinética,  $k$ , espessura das matrizes e coeficiente de difusão aparente, determinados através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS<sup>®</sup> com incorporação de fibras de PLA e fármaco não encapsulado (perfil 1, 2, 3, 6 e 7)

Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação	$k \times 10^5 (s^{-1})$	Espessura da matriz (mm)	Coefficiente de difusão aparente $D \times 10^{15} (m^2 \cdot s^{-1})$
1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5/4,5 (CLF/DMF)	3,42	3,2	2,35
2- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5/1,5 (CLF/DMF)	5,93	3,1	6,64
3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado	2,90	3,6	2,14
6- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 10,5/4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	2,29	3,6	1,34
7- Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras 13,5/1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado	5,85	3,4	7,76

Relativamente à Tabela 6, verifica-se que, de um modo geral, os valores de coeficiente de difusão determinados estão de acordo com os perfis apresentados na Figura 25 no gráfico de ampliação, que relaciona a massa acumulada de DF por massa de amostra em função do tempo, onde se consegue observar a libertação até ao tempo onde o modelo de Korsmeyer-Peppas é aplicado, i.e., até  $M_t/M_\infty < 0,6$ , uma vez que, quanto mais rápida é a libertação, maior será o coeficiente de difusão e constante de libertação. Atendendo à Figura 25, nos gráficos de ampliação os perfis que exibem uma maior taxa de libertação são os perfis 7 e 2, logo faz sentido que o coeficiente de difusão e constante de libertação sejam superiores. Os restantes valores de coeficiente de difusão e constante de libertação para os perfis 1, 3 e 6 são próximos, estando de



acordo com o gráfico de ampliação da Figura 25, pois nessa zona o perfil de libertação de fármaco para essas amostras são muito semelhantes.

Em relação ao perfil 4, segundo o coeficiente de determinação, o modelo que melhor descreve o mecanismo de libertação é o de “dessorção limitante” ( $R^2 = 0,978$ ). Segundo este modelo, a libertação do fármaco ocorre a partir da superfície ou de micróporos de uma fibra polimérica e a sua libertação é limitada pela dessorção e não pelos mecanismos de difusão. Deste modo, foram calculados os parâmetros característicos do modelo, que se encontram apresentados na Tabela 7. Os parâmetros obtidos resultaram de um ajuste não linear de uma equação do tipo  $y = a \times (1 - \exp(-bx))$  (ver Anexo B), onde  $a$  é o parâmetro  $\alpha$  (fator de porosidade) e  $b$  permite calcular o parâmetro  $\tau_r$  (tempo característico da libertação).

Tabela 7 - Parâmetros do modelo de "dessorção limitante" para o perfil 4, relativo à libertação de fibras preparadas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas, não incorporadas na matriz k-IBS®.

Descrição da amostra correspondente ao perfil de libertação	$\alpha$	$\tau_r(h)$
4- 10 % de DF em fibras PLA 10,5/4,5 (CLF/DMF) não incorporadas	0,337	5,07

Avaliando a Tabela 7, pode concluir-se que o fator de porosidade ( $\alpha$ ) vai de encontro ao esperado, uma vez que é menor que 1. Conhecendo o valor deste parâmetro, determinou-se a quantidade de fármaco aderido à superfície. Sabendo a massa inicial de fármaco na mesma, verificou-se que cerca de 33,7% do fármaco se concentrou na superfície da fibra e a restante parte no seu interior. Considerando-se que  $L$  é igual ao valor mais frequente apresentado no histograma da Figura 22 (fibras 10.5:4.5 (CLF/DMF)), isto é,  $L = 700$  nm, e o valor obtido do parâmetro  $\tau_r$  através da expressão apresentada na secção 1.3.2, relativa à relação entre  $\tau_r$  e  $D_{eff}$  verificou-se que o coeficiente de difusão efetivo é de  $2,68 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Para verificar que  $D_{eff} / D \ll 1$ , recorreu-se ao modelo de Korsmeyer-Peppas para determinar o coeficiente de difusão, uma vez que este apresentava um  $R^2$  bastante próximo do modelo de “dessorção limitante”. Obteve-se, pelo modelo de Korsmeyer-Peppas  $D = 6,60 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Fazendo a divisão de  $D_{eff}$  por  $D$  verifica-se que  $D_{eff} / D = 4,1 \times 10^{-9}$ , isto é, muito menor que 1, tal como pressuposto no modelo.

Para o perfil 5, o modelo que melhor se adaptou foi o de Higuchi. Uma vez que este é dependente da raiz quadrada do tempo, significa que estamos perante um caso de difusão fickiana. Aplicando o modelo conclui-se que a constante de dissolução de Higuchi ( $K_H$ ) apresenta o valor de  $5,26 \times 10^{-6} \text{ s}^{-0,5}$ . Como não é conhecido a porosidade e tortuosidade das fibras, não se pode calcular o coeficiente de difusão. Dado que as fibras durante o ensaio de

libertação se dispunham no meio de um modo planar, se considerarmos o modelo de Korsmeyer-Peppas, o expoente  $n$  que se obtêm através do declive da reta é de 0,41. No entanto, era esperado que este se aproximasse mais do valor de 0,5, para corresponder a um mecanismo de transporte por difusão fickiana, tal como descreve o modelo de Higuchi.

## 3.2. Sistemas de libertação de diclofenac sódico baseados em partículas

### 3.2.1. Partículas de PHBV produzidas

Como referido na secção 2.2.3, foram efetuados dois ensaios de produção de partículas, em que o único parâmetro que diferiu foi a quantidade de DF utilizada para saturar a fase contínua. Para o ensaio 1, o ensaio onde foi utilizada uma maior quantidade de DF para saturar a fase contínua, obteve-se uma eficiência de encapsulação de  $113,37 \pm 0,06\%$  e um rendimento de 77,8%. A eficiência foi superior a 100%, devido ao facto de grande parte do fármaco adicionado na fase contínua ter ficado aderido à superfície do polímero (Figura 26). Por outro lado, no ensaio onde se utilizou cerca de metade da quantidade anterior para saturar a fase contínua (ensaio 2), a eficiência de encapsulação foi de  $68,55 \pm 0,09\%$  e o rendimento de 91,1%. As partículas produzidas pelo ensaio 1, foram utilizadas nos testes de libertação controlada de fármaco. Apenas estas foram analisadas por SEM e SEM/EDS. Na Figura 26, pode observar-se as imagens obtidas por SEM das partículas produzidas no ensaio 1, é possível observar-se partículas aglomeradas (com diâmetros aproximadamente entre 50 e 300  $\mu\text{m}$ ) cobertas por estruturas que, tudo indica, serão cristais de DF. Apesar de os diâmetros medidos se encaixarem na definição adotada neste trabalho para uma micropartícula, estes foram obtidos por poucas medições das Fig.26 (A) e (D), para além disso, eram visíveis a olho nu aglomerados de maiores dimensões, desta forma, não se pode afirmar que foram produzidas micropartículas.

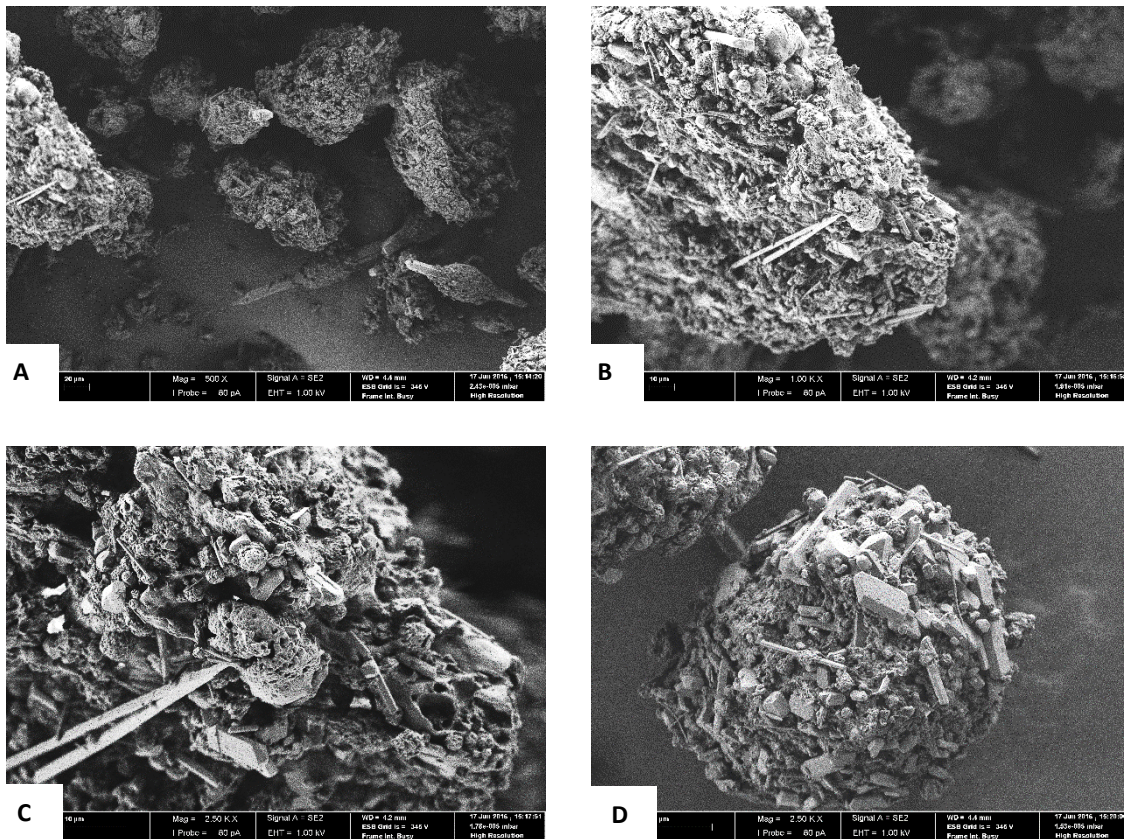


Figura 26 – Imagens de SEM de partículas de PHBV com 10% de fármaco produzidas pela técnica de emulsão e EES (Ensaio1), em diferentes ampliações: A -500x; B -1000x; C -2500x; D -2500x.

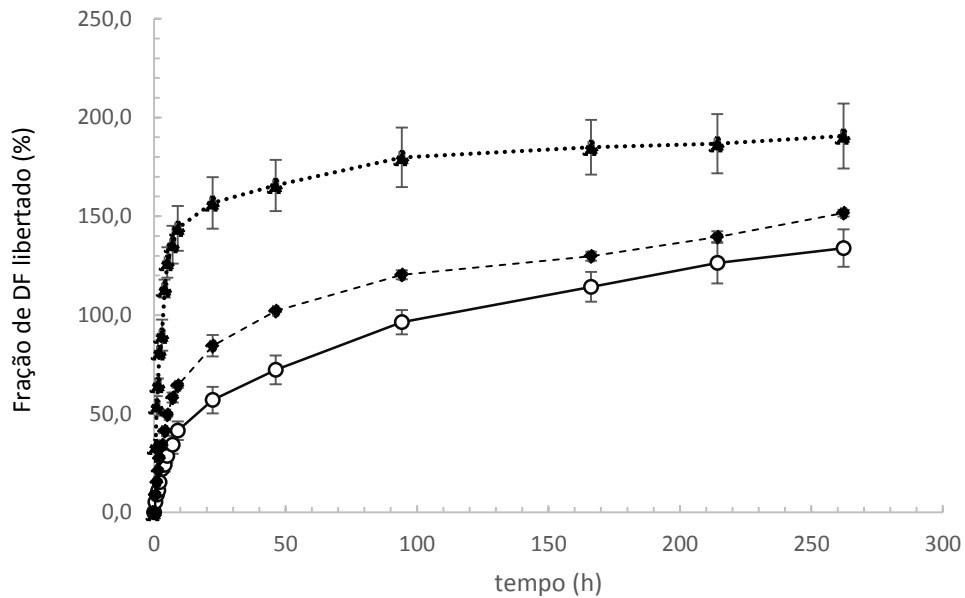
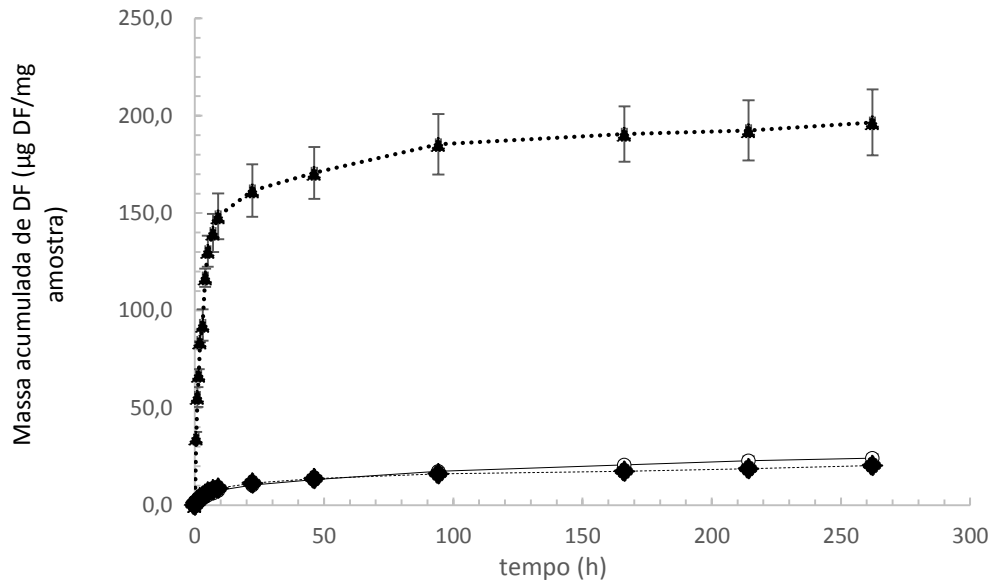
A aglomeração das partículas pode dever-se fundamentalmente a dois fatores: (i) existência de cristais de fármaco à superfície das partículas, dado que em meios com pH ácido o DF não se dissolve, aderindo à superfície do polímero e podendo contribuir para a aglomeração das partículas; e (ii) a concentração de tensoativo utilizado durante o processo de emulsão, na medida em que maiores concentrações de tensoativo mitigam a coalescência das micelas durante a execução da emulsão. Ao contrário do que foi feito na análise das imagens das fibras, não foi possível construir um histograma com a distribuição dos diâmetros das partículas devido à sua aglomeração, tal como referido. Deste modo, não é possível afirmar de modo claro a escala de tamanho das partículas produzidas.

### 3.2.2. Sistemas de libertação baseados em partículas de PHBV contendo diclofenac sódico

Os ensaios de libertação de DF a partir de partículas de PHBV foram efetuados utilizando as partículas produzidas pelo ensaio 1 (onde se utilizou cerca de 100 mg para saturar a fase contínua no processo de emulsão). Como a eficiência de encapsulação das partículas utilizadas neste ensaio foi determinada depois de se terem preparado as matrizes, as

concentrações de DF (massa de DF em relação à massa das matrizes) incorporado não foram as previstas, mas superiores. Os perfis que se apresentam na Figura 27 e 28 dizem respeito à libertação do fármaco ao longo do tempo a partir de matrizes k-IBS<sup>®</sup> com partículas incorporadas e a libertação de DF a partir de partículas isoladas. Analisando a Figura 27, é notória a diferença entre o perfil de libertação de DF a partir das partículas não incorporadas na matriz (perfil B) e os perfis em que as partículas se encontram incorporadas na matriz compósita (perfis A e C). A Figura 28 é uma ampliação do perfil A e C, de modo a facilitar a sua análise. De realçar que o perfil B está associado a uma maior variabilidade entre réplicas (maior desvio-padrão). Isto deve-se ao facto de ter sido necessário centrifugar os tubos de *Falcon* onde se encontravam as partículas antes de se retirarem as alíquotas, dado apresentarem material em suspensão, não sendo garantida a inexistência de partículas de menor dimensão em suspensão mesmo após a centrifugação. Nos perfis A e C, os frascos de vidro não foram centrifugados antes de se retirarem as alíquotas por não apresentarem material em suspensão visível, porém, também poderão existir partículas de diminutas dimensões em suspensão, que contribuam para a absorvância lida. Além disso, como se calcula a massa libertada acumulada, o erro associado a cada ponto no gráfico é cumulativo também. Por esse motivo, na Figura 27 e 28 podem ser observadas percentagens de libertação de DF superiores a 100%.

Relativamente à análise dos perfis, a Tabela 8 resume em que momento foi atingido o *plateau* e a fração percentual de DF libertado em relação à massa incorporada na amostra, até esse momento.



—○— A - Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV

...▲... B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas

--◆-- C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,423% de DF encapsulado em partículas de PHBV

Figura 27 – Perfis de liberação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra (matriz k-IBS®/partículas) e percentagem de DF libertado em relação ao introduzido na matriz ou partículas de PHBV obtidas no ensaio 1. Barras de erro: desvio padrão (n=3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

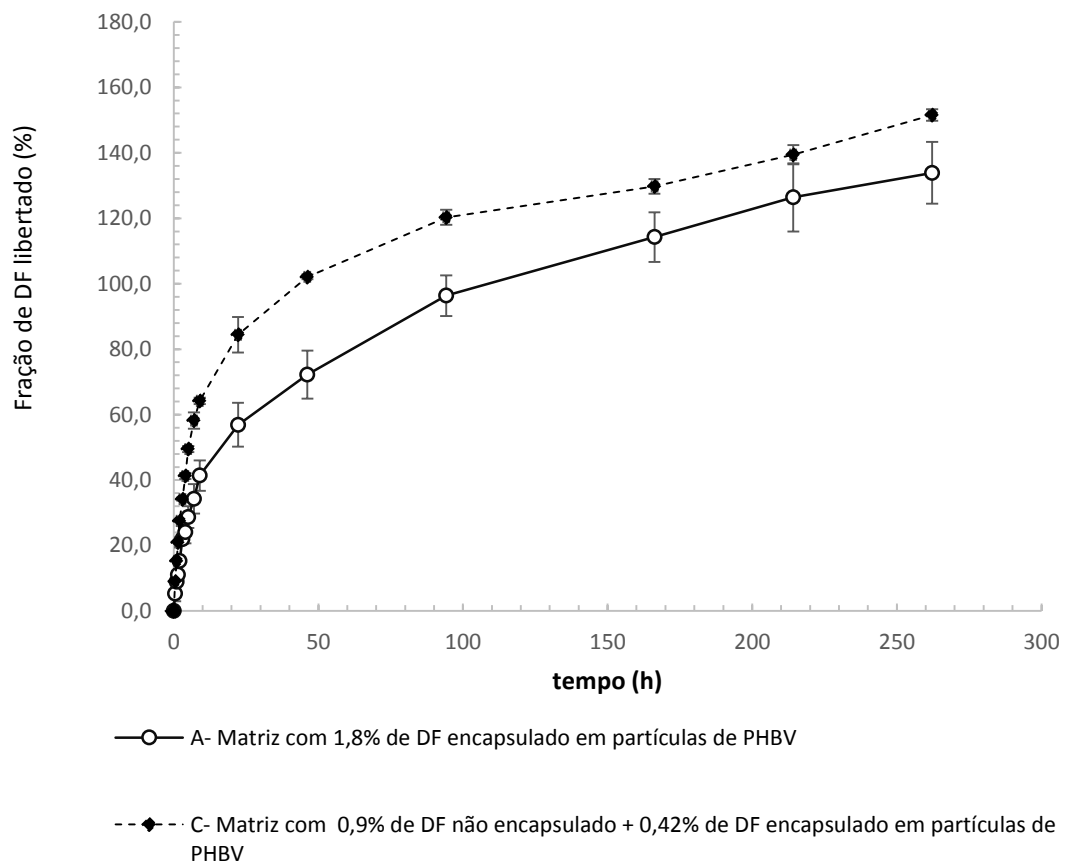
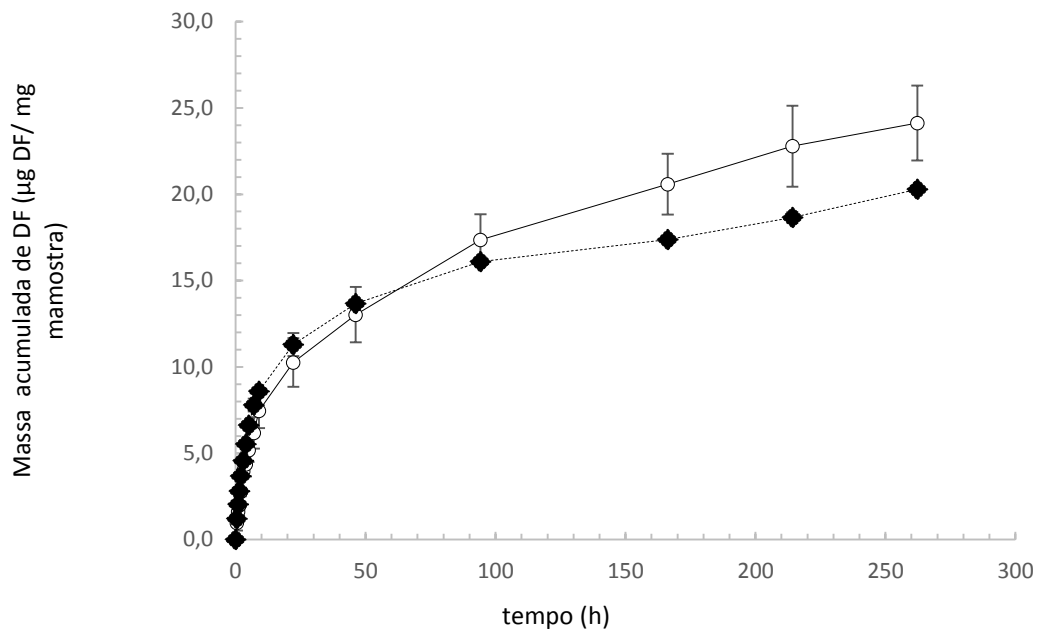


Figura 28 - Ampliação da Figura 27 somente para o caso dos perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes k-IBS® com partículas de PHBV (ensaio 1) incorporadas. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

Tabela 8 - Verificação do momento em que se atinge o *plateau* (h) em todos os perfis estudados que envolvem partículas de PHBV, e respetiva fração percentual de DF libertado em relação à massa de DF incorporada inicialmente na amostra. Os valores obtidos são aproximados à unidade.

Perfil	Tempo em que o <i>plateau</i> é atingido (h)	Fração de DF libertada (%)
A – Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV	*	*
B – 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas	46	165
C – Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV	95 **	120**

\*O *plateau* não foi atingido no tempo de libertação considerado; \*\* O *plateau* foi atingido mas de seguida ocorreu uma nova libertação.

Analisando o perfil relativo às partículas não incorporadas na matriz (perfil B, Figura 27) e consultando a Tabela 8, verifica-se que ocorre a libertação do DF de forma muito rápida logo nas primeiras 9 horas do processo de libertação, atingindo-se o *plateau* ao fim de 46 h e exibindo uma percentagem de libertação igual a 165%. Esse comportamento deverá ficar a dever-se ao fato de existirem cristais de DF aderidos à superfície do polímero, que se dissolvem facilmente em contacto com o meio de libertação. Para além disso, relativamente ao DF que se encontra no interior das partículas, a única “barreira” que encontra para ser libertado é a sua passagem através da rede polimérica. Na Figura 28, em termos de massa acumulada de DF por massa de matriz, pode observar-se que a matriz k-IBS<sup>®</sup> com 1,8% de DF encapsulado em partículas (perfil A) e a matriz com 0,9% de DF não encapsulado e 0,4% de fármaco encapsulado em partículas (perfil C) apresentam perfis semelhantes que após as 260 h ainda não atingiram o *plateau*. Porém, verifica-se que o perfil C, na fase inicial, se sobrepõem ligeiramente ao perfil A, provavelmente porque o fármaco não encapsulado está a ser libertado mais rapidamente. No entanto, a partir das 95 h de libertação, o perfil A apresenta uma quantidade de DF libertada sempre superior à do perfil C, porém estes perfis também se encontram associados ao erro cumulativo referido anteriormente. Em termos de percentagem de libertação, o perfil C da Figura 28 revela uma maior percentagem de fármaco libertado, parecendo ter atingido o *plateau* às 95 h (libertando 120% de DF), porém observa-se um ponto de inflexão quando  $t = 160$  h. Para este tempo, parece que o DF já tinha atingido o equilíbrio, no entanto, a partir desse tempo, o perfil sobe ligeiramente, indicando haver nova libertação de fármaco. O mais provável é que, até às 160 h, o DF não encapsulado seja libertado e, depois desse tempo, começa-se a libertar o DF encapsulado nas partículas.

### 3.2.3. Análise da cinética de libertação

Para o estudo da cinética de libertação de DF foram considerados os seguintes modelos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas e o modelo de Baker-Lonsdale. Foram selecionados estes modelos por se adequarem aos sistemas aqui estudados – sistemas com partículas incorporadas em matriz k-IBS<sup>®</sup>; sistemas com parte de DF encapsulado em partículas e outra parte de DF disperso diretamente na matriz k-IBS<sup>®</sup> (não encapsulado); e partículas isoladas não incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup>. O critério utilizado para averiguar a adequabilidade do modelo foi o mesmo que se utilizou na análise da cinética de libertação das fibras. As representações gráficas de todos os modelos para cada amostra podem ser consultados no Anexo C. De realçar que para o modelo de Korsmeyer-Peppas e Higuchi foi assumido que o  $M_{\infty}$  seria igual à massa de DF libertada acumulada no último ponto do ensaio de libertação. A Tabela 9 resume os coeficientes de determinação obtidos para cada amostra (matriz com partículas/partículas isoladas) e para cada modelo.

Tabela 9 - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido através da aplicação dos modelos matemáticos aos perfis de libertação de DF dos vários sistemas preparados baseados em partículas de PHBV obtidas no ensaio 1.

Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )					
	Ordem Zero	1ª Ordem	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer e Peppas	Baker-Lonsdale
A. Matriz com 1,8% de DF encapsulado partículas de PHBV	0,872	0,594	<b>0,972</b>	0,872	<b>0,966</b>	0,981
B. 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas	0,476	0,365	<b>0,991</b>	0,476	0,987	0,644
C. Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,42% de DF encapsulado em partículas de PHBV	0,765	0,512	<b>0,967</b>	0,765	<b>0,968</b>	0,919

Apesar do coeficiente de determinação do perfil A (matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas) ter-se revelado superior na aplicação do modelo de Baker-Lonsdale este não pode ser considerado, uma vez que o modelo de Baker-Lonsdale é específico para a libertação de fármaco a partir de matrizes com geometria esférica. Embora o contexto envolva partículas aproximadamente com essa geometria, estas são incorporadas numa matriz compósita com forma cilíndrica, daí o modelo não poder ser aplicado. Por outro lado, apesar do coeficiente de determinação para o modelo de Baker-Lonsdale ter-se revelado mais elevado pode significar que a libertação do fármaco a partir das partículas tenha um comportamento dominante em relação à saída do fármaco através da matriz compósita. Desta forma para o perfil A, atendendo ao segundo maior  $R^2$ , pode ser descrito pelo modelo de Higuchi, podendo ser feita uma comparação com o modelo de Korsmeyer-Peppas relativamente ao mecanismo de transporte, uma vez que este modelo



apresenta um coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,966$ ) muito próximo do  $R^2$  para o modelo de Higuchi.

O perfil B (partículas isoladas) pode ser descrito pelo modelo de Higuchi. No entanto, era expectável que o modelo que melhor se aplicasse às partículas isoladas fosse o de Baker-Lonsdale, pois este destina-se à descrição dos perfis para formas farmacêuticas com geometria esférica. Tal como no perfil A, e dada a proximidade do  $R^2$  do modelo de Korsmeyer-Peppas com o  $R^2$  do modelo de Higuchi, será efetuada uma comparação entre ambos, relativamente ao mecanismo de transporte.

Para o perfil C (matriz k-IBS<sup>®</sup> com parte do DF encapsulado em partículas e outra parte não encapsulado), o modelo que apresentou um maior coeficiente de determinação foi o de Korsmeyer-Peppas ( $R^2 = 0,968$ ), porém para o modelo de Higuchi obteve-se  $R^2 = 0,967$ . Logo serão considerados os dois modelos. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos pelo método de Higuchi relativamente aos perfis A, B e C.

Tabela 10 - Constantes de Higuchi relativas à libertação de DF a partir partículas de PHBV (obtidas pelo ensaio 1) incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup> (perfil A); partículas isoladas (perfil B); e matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas com DF encapsulado e não encapsulado (perfil C).

<b>Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação</b>	<b><math>K_H \times 10^5 (s^{-0,5})</math></b>
A. Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV	2,36
B. 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas	8,17
C. Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,42% de DF encapsulado em partículas de PHBV	3,61

Quando os perfis de libertação são descritos pelo modelo de Higuchi, significa que o mecanismo de transporte do fármaco é difusão fickiana. As constantes de dissolução de Higuchi obtidas estão de acordo com os perfis de libertação de fármaco apresentados nas Figuras 27 e 28. Uma vez que, quanto mais rápida é a libertação maior será a constante de dissolução de Higuchi. Relativamente ao coeficiente de difusão, nada pode ser concluído uma vez que não é conhecida a porosidade e tortuosidade das matrizes e das partículas.

Em relação à aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas, para os perfis A, B e C, tendo em atenção a geometria de cada amostra, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Mecanismos de transporte determinados a partir do valor do expoente  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS<sup>®</sup> com partículas de PHBV incorporadas (perfil A); partículas de PHBV isoladas (perfil B); e matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas PHBV e DF não encapsulado (perfil C).

<b>Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação</b>	<b>Valor do expoente <math>n</math></b>	<b>Geometria</b>	<b>Mecanismo de transporte</b>
A. Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV	0,59	Cilíndrica	Transporte anômalo (não fickiano)
B. 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas	0,56	Esférica	Transporte anômalo (não fickiano)
C. Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,42% de DF encapsulado em partículas de PHBV	0,61	Cilíndrica	Transporte anômalo (não fickiano)

Analisando a Tabela 11, para todas as amostras, ao contrário do esperado o mecanismo de transporte do fármaco para o meio de libertação é classificado como transporte anômalo (não fickiano), ou seja, as taxas de difusão são semelhantes às taxas de relaxamento das cadeias poliméricas. Seria esperado constatarem-se mecanismos de difusão fickiana de modo a ir de encontro à aplicabilidade do modelo de Higuchi.

Para os perfis A e C, encontram-se na Tabela 12 os restantes parâmetros do modelo de Korsmeyer-Peppas.

Tabela 12 - Constante cinética,  $k$ , espessura das matrizes e coeficiente de difusão aparente, determinados através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para as matrizes k-IBS<sup>®</sup> com incorporação de partículas de PHBV (obtidas pelo ensaio 1) e fármaco não encapsulado (perfil A e C)

<b>Descrição das amostras correspondentes aos diferentes perfis de libertação</b>	<b><math>k \times 10^5 (s^{-1})</math></b>	<b>Espessura da matriz (mm)</b>	<b>Coeficiente de difusão aparente <math>D \times 10^{15} (m^2 \cdot s^{-1})</math></b>
A. Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV	2,01	3,4	0,916
C. Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,42% de DF encapsulado em partículas de PHBV	2,98	3,5	2,14

Analisando a Tabela 12, verifica-se que para a matriz com 0,9% de DF não encapsulado e 0,42% de DF encapsulado em partículas de PHBV (perfil C), o coeficiente de difusão e a constante de libertação  $k$ , são superiores aos da matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV (perfil A), estando em concordância com a Figura 28, onde a libertação dos primeiros 60% de fármaco foi mais rápida para a matriz correspondente ao perfil C. Pode

verificar-se que os valores das constantes cinéticas ( $k$ ) e dos coeficientes de difusão ( $D$ ) obtidos são da mesma ordem de grandeza dos obtidos com sistemas de fibras de PLA

### 3.3. Comparação entre os perfis de liberação de DF não encapsulado, encapsulado em fibras e partículas e incorporado na matriz k-IBS<sup>®</sup>

Dado o objetivo do projeto, torna-se necessário comparar os perfis de liberação controlada de fármaco encapsulado nas diversas matrizes poliméricas (fibras de PLA, partículas de PHBV) incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup>. Relembrando, a aplicabilidade final da matriz k-IBS<sup>®</sup> destina-se a zonas de tecido ósseo que sofreram lesões ou malformações e que estejam sujeitas a processos inflamatórios pós-cirúrgicos. Deste modo, é de todo o interesse que ocorra uma liberação de DF mais acentuada no período inicial e que esta se prolongue durante os dias posteriores, até um limite entre 8 a 10 dias. As Figuras 29 — 31 seguem comparam a liberação de DF, quer em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra (matriz/fibras/partículas), quer em termos de percentagem de liberação. As comparações entre os perfis de liberação de DF a partir das partículas e fibras isoladas encontram-se na Figura 29.

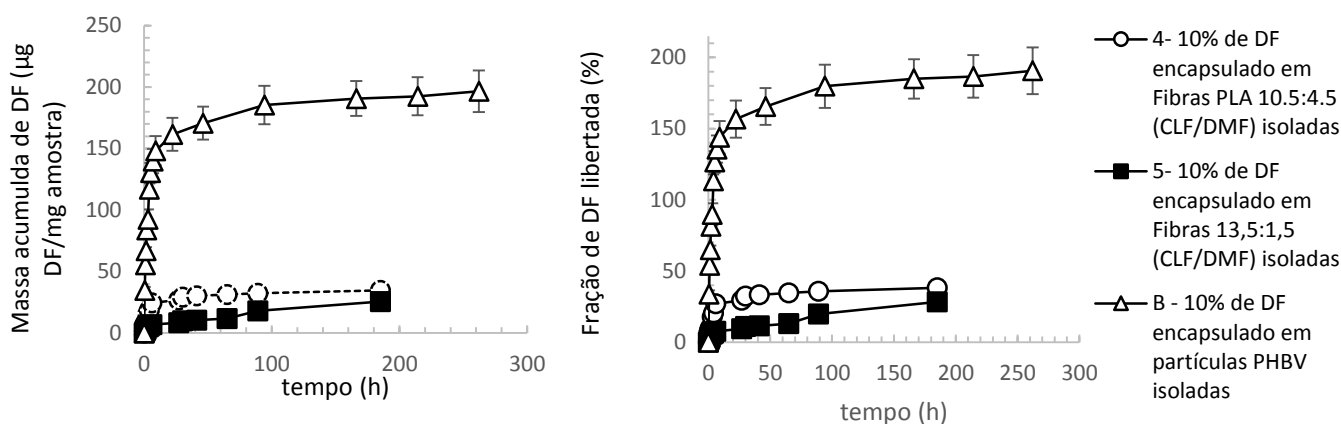


Figura 29 - Perfis de liberação de DF a partir de fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); e partículas de PHBV obtidas pelo ensaio 1. Barras de erro: desvio padrão ( $n = 3$ ). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

Analisando a Figura 29, verifica-se que a liberação de DF a partir das partículas é mais rápida do que a partir das fibras, devendo realçar-se que os resultados obtidos para as partículas são influenciados pelo fato das leituras das amostras estarem associadas a um erro cumulativo que se deveu à presença de partículas de pequena dimensão em suspensão nas alíquotas, tal como referido. Apesar desse erro inerente ao perfil das partículas isoladas, o fato de estas libertarem o fármaco mais rapidamente quando comparado com as fibras, isso pode ser explicado por vários fatores que justificam os perfis obtidos: (i) presença de cristais de fármaco

à superfície dos sistemas poliméricos; (ii) entrelaçamento das fibras; (iii) dispersão das partículas e fibras no meio de libertação; (iv) e afinidade do polímero para com o fármaco. Por um lado, as partículas possuem uma maior quantidade de fármaco à sua superfície, que é facilmente solúvel no meio de libertação, e a dispersão das partículas no meio de libertação é efetuada facilmente. Por outro lado, as fibras produzidas por electrofiação, por possuírem menos fármaco à sua superfície, exibem uma libertação mais lenta. Além disso, o entrelaçamento das mesmas pode atrasar a saída do fármaco e a sua dispersão é mais difícil, pois o PLA é hidrofóbico, tendendo a não se dispersar no meio de libertação. De um modo geral, a libertação do DF a partir das fibras produzidas através da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) atingiu o equilíbrio, libertando cerca de 40% de DF, tendo em conta a quantidade inicial de fármaco incorporado nas fibras. Porém, as fibras produzidas a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) não atingiram o equilíbrio, tendo-se obtido uma percentagem de 30% de DF no último ponto do ensaio. Por outro lado, nas partículas, a partir das 95 h aproximadamente, o equilíbrio terá sido atingido, não se libertando mais fármaco e obtendo-se uma percentagem de libertação de 165%.

Em relação à incorporação de DF encapsulado (em fibras e partículas) e não encapsulado na matriz k-IBS<sup>®</sup>, podem observar-se os perfis obtidos na Figura 30. Verifica-se que as fibras, quando incorporadas em matrizes k-IBS<sup>®</sup>, exibem perfis de libertação semelhantes, não se evidenciando nenhuma diferença significativa entre ambos, i.e., a utilização de fibras produzidas a partir da solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) e a utilização de fibras produzidas a partir da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF), torna-se indiferente quando incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup>, uma vez que os perfis de libertação se sobrepõem quase por completo, tal como referido na secção 3.1.2. Relativamente à matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas incorporadas (perfil A), pode observar-se que a sua libertação é mais lenta, não atingindo o equilíbrio ao fim de 260 h, ou seja quase 11 dias. Para o perfil correspondente à matriz k-IBS<sup>®</sup> com fármaco não encapsulado (perfil 3), verifica-se que o perfil de libertação é mais rápido do que nas fibras, atingindo percentagens de libertação superiores, no entanto, quando comparado com o perfil A, este atinge percentagens de libertação inferiores.

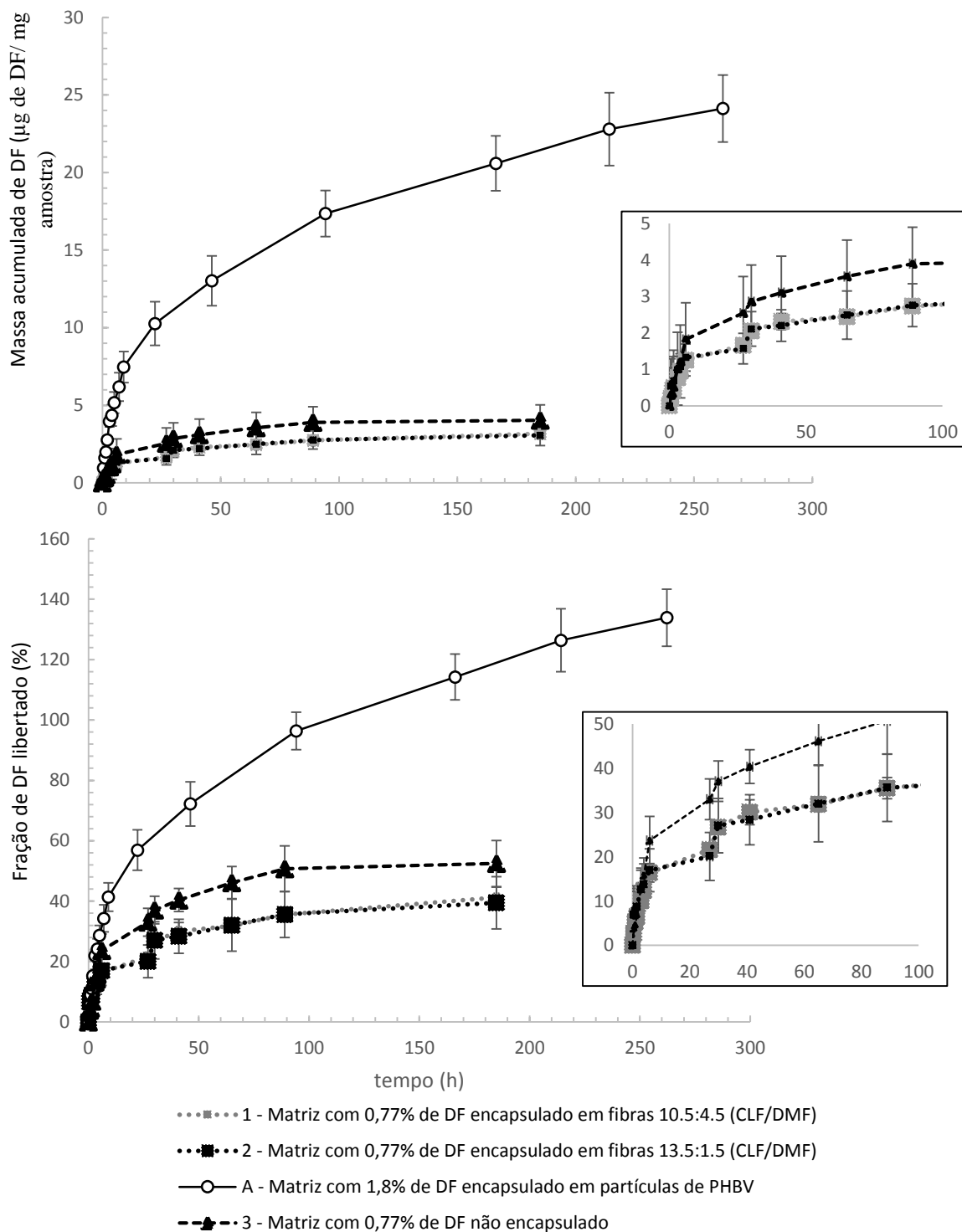


Figura 30 - Perfis de libertação de DF encapsulado (em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF); fibras 13,5:1,5 (CLF/DMF); partículas de PHBV (ensaio 1)) e DF não encapsulado a partir de matrizes k-IBS® (perfil 1, 2, A, 3, respetivamente). Os gráficos menores são uma ampliação sem a representação do perfil A, com os eixos das abcissas e ordenadas com o mesmo significado dos gráficos de maior dimensão. Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis

A Figura 31 refere-se a todas as matrizes k-IBS<sup>®</sup> onde foi incorporado DF através de fibras de PLA, partículas de PHBV ou DF não encapsulado.

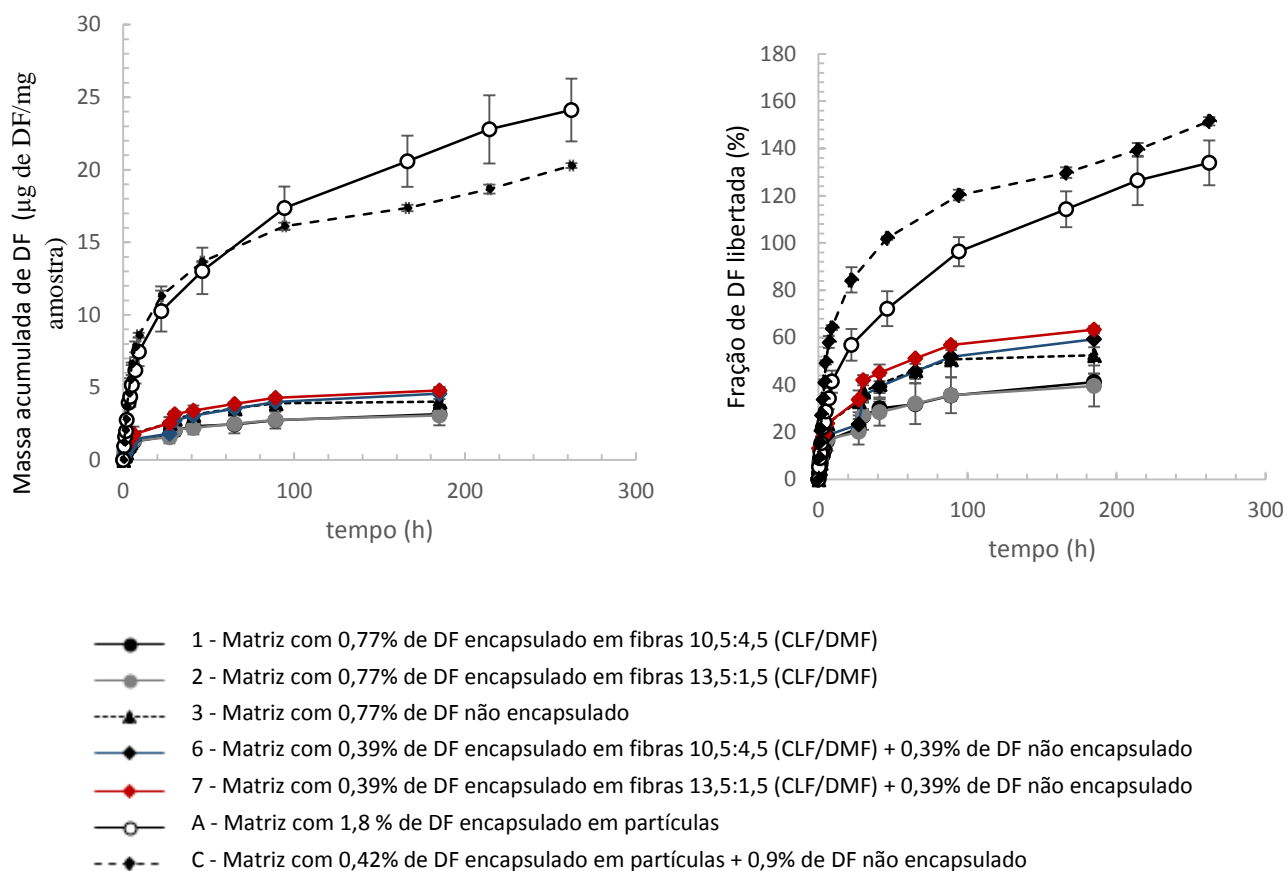


Figura 31 - Representação de todos os perfis estudados que envolvam a utilização da matriz k-IBS<sup>®</sup> com DF encapsulado em fibras de PLA e partículas de PHBV e DF não encapsulado, disperso diretamente na matriz (perfis 1, 2, 3, 6, 7 A e C), em termos de massa acumulada de DF por massa de amostra (esquerda) e fração de DF libertada (%) (direita). Barras de erro: desvio padrão (n = 3). As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

Analisando a Figura 31, verifica-se que todas as matrizes constituídas por partículas de PHBV com fármaco nelas encapsulado ou disperso (não encapsulado) (perfil A e C) são as que exibem um período de libertação que vai de encontro ao tempo de libertação pretendido, uma vez que as libertações de DF são mais rápidas nas primeiras horas, e conseguem prolongar-se por um maior período de tempo, não tendo atingido o *plateau* ao fim de 260 h. Porém, o perfil A sugere que o equilíbrio seria atingido pouco tempo depois das 260 h, uma vez que o último ponto do perfil A (matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas) indica que a libertação vai estabilizar. Por outro lado, o último ponto do perfil C (matriz com 0,9% de DF não encapsulado e 0,4% de DF encapsulado em partículas) dá indicação de que o sistema tende a libertar mais fármaco nos tempos posteriores. No entanto, é de realçar que estes perfis (A e C) estão associadas a um erro cumulativo, explicado anteriormente na secção 3.2.1. Relativamente aos perfis que envolvem a libertação de DF a partir de fibras de PLA (perfis 1, 2, 6 e 7), a Figura 31 sugere que atingem percentagens de libertação inferiores comparativamente com os perfis

A e C. Por outro lado, as matrizes que envolvem uma parte de DF não encapsulado e outra parte encapsulada em fibras (perfis 6 e 7) atingem percentagens de libertação superiores às matrizes k-IBS<sup>®</sup> com DF encapsulado em fibras (perfil 1 e 2). No entanto, de um modo geral, a libertação de DF a partir de matrizes k-IBS<sup>®</sup> com fibras não se aproxima do perfil pretendido, uma vez que exibem libertações mais rápidas e baixas percentagens de libertação de DF.

### 3.4. Efeito da esterilização com radiação gama na libertação de fármaco

Dado que a esterilização por radiação pode modificar/clivar cadeias da rede polimérica, foi efetuado um estudo onde se submeteu ao processo de esterilização por radiação gama uma matriz k-IBS<sup>®</sup> que não continha fase inorgânica (hidroxiapatite e fosfato de tricálcio) para se procurar verificar se ocorria alguma degradação da matriz polimérica e isso tivesse efeito na libertação do DF. Para este estudo, secção 2.3, utilizaram-se matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem os componentes inorgânicos, i.e., constituídas somente por quitosano, PEG e ácido láctico, contendo também DF não encapsulado, tendo sido sujeitas ao processo de esterilização por radiação gama. Os resultados que se apresentam na Figura 32, dizem respeito a estes dois sistemas, bem como a uma matriz k-IBS<sup>®</sup> completa, todos contendo DF não encapsulado. Os sistemas sem a parte inorgânica foram submetidos ao processo de esterilização por radiação gama, tendo recebido doses de radiação de 15 e 25 kGy, enquanto que o sistema baseado em k-IBS<sup>®</sup> completo o não foi.

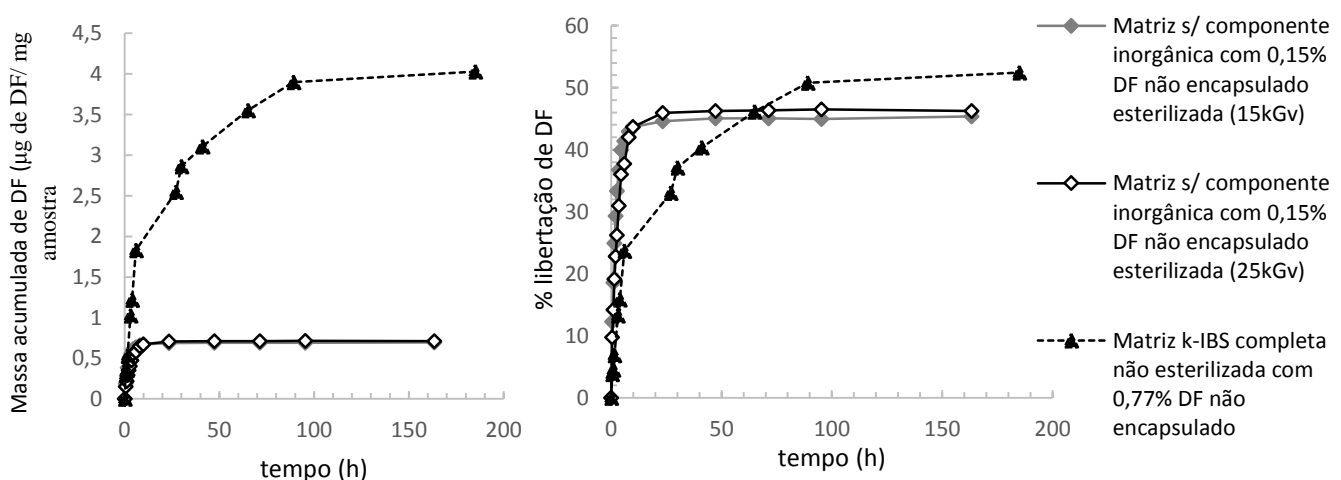


Figura 32 - Libertação de DF a partir de matrizes poliméricas (quitosano, ácido láctico e PEG) com 0,15% de DF esterilizadas com 15 e 25 KGy e matriz k-IBS<sup>®</sup> com 0,77% de DF não encapsulado não esterilizado. No gráfico à esquerda (massa acumulada de DF por massa de amostra) os perfis relativos à libertação de DF a partir das matrizes esterilizadas encontram-se sobrepostos., assim como no gráfico da direita (Fração de DF libertada (%)).As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis.

Analisando a Figura 32 verifica-se que a dose de radiação utilizada na esterilização das matrizes poliméricas sem fase inorgânica não afeta os perfis de libertação de DF, uma vez que os perfis de libertação são extremamente semelhantes, sobrepondo-se no gráfico à esquerda da Figura 32. Nas duas matrizes sujeitas a esterilização o *plateau* atinge-se ao fim de 9 h de libertação. Em termos de percentagem de libertação, verifica-se que as matrizes poliméricas sem fase inorgânica atingem o *plateau* libertando apenas ~ 45% do DF incorporado, o que indica que existe uma interação entre o fármaco e a matriz polimérica (quitosano, PEG e ácido láctico), dado que a concentração DF no último ponto dos perfis para as duas matrizes poliméricas é inferior à solubilidade do DF em meio tampão com pH igual a 7 à temperatura de 37 °C. Na matriz completa de k-IBS<sup>®</sup> com DF não encapsulado verifica-se que a presença da hidroxiapatite e fosfato de tricálcio atenuam a rapidez da libertação atingindo-se o equilíbrio por volta das 89h aproximadamente, apresentando uma percentagem de libertação de DF de 51%. Tal como verificado na secção 3.1.2, a concentração do último ponto deste perfil também é inferior à solubilidade do DF nas condições referidas (pH igual a 7 e temperatura igual a 37 °C). Concluindo-se deste estudo que poderá existir uma interação entre o DF e os compostos poliméricos da matriz k-IBS<sup>®</sup>. Relativamente à influência da radiação nas matrizes poliméricas, verifica-se que os perfis de libertação de DF são idênticos.

### 3.5. Caracterização morfológica das matrizes de k-IBS<sup>®</sup>

Para além das imagens obtidas por SEM das partículas e fibras produzidas, foram também analisadas por SEM algumas matrizes k-IBS<sup>®</sup> contendo fibras e partículas incorporadas, bem como a matriz k-IBS<sup>®</sup> sem fármaco incorporado (branco). Na Figura 33 apresentam-se as imagens obtidas do branco.

Analisando a Figura 33, verifica-se a presença da fase inorgânica (hidroxiapatite e fosfato de tricálcio) sob a forma de grãos, podendo observar-se também a presença de uma fase polimérica com aspeto de películas, onde os grãos da fase inorgânica se encontram aderidos.



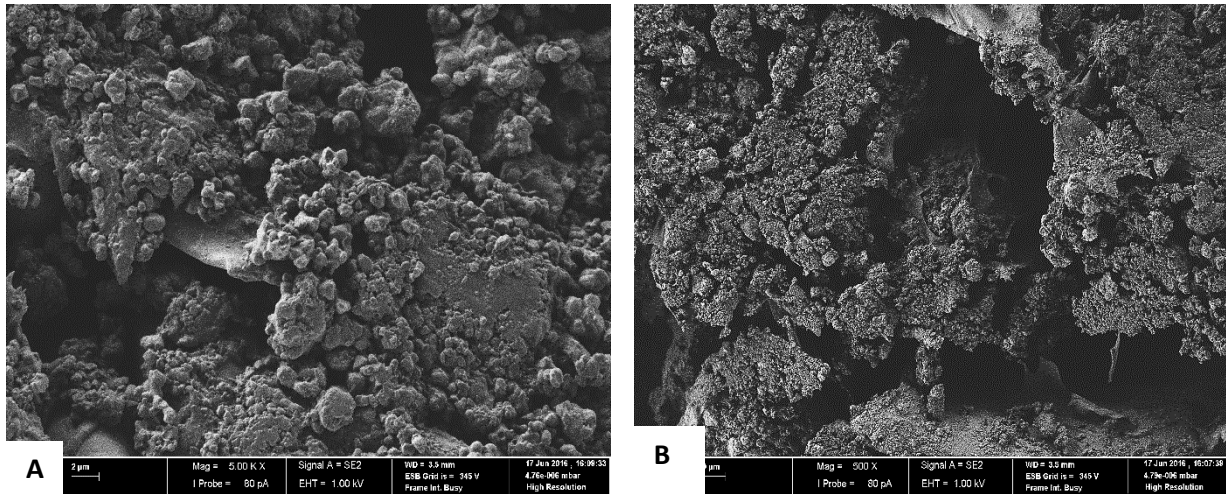


Figura 33 - Imagem obtida por SEM da Matriz k-IBS® sem DF. Ampliação: A -5000x; B- 500x

A Figura 34 apresenta uma matriz k-IBS® com fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) incorporadas.

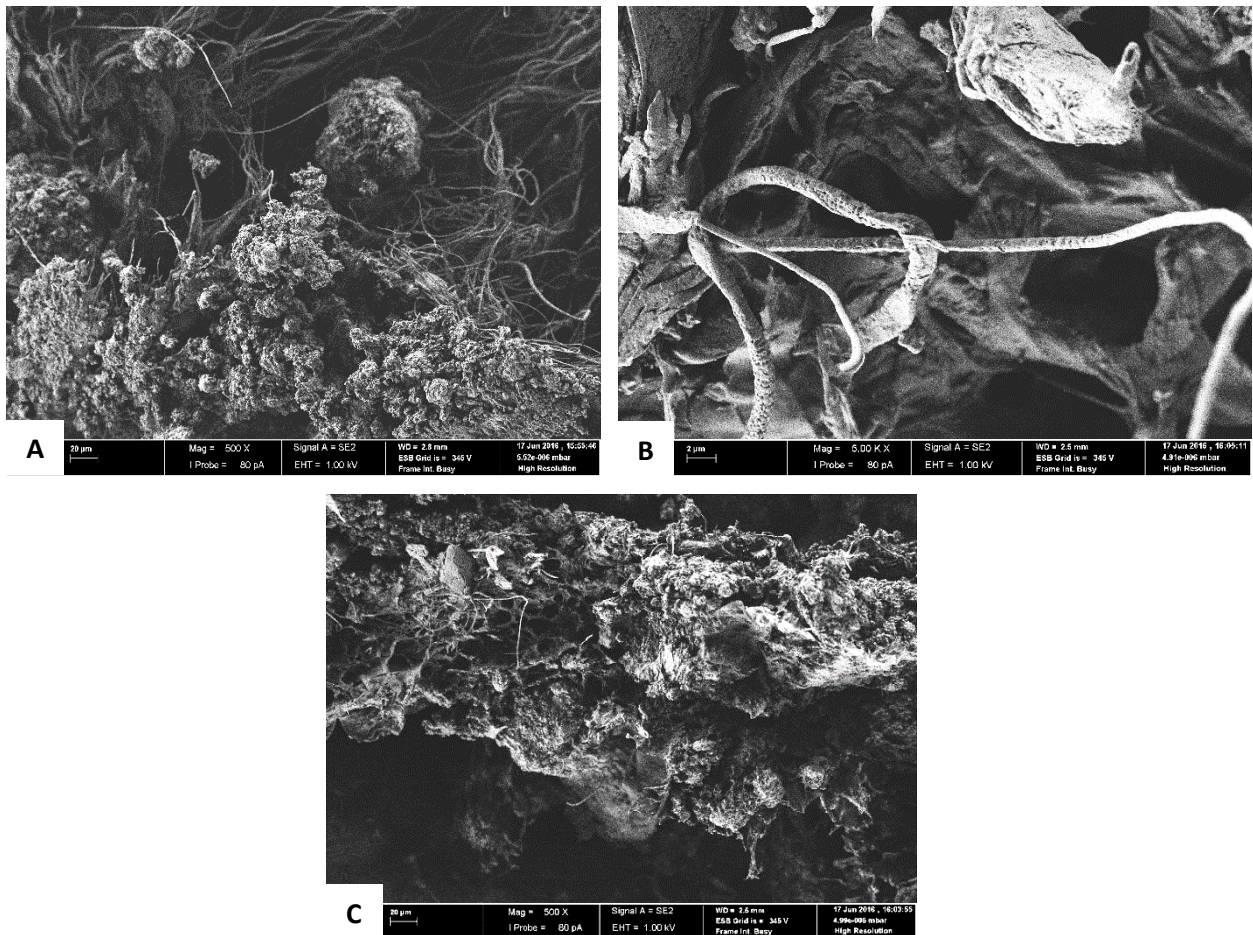


Figura 34 – Imagens obtidas por SEM da Matriz k-IBS® com fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) com 0,77% de DF encapsulado. Ampliação: A – 500x ; B – 5000 x; C – 500x.

Pela visualização da Figura 34, verifica-se que as fibras não se encontram homogeneamente dispersas, havendo zonas onde se apresentam mais concentradas. Tal deve-se ao fato de ser difícil a dispersão das fibras e a sua mistura na matriz compósita, para além de que as fibras têm carácter hidrofóbico e a matriz é hidrofílica, daí ser difícil a sua mistura. Além disso, tal como referido na Figura 23 da secção 3.1.1, observa-se porosidade nas fibras na Figura 34.B.

As matrizes k-IBS<sup>®</sup> com fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 0,39% de DF encapsulado e 0,39% de DF não encapsulado também foram analisadas (Figura 35).

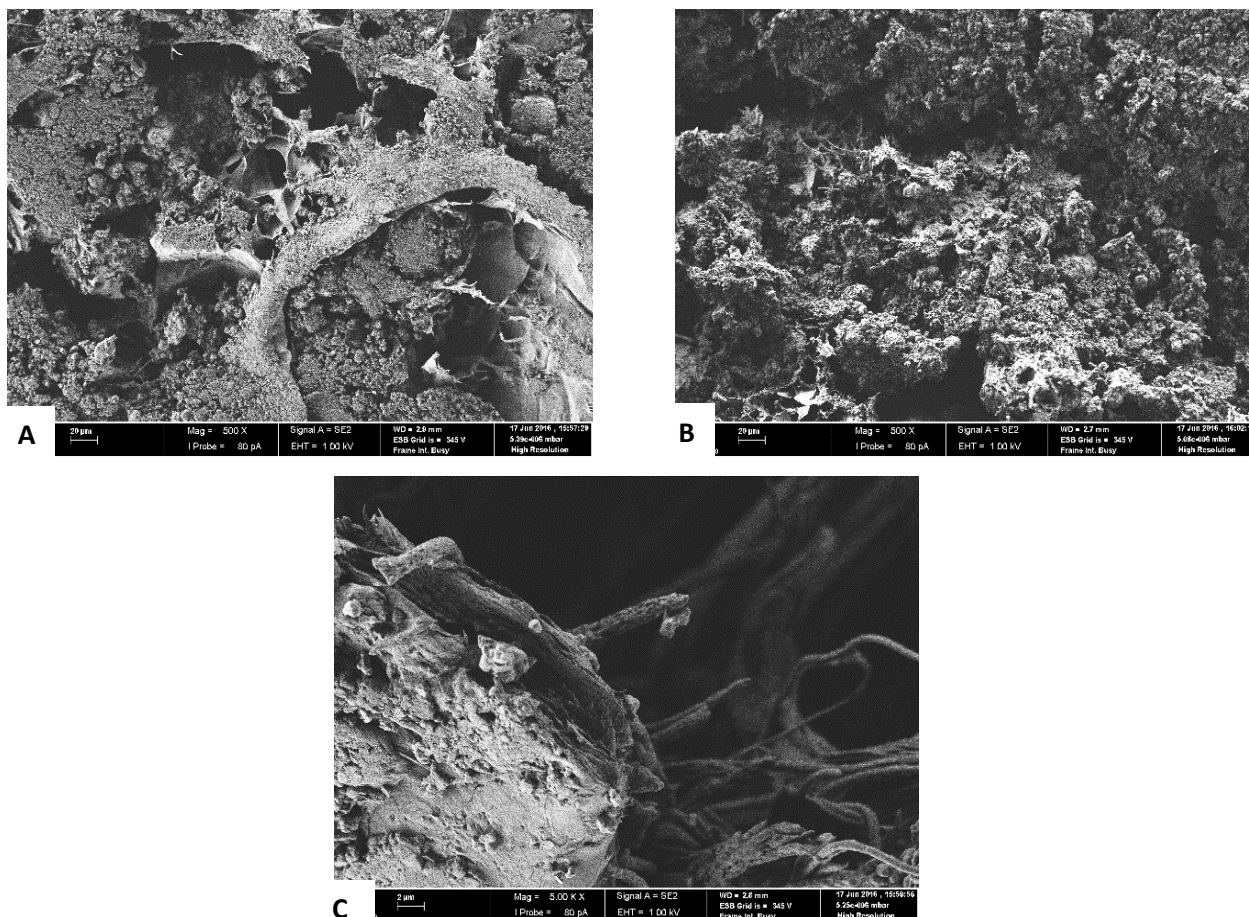


Figura 35 - Imagens obtidas por SEM da matriz k-IBS<sup>®</sup> com fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 0,39% de DF encapsulado + 0,39% de DF não encapsulado Ampliação: A -500x; B- 500x; C -5000x

Na análise da Figura 35 conseguiram-se observar algumas fibras, porém não se observaram cristais de DF pois estes podem ter-se dissolvido durante a preparação da matriz e também por existirem a baixa concentração (0,39% m/m), podem não ter sido encontrados na zona analisada.

A matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas incorporadas apresenta-se na Figura 36.

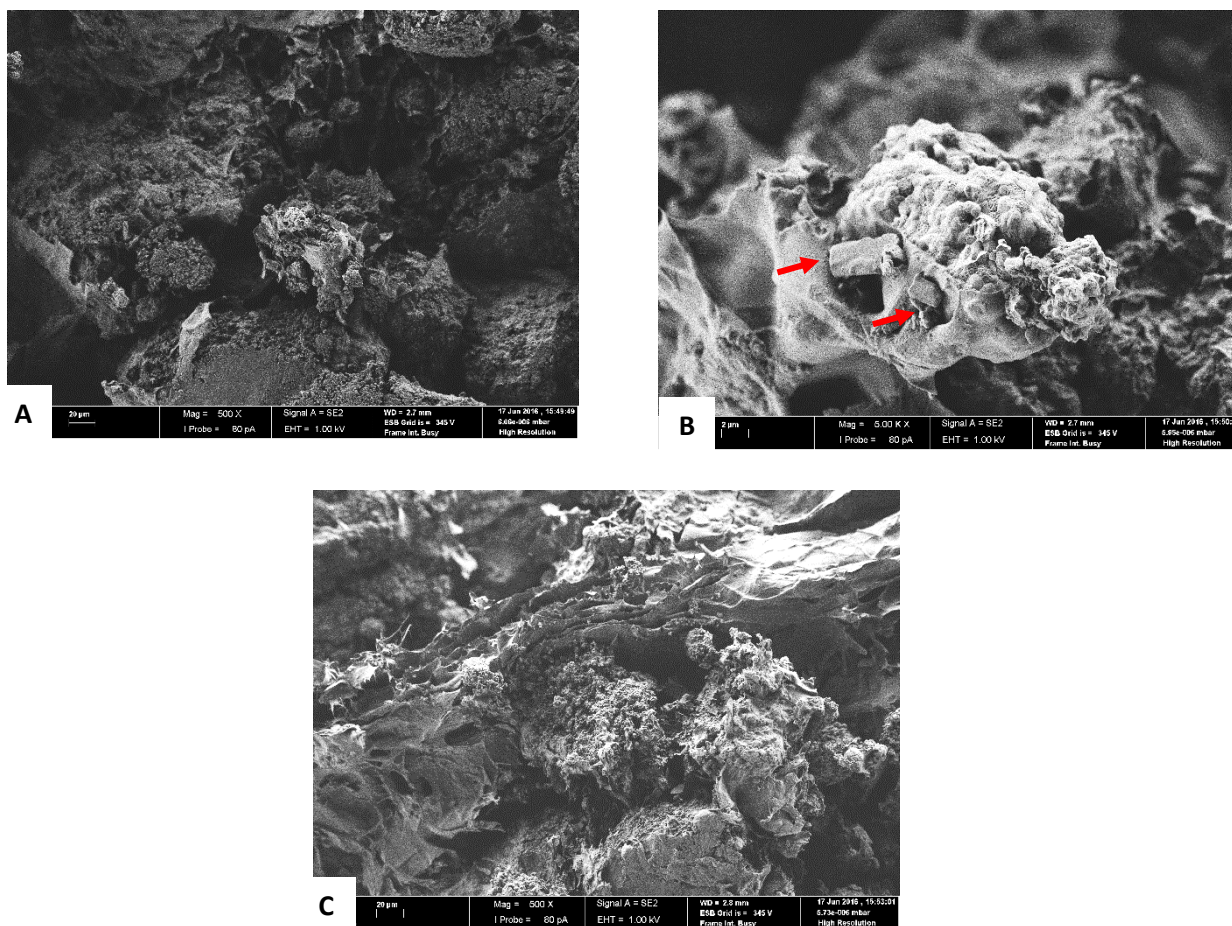


Figura 36 - Imagens obtidas por SEM da matriz k-IBS<sup>®</sup> com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV. Ampliação: A - 500x; B- 5000x; C -500x. As setas a vermelho indicam possíveis cristais de DF.

Observando a Figura 36, relativa à matriz k-IBS<sup>®</sup> com partículas de PHBV e comparando-a com a Figura 33 relativa ao branco (matriz k-IBS<sup>®</sup> sem DF), verifica-se que não é fácil diferenciar as partículas de PHBV da parte inorgânica da matriz k-IBS<sup>®</sup>. No entanto, conseguiram-se observar umas estruturas na Figura 36.B que indicam ser cristais de DF (assinalados com setas a vermelho), porém, observaram-se poucos. Isso pode ser justificado devido ao fato do DF se ter dissolvido aquando a sua incorporação na matriz.

### 3.6. Análise com SEM/EDS

Com o objetivo de verificar de que forma o DF se encontrava disperso ao longo da superfície dos sistemas poliméricos e matrizes compósitas k-IBS<sup>®</sup>, efetuou-se uma análise por SEM/EDS que incidiu sobre as partículas de PHBV com 1,8% de DF encapsulado (Figura 37), fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 10% de DF encapsulado (Figura 38) e sobre matrizes k-IBS<sup>®</sup> com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) (Figura 39). Os

elementos que se procuraram detetar foram o cloro e o sódio, uma vez que fazem parte da estrutura molecular do fármaco, que possui dois átomos de cloro e um de sódio (Fig. 16 secção 1.5.1). As Figuras 37, 38 e 39 dizem respeito aos mapeamentos obtidos.

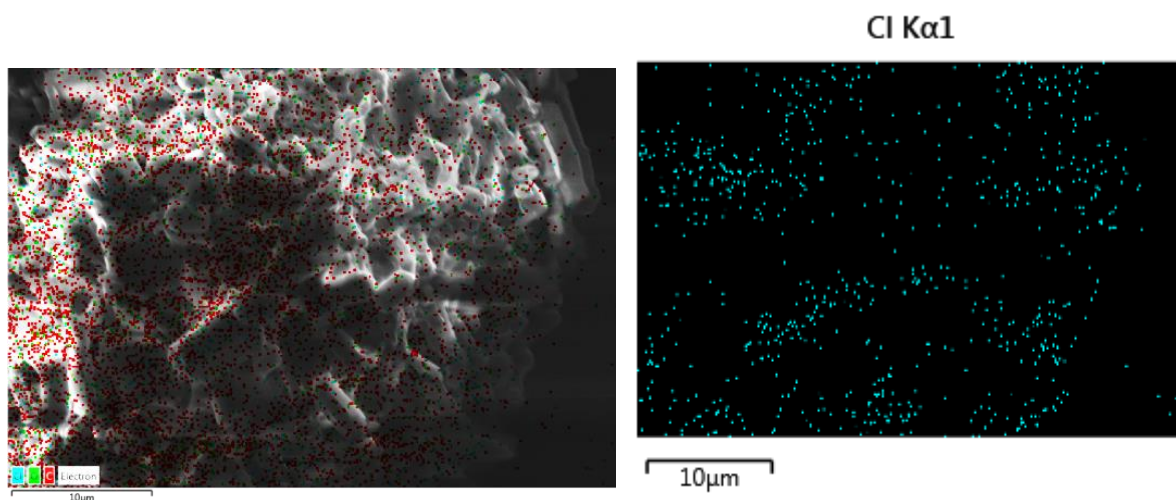


Figura 37 - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivo mapa de distribuição dos átomos que constituem partículas de PHBV com 1,8% de DF encapsulado (ensaio 1). Átomos detetados: C (vermelho), O (verde) e Cl (azul).

Pela Figura 37, pode observar-se que foi detetado cloro na superfície das partículas, que dizem respeito aos cristais que se encontram aderidos à superfície das mesmas, tal como observado na Figura 26 da secção 3.2.1. Detetou-se também, e em grande quantidade, carbono e oxigénio, dado que são os elementos químicos que constituem maioritariamente as partículas e o fármaco (PHBV e DF). Porém, não se detetou sódio, provavelmente porque este se encontra em pouca quantidade relativamente ao cloro, pois existem 2 átomos de cloro para 1 átomo de sódio na molécula de DF.

Na Figura 38 podem ser observados os mapas de distribuição dos elementos para as fibras de PLA 10,5;4,5 (CLF/DMF).

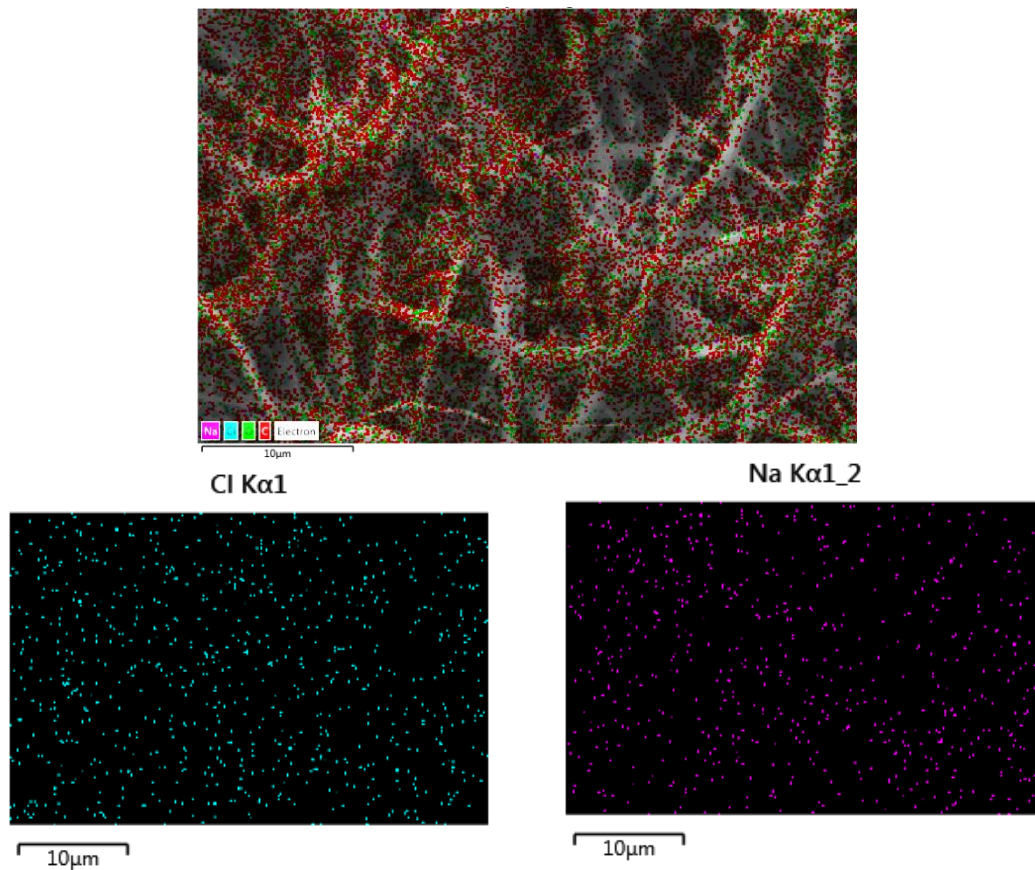
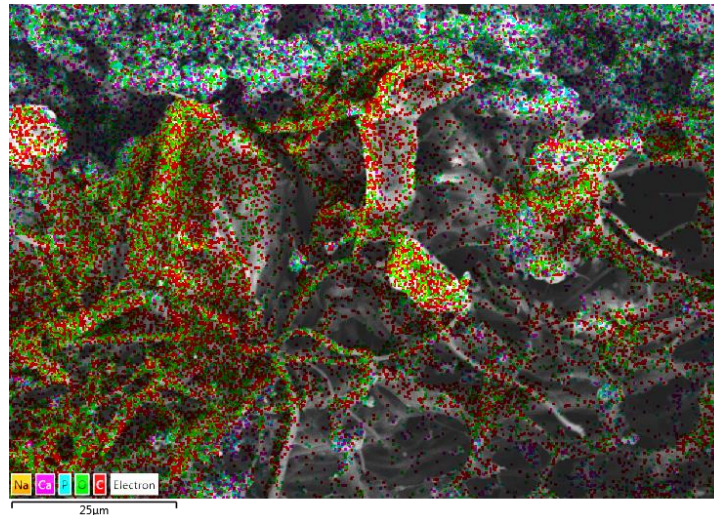


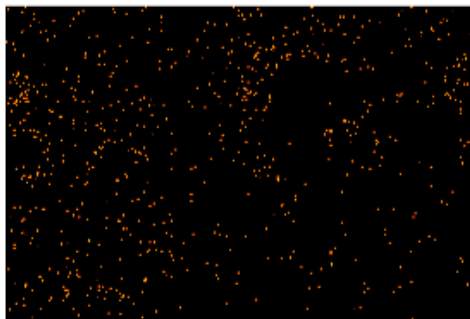
Figura 38 - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivo mapa de distribuição dos átomos que constituem as fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) com 10% de DF encapsulado. Átomos detetados: C (a vermelho), O (a verde), Na (azul) e Cl (amarelo).

Através da Figura 38, verifica-se que à superfície das fibras detetou-se cloro e sódio, o que indica que as fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF), tal como afirmado anteriormente (Figura 22, secção 3.1.1) possuem partículas de DF à sua superfície. Foi também detetado carbono e oxigénio, que dizem respeito à presença do PLA, essencialmente.

Na Figura 39 podem ser observados os mapas de distribuição dos elementos para a matriz k-IBS<sup>®</sup> com as fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) incorporadas.



Na K $\alpha$ 1\_2



Cl K $\alpha$ 1

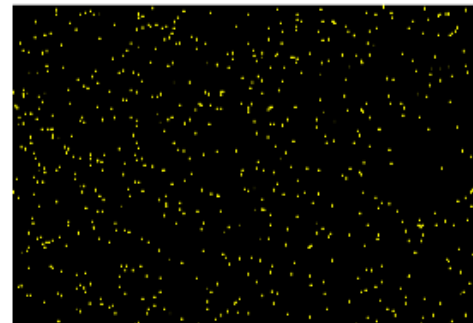


Figura 39 - Imagens obtidas por SEM/EDS e respetivos mapas de distribuição dos átomos que constituem matrizes k-IBS<sup>®</sup> com 0,77% de DF encapsulado em fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF). Átomos detetados: C (a vermelho), O (a verde), Ca (a roxo), P (azul), Na (laranja) e Cl (amarelo).

Os mapas de distribuição de elementos para a matriz em estudo (Figura 39), indicaram a presença de cloro e sódio dispersos ao longo de toda a imagem. Ou seja, o que pode ter acontecido é que ao misturar as fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) na matriz, por as fibras possuírem partículas de DF à superfície, e a matriz k-IBS<sup>®</sup> ser hidrofílica, as partículas de fármaco dispersaram-se ao longo da matriz. Foram também detetados os seguintes elementos: carbono, oxigénio, cálcio e fósforo. Estes elementos fazem parte da componente inorgânica e orgânica da matriz k-IBS<sup>®</sup> e era esperado que fossem detetados.



## Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras

Neste projeto foram preparados dois sistemas para encapsulação de fármaco para serem incorporados numa matriz compósita k-IBS<sup>®</sup>. Estudou-se o efeito da encapsulação de DF nos perfis de libertação a partir de partículas de PHBV, produzidas pelo método de emulsão e EES, e a partir de fibras de PLA, produzidas pelo método de electrofiação, com percentagens de (m/m) de DF encapsulado e percentagens (m/m) de DF não encapsulado. O objetivo do trabalho era obter um sistema compósito sólido que possa ser utilizado em Medicina Dentária e Ortopedia na reconstrução e regeneração de tecido ósseo e que permita uma libertação de DF controlada e localizada, pretendendo-se um período de libertação seja de 8 a 10 dias. Era pretendido obter-se uma matriz sólida e seca, que pudesse ser cortada com as dimensões pretendidas. Atendendo ao objetivo do projeto conclui-se, de um modo geral, que os sistemas que melhor se enquadram nos objetivos propostos são os sistemas que envolvem a utilização de partículas de PHBV, uma vez que libertam fármaco durante um maior período de tempo, verificando-se também uma libertação rápida nas primeiras horas, tal como desejado. Em relação ao fato de se obter uma matriz sólida que possa ser cortada, isso é possível, porém através do seu manuseamento durante os ensaios experimentais, conclui-se que pode ocorrer alguma desagregação do material durante o processo de corte.

No método de electrofiação foram testadas duas soluções distintas (10,5:4,5 (CLF/DMF) e 13,5:1,5 (CLF/DMF), obtendo-se fibras com propriedades morfológicas diferentes. Conclui-se que as fibras produzidas com a solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) ficaram mais compactas, não eram porosas, possuíam partículas de DF à sua superfície e os diâmetros obtidos eram maiores, comparativamente com as fibras produzidas através da solução 13,5:1,5 (CLF/DMF), que apesar de mais finas, apresentavam porosidade e não era visível DF à sua superfície, não se mostrando tão compactas. Estas conclusões foram tiradas a partir da análise das imagens obtidas por SEM.

Pelo método de emulsão por EES foram efetuados dois ensaios para produzir partículas de PHBV. No ensaio 1, através da análise das imagens obtidas por SEM, concluiu-se que as partículas produzidas encontravam-se aglomeradas e possuíam cristais de DF à sua superfície. A eficiência de encapsulação das partículas do ensaio 1 foi de  $113,37 \pm 0,06\%$  e o rendimento de 77,8%. Para o ensaio 2, nada se pode concluir em relação ao tamanho das partículas/aglomeração, pois estas não foram analisadas por SEM. Obteve-se, para as partículas do ensaio 2, uma eficiência de encapsulação de  $68,55 \pm 0,09\%$  e um rendimento de 91,1%.



Nos sistemas de libertação de DF foram testadas as incorporações na matriz k-IBS<sup>®</sup> das fibras e das partículas, assim como DF não encapsulado, i.e., disperso diretamente na matriz. Conclui-se que para as matrizes com fibras incorporadas, não se verificou uma diferença significativa relativamente aos perfis de libertação obtidos para os diferentes tipos de fibras (10,5:4,5 (CLF/DMF) e 13,5:1,5 (CLF/DMF)), tendo estas atingido o *plateau* por volta das 89 h, libertando apenas 36 % de DF nelas encapsulado. Para as matrizes com DF não encapsulado (matriz com 0,77% de DF disperso não encapsulado), estas libertaram 51% do DF quando atingiram o *plateau* às 89h. Nas matrizes k-IBS<sup>®</sup> que possuíam fibras e fármaco não encapsulado, o equilíbrio não foi atingido ao fim de 165 h, tendo-se até esse momento libertado entre 59 e 63 % de DF.

Para os sistemas de libertação de DF que envolviam a incorporação de partículas e DF não encapsulado, foram utilizadas as partículas do ensaio 1. Deve-se realçar que os resultados obtidos estão associados a um erro cumulativo proveniente das leituras durante a execução experimental, provocadas pela existência de partículas de pequenas dimensões nas alíquotas e resultando em percentagens de libertação de DF superiores a 100%. Verificou-se que a matriz que continha 1,8% de DF encapsulado em partículas, o equilíbrio não foi atingido ao fim de 260 h, indicando o perfil de libertação que este seria atingido pouco tempo depois. No último ponto do perfil de libertação verificou-se uma percentagem de libertação de DF de 134%. Para o perfil com parte do fármaco encapsulado em partículas e a restante parte não encapsulada (0,4% de DF encapsulado em partículas mais 0,9 % de DF não encapsulado) verificou-se que este não atingiu o equilíbrio ao fim de 260 h, libertando 152% de DF ao fim desse tempo. Dado objetivo do projeto conclui-se que o sistema que melhor se enquadra no objetivo é a matriz que contém 1,8% de DF encapsulado em partículas, uma vez que liberta o fármaco rapidamente nos instantes iniciais e é expectável que o seu *plateau* seja atingido pouco tempo depois das 260 h, tal como referido. No entanto, é de realçar que os resultados para esta matriz também estão associados ao erro cumulativo acima referido.

Foi feito também um estudo de libertação com os dois tipos de fibras (10,5:4,5 (CLF/DMF) e 13,5:1,5 (CLF/DMF)) e com as partículas do ensaio 1, isoladas. Verificou-se que para as fibras produzidas com 10,5:4,5 (CLF/DMF) o equilíbrio foi atingido após 30 h, libertando-se 30% do DF. Para as fibras (13,5:1,5 (CLF/DMF)) o equilíbrio não foi atingido tendo-se alcançado uma percentagem de libertação de 30% ao fim de 185 h de ensaio. Para as partículas, o *plateau* foi atingido ao fim de 46 h, atingindo-se uma percentagem de libertação de 165%.

Do estudo da cinética de libertação de DF a partir de matrizes com fibras e matrizes com fibras e DF não encapsulado conclui-se que o modelo que melhor se adequou foi o de

Korsmeyer-Peppas, assim como para a matriz que só continha DF não encapsulado/disperso na matriz. Para descrever a cinética das fibras isoladas, i.e., para as fibras não incorporadas na matriz k-IBS<sup>®</sup>, o modelo que melhor se adequou às fibras produzidas pela solução 10,5:4,5 (CLF/DMF) foi o de “dessorção limitante” e para as fibras produzidas pela solução 13,5:1,5 (CLF/DMF) os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas, contudo o valor parâmetro  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas foi diferente daquele que deveria corresponder ao modelo de Higuchi.

Do estudo da cinética de liberação de DF a partir de matrizes com partículas, matrizes com partículas e DF não encapsulado e partículas isoladas os modelos que melhor se adaptaram, ou seja que apresentaram um coeficiente de determinação mais elevados foram o modelo de Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Porém, conclui-se que os valores de  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas foram diferentes daqueles que deveriam corresponder ao modelo de Higuchi. No entanto, deve realçar-se que, dada a proximidade dos coeficientes de determinação nos vários modelos testados, para os vários sistemas que incluem matrizes k-IBS<sup>®</sup> com fibras/partículas/DF não encapsulado, não se pode afirmar categoricamente que os mecanismos de transporte do DF para o meio de liberação são os indicados.

Relativamente à influência da radiação gama em sistemas poliméricos k-IBS<sup>®</sup> ausentes de fase inorgânica, verificou-se que os perfis de liberação de fármaco foram idênticos, concluindo-se que as amostras poliméricas carregadas com 0,15% de DF quando submetidas a 15 e 25 kGy não exibem comportamentos distintos relativamente ao processo de liberação do fármaco, tendo-se atingido o *plateau* ao fim de 9 h e alcançando-se uma percentagem de liberação de DF  $\sim 45\%$ , ou seja, a dose de esterilização utilizada não afeta os perfis de liberação. Comparando os perfis de liberação das matrizes k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica (esterilizadas) e com fármaco com a matriz k-IBS<sup>®</sup> completa (não esterilizada) com fármaco, pode concluir-se que a fase inorgânica atenua o processo de liberação do fármaco. Além disso, dadas as percentagens de liberação obtidas para as matrizes esterilizadas sem fase inorgânica e para a matriz completa (51% de DF libertado no *plateau*), conclui-se que é provável que exista uma interação entre o DF e a componente polimérica da matriz k-IBS<sup>®</sup>.

Em relação às imagens obtidas por SEM, verificou-se no caso das matrizes com fibras, que estas não ficaram homogeneamente dispersas ao longo da superfície da matriz. No caso das matrizes com partículas, foi difícil a sua identificação pois estas eram facilmente confundidas com a hidroxiapatite e o fosfato de tricálcio, porém conseguiram-se visualizar alguns cristais de DF.

Nos mapeamentos obtidos por SEM/EDS, conclui-se que foi detetado cloro à superfície das partículas de PHBV e na análise da imagem das fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) foi

detetado cloro e sódio à superfície das fibras. Por fim, na análise de uma matriz k-IBS<sup>®</sup> com fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF), detetou-se cloro e sódio ao longo de toda a imagem, i.e., ao incorporarem-se as fibras 10,5:4,5 (CLF/DMF) matriz k-IBS<sup>®</sup> as partículas de DF à superfície podem ter desorvido e misturaram-se na matriz compósita.

Como sugestões de trabalho futuro, nos sistemas estudados com partículas, de modo a diminuir-se o erro associado às leituras de absorvância das alíquotas que envolviam partículas em suspensão, seria vantajoso se fosse utilizado um branco para descontar esse erro. Seria interessante também submeter as matrizes com fibras/partículas a esterilização gama e fazer o estudo da libertação do fármaco ao longo do tempo, como foi feito com a matriz k-IBS<sup>®</sup> sem fase inorgânica.

Também seria interessante produzir fibras com outro polímero que não fosse tão hidrofóbico como o PLA e permitisse uma dispersão das fibras mais homogênea na matriz.

Sugere-se também que seja avaliada a citotoxicidade *in vitro* do DF quando incorporado nas matrizes, para se concluir em que concentrações este se torna tóxico para as células ou não. Além disso, seria vantajoso determinar-se a porosidade das matrizes produzidas, de modo a verificar se estas possuem poros com dimensão suficiente que permitam a neovascularização e formação de tecido novo.

## Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

- [1] E. Jimi, S. Hirata, K. Osawa, M. Terashita, C. Kitamura, and H. Fukushima, “The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects,” *Int. J. Dent.*, 3, 1 –7, 2012.
- [2] C. Gao, Y. Deng, P. Feng, Z. Mao, P. Li, B. Yang, J. Deng, Y. Cao, C. Shuai, and S. Peng, “Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration,” *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 4714 – 4732, 2014.
- [3] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, and S. J. Roberts, “Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds,” *J. Anat.*, 213, 66–72, 2008.
- [4] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H.-P. Wiesmann, *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 211 – 232, Springer, Heidelberg, 2009.
- [5] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials,” *Biomaterials*, 30, 5897–5909, 2009.
- [6] R. S. Park, Joon, Lakes, *Biomaterials: An Introduction*, 223–240, 3rd ed, Elsevier, Oxford, 2013.
- [7] D. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, 42, Liverpool University Press, Liverpool, 1999.
- [8] Buddy D. Ratner, *Biomaterials Science : An Interdisciplinary Endeavor in Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (Buddy D. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons), Academic Press, San Diego, 1996.
- [9] R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*, 217 - 236, 3rd ed., San Diego Academic Press, 2011.
- [10] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, 14, 88–95, 2011.
- [11] L. C. Junqueira and J. Carneiro, *Histologia Básica*, 135 - 152, 11<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
- [12] J. M. Phipps Wilma, Judith Sands, *Enfermagem Médico-Cirúrgica - Conceitos e Prática Clínica*, 2133 - 2138, 6th ed., Lusociência, Loures, 2004.
- [13] Vilela A., “Anatomia e Fisiologia Humanas.” [Online]. Available: <http://www.afh.bio.br/sustenta/sustenta2.asp>. [Accessed: 05-Mar-2016].
- [14] Y. H. An and K. L. Martin, *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, 59 - 72, Humana Press Inc., Totowa, 2003.
- [15] Ayse B. Celil, Scott Guelcher, Jeffrey O. Hollinger, and Michael Miller, *Tissue Engineering Applications*, in *Tissue Engineering* (Fisher J, Mikos A., Bronzino J.), CRC Press, New York, 2007.
- [16] A. C. B. M. Fook, A. H. Aparecida, and M. V. L. Fook, “Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea,” *Rev. Mater.*, 15, 392–399, 2010.
- [17] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, 26, 5474–5491, 2005.
- [18] S. Bose and M. Roy, “Recent Advances in Bone Tissue Engineering Scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, 30, 546–554, 2013.
- [19] N. R. Ahsan T, “Bioengineered tissues : the science , the technology , and the industry,” 8 , 134 - 140, 2005.
- [20] R. F. Oliveira Luciana, Oliveira Conceição, Machado Ana, “Revisão: Biomateriais com aplicação na regeneração óssea–método de análise e perspectivas futuras,” *Rev. Ciência*, 9, 37 – 44, 2010.
- [21] J. H. Lee, H. W. Jung, I.-K. Kang, and H. B. Lee, “Cell behaviour on polymer surfaces

- with different functional groups,” *Biomaterials*, 15, 705–711, 1994.
- [22] A. C. Guastaldi and A. H. Aparecida, “Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos,” *Quim. Nova*, 33, 6, 1352–1358, 2010.
- [23] K. K. Jain, *Drug delivery systems - An overview*, in *Drug delivery systems*, 1 - 50, Humana Press Inc, Totowa, 2008.
- [24] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, and S. Kankane, “Responsive polymers in controlled drug delivery,” *Prog. Polym. Sci.*, 33, 1088–1118, 2008.
- [25] J. B. Li Xiaoling, *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*, 107 - 172, McGraw-Hill, New York, 2005.
- [26] G. E. Wnek and G. L. Bowlin, *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, 880 - 890, 2nd ed., Informa Healthcare, New York, 2008.
- [27] K. Milczewska, A. Voelkel, J. Zwolińska, and D. Jędro, “Preparation of hybrid materials for controlled drug release.,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 42, 1058–1065, 2016.
- [28] M. Catauro, D. Verardi, D. Melisi, F. Belotti, and P. Mustarelli, “Novel sol-gel organic-inorganic hybrid materials for drug delivery.,” *J. Appl. Biomater. Biomech.*, 8, 42–51, 2010.
- [29] R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, A. V. Bazilevsky, and E. Kelley, “Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers,” *Langmuir*, 24, 965–974, 2008.
- [30] D. Wise, *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, 68 - 70 , Marcel Dekker, Inc New York, 2000.
- [31] Crank J., *The mathematics of diffusion*, 1 - 80, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1977.
- [32] P. Coelho, “Desenvolvimento de Formulações de Libertação Modificada de Ranitidina,” FFUP - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.
- [33] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices,” *J. Control. Release*, 5, 37–42, 1987.
- [34] P. Costa and J. M. Sousa Lobo, “Modeling and comparison of dissolution profiles,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 123–133, 2001.
- [35] D. Y. Arifin, L. Y. Lee, and C. H. Wang, “Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 1274–1325, 2006.
- [36] K. H. Ramteke, P. A. Dighe, A. R. Kharat, and S. V Patil, “Review Article Mathematical Models of Drug Dissolution : A Review,” *Sch. Acad. J. Pharm.*, 3, 388–396, 2014.
- [37] H. K. Shaikh, R. V Kshirsagar, and S. G. Patil, “Mathematical Models for Drug Release Characterization : a Review,” *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4, 324–338, 2015.
- [38] S. H. Natu M, Gil Maria, “Electrospun Drug-Eluting Fibers for Biomedical Applications,” 127, 2011.
- [39] P. J. C. Da Costa, “Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas,” *Rev. Bras. Ciências Farm.*, 38, 141–153, 2002.
- [40] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, 28, 325–347, 2010.
- [41] I. Sebe, P. Szabó, B. Kállai-Szabó, and R. Zelkó, “Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review,” *Int. J. Pharm.*, 494, 516–530, 2015.
- [42] H. C. de Sousa, M. E. M. Braga, and A. Sosnik, *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*, 385 - 400, Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.
- [43] R. Vasita and D. S. Katti, “Nanofibers and their applications in tissue engineering,” *Int. J. Nanomedicine*, 1, 15–30, 2006.
- [44] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, “Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.,” *Tissue Eng.*, 12, 1197–211, 2006.

- [45] R. G. F. Costa, J. E. De Oliveira, G. F. De Paula, E. S. De Medeiros, C. Ribeiro, L. H. C. Mattoso, and P. H. de S. Picciani, "Eletrofição de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica," *Polímeros*, 22, 170–177, 2012.
- [46] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, and X. Jing, "Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications," *J. Control. Release*, 185, 12–21, 2014.
- [47] P. Raghavan, D. H. Lim, J. H. Ahn, C. Nah, D. C. Sherrington, H. S. Ryu, and H. J. Ahn, "Electrospun polymer nanofibers: The booming cutting edge technology," *React. Funct. Polym.*, 72, 915–930, 2012.
- [48] J. Pelipenko, P. Kocbek, and J. Kristl, "Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration," *Int. J. Pharm.*, 484, 57–74, 2015.
- [49] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, and P. Supaphol, "Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter RID C-4353-2008," *Macromol. Chem. Phys.*, 205, 2327–2338, 2004.
- [50] C. L. Casper and J. S. Stephens, "Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in Electrospinning Process," *Macromolecules*, 37, 573–578, 2004.
- [51] S.-F. Chou, D. Carson, and K. A. Woodrow, "Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers," *J. Control. Release*, 220, 584–591, 2015.
- [52] T. Jiang, E. J. Carbone, K. W.-H. Lo, and C. T. Laurencin, "Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration," *Prog. Polym. Sci.*, 46, 1–24, 2014.
- [53] L. Nikkola, T. Morton, E. R. Balmayor, H. Jukola, A. Harlin, H. Redl, M. van Griensven, and N. Ashammakhi, "Fabrication of electrospun poly(D,L lactide-co-glycolide)80/20 scaffolds loaded with diclofenac sodium for tissue engineering," *Eur. J. Med. Res.*, 20, 54, 2015.
- [54] E. V. Anslyn and D. A. Dougherty, *Modern physical organic chemistry*, 147, University Science Books, Sausalito, 2006.
- [55] M. V. Natu, H. C. de Sousa, and M. H. Gil, "Electrospun Drug-Eluting Fibers for Biomedical Applications," 57–85, 2011.
- [56] R. M. Mainardes and L. P. Silva, "Drug delivery systems: past, present, and future.," *Curr. Drug Targets*, 5, 449–55, 2004.
- [57] H. E.S. Wolfgang Sigmund, *Particulate systems in nano- and biotechnologies*, 258 - 263, CRC Press, New York, 2009.
- [58] B. P. G. L. Damasceno, J. A. Silva, E. E. Oliveira, W. L. L. Silveira, I. B. Araújo, A. G. Oliveira, and E. S. T. Egito, "Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis," *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.*, 32, 9–18, 2011.
- [59] M. Li, O. Rouaud, and D. Poncelet, "Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches," *Int. J. Pharm.*, 363, 26–39, 2008.
- [60] K. Rege and I. Medintz, *Methods in Bioengineering: Nanoscale Bioengineering and Nanomedicine*, 211-213, Artech House, Boston, 2009.
- [61] M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi, and A. Elaissari, "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation," *Int. J. Pharm.*, 496, 173–190, 2015.
- [62] D. Liu, S. Jiang, H. Shen, S. Qin, J. Liu, Q. Zhang, R. Li, and Q. Xu, "Diclofenac sodium-loaded solid lipid nanoparticles prepared by emulsion/solvent evaporation method," *J. Nanoparticle Res.*, 13, 2375–2386, 2011.
- [63] M. Malmsten, *Surfactants and polymers in drug delivery*, 48 - 55, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
- [64] N. Limpan, T. Prodpran, S. Benjakul, and S. Prasarpran, "Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films," *Food Hydrocoll.*, 29, 226–233, 2012.
- [65] S. Zhang, M. P. Prabhakaran, X. Qin, and S. Ramakrishna, "Biocomposite scaffolds for bone regeneration: Role of chitosan and hydroxyapatite within poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate on mechanical properties and in vitro evaluation," *J. Mech. Behav.*

*Biomed. Mater.*, 51, 88–98, 2015.

- [66] INFARMED, *Farmacopeia Portuguesa 9.0*. INFARMED, 2008.
- [67] a Pobudkowska and U. Domanska, “Study of Ph-Dependent Drugs Solubility in Water,” *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 20, 115–126, 2014.
- [68] C. S. Proikakis, P. A. Tarantili, and A. G. Andreopoulos, “The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly(dl-lactic acid) tablets,” *Eur. Polym. J.*, 42, 3269–3276, 2006.
- [69] “U.S. Pharmacopeia.” [Online]. Available: [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_alpha-2-13.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_alpha-2-13.html). [Accessed: 02-Apr-2016].
- [70] “Product Block.” [Online]. Available: <http://www.scbt.com/pt/datasheet-202136-Diclofenac-Sodium.html>. [Accessed: 02-Apr-2016].
- [71] S. M. F. Hasan, T. Ahmed, N. Talib, and F. Hasan, “Pharmacokinetics of diclofenac sodium in normal man.,” *Pak. J. Pharm. Sci.*, 18, 18–24, 2005.
- [72] Ceramed, [Online]. Available: <http://www.ceramed.pt/trauma?setLn=pt> [Accessed: 05-Mar-2016].
- [73] Altakitin SA, “altakitin.” [Online]. Available: <http://www.altakitin.com/?Products>. [Accessed: 05-Mar-2016].
- [74] J. D. Kretlow, L. Klouda, and A. G. Mikos, “Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 263–273, 2007.
- [75] A. S. Baume, N. V. Coleman, and P. C. Boughton, “Methods for Achieving Soft Tissue Scaffold Sterility,” *J. Biomim. Biomater. Tissue Eng.*, 4, 59–69, 2009.
- [76] W. J. Rogers, *Sterilisation of Polymer Healthcare Products*, 151 - 160, Rapra Technology Limited, Shropshire, 2005.
- [77] Q. M. Romano Juliana, “Esterilização por radiação ionizante,” 1997. [Online]. Available: <http://www.hospvirt.org.br/enfermagem/port/radion.html>. [Accessed: 02-Jun-2016].
- [78] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, and G. Machado, “Microscopia Eletrônica De Varredura - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores,” *Dados Int. Cat. na Publicação*, 60, 2007.
- [79] J. L. Marshall, “Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-ray (SEM/EDX) Characterization of Solder Solderability and Reliability,” in *Solder Joint Reliability*, 173–224, Springer, Boston, 1991.
- [80] A. Jouyban, *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*, 121 - 123, CRC Press, New York, 2010.
- [81] R. Vaishya, M. Chauhan, and A. Vaish, “Bone cement,” *J. Clin. Orthop. Trauma*, 4, 157–163, 2013.
- [82] J. F. Coelho, P. C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A. C. Fonseca, J. R. Góis, and M. H. Gil, “Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments,” *EPMA J.*, 1–46, 2010.







# Anexos

## Anexo A – Perfis de libertação obtidos pelo ensaio I de electrofiação

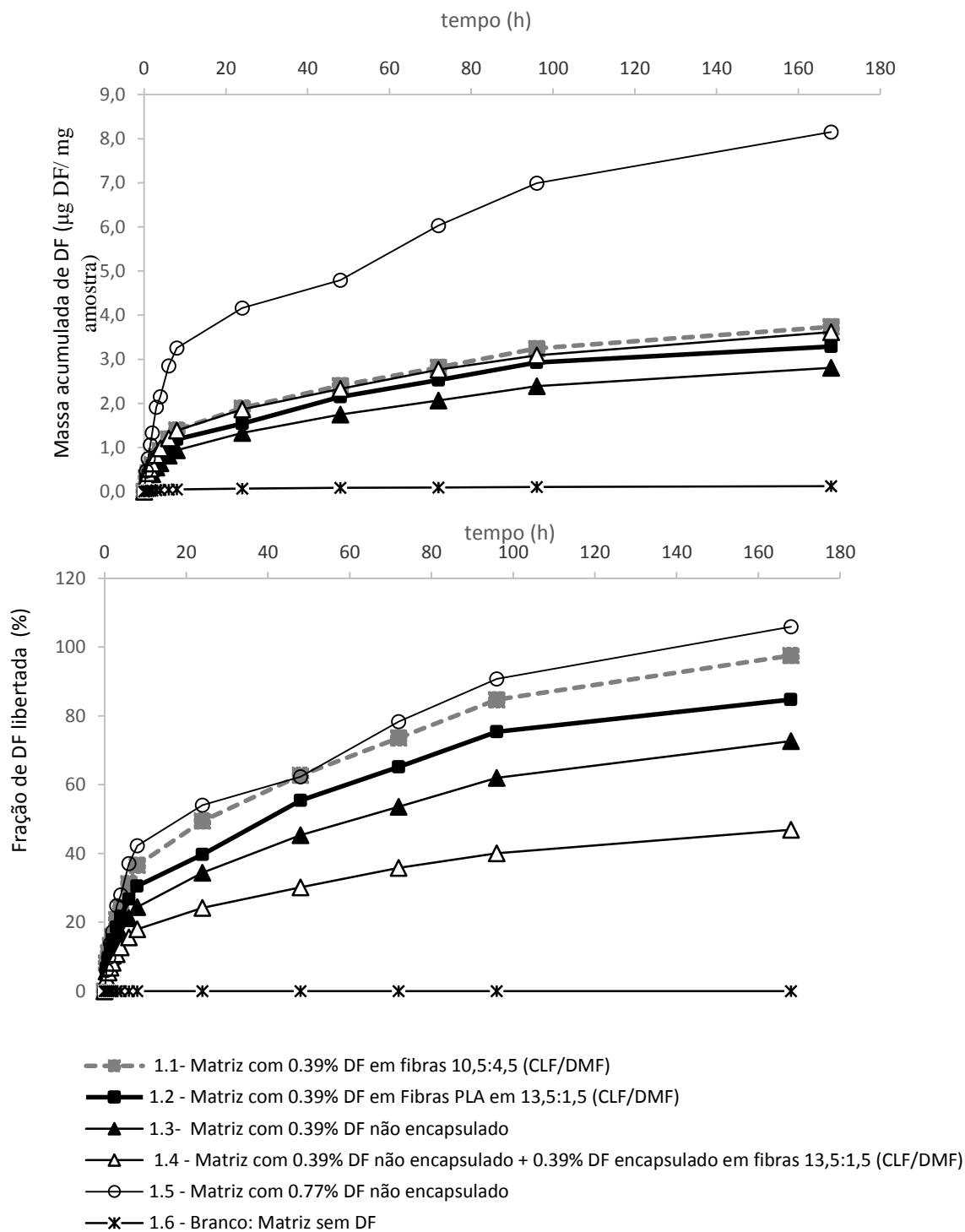


Figura 40 - Perfil de libertação de DF em termos de massa libertada acumulada por massa de amostra e percentagem de DF libertado em relação ao introduzido na matriz. As linhas representadas destinam-se somente a facilitar a identificação dos perfis

## Anexo B - Ajuste dos perfis de libertação do fármaco aos modelos matemáticos: Amostras com Fibras de PLA obtidas pelo ensaio 2.

- Modelo de Ordem Zero

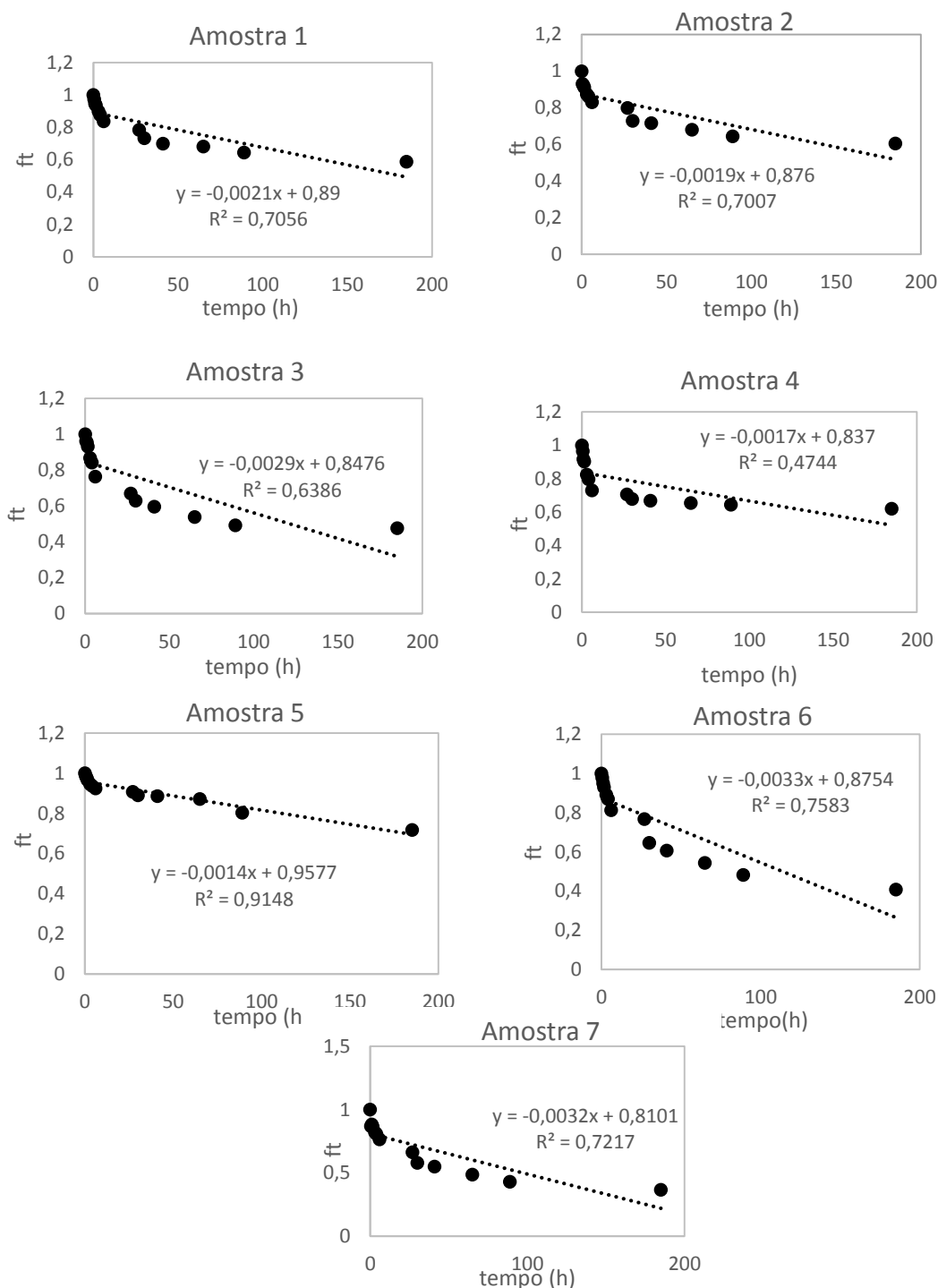


Figura 41 - Representação gráfica do modelo de ordem zero para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado.

- Modelo de 1ª Ordem

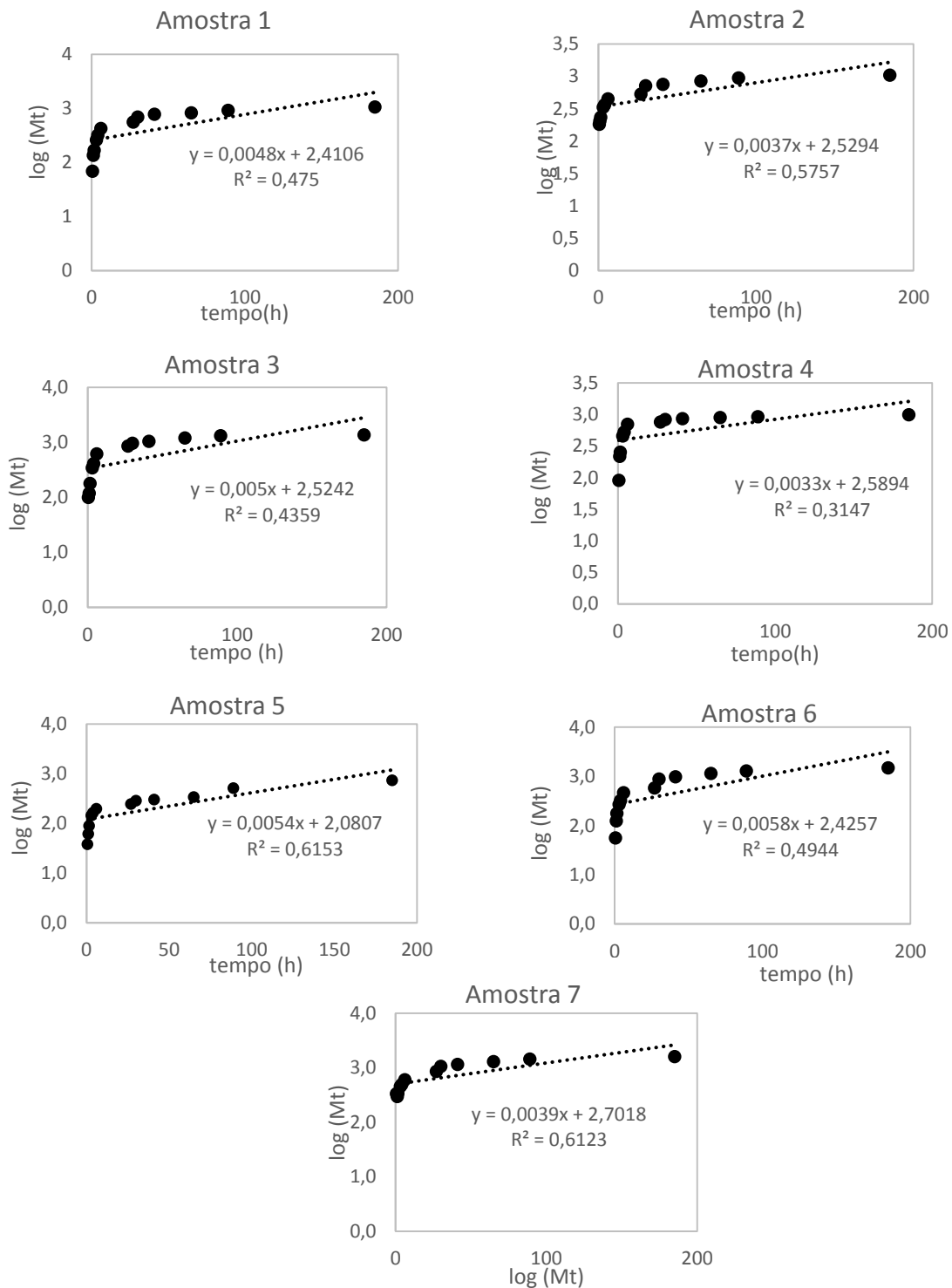


Figura 42 -Representação gráfica do modelo de 1ª ordem para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas;5 -10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado

- Modelo de Higuchi

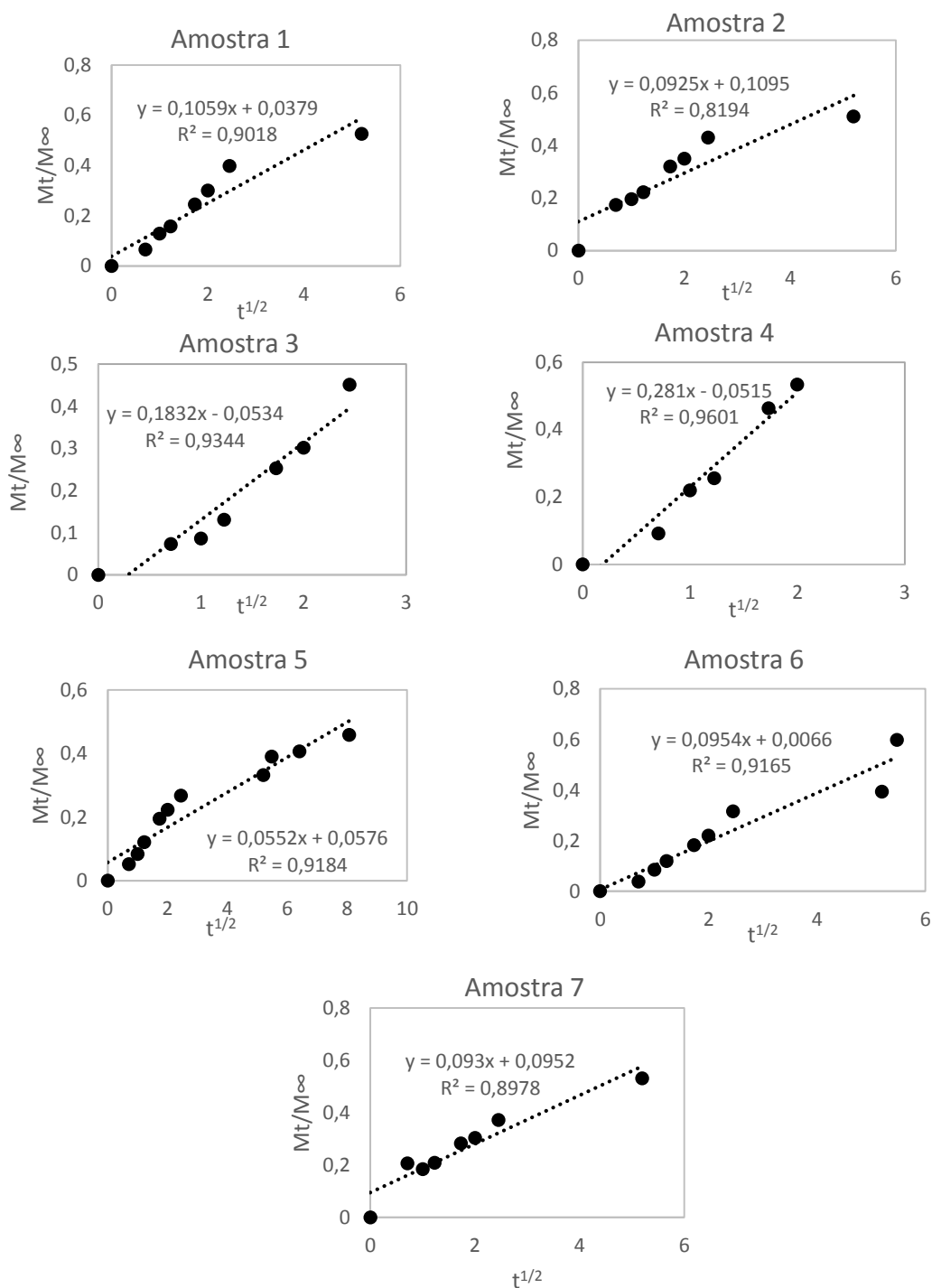


Figura 43 - Representação gráfica do modelo de Higuchi para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado.

- Modelo de Hixson-Crowell

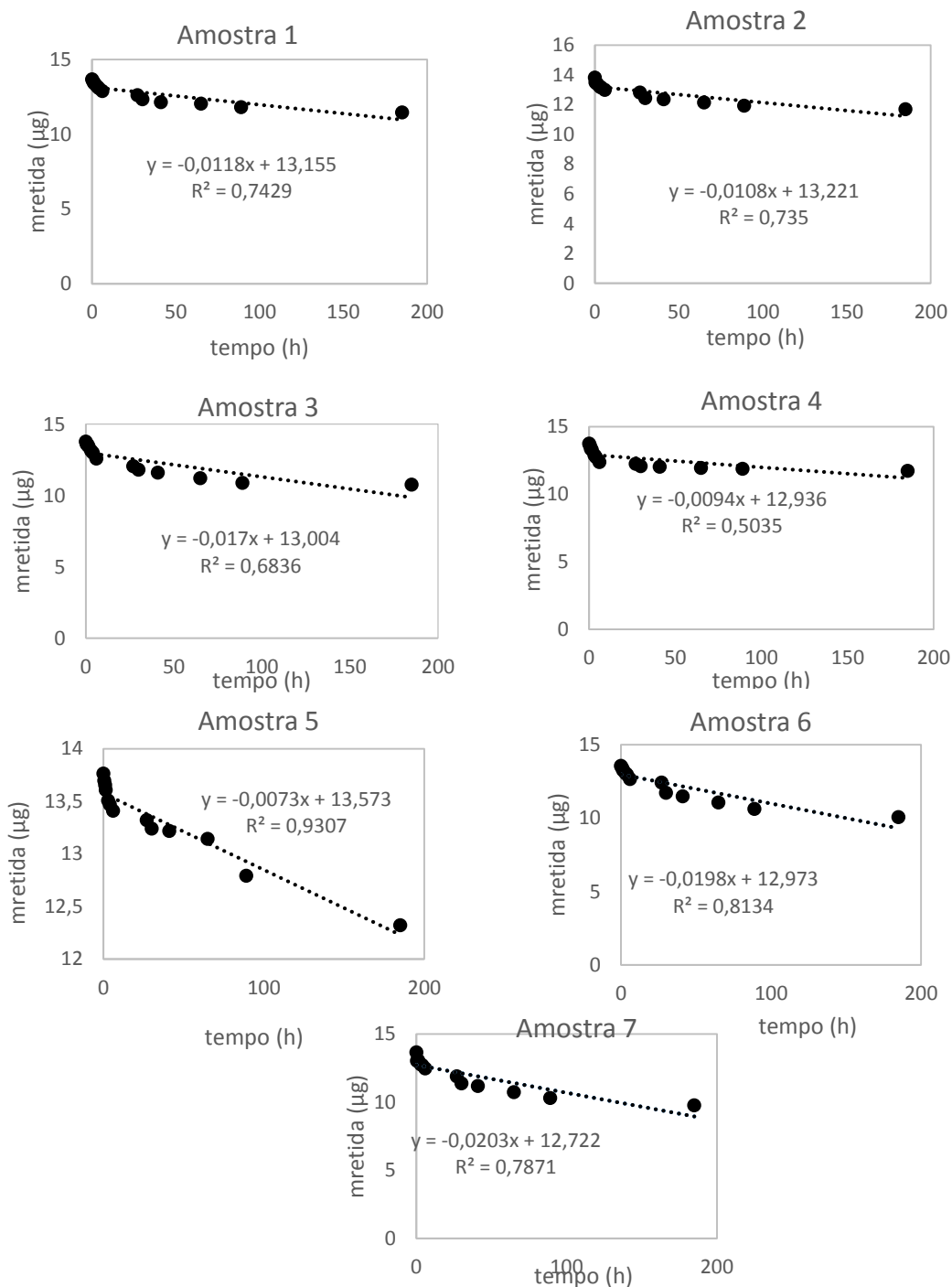


Figura 44 -Representação gráfica do modelo de Hixson-Crowell para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 -10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas;5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado.

- Modelo de Korsmeyer-Peppas

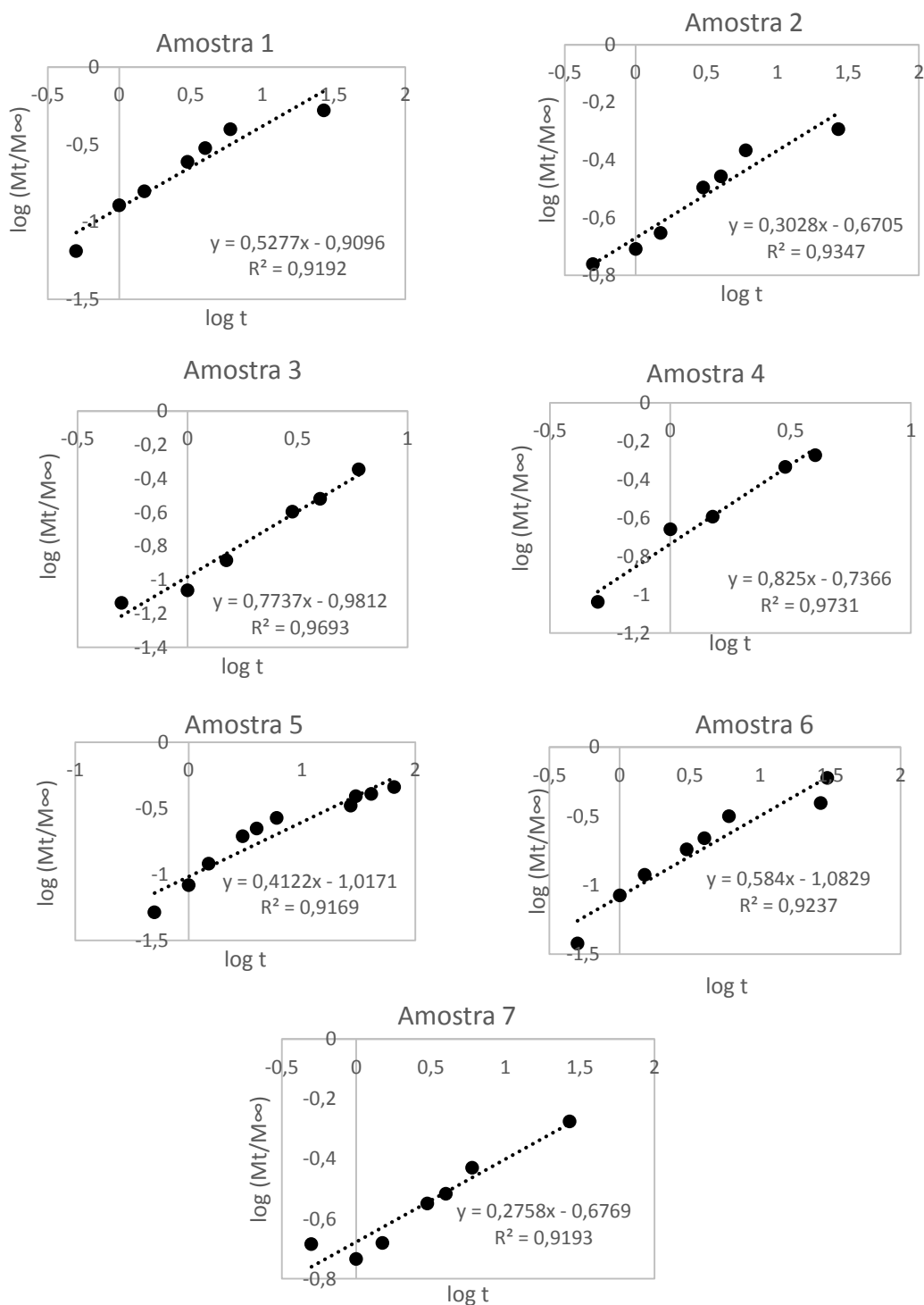


Figura 45 - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer -Peppas para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 3 - Matriz com 0,77% de DF não encapsulado; 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5 - 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado

- Modelo de “dessorção limitante”

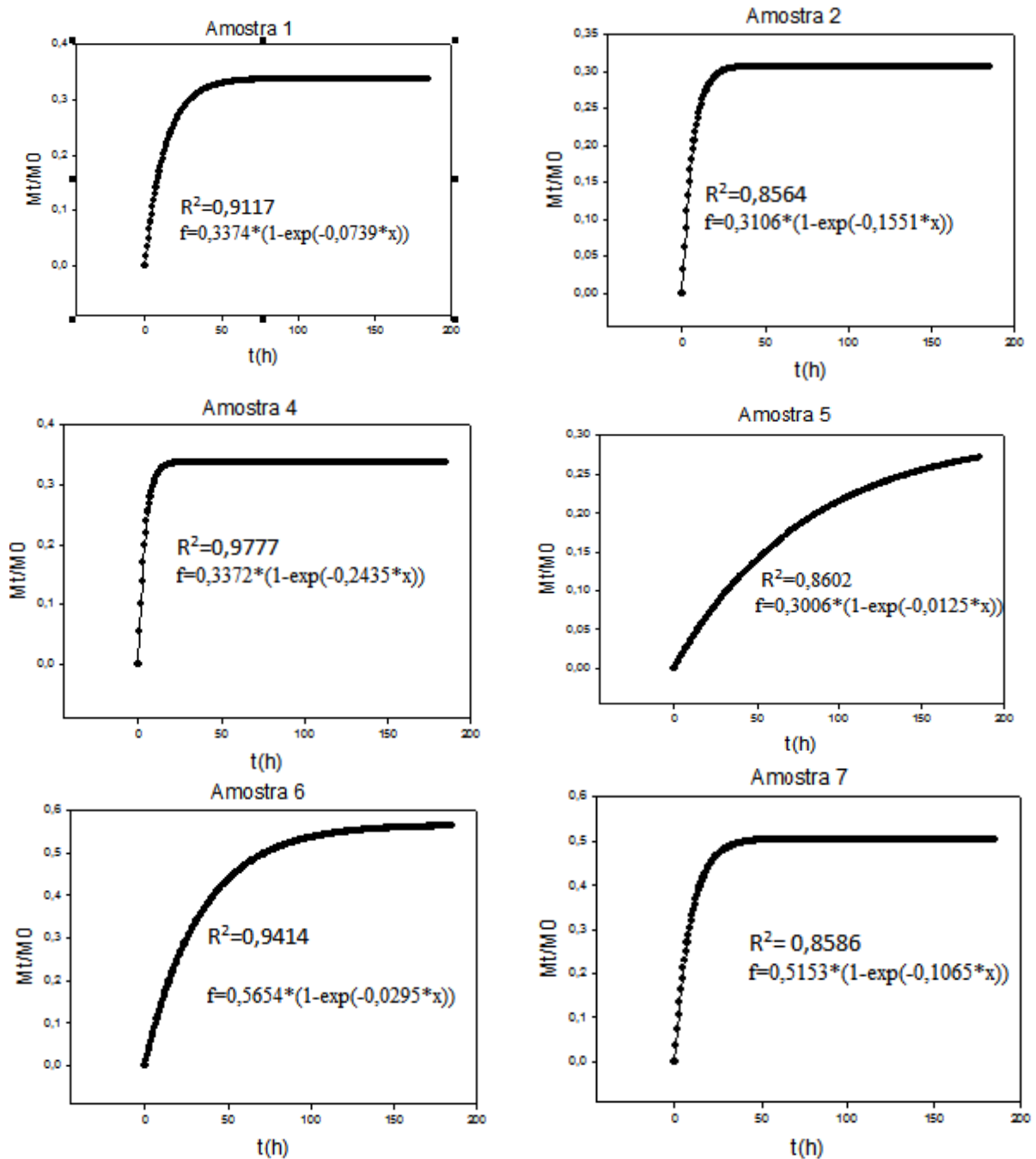


Figura 46 - Representação gráfica do modelo de “dessorção limitante” para as amostras: 1- Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF); 2 - Matriz com 0,77% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF); 4 - 10% de DF em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) isoladas; 5- 10% de DF em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) isoladas; 6 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 10,5:4,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado; 7 - Matriz com 0,39% de DF encapsulado em fibras de PLA 13,5:1,5 (CLF/DMF) + 0,39% de DF não encapsulado. O modelo não foi aplicado à amostra 3 porque essa amostra não possuía fibras.



## Anexo C - Ajuste dos perfis de libertação do fármaco aos modelos matemáticos: Partículas de PHBV (Ensaio I)

- Modelo de Ordem Zero

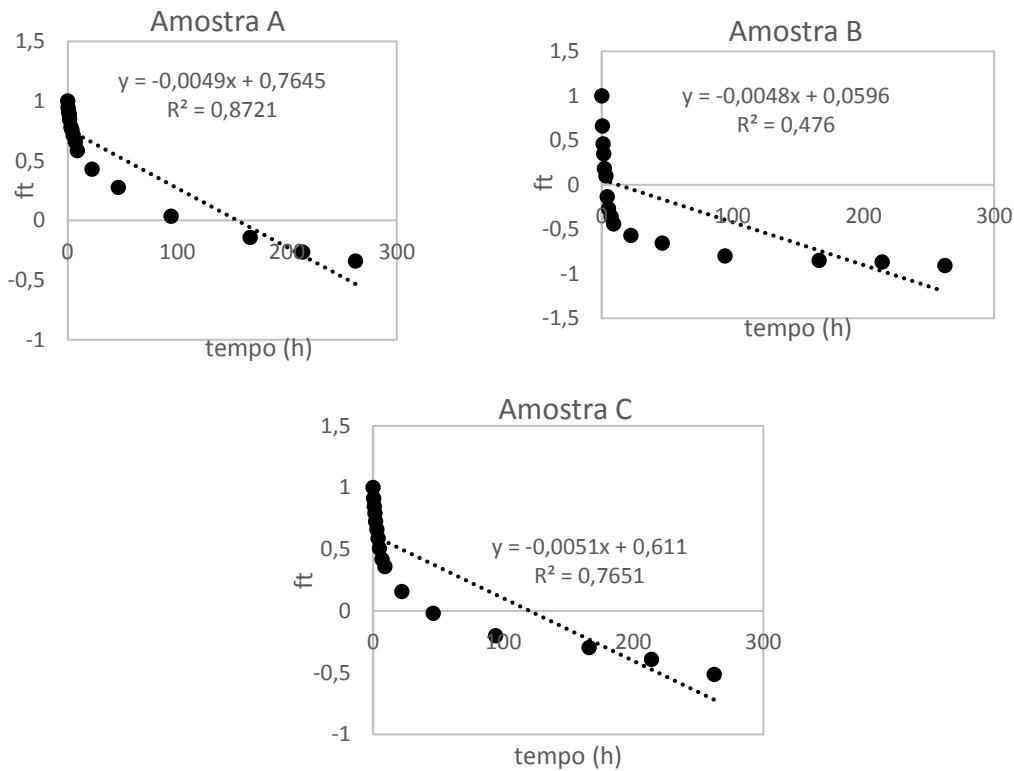


Figura 47- Representação gráfica do modelo de ordem zero para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV

- Modelo de Primeira Ordem

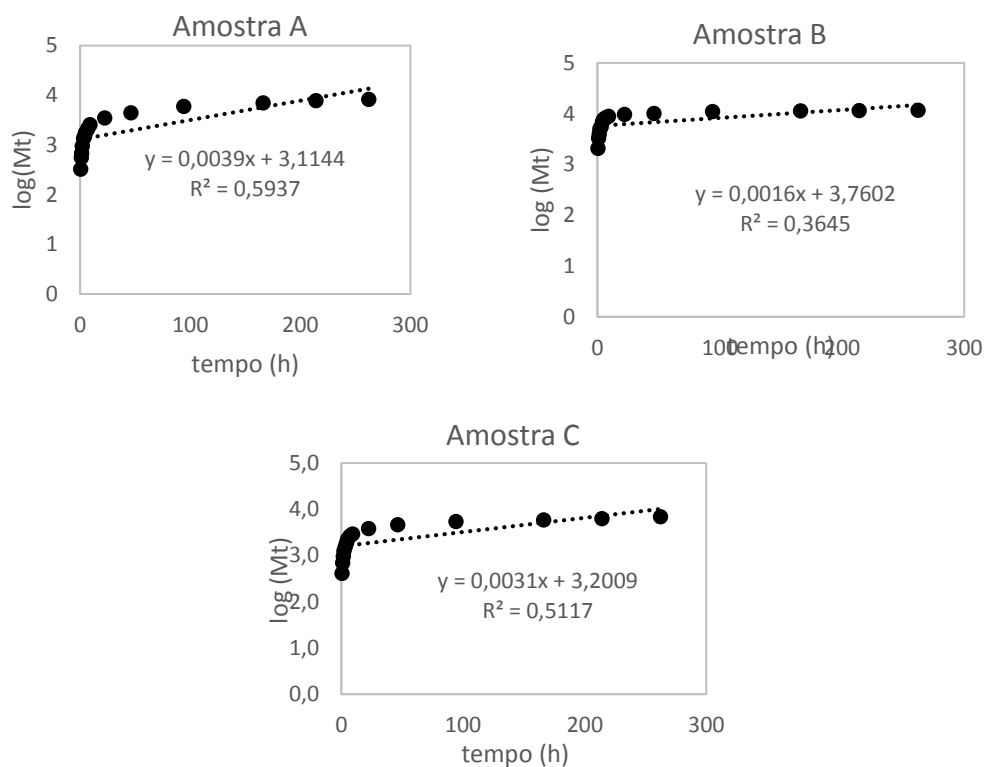


Figura 48- Representação gráfica do modelo de 1ª ordem para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV.

- Modelo de Higuchi

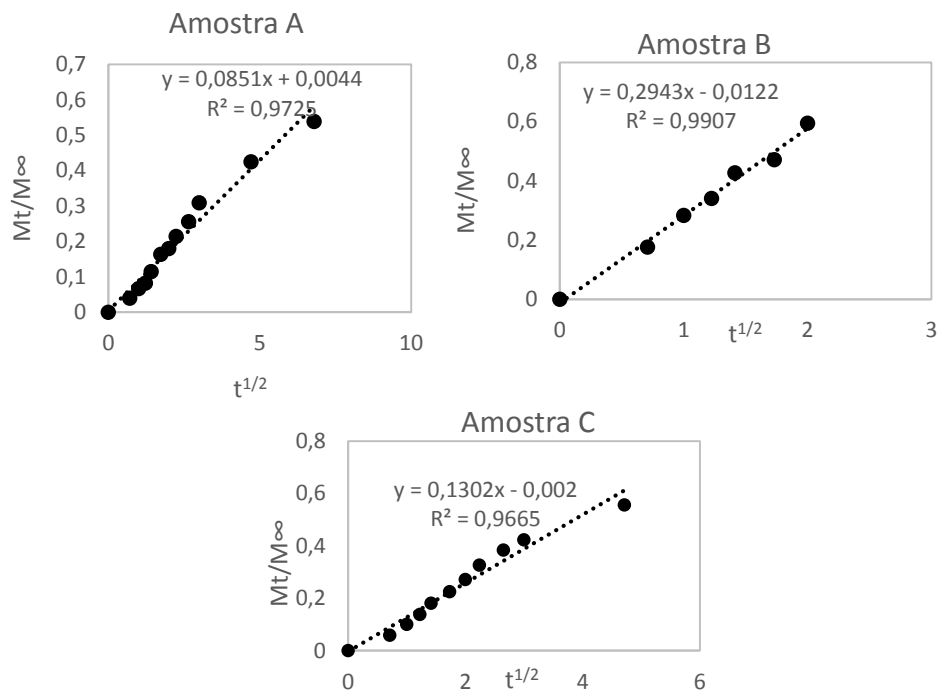


Figura 49 - Representação gráfica do modelo de Higuchi para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV.

- Modelo de Hixson-Crowell

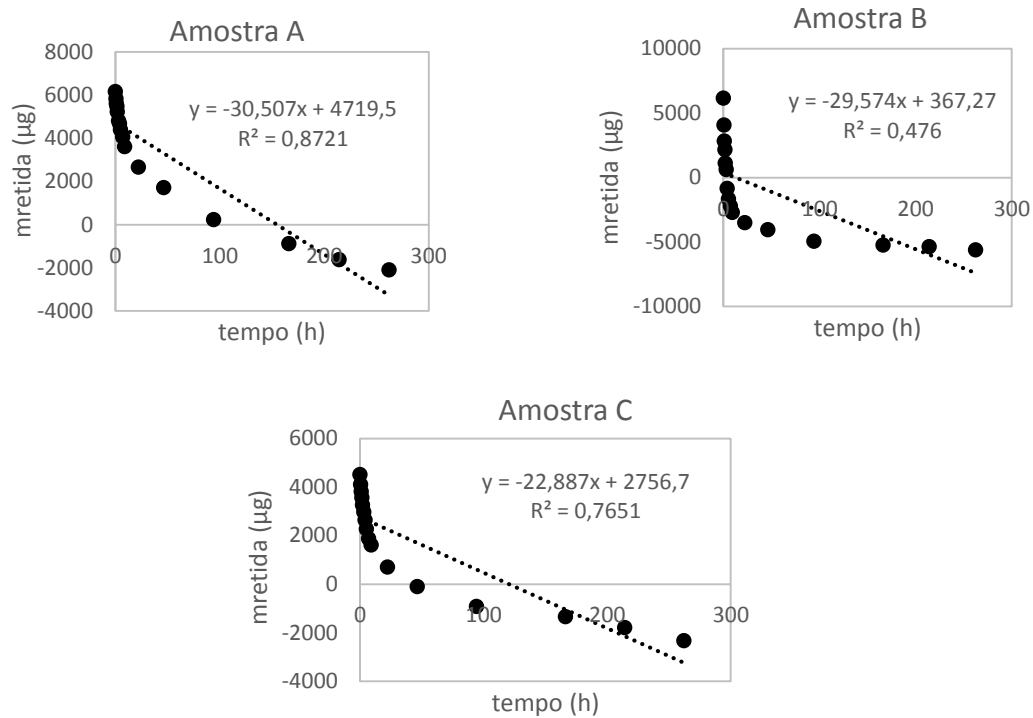


Figura 50 - Representação gráfica do modelo de Hixson-Crowell para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV.

- Modelo de Korsmeyer-Peppas

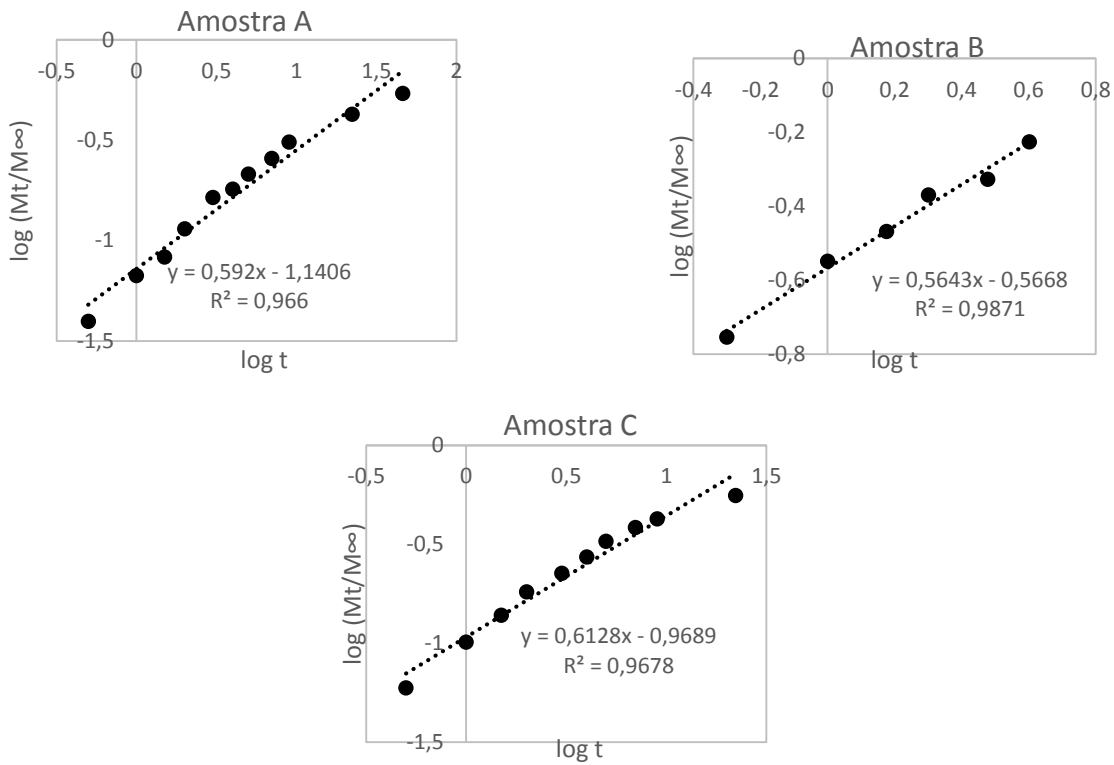


Figura 51 - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV.

- Modelo de Baker-Lonsdale

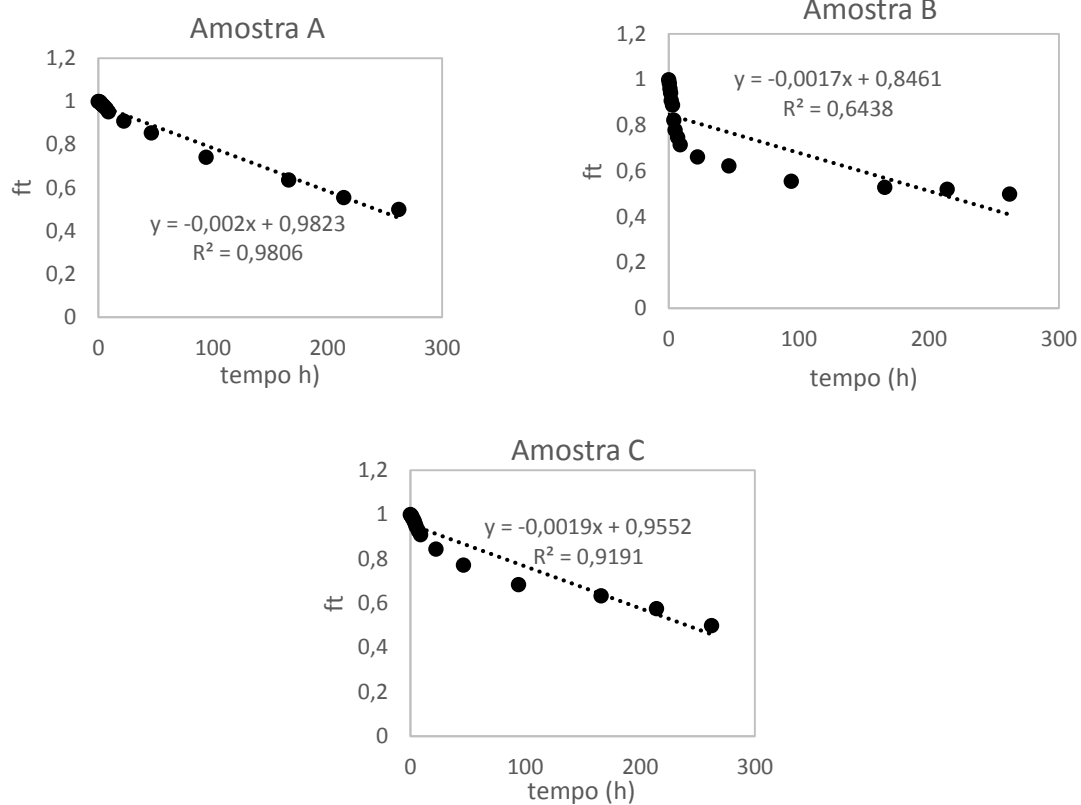


Figura 52- Representação gráfica do modelo de Baker-Lonsdale para as amostras: A- Matriz com 1,8% de DF encapsulado em partículas de PHBV; B - 10% de DF encapsulado em partículas de PHBV isoladas; C - Matriz com 0,9% de DF não encapsulado + 0,4% de DF encapsulado em partículas de PHBV