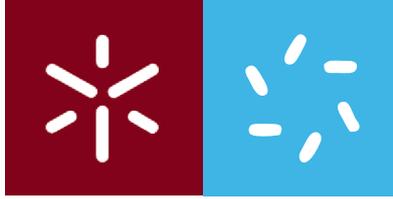


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Tiago Miguel Castro Costa

Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para coencapsulação de aciclovir e ácidos gordos ómega-3 por *electrospinning*



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Tiago Miguel Castro Costa

**Desenvolvimento de um sistema
nanoestruturado para coencapsulação
de aciclovir e ácidos gordos ómega-3
por *electrospinning***

Tese de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da

Doutora Teresa Viseu

e da

Doutora Marlene Lúcio

DECLARAÇÃO

Nome: Tiago Miguel Castro Costa

Endereço eletrónico: tiago-costa_3@hotmail.com

Número do Cartão de Cidadão: 14152806

Título dissertação: Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para coencapsulação de aciclovir e ácidos gordos ómega-3 por *electrospinning*

Orientador(es):

Doutora Teresa Viseu

Doutora Marlene Lúcio

Ano de conclusão: 2017

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 31/10/2017

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação gostaria de agradecer o apoio e incentivo de diversas pessoas e entidades que tornaram possível este projeto.

Em primeiro lugar queria agradecer à Doutora Teresa Viseu e à Doutora Marlene Lúcio pela orientação desta dissertação. Obrigado pela oportunidade e voto de confiança demonstrado, pela disponibilidade, empenho, dedicação e enorme interesse e zelo com que se dedicaram a este projeto. Estarei eternamente grato pelo exemplo que me deram e pelo conhecimento transmitido que contribuíram para o meu crescimento enquanto pessoa e enquanto investigador.

À Professora Etelvina Gomes por me ter recebido no laboratório e me ter dado acesso a todo o equipamento necessário para a produção das fibras por *electrospinning*. Agradeço ainda toda a disponibilidade e sugestões dadas para a realização desta dissertação.

À PARALAB pelas imagens de microscopia e análise de SEM-EDS.

Ao Doutor Raul Machado, ao Dr. Artur Ribeiro, ao Dr. Senentxu Lanceros-Méndez e a Doutora Clarisse Ribeiro pelas análises efetuadas que contribuíram para a construção desta dissertação.

À Andreia Almeida, ao Doutor José das Neves e ao Doutor Bruno Sarmento pelos ensaios de viabilidade celular.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, apoio, mas acima de tudo pelos momentos partilhados. Um agradecimento especial à Telma Soares, à Rita Mendes e à Tatiana Ventura.

À Daniela Pereira por ter embarcado comigo neste grande desafio. Obrigado pela paciência e apoio. Sem ti tudo teria sido muito mais complicado.

Aos meus pais, obrigado pelo apoio constante e incondicional e pela vossa presença na minha vida. Obrigado pelo carinho, dedicação e esforço que fizeram para que eu pudesse concluir esta etapa tão importante para a minha vida.

Por fim, mas não menos importante à minha irmã, o pilar fundamental na minha vida.

Obrigado a todos!

Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para coencapsulação de aciclovir e ácidos gordos ómega-3 por *electrospinning*

Resumo

As infeções herpéticas e em particular as infeções causadas pelo *Herpes simplex virus* (HSV) estão entre os agentes etiológicos das infeções humanas mais comuns, afetando cerca de 67 % da população mundial. O tratamento padrão para o herpes oro-facial consiste na administração de fármacos antivirais entre os quais se destaca o aciclovir (ACV). Apesar da eficácia terapêutica, a posologia do ACV requer uma administração contínua e repetitiva de doses elevadas (cerca de 200 mg, a cada 5 horas). A possibilidade de associar os antivirais a outros compostos bioativos, em particular aos ácidos gordos ómega-3 que promovem a angiogénese acelerando a cicatrização do tecido lesado, tem sido defendida. Quer o ACV quer os ácidos gordos ómega-3 apresentam, nas suas formulações clássicas, problemas galénicos e de farmacocinética. Deste modo, outras formulações e vias de administração têm sido propostas.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para a coencapsulação de ACV e ácidos gordos ómega-3 para aplicação cutânea para o tratamento do herpes labial. Para tal foram selecionados dois polímeros, a policaprolactona (PCL) e a proteína zeína e através da técnica de *electrospinning* produziram-se nanofibras destes polímeros. As nanofibras de PCL foram as selecionadas para fazer a coencapsulação dos dois compostos bioativos. Procedeu-se à sua caracterização por diversas técnicas: microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDS), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), estudo da molhabilidade por avaliação do ângulo de contacto e difração de raios-X (XRD). Foram ainda feitos alguns estudos avaliativos do interesse terapêutico dos sistemas desenvolvidos, tais como a determinação do seu fator oclusivo, da sua capacidade de permeação cutânea e da sua biocompatibilidade avaliada pela viabilidade de linhas celulares de queratinócitos e fibroblastos. O sistema polimérico nanoestruturado desenvolvido revelou ser promissor, devido às suas características mecânicas e capacidade de veiculação e libertação dos compostos bioativos, tendo ainda revelado um efeito oclusivo favorável à penetração cutânea dos compostos bioativos e uma baixa citotoxicidade. Aspetos a melhorar neste sistema incluem uma possível modificação superficial ou associação a um sistema de penso para melhorar a adesão celular e consequentemente melhorar a permeação cutânea.

Palavras-Chave: Nanofibras poliméricas, Aciclovir; ácidos gordos ómega-3; *Electrospinning*; Policaprolactona e Proteína zeína.

Development of a nanostructured co-delivery scaffold for Acyclovir and omega-3 fatty acids via electrospinning

Abstract

Herpetic infections, in particular infections caused by *Herpes simplex virus* (HSV) are among the most common human infections, affecting for around 67% of the world's population. The standard treatment for oro-facial herpes is the administration of antiviral drugs, mostly acyclovir (ACV). Despite the therapeutic efficacy, the dosing use of ACV requires a continuous and repetitive administration of high dose (about 200 mg, every 5 hours). The possibility of associating antivirals with other bioactive compounds, in particular omega-3 fatty acids that promote angiogenesis, accelerating the healing of the injured tissue, has been supported. Both ACV and omega-3 fatty acids present, in their classic formulations, galenic and pharmacokinetic problems. Thus, other formulations and routes of administration have been proposed.

The aim of this work was the production of a nanostructured system for co-encapsulation of ACV and omega-3 fatty acids with cutaneous application for the treatment oro-facial herpes. For this, two polymers were selected, polycaprolactone (PCL) and zein protein and by the electrospinning technique nanofibers of these polymers were produced. The PCL nanofibers were selected to co-encapsulated the two bioactive compounds and their characterization was made by several techniques: scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), infrared absorption spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), study of wettability by contact angle evaluation, and X-ray diffraction (XRD). After the characterization, many studies were carried out indicating the therapeutic interest of the developed systems, such as the determination of the occlusive factor, skin permeation capacity and its biocompatibility evaluated by the effect on the viability of keratinocyte and fibroblast cell lines. The developed nanostructured polymer system has been shown to be promising for its mechanical characteristics and the ability to deliver and release the bioactive compounds, it has also shown a suitable occlusive effect on skin penetration of the bioactive compounds. As a positive feature there is still to be mentioned its low cytotoxicity. Improvements in this system include a possible surface modification or association to a dressing system to improve cell adhesion and consequently improve skin permeation.

Keywords: Polymeric nanofibers, Acyclovir; Omega-3 fatty acids; Electrospinning; Polycaprolactone and Protein zein.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos	xix
Introdução	1
1. Aplicação da Nanotecnologia à Indústria Farmacêutica	5
2. Infecções Herpéticas	13
2.1. Infecções herpéticas: prevalência e sintomatologia.....	13
2.2. Infecções herpéticas: terapêutica.....	17
2.3. Aciclovir – um fármaco antiviral.....	20
2.3.1. Aciclovir: descoberta, origem e síntese	20
2.3.2. Aciclovir: características físico-químicas	20
2.3.3. Aciclovir: mecanismos de ação/bioativação	21
2.3.4. Aciclovir no tratamento de infecções herpéticas	23
2.3.5. Aciclovir: problemas Farmacocinéticos.....	25
2.4. Ácidos gordos ómega-3 – um nutracêutico essencial.....	31
2.4.1. Ácidos gordos ómega-3: origem e seus derivados.....	31
2.4.2. Ácidos gordos ómega-3 na promoção da saúde	33
2.4.3. Ácidos gordos ómega-3: problemas galénicos.....	36
3. Encapsulamento de Compostos Bioativos por <i>Electrospinning</i>	39
3.1. Origem e desenvolvimento do <i>electrospinning</i>	42
3.2. Parâmetros do <i>electrospinning</i>	46
3.2.1. Parâmetros associados à solução polimérica.....	46
3.2.2. Parâmetros de processamento	50
3.2.3. Parâmetros ambientais	51
3.3. Polímeros/biopolímeros aprovados pela FDA para veiculação de compostos.....	52
3.3.1. Policaprolactona.....	54
3.3.2. Zeína	55
4. Materiais e Métodos	57
4.1. Materiais e compostos químicos utilizados ao longo do trabalho.....	62
4.2. Preparação das soluções poliméricas	63

4.3.	Produção das nanofibras poliméricas por <i>electrospinning</i>	65
4.4.	Preparação dos meios para o estudo da libertação dos princípios ativos	67
4.5.	Doseamento dos princípios ativos por espectroscopia de absorção UV/Vis	68
4.6.	Espectroscopia de absorção UV/Vis	69
4.7.	Técnicas de caracterização das nanofibras de PCL com ACV e ácidos gordos ómega-3.	71
4.7.1.	Microscopia eletrónica de varrimento com dispersão de raios-X (SEM-EDS)	71
4.7.2.	Difração de raios-X	73
4.7.3.	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	74
4.7.4.	Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR)	76
4.7.5.	Resistência mecânica à tração	78
4.7.6.	Ângulo de contacto	79
4.8.	Ensaio de viabilidade dos sistemas terapêuticos	80
4.8.1.	Ensaio de oclusão	80
4.8.2.	Ensaio de viabilidade celular por MTT	81
4.8.3.	Estudos de permeação cutânea	83
5.	Resultados e Discussão	87
5.1.	Soluções poliméricas	89
5.2.	Nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i>	90
5.3.	Doseamento espectrofotométrico dos compostos bioativos	93
5.3.1.	Doseamento do ACV nas fibras poliméricas	93
5.3.2.	Doseamento do aciclovir na formulação comercial Zovirax™ creme	101
5.3.3.	Doseamento do ómega-3 nas fibras poliméricas	103
5.4.	Caracterização das nanofibras de PCL com a coencapsulação de ACV e ácidos gordos ómega-3	107
5.4.1.	Microscopia eletrónica de varrimento com dispersão de raios-X (SEM-EDS)	107
5.4.2.	Difração de raios-X	112
5.4.3.	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	117
5.4.4.	Espectroscopia de infravermelho de reflexão total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR)	121
5.4.5.	Comportamento mecânico à tração	126
5.4.6.	Ângulo de contacto e molhabilidade	129
5.4.7.	Viabilidade do sistema terapêutico	131
5.4.7.1.	Determinação do fator de oclusão	131
5.4.7.2.	Viabilidade celular determinada por MT	132
5.4.7.3.	Permeação cutânea	134

6. Conclusão	139
7. Bibliografia	145
8. Anexos	155

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação das várias aplicações da nanotecnologia em medicina e na indústria farmacêutica. Adaptado de Coimbra, A. (2013) [12].....	8
Figura 2 – Diagrama da classificação taxonómica da família <i>Herpesviridae</i>	14
Figura 3 – Estrutura química do ACV (linhas sólidas).....	21
Figura 4 – Etapas de conversão enzimática do ACV nos seus derivados fosfatados	22
Figura 5 – Sistema de Classificação Farmacêutica de fármacos segundo a solubilidade em água e a permeabilidade membranar dos mesmos.....	28
Figura 6 – Estrutura dos diferentes ácidos gordos ómega 3 e 6. Desenhado no <i>software MarvinSketch64</i>	31
Figura 7 – Principais ácidos gordos das famílias ómega 3, 6 e 9. Adaptado de Teixeira, M. (2016) [41]	32
Figura 8 – Representação esquemática da técnica de <i>electrospinning</i> vertical	43
Figura 9 – Esquema da formação do cone de Taylor. Adaptado de Lima, R. (2013).....	44
Figura 10 – Efeito da concentração de PCL na morfologia das nanofibras.....	48
Figura 11 – Imagens de SEM de nanofibras obtidas a partir de soluções de PCL de igual concentração (25 wt%) mas diferentes massas moleculares. Adaptado de Karakas, H. (2015) [49]	50
Figura 12 – Síntese de PCL pela polimerização do anel ϵ -caprolactona. Desenhado no <i>software MarvinSketch64</i> . Adaptado de Hasan <i>et al.</i> (2014) [64].....	54
Figura 13 – Estrutura molecular da zeína. Adaptado de Sunguc, C. (2013)	56
Figura 14 – Metodologia desenvolvida ao longo do trabalho.....	61
Figura 15 – Diagrama de fases para a solubilidade da zeína em etanol e água (adaptado de Shukla & Munir (2001) [67].....	64
Figura 16 – Fotografia do equipamento de <i>electrospinning</i>	66
Figura 17 – Estrutura do lauril sulfato de sódio	68
Figura 18 – Espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC	69
Figura 19 – Diagrama de blocos de um espectrofotómetro convencional de duplo feixe.....	70
Figura 20 – Representação esquemática do princípio de funcionamento da técnica do SEM. 72	
Figura 21 – Esquema ilustrando a difração de raios-X. Adaptado de Epp (2016) [78]	73

Figura 22 – Calorímetro diferencial de varrimento do tipo fluxo de energia calorífica da marca DSC 3+ Mettler Toledo (A)	75
Figura 23 – Curva modelo de DSC representando transições de 1ª ordem: (A) e (B) picos endotérmicos e (C) pico exotérmico e transições de 2ª ordem (D)	75
Figura 24 – Representação esquemática do modo de funcionamento do ATR-FTIR.....	77
Figura 25 – Espetómetro ATR-FTIR da marca Perkin-Elmer, Spectrum Two Spetrometer.....	78
Figura 26 – Equipamento de AGS-X Shimadzu 500 N usado para determinação da resistência mecânica	78
Figura 27 – Ângulo de contacto de uma gota numa superfície sólida. Adaptado de Bracco <i>et al.</i> (2013) [81]	79
Figura 28 – Fotografia do sistema utilizado no teste de oclusividade.....	81
Figura 29 – Conversão do MTT em formazano. Adaptado de Riss <i>et al.</i> (2016) [86]......	82
Figura 30 – Célula de difusão de Franz	84
Figura 31 – Soluções poliméricas de PCL	89
Figura 32 – Fotografia das nanofibras de PCL (A) e de PCL com ACV (B).....	90
Figura 33 – Fotografia das nanofibras de PCL com ómega-3 produzidas por <i>electrospinning</i> . 91	
Figura 34 – Nanofibras de zeína produzidas por <i>electrospinning</i> a partir de soluções.....	91
Figura 35 – Esquema de <i>electrospinning</i> para nanofibras de zeína, com o reservatório de etanol. Adaptado de Li, Lim & Kakuda (2009) [90]	92
Figura 36 – Nanofibras da proteína zeína produzidas por <i>electrospinning</i> , com incorporação de ACV (A) e com incorporação de ómega-3 (B)	92
Figura 37 – Nanofibras de PCL com ACV e ómega-3, preparadas por <i>electrospinning</i>	93
Figura 38 – Perfil de libertação do ACV de nanofibras de PCL em tampão pH \approx 5,5. (A) ao fim de 145 horas e (B) ao fim de 6 horas	94
Figura 39 – Perfil de libertação do ACV de nanofibras de PCL em meio micelar (pH \approx 5,5). .	95
Figura 40 – Comparação do perfil de libertação do ACV das fibras de PCL	96
Figura 41 – Perfil de libertação do ACV de nanofibras de zeína em tampão pH \approx 5,5	97
Figura 42 – Comparação dos perfis de libertação do ACV.....	98
Figura 43 – Comparação dos perfis de libertação do ACV das fibras em meio micelar	98
Figura 44 – Perfil de libertação do ACV a partir de nanofibras de PCL	99
Figura 45 – Comparação do perfil de libertação do ACV a partir de PCL	100

Figura 46 – Representação esquemática da libertação do fármaco ACV da matriz polimérica das nanofibras que justifica uma cinética bifásica ajustada pelo modelo de Gallagher-Corrigan	101
Figura 47 – Perfil de libertação do ACV da formulação comercial Zovirax™ Creme.....	102
Figura 48 – Comparação dos perfis de libertação do ACV das nanofibras produzidas e da formulação comercial em meio micelar	103
Figura 49 – Perfil de libertação do ómega-3 em hexano	104
Figura 50 – Comparação do perfil de libertação de ACV das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 com diferentes estados de oxidação	106
Figura 51 – Fotografia de nanofibras de PCL com ómega-3 com diferentes estados de oxidação.	106
Figura 52 – Visualização, por microscopia eletrónica de varrimento.....	107
Figura 53 – Visualização por microscopia eletrónica de varrimento de nanofibras de PCL com ACV	107
Figura 54 – Visualização por microscopia eletrónica de varrimento	108
Figura 55 – Histogramas representativos da distribuição dos diâmetros das fibras	109
Figura 56 – Imagem de microscopia eletrónica de varrimento de um corte lateral de uma matriz polimérica de fibras de PCL contendo ACV e ómega-3 realizado com ultramicrotomo após congelamento em azoto líquido da amostra. A espessura da matriz polimérica é de cerca de 315 µm	110
Figura 57 – Espectro de EDS de uma amostra de fibras de PCL com ACV mostrando a presença dos elementos azoto (N), carbono (C) e oxigénio (O).....	111
Figura 58 – Difratoograma de raios-X de nanofibras de PCL (vermelho) e de PCL em grãos (azul)..	112
Figura 59 – Difratoograma de raios-X de ACV pó (azul), nanofibras de PCL (vermelho) e nanofibras de PCL com 4 % de ACV (preto)	113
Figura 60 – Difratoograma de raios-X de ACV pó (azul) e nanofibras de PCL com 4 % de ACV (preto).....	116
Figura 61 – Curva calorimétrica do ACV em pó a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto.	118
Figura 62 – Curva calorimétrica do PCL em grãos (preto) e na forma de nanofibras (vermelho). A taxa de aquecimento foi de 10 °C por minuto.	120

Figura 63 – Curvas calorimétricas das nanofibras de PCL com e sem os compostos bioativos assim como do ACV	121
Figura 64 – Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir das diferentes amostras analisadas.....	122
Figura 65 – Espectros de transmitância de ATR-FTIR do ACV em pó das nanofibras de PCL e das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3.....	125
Figura 66 – Espectros de transmitância de ATR-FTIR do ómega-3 e das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3.....	126
Figura 67 – Curvas de tensão em função da percentagem de alongação para as nanofibras de PCL	127
Figura 68 – Curvas de tensão em função da percentagem de alongação para as nanofibras de PCL com os compostos bioativos incorporados	128
Figura 69 – Curvas de tensão em função em função da percentagem de alongação para as nanofibras de PCL com os compostos bioativos incorporados, em diferentes estados de oxidação.	128
Figura 70 – Diagrama dos diferentes graus de molhabilidade e os ângulos de contacto correspondentes. Adaptado de Ferreira (2013) [80]	131
Figura 71 – Representação do fator de oclusão em função do tempo para as de nanofibras poliméricas de PCL com ACV+ómega-3	132
Figura 72 – Viabilidade das células HaCaT (A) e HFF-1 (B) avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com extratos de fibras PCL e gaze hidrofílica	133
Figura 73 – Perfil de difusão do ACV a partir de nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 através de uma membrana de PSO	134
Figura 74 – Cinética de difusão cutânea do ACV num excisado de pele de porco	135

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tipos de nanossistemas para a entrega de fármacos classificados de acordo com a sua composição, adaptado de Fernandes, M. (2016) [19].....	9
Tabela 2 – Ácidos gordos essenciais predominantes em óleos comuns.....	33
Tabela 3 – Exemplos de alguns polímeros e solventes usados para a produção de nanofibras e respetiva aplicação. Adaptado de Huang <i>et al.</i> (2003) [51]	45
Tabela 4 – Parâmetros envolvidos no processo de <i>electrospinning</i>	46
Tabela 5 – Constantes dieléctricas para diversos solventes, adaptado de Lima, R. (2013) [7].	47
Tabela 6 – Exemplos de fármacos/compostos encapsulados em nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i> . Adaptado de Pillay <i>et al.</i> (2013) [8] e Hu <i>et al.</i> (2014) [20].....	53
Tabela 7 – Resumo das principais propriedades da zeína comercial	56
Tabela 8 – Reagentes e solventes usados na preparação das soluções poliméricas	62
Tabela 9 – Reagentes e compostos utilizados na preparação do meio para o estudo de viabilidade celular.....	63
Tabela 10 – Condições de preparação das soluções poliméricas.....	64
Tabela 11 – Condições de produção das nanofibras poliméricas.....	67
Tabela 12 – Quadro resumo dos parâmetros do XRD para as diferentes amostras analisadas	114
Tabela 13 – Picos de difração dos diferentes polimorfos de ACV	116
Tabela 14 – Comportamento térmico das diferentes formas polimórficas da molécula de ACV [110].....	118
Tabela 15 – Quadro resumo dos parâmetros do DSC para as diferentes amostras analisadas.	121
Tabela 16 – Comparação da localização dos picos de transmitância do ACV (pó) obtidos experimentalmente por ATR-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Yu <i>et al.</i> (2011) [113].....	123
Tabela 17 – Comparação da localização dos picos de transmitância do ácido gordo ómega-3 obtidos experimentalmente por ATR-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Zhang (2009) [118].....	123

Tabela 18 – Comparação da localização dos picos de transmitância das nanofibras de PCL obtidos experimentalmente por ART-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Naghashzargar <i>et al.</i> (2016) [115]	124
Tabela 19 – Quadro resumo do ensaio do ângulo de contacto	130

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos

AA	Ácido araquidônico
ACV	Aciclovir
ALA	Ácido linolénico
ATP	Adenosina trifosfato
ATR-FTIR	Espetroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada
BC	Cloreto de benzalcônio
BSE	Elétrões retrodifundidos, do inglês, <i>backscattered electrons</i>
CMV	Citomegalovírus, também designado por HHV6
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Profundidade de penetração
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
DSMO	Dimetilsulfóxido
EBV	Vírus Epstein-Barr também designado por HHV4
EC	Etil celulose
ED	Espetroscopia derivativa
EDS	Espetroscopia de dispersão de energia de raios-X
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EVA	Acetato-vinilo de etileno
F	Fator de oclusão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Transformadas de Fourier
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células da glia humanas
GP	Grau de pureza
GTP	Guanina trifosfato
HHV	<i>Human herpesvirus</i>
HHV3	<i>Human herpesvirus 3</i> , também designado por vírus varicela-zoster (VZV)
HHV4	<i>Human herpesvirus 4</i> , também designado por vírus Epstein-Barr (EBV)
HHV5	<i>Human herpesvirus 5</i> , também designado por citomegalovírus (CMV)

HHV6	<i>Human herpesvirus 6</i>
HHV7	<i>Human herpesvirus 7</i>
HHV8	<i>Human herpesvirus 8</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
HSV1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
IR	Espetroscopia de infravermelho
LA	Ácido linoleico
LCPUFA	Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa
LDH	Lactato desidrogenase
MM	Massa molecular
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NGF	Fator de crescimento nervoso humano β
NLC	Transportadores lipídicos nanoestruturados
PA	Poliamida
PAN	Poliacrilonitrila
PANI	Polianilina
PBI	Polibenzimidazol
PC	Policarbonato
PCL	Policaprolactona
PCLA	Poli (ácido láctico-co-caprolactona)
PCLEEP	Poli(fosfato- ϵ -caprolactona-co-etil)
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Poliétileno
PEN	Poli (aftalato de etileno)
PEO	Poli (óxido de etileno)
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PEVA	Poli (acetato de etileno-co-vinilo)
PG	Prostaglandina
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno

PSO	Polissulfona
PU	Poliuretano
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
PVA	Poli (álcool vinílico)
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
SFB	Soro fetal Bovino
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
SLS	Lauril sulfato de sódio
T_f	Temperatura de fusão
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
THF	Tetrahidrofurano
TQV	Timidina quinase viral
TX	Tromboxanos
VZV	Vírus varicela-zoster, também designado por HHV3
XRD	Difração de raios-X

Introdução

Os vírus da família *Herpesviridae* e em particular os subtipos 1 e 2 das espécies *Herpes simplex virus* (HSV) estão entre os agentes etiológicos das infecções humanas mais comuns, afetando cerca de 67 % da população mundial [1,2]. Estes agentes virais são responsáveis por um amplo conjunto de patologias que podem variar desde simples lesões mucocutâneas oro-faciais e genitais de fácil tratamento (por exemplo: gengivo-estomatites, herpes labial e herpes genital) até infecções mais graves que afetam os olhos (ceratoconjuntivite) e o sistema nervoso central (encefalite herpética e meningites) [1,3,4]. Dada a elevada prevalência de infecções virais, a indústria farmacêutica tem concentrado os seus esforços no desenvolvimento de fármacos antivirais.

Descoberto na década de 70, o aciclovir (ACV) é um pró-fármaco, análogo da 2'-desoxiguanosina, conhecido pela sua atividade antiviral contra o HSV. O ACV atua na enzima DNA polimerase viral impedindo a replicação do vírus no organismo do hospedeiro. O ACV é considerado o fármaco de eleição para o tratamento de infecções causadas pelos subtipos 1 e 2 do HSV (HSV1 e HSV2) e ainda para o tratamento de infecções provocadas por outros vírus da família *Herpesviridae*, tais como infecções provocadas pelo vírus varicela zoster (VZV ou HHV3), vírus Epstein-Barr (EBV ou HHV4) e citomegalovírus (CMV ou HHV5). No entanto, apesar da sua eficácia ao nível do alvo viral, o ACV apresenta uma série de limitações relacionadas com a sua farmacocinética, o que se reflete numa menor eficácia terapêutica. Entre elas encontram-se: (i) a baixa biodisponibilidade do fármaco no organismo (após toma oral apenas 10-20 % do fármaco são absorvidos ao nível gastrointestinal); (ii) a sua curta semi-vida plasmática (2,5 horas) e (iii) a sua baixa lipofilicidade e baixa solubilidade em água. Estas limitações aliadas a uma elevada excreção do ACV na forma inalterada através da urina, assim como a uma elevada distribuição inespecífica do fármaco em tecidos que não constituem o seu alvo terapêutico (designada por distribuição *off-target*), leva à necessidade de uma administração repetida de doses elevadas de ACV para atingir os níveis terapêuticos (por exemplo, na maioria das infecções é recomendada uma administração oral de 200 mg de ACV, 5 vezes por dia, durante 10 dias). Outro dos problemas associados ao ACV é a ocorrência de flebites, causadas pela precipitação de cristais do fármaco nos túbulos renais, principalmente em administração intravenosa. Torna-se assim evidente a necessidade de desenvolver sistemas alternativos que permitam a veiculação e distribuição do

ACV de forma a minimizar os problemas farmacocinéticos deste fármaco. Neste sentido têm sido desenvolvidos nanossistemas para a veiculação do ACV de forma a aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos secundários do mesmo [5,6].

As nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning* surgem como um recurso promissor para a veiculação de fármacos devido à elevada relação superfície-volume e à sua elevada porosidade, permitindo uma elevada eficiência de encapsulamento. Por outro lado, o *electrospinning* apresenta-se como uma técnica simples que, pela simples aplicação de um campo elétrico a uma seringa contendo uma solução polimérica e mediante a evaporação do solvente dessa solução, permite a formação de nanofibras poliméricas que se depositam num coletor [7]. As nanofibras produzidas por esta técnica apresentam-se como veículos versáteis para diversas aplicações terapêuticas, uma vez que através da alteração dos parâmetros de processamento do *electrospinning* é possível adaptar as propriedades das nanofibras à utilização em causa [8].

De acordo com o exposto, o objetivo desta dissertação é a coencapsulação de dois compostos bioativos (o fármaco ACV e o óleo de peixe rico em ácidos gordos ómega-3) em nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning* para o tratamento de infeções herpéticas. A coencapsulação foi uma opção tomada, pois tem sido descrito que para além dos antivirais, outros compostos (analgésicos, nutracêuticos ou outros compostos bioativos) podem ser administrados de forma a minimizar a sintomatologia decorrente das infeções herpéticas, por exemplo para aliviar a dor e prurido ou melhorar a cicatrização após a lesão [9]. Neste contexto, destaca-se o uso de ácidos gordos essenciais, como os ácidos gordos ómega-3, que quando colocados sobre o tecido lesado promovem a angiogénese acelerando a cicatrização, conseguindo-se assim um efeito sinérgico no tratamento das lesões [10]. Assim, através do desenvolvimento deste sistema espera-se obter um dispositivo que permita uma aplicação tópica com uma libertação controlada do ACV de forma a melhorar as limitações das formulações convencionais e os problemas farmacocinéticos deste fármaco. Por outro lado, os ómega-3 são coadministrados com o objetivo de atuarem ao nível do tecido lesado acelerando a cicatrização do mesmo.

De forma a obter uma formulação definitiva com uma matriz polimérica que permitisse atingir os objetivos propostos procedeu-se a estudos de pré-formulação onde foram testadas duas matrizes poliméricas constituídas por dois polímeros com lipofilicidade e características mecânicas diferentes – a policaprolactona (PCL) e a proteína zeína. Nestes estudos de pré-formulação pretendeu-se avaliar qual o sistema mais promissor para a aplicação pretendida, comparando-o

com a formulação comercial Zovirax™ creme. Após a seleção do melhor sistema, este foi caracterizado ao nível topográfico, estrutural, mecânico e térmico (entre outros), tendo sido também estudada a taxa de libertação dos princípios bioativos.

Esta dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos. O **capítulo 1** tem como objetivo contextualizar a utilização de nanossistemas para a veiculação de compostos bioativos, assim como as vantagens que estes sistemas proporcionam ao nível da coencapsulação de compostos com atividades terapêuticas sinérgicas.

No **capítulo 2** as infeções herpéticas são caracterizadas quanto à sua incidência, manifestações clínicas e tratamento. Neste capítulo serão ainda abordados os fármacos antivirais e os compostos nutracêuticos utilizados nesta dissertação e identificados os problemas farmacocinéticos dos mesmos.

No **capítulo 3** é descrita a técnica de *electrospinning*. É abordada a origem e o desenvolvimento desta técnica, assim como os seus parâmetros de processamento. Analisa-se também como é que os polímeros usados influenciam os parâmetros de processamento e fundamenta-se a escolha dos polímeros utilizados neste trabalho. Por último, são analisadas as potencialidades das nanofibras produzidas por *electrospinning* como *scaffolds* para a veiculação de fármacos, dando-se exemplos da sua utilização.

No **capítulo 4** são descritos os materiais e os procedimentos experimentais utilizados ao longo desta dissertação, quer na produção das nanofibras por *electrospinning*, quer na sua caracterização.

No **capítulo 5** são apresentados os resultados relativos aos procedimentos experimentais utilizados. Neste capítulo são ainda discutidos os resultados obtidos tendo por base os conhecimentos teóricos e práticos de cada uma das técnicas de caracterização assim como a bibliografia utilizada.

No **capítulo 6** são apresentadas as principais conclusões retiradas deste trabalho sendo dada uma perspetiva futura do mesmo.

No **capítulo 7** são enumeradas as referências bibliográficas utilizadas nesta dissertação.

Por último, no **capítulo 8** são apresentados os anexos deste trabalho.

A referenciação bibliográfica segue as indicações do *IEEE Editorial Style Manual*.

Capítulo 1

Aplicação da Nanotecnologia à Indústria Farmacêutica

1. Aplicação da Nanotecnologia à Indústria Farmacêutica

O conceito de nanotecnologia foi inicialmente apresentado em 1959 por Richard Feynman, numa palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*”, onde este propôs a possibilidade, ainda que teórica, de manipular de forma individual átomos e moléculas. Do ponto de vista experimental, a primeira publicação que refere o uso da nanotecnologia data de 1974, onde o autor Norio Taniguchi descreve o uso de técnicas de deposição de filmes finos e feixes de energia, com controlo de tamanho na escala nanométrica [11,12]. Taniguchi definiu a nanotecnologia como uma ciência que consiste no processamento, consolidação e deformação de matérias à escala atômica [13]. Nos anos seguintes o conceito foi aprofundado e foi sofrendo alterações por ser um domínio científico emergente [14].

Na palavra nanotecnologia o prefixo “nano” deriva do grego “nânos” que significa anão (pequeno tamanho). A nanotecnologia pode então ser definida como uma ciência que tem como objetivo o estudo, o desenvolvimento e a manipulação de sistemas ou dispositivos à escala nanométrica, com dimensões compreendidas entre 1 e 1000 nm. No entanto definições mais restritas consideram a escala nanométrica entre 0,1 e 100 nm [11,15]. A nanotecnologia é atualmente uma área transversal a todas as áreas da sociedade com aplicações em todas os domínios tecnológicos, como energia, ciências ambientais, eletrónica, segurança, indústria alimentar, transportes, exploração espacial, medicina e indústria farmacêutica [14,15]. De entre as aplicações enumeradas uma das que apresenta um maior potencial com impacto direto na vida dos seres humanos é a aplicação da nanotecnologia na área biomédica. Esta conjugação da biomedicina e nanotecnologia originou um novo conceito – a nanomedicina. O termo nanomedicina surgiu nos Estados Unidos pelo *National Institute of Health* e descreve a aplicação da nanotecnologia no estudo e conceção de sistemas ou dispositivos nanométricos para uso na prática clínica. Trata-se de uma área de estudo que se destina ao diagnóstico, prevenção, monitorização e controlo dos sistemas biológicos com o objetivo de melhorar a qualidade de vida das populações [11,14,16]. Ao operar na escala nanométrica, tamanho semelhante a algumas estruturas biológicas, a nanomedicina permite uma maior exploração das propriedades físicas decorrentes da redução de tamanho, aumentando a probabilidade de interação dos dispositivos médicos nanométricos com as estruturas biológicas [3]. Na Figura 1 estão representadas algumas

das áreas de aplicação da nanotecnologia em nanomedicina, e é ilustrada a aplicação da nanomedicina ao nível da indústria farmacêutica.

A nanotecnologia farmacêutica é um ramo da nanomedicina que tem como objetivo o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos à escala nanométrica, com o objetivo de direcionar e controlar a libertação de fármacos no local alvo através da sua veiculação em nanossistemas. O uso destes nanossistemas surgiu na década de 60 com a descoberta dos lipossomas e com o desenvolvimento da microencapsulação de compostos em partículas micrométricas, sendo a base para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas à escala nanométrica [11,16].

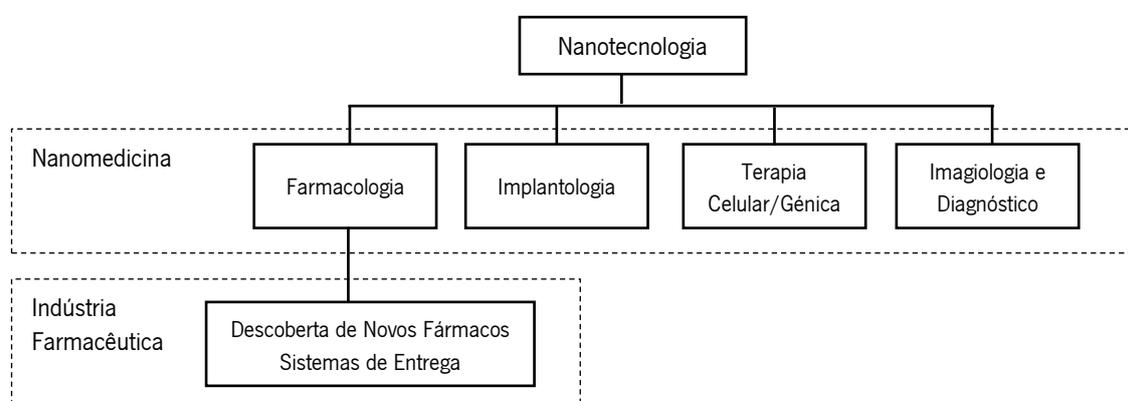


Figura 1 – Representação das várias aplicações da nanotecnologia em medicina e na indústria farmacêutica. Adaptado de Coimbra, A. (2013) [12].

Os nanossistemas para a veiculação de fármacos são dispositivos à nanoescala, pelo menos numa das dimensões, atuando como ferramentas terapêuticas, de modo a melhorar as características dos fármacos tradicionais, nomeadamente a biocompatibilidade, a solubilidade ou a estabilidade dos mesmos. A veiculação dos fármacos em nanossistemas pode dar-se por adsorção do fármaco à superfície do nanossistema ou então por encapsulação do fármaco no nanossistema e tem como principais objetivos o aumento da eficácia terapêutica e a redução da toxicidade do composto pelo seu direcionamento para o alvo terapêutico. Estes sistemas apresentam vantagens inerentes à veiculação de compostos, ou seja, permitem melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico dos fármacos através de diversas ações benéficas: (i) transportam os fármacos para o local alvo, ultrapassando algumas barreiras biológicas e aumentando a sua concentração no local de atuação, aumentando assim a sua eficácia; (ii) controlam a taxa de libertação do fármaco no local alvo e evitam a distribuição *off-target* do fármaco

levando a uma redução significativa da concentração de fármaco no organismo e consequentemente a uma redução dos efeitos tóxicos do mesmo; (iii) melhoram a estabilidade dos fármacos veiculados e evitam a sua degradação precoce (proteção contra a oxidação, hidrólise, fotólise, etc...) enquanto asseguram a biocompatibilidade e biodegradabilidade do nanossistema contendo o fármaco [11,14].

A escolha do nanossistema depende da ação terapêutica pretendida, das características do composto a veicular e da via de administração [17]. Alguns exemplos de sistemas de veiculação de fármacos são apresentados na Tabela 1. Dentro desses exemplos destacam-se as nanofibras poliméricas que, principalmente ao longo da última década, foram ganhando especial destaque devido às suas características intrínsecas [18]. Em primeiro lugar destaca-se a grande relação entre a superfície e o volume das nanofibras traduzindo-se numa elevada porosidade das mesmas. A elevada superfície permite uma maior adsorção do fármaco enquanto que a sua arquitetura porosa permite uma maior taxa de encapsulação. Em segundo lugar é possível, através da variação criteriosa dos parâmetros de processamento, adaptar as propriedades das nanofibras de acordo com a aplicação em causa, nomeadamente controlar o diâmetro, a porosidade e a morfologia, sendo possível, deste modo regular o perfil de libertação do fármaco [8].

Tabela 1 – Tipos de nanossistemas para a entrega de fármacos classificados de acordo com a sua composição, adaptado de Fernandes, M. (2016) [19].

Nanossistemas para a entrega de fármacos		
Nanossistemas Poliméricos	Nanossistemas Lipídicos	Nanossistemas Inorgânicos
Nanopartículas	Micelas	Nanopartículas metálicas
Nanocápsulas	Lipossomas	Nanocristais
Nanofibras	Etossomas	
	Nanoemulsões	
	Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC)	
	Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	

O *electrospinning* é o método *standard* na obtenção de nanofibras a partir de uma solução polimérica sujeita a um campo elétrico intenso. A solução polimérica é colocada dentro de uma seringa injetora. Usando condições adequadas, o campo elétrico provoca o alongamento da gota que se forma na ponta da agulha originando um jato estável e de pequenas dimensões. Com a evaporação do solvente as nanofibras são depositadas num coletor de forma contínua, formando um tapete homogêneo, permitindo a obtenção de fibras com elevada qualidade e resistência [20].

A entrega controlada de fármacos através de nanofibras poliméricas está dependente das propriedades das matrizes poliméricas e é também condicionada pelo tipo de polímero usado que pode ser biodegradável ou não degradável. Com polímeros não degradáveis o mecanismo de libertação dá-se essencialmente através da difusão do fármaco, enquanto que com polímeros biodegradáveis a libertação ocorre devido à erosão da matriz polimérica, acompanhada também por mecanismos de difusão. A taxa de libertação do fármaco pode ser então controlada pela escolha do polímero. Regra geral polímeros lipofílicos são utilizados para veicular compostos lipofílicos, enquanto os polímeros hidrofílicos são utilizados para veicular compostos hidrofílicos. Para além de fármacos também podem ser encapsulados compostos bioativos de origem natural tais como óleos de peixe contendo ácidos gordos ómega-3 e 6, curcumina, sorgo, proteínas e vitaminas [8].

Apesar das vantagens associadas ao uso da nanotecnologia na indústria farmacêutica, esta apresenta ainda algumas limitações relacionadas com a sua aplicação. À medida que diminui o tamanho das estruturas utilizadas para a veiculação dos fármacos, como é o caso das nanopartículas, aumenta a sua capacidade de penetrarem no organismo em tecidos *off-target*. Outra das preocupações associadas à aplicação da nanotecnologia à indústria farmacêutica, prende-se com o método de produção dos nanossistemas terapêuticos e com a reprodutibilidade dos mesmos. Pretende-se um método de produção simples (de fácil operação), barato, com elevada reprodutibilidade do processo e com facilidade de produção à escala industrial. O custo associado à matéria prima é também um fator essencial, uma vez que este vai interferir no custo de todo o processo podendo levar a um aumento do custo do medicamento/produto final imputado ao consumidor, tornando-o inacessível à maioria da população [11].

Capítulo 2

Infeções Herpéticas

2. Infecções Herpéticas

2.1. Infecções herpéticas: prevalência e sintomatologia

As infecções herpéticas são um conjunto de doenças infectocontagiosas muito comuns no ser humano, causadas pela exposição direta aos vírus da família *Herpesviridae* ou através do contacto com objetos contaminados por estes vírus [9]. Historicamente, as infecções causadas por estes vírus já são descritas desde a Grécia antiga, onde Hipócrates utilizou o termo “herpes” (do grego “rastejar”) para descrever lesões cutâneas com etiologias variadas [3]. O herpes genital foi identificado pela primeira vez por John Astruc, em França, no ano de 1736 sendo uma doença comum no século XVIII, especialmente em prostitutas, pelo que foi designada como ‘doença vocacional das mulheres’ [9]. Contudo foi apenas no final do século XIX que estas lesões foram reconhecidas como uma entidade clínica. Os vírus da família *Herpesviridae*, tal como todos os vírus em geral, podem ser definidos como agentes patogénicos de dimensão submicroscópica cujo genoma contém ácido nucleico, envolvido por uma série de proteínas que constituem a cápside, formada a partir de diversas subunidades chamadas de capsómeros. A atividade infecciosa destes agentes patogénicos deve-se ao conjunto formado pela cápside e pelo genoma viral. Estes vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que, após infeção, colocam os organelos celulares do hospedeiro ao serviço do seu processo de replicação. A família *Herpesviridae* é responsável por infetar mamíferos, aves, répteis, peixes e outros seres vivos. Os vírus desta família possuem um genoma extenso e embora descendam de um ancestral comum há pouca semelhança genómica entre eles. Apesar disso, todos os vírus da família *Herpesviridae* possuem a capacidade de se hospedar num organismo multiplicando-se de forma eficiente. Estes agentes patogénicos possuem ainda a capacidade de latência, provocando infeções recorrentes. O tipo de célula no qual se tornam latentes varia de acordo com a espécie [2]. Foram identificadas cerca de 130 espécies de vírus da família *Herpesviridae* capazes de infetar os seres vivos, contudo apenas oito são capazes de infetar o ser humano (*Human herpesvirus* ou HHV) e causar manifestações clínicas [2].

Os vírus HHV mais comuns são os das espécies *Herpes simplex virus* (HSV), em particular os subtipos 1 e 2 (HSV1 e HSV2) e ainda os vírus varicela-zoster (HHV3 ou VZV), Epstein-Barr (HHV4 ou EBV) e o citomegalovírus (HHV5 ou CMV) [21]. Na Figura 2 está representada parte da

família *Herpesviridae* assim como as respetivas subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*.

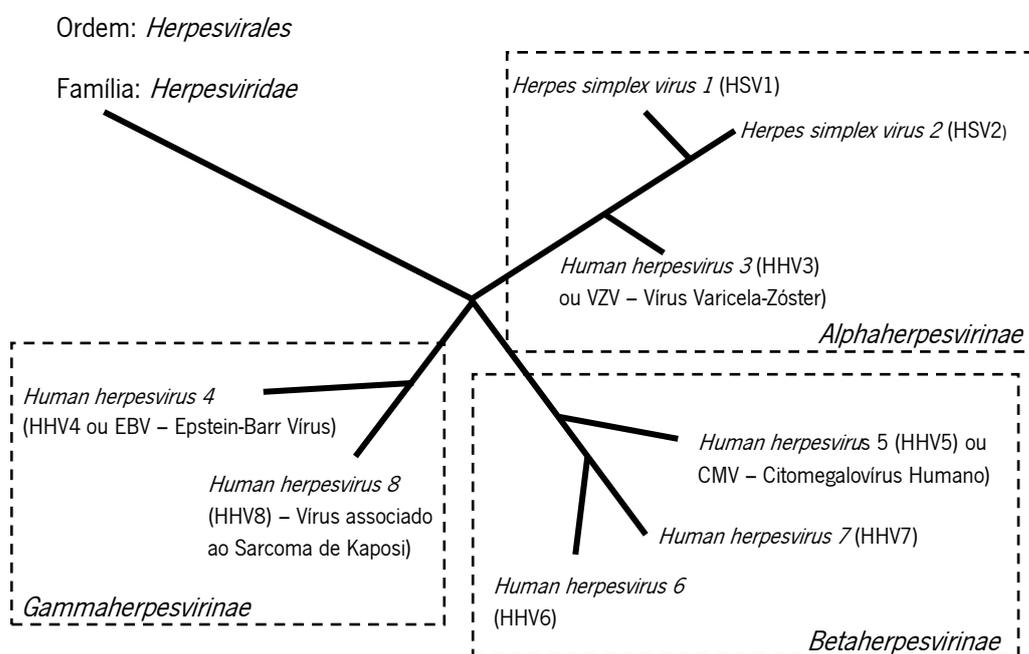


Figura 2 – Diagrama da classificação taxonómica da família *Herpesviridae*.
 Adaptado de Davison, A. (2010) [22] e Fonseca, B. (n/d) [23]

De todos os HHV, os HSV são os que mais afetam o homem e as infeções causadas pelo HSV constituem a segunda virose humana mais comum a seguir às infeções respiratórias virais [4,24]. Trata-se de infeções de distribuição universal, com taxas crescentes de incidência à medida que a população envelhece. Dados de 2012 indicam uma prevalência mundial, para todas as idades, de infeções por HSV1 e HSV2 de 67 e 11,2 %, respetivamente. Numa distribuição geográfica, os dados indicam uma maior prevalência por HSV em países em desenvolvimento, em particular na África Subsariana e no sudeste Asiático. Por outro lado, a Europa Ocidental apresenta as taxas mais baixas de infeções por HSV. O HSV1 apresenta uma distribuição igualitária de prevalência entre os sexos, enquanto que o HSV2 afeta maioritariamente as mulheres [2,9,25]. Estima-se que atualmente 40 a 70 % dos adultos apresentem lesões herpéticas recorrentes cujo agente etiológico é o HSV e que na maioria das vezes é mal diagnosticada e consequentemente não é tratada de forma adequada [24].

Como já foi referido, o HSV é um vírus ubíquo e latente para o qual o ser humano é o reservatório natural [4,26]. A transmissão de HSV ocorre mais frequentemente através do contacto

direto local com um indivíduo com o vírus ativo. Esta transmissão pode dar-se através do contacto entre superfícies mucosas (nasal, oral ou genital), através de secreções orais ou ainda através do contacto de tecidos infetados com fissuras da pele, sendo as vias de transmissão mais comuns a via oro-facial para o HSV1 e a via genital para o HSV2. É também reconhecida a transmissão de HSV a bebés recém-nascidos pelas mães infetadas [3,9,24]. O vírus quando entra em contacto com o hospedeiro pela primeira vez (primoinfeção) penetra no interior das células epiteliais da derme e epiderme e começa a replicar-se de forma exponencial. Esta primeira infeção é normalmente assintomática mas no caso de ocorrerem manifestações clínicas, a sua maioria surge 2-3 dias após a transmissão viral, período que é designado por incubação [9].

Ao atingir o tecido conjuntivo, o vírus é transportado intra-axonalmente para os corpos das células nervosas que vão constituir o seu local de latência [9]. O local de latência viral varia de acordo com a espécie do vírus. Os vírus HSV1, HSV2 e VZV, após a primoinfeção, deslocam-se para os gânglios nervosos sensitivos, correspondentes à região infetada; o CMV e o EBV têm como local de latência os leucócitos, mais concretamente os linfócitos B no caso do EBV; o HHV6 e HHV7 apresentam latência nos tecidos linfáticos e o HHV8 migra para diversos órgãos internos. A infeção dos gânglios do nervo trigémeo pelo HSV1 é a mais comum, embora possa também afetar os gânglios cervicais superiores e inferiores. Em infeções genitais os gânglios da raiz do nervo sacral (S2 a S5) são os mais afetados. A replicação do vírus nos gânglios e no tecido neuronal apenas ocorre durante a infeção primária (à exceção do EBV latente nos linfócitos B) [3]. Após a inoculação inicial, o vírus espalha-se pelas mucosas através dos nervos periféricos. Este tipo de disseminação permite a propagação da lesão de forma sistémica [9].

O vírus permanece no hospedeiro, nestes locais de latência, sem se manifestar, por longos períodos de tempo, não causando portanto qualquer sintomatologia. A reativação do vírus após latência tende a ser menos grave que a primoinfeção e pode ser sintomática ou não, representando uma nova oportunidade para a disseminação do vírus [3]. Os fatores que podem desencadear a reativação do vírus não são consensuais e dependem da espécie em causa, contudo podem ser agrupados em dois grandes grupos, fatores externos, tais como a exposição solar e a exposição a ambientes quentes ou frios, e a fatores internos, que incluem traumatismos, fadiga, *stress*, episódios de febre, alterações hormonais, imunodepressão, alterações dos mediadores inflamatórios locais ou da atividade antiviral da saliva, entre outros [3,4,21]. Indivíduos com sistema imunitário imaturo ou comprometido, tais como os recém-nascidos, doentes

transplantados, indivíduos seropositivos e outros indivíduos imunodeprimidos estão mais propensos a infecções por HSV, sendo a probabilidade de infecção/reativação do vírus maior quanto maior for a imunodepressão [9].

Como foi dito, primoinfeção por HSV é geralmente assintomática [21] no entanto os episódios de reativação da mesma (recidivas) podem causar várias manifestações clínicas tais como lesões cutâneas ou da mucosa, podendo afetar a boca e todo o rosto, no caso de herpes orofacial ou lesões ao nível dos órgãos genitais em casos de herpes genital. Outras sintomatologias podem incluir lesões oculares ou no sistema nervoso como encefalites e ainda outras lesões da pele e anexos (sicose herpética, eczemas e dermatite atópica). O HSV1 causa principalmente infecções no sistema nervoso central, garganta, face, olhos, enquanto que o HSV2 causa principalmente infecções anogenitais [9].

As manifestações clínicas do herpes orofacial, às quais se destinam os nanossistemas desenvolvidos neste trabalho, podem ser divididas em três períodos de acordo com o estágio da doença: (1) período prodrômico; (2) período clínico ativo e (3) período reparatório. O primeiro período ocorre até 24 horas antes da doença se manifestar explicitamente, permitindo ao indivíduo prevenir-se de lesões maiores e desconfortáveis. Neste período, o local da lesão apresenta uma sintomatologia desconfortável, caracterizada por formigamento ou sensibilidade aumentada. O local apresenta-se eritematoso e quente ficando dorido, com episódios de prurido e ardor. O segundo período pode durar entre 2 a 4 dias e caracteriza-se pelo aparecimento repentino de microulcerações no local da lesão correspondendo ao aparecimento de vesículas e bolhas (de dimensões superiores a 3 mm) cheias de líquido, que representam um exsudado inflamatório seroso (contendo leucócitos polimorfonucleares e milhões de partículas virais). Estas vesículas podem rebentar e deixar uma pequena ulceração com um halo eritematoso. Estas manifestações locais são geralmente dolorosas, especialmente ao toque. O toque ou a manipulação do local afetado representa um elevado risco de contaminação, pelo que a limpeza das lesões deve ser feita de forma cuidadosa com gaze ou outro material descartável. Estudos recentes indicam que 67 % dos indivíduos com o herpes orofacial ativo têm também o vírus nas mãos. Por fim o período reparatório ocorre após a redução do volume das vesículas e bolhas, devido a reabsorção do exsudado seroso. O local apresenta-se escamoso e coberto por crosta amarela que dura em média 2 a 4 dias. Em pacientes imunocomprometidos, as recorrências são mais frequentes e as lesões

maiores, sendo que os períodos clínicos são atípicos, podendo não corresponder ao descrito e podendo ainda ser observadas infecções secundárias [4,24].

2.2. Infecções herpéticas: terapêutica

O diagnóstico das infecções herpéticas é essencialmente clínico, efetuado a partir da análise dos sintomas e dos sinais físicos detetados. Pode ainda ser necessária a realização de testes laboratoriais de forma a identificar a espécie vírica de modo a tentar prever a frequência e a probabilidade de reativação de surtos após o primeiro contacto. Esses testes incluem a cultura do vírus, esfregaços, biópsias da pele, deteção de anticorpos de HSV por PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) e análises imunocitoquímicas [9,24]. O uso de medicamentos antivirais pode reduzir a infecção, reduzir a frequência dos surtos e aliviar os sintomas. A prevenção da infecção através de barreiras à transmissão viral, como o uso de preservativo e o uso de antivirais em toma profilática pode reduzir a disseminação da doença [9].

Atualmente não é possível a erradicação completa do vírus HSV, já que os medicamentos antivirais apenas reduzem a frequência, a duração e a gravidade dos surtos infecciosos [9]. A ideia inicial para o tratamento de infecções causadas pelo HSV era utilizar um agente antiviral capaz de inibir a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) viral sem afetar o DNA da célula hospedeira. O tratamento para o herpes foi iniciado na década de 60 com o uso experimental de análogos de bases de DNA (a 5-iododeoxi-uridina e a 5-trifluorometildioxiuridina) de modo a impedir a replicação viral. Estes dois agentes são nucleósidos de pirimidina e poderiam ser usados numa aplicação tópica, no entanto exibiam elevada toxicidade para serem administrados parentericamente. A vidarabina, o primeiro nucleósido de purina que apresentou uma atividade antiviral aceitável, surgiu em meados da década de 1960, sendo o primeiro fármaco antiviral administrado sistemicamente e com atividade contra o HSV. Este composto poderia ser usado não só em aplicações tópicas, mas também em aplicações intravenosas, embora o índice terapêutico não fosse muito elevado. No final da década de 1960, foram sintetizados outros agentes antivirais derivados de nucleósidos de purina e de guanina, para o tratamento de infecções com HSV1. Posteriormente, com a introdução dos análogos nucleosídeos e mais especificamente com o aciclovir (ACV), na década de 70, abriram-se portas para novas abordagens ao tratamento. A menor toxicidade do ACV, assim como a facilidade de administração em relação à vidarabina,

levaram à escolha do ACV como fármaco de 1ª linha para o tratamento do herpes, após aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1982 [5,9,27].

O ACV está indicado para o tratamento de infecções cutâneas causadas pelo HSV, incluindo o herpes genital inicial e recorrente. Está também indicado para a prevenção de recidivas de infecções causadas pelo HSV em doentes imunocompetentes e em tratamentos profiláticos em doentes imunocomprometidos. O ACV produz um efeito inibitório da dor e pode reduzir a incidência de neuralgia pós-herpética [12]. Um estudo realizado por Rompalo *et al.*, demonstrou que doentes com episódios de infecção retal causada pelo HSV, tratados com 400 mg de ACV, 5 vezes por dia apresentaram uma redução significativa da replicação viral, na formação de novas lesões e na duração dos sintomas nos casos de herpes recorrente, em comparação com o grupo placebo. Quatro dias após o início do tratamento todos os pacientes tratados com ACV apresentaram uma inibição completa da replicação do vírus, enquanto que no grupo de controlo e após 10 dias, 50 % dos doentes apresentaram o vírus ativo [28]. Estas descobertas aliadas à especificidade do ACV para atuar em células infetadas levaram ao reconhecimento da eficácia deste fármaco contra as infecções virais. O conhecimento do mecanismo de ação do ACV, aliado ao progresso científico, permitiu que se efetuassem melhorias na estrutura da molécula de ACV dando origem a pró-fármacos com maior solubilidade e biodisponibilidade. Um desses pró-fármacos é o valaciclovir que no organismo é convertido a ACV. Esta alteração estrutural efetuada nos pró-fármacos de ACV aumenta a biodisponibilidade e a semi-vida plasmática do ACV [21].

Entre os principais fármacos anti-HSV disponíveis no mercado para aplicação sistémica estão o aciclovir, o valaciclovir, famciclovir, penciclovir, ganciclovir, valganciclovir, foscarnet e cidofovir [9,21]. Recentemente, os regimes posológicos têm vindo a considerar outras hipóteses terapêuticas para o tratamento do herpes para além do ACV. Por exemplo, Consolaro, *et al.* (2009) descreve um regime posológico de 5 dias baseado na toma oral de 12 em 12 h de 500 mg de valaciclovir (Valtrex®) indicado para o tratamento de doentes imunocompetentes portadores de herpes peribucal e intrabucal [24]. Apesar destes novos regimes posológicos, o ACV continua a ser um dos fármacos mais prescritos e o mais estudado para o tratamento de infecções herpéticas [21,27].

Para além dos fármacos antivirais podem ser utilizados concomitantemente outros compostos de forma a minimizar os efeitos das infecções herpéticas. Estes podem ser analgésicos antipiréticos e anti-inflamatórios, tais como o paracetamol e o ibuprofeno, para o tratamento

sintomático da dor e para reduzir a febre e a inflamação. Ao nível tópico podem ainda associar-se anestésicos como a prilocaina, lidocaína e benzocaína para aliviar a dor e o prurido. Podem-se ainda usar compostos que tenham ações benéficas no processo de cicatrização através da estimulação da angiogénese [9].

A cicatrização é um processo que se inicia após a ocorrência da lesão e envolve uma série de etapas originadas e coordenadas pelo organismo com o objetivo de reconstruir, estrutural e funcionalmente, o tecido lesado. Alguns produtos nutracêuticos contribuem para o processo de cicatrização, destacando-se entre estes os ácidos gordos essenciais. Os ácidos gordos promovem o aumento da resposta imune e mantêm o tecido lesado húmido acelerando o seu crescimento, estimulando o processo de cicatrização através da promoção da angiogénese e da epitelização, para além de possuírem propriedades anti-bacterianas. A eficácia do uso de ácidos gordos na cicatrização de feridas começou a ser estudada ainda na primeira metade do século XX a partir da observação de lesões cutâneas. Recentemente têm sido desenvolvidos vários estudos, com a utilização de ácidos gordos essenciais, onde foi possível verificar um incremento significativo no crescimento e cicatrização dos tecidos lesados [10].

2.3. Aciclovir – um fármaco antiviral

2.3.1. Aciclovir: descoberta, origem e síntese

O ACV foi descoberto em 1974 por Gertrude Belle Elion na Carolina do Norte quando a sua equipa procurava identificar um agente antiviral específico capaz de atuar sobre o vírus HSV sem danificar as células hospedeiras. Através do estudo das vias biológicas para a síntese de nucleótidos em diferentes organismos, como bactérias, vírus e células cancerígenas, foi possível verificar que um dos análogos nucleóticos, o ACV, inibia a replicação do vírus do herpes. A inibição da replicação ocorre pela ativação do ACV em contacto com células virais pela ação de uma enzima específica – a timidina quinase viral (TQV). Esta enzima é responsável por fosforilar o ACV, dentro da célula hospedeira e inibir a ação da DNA polimerase [21].

O método mais comum para sintetizar o ACV, apesar de não ser muito rentável, envolve a reação de condensação da diacetilguanina com o acetato de (2-acetoxietoxi)metilo. Izawa e Shimagami propuseram, em 1998, outra alternativa na qual a guanina (obtida a partir da fermentação do *Bacillus subtilis*) reage com o acetato de (2-acetoxietoxi)metilo em anidrido acético formando o diacetilaciclovir. Este produto da reação é posteriormente hidratado com NaOH aquoso formando o ACV, com elevado grau de pureza, cerca de 92 % [21]

2.3.2. Aciclovir: características físico-químicas

O ACV, [9-(2-hidroxietoximetil) guanina], é um análogo nucleosídico da guanina e um eficiente antivírico. Estruturalmente é semelhante à desoxirribose guanina, apenas com diferenças nos carbonos 2' e 3' e no grupo 3'-hidroxilo do anel desoxi-aniónico [5,21]. A sua estrutura química está representada na Figura 3. A massa molecular do ACV é de 225,15 g mol⁻¹ e os seus valores de pKa são de 2,27-2,52 e 9,25-9,35 [29]. A solubilidade em água é de 1,3 mg mL⁻¹ a 25 °C e de 2,5 mg mL⁻¹ a 37 °C [30].

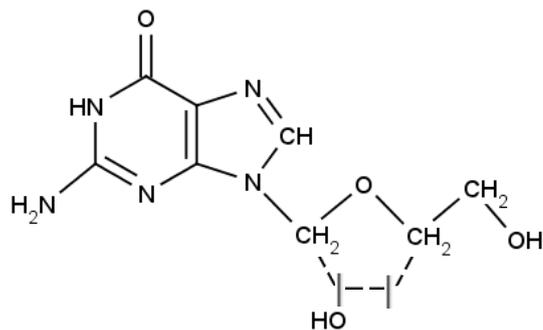


Figura 3 – Estrutura química do ACV (linhas sólidas).

As linhas a tracejado representam os grupos adicionais presentes na desoxirribose guanina.
Desenhado no *software MarvinSketch64*. Adaptado de Elion B. (1993) [5].

2.3.3. Aciclovir: mecanismos de ação/bioativação

O transporte do ACV, da corrente sanguínea ou dos espaços intercelulares, para o citoplasma da célula hospedeira dá-se através de proteínas transportadoras de bases dos ácidos nucleicos, como as pirimidinas e as purinas, com as quais o ACV compete. No citoplasma da célula hospedeira infetada o ACV é fosforilado por enzimas específicas e convertido a derivados mono, di- e tri-fosfatos num processo que se conhece como a conversão do ACV na sua forma ativa [5,7] (Figura 4). A enzima responsável pela primeira fosforilação do ACV em ACV monofosfato é uma timidina quinase específica produzida pelo vírus (a TQV). Esta enzima é ainda responsável por converter outros compostos como a timina, a desoxicitidina e várias desoxiuridinas para derivados monofosfatados. A TQV possui uma configuração distinta das demais TQ celulares sendo responsável pela seletividade do ACV para o vírus. A TQV reconhece o ACV como sendo um substrato, contudo pode aceitar outros substratos com pequenas variações na cadeia lateral, desde que o grupo hidroxilo terminal seja mantido [5]. Após a primeira fosforilação a enzima guanilato quinase realiza a segunda fosforilação do ACV. Este processo é altamente eficiente uma vez que o ACV monofosfato não se acumula na célula. O passo final da fosforilação (a terceira fosforilação) pode ser realizado por um vasto conjunto de enzimas celulares, que incluem a fosfoglicerato quinase, a nucleósido difosfato quinase e a fosfoenol piruvato quinase. Após esta série de reações é formado o trifosfato de ACV, o agente antiviral ativo. O trifosfato de ACV é internalizado no núcleo da célula hospedeira e como é um análogo nucleósido compete com o trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), substrato natural da DNA polimerase viral, sendo

incorporado em vez da dGTP na cadeia de DNA viral durante a sua síntese o que bloqueia a ação da DNA polimerase viral e cessa a replicação do material genético viral [5,7,30,31].

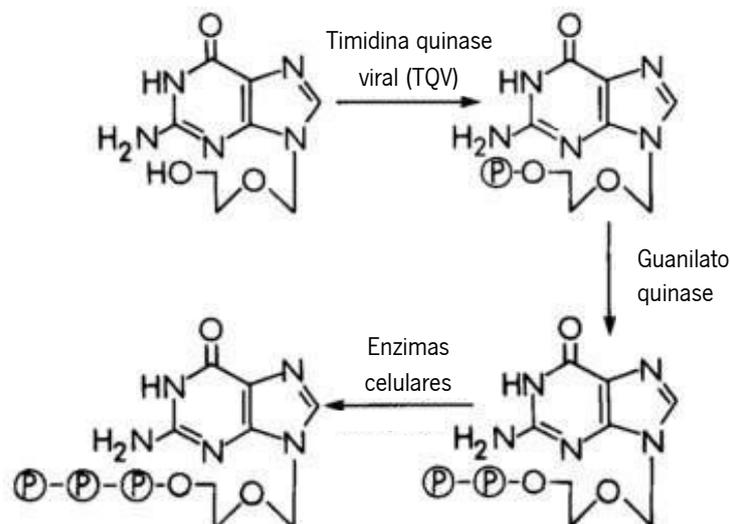


Figura 4 – Etapas de conversão enzimática do ACV nos seus derivados fosfatados.
Adaptado de Elion B. (1993) [5].

O ACV é um inibidor eficaz na replicação do HHV quer *in vitro* quer *in vivo* [5]. Em culturas celulares (*in vitro*) o ACV revelou maior atividade antiviral contra o HSV1, HSV2 e VZV apresentando valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50 % da replicação de viral) respetivamente de 0,1 μM; 0,6 μM e 4,0 μM. O ACV possui menor atividade para o EBV e o CMV apresentando para estes vírus um valor de IC₅₀ superior a 200 μM uma vez que estas espécies de vírus não sintetizam a TQV necessária para a conversão do ACV por fosforilação na sua forma ativa [21,30,31]. A atividade inibitória deste fármaco é altamente seletiva uma vez que as enzimas necessárias para a fosforilação do ACV, a TQV e a guanilato quinase, são codificadas pelo genoma do HSV e não estão presentes nas células não infetadas [31,32]. Deste modo, o ACV pode ser considerado um fármaco seletivo para as células infetadas uma vez que a inibição sobre a DNA polimerase viral é cerca de 10 a 30 % mais extensa quando comparada com a DNA polimerase das células saudáveis [21]. Assim, em todas as espécies do vírus, o IC₅₀ viral é inferior ao valor encontrado para a inibição do crescimento de células do hospedeiro (>300 μM) [31]. Contudo o efeito inibitório do ACV varia de acordo com a linha celular em causa [5]. Por exemplo, para a linha celular Vero (linha celular derivada de rim de macaco), o ACV exibe um IC₅₀ celular de 300 μM, o que representa um valor 3000 vezes superior ao efeito do fármaco na replicação do DNA do HSV1 e 150 vezes superior ao

efeito do fármaco na replicação do DNA do HSV2. Já para o CMV o ACV é menos sensível, contudo, há ainda uma diferença de 30 vezes entre o efeito inibitório sobre este vírus e o efeito sobre a linha celular estudada [5].

Em suma, a atividade e seletividade do ACV em células infetadas pode ser resumida por: i) ativação de uma timidina quinase específica na célula infetada; ii) maior sensibilidade da DNA polimerase viral para o trifosfato de ACV, em comparação com a DNA polimerase celular; iii) maior inativação da DNA polimerase viral pelo trifosfato de ACV, em comparação com a DNA polimerase celular, e iv) término da síntese de DNA viral por incorporação do trifosfato de ACV [5].

2.3.4. Aciclovir no tratamento de infeções herpéticas

O ACV está indicado na profilaxia e no tratamento de infeções herpéticas, sendo que este tratamento deve iniciar-se o mais cedo possível após a infeção de modo a aumentar a eficiência e os resultados terapêuticos. No caso de infeções recorrentes o tratamento deve ser iniciado durante a fase prodrômica ou assim que aparecem os primeiros sinais de lesões [33].

O ACV encontra-se comercializado por muitos laboratórios farmacêuticos, apresentando-se sob diferentes formas farmacêuticas. Pode ser administrado de forma sistémica (formas orais ou parentéricas) ou localmente, sendo utilizado em formulações sólidas como comprimidos ou cápsulas, soluções parentéricas para administração intravenosa, ou formas semi-sólidas para aplicação tópica ou ocular [29,31]. As indicações terapêuticas para cada formulação variam de acordo com a forma farmacêutica, o estado geral do doente assim como a idade (adultos e crianças). Em Portugal, a autorização para comercialização do ACV existe sob o nome comercial de Zovirax™ desde 10 de abril de 1984 sob a forma de comprimidos e pomada oftálmica, pelos Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda [7,33,34], e desde 11 de outubro de 1984 sob a forma de suspensão oral, pelo mesmo laboratório [33] e a partir de 5 de agosto de 1985 sob a forma de creme pelos laboratórios GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Produtos para a Saúde e Higiene Lda [35]. Atualmente com a perda da propriedade intelectual dos laboratórios titulares de AIM, estas formas farmacêuticas são asseguradas por outros laboratórios, quer sob diferentes nomes comerciais, quer na forma de medicamentos genéricos. No Anexo 1 encontra-se uma lista de medicamentos aprovados pelo INFARMED (agosto 2017) cuja substância ativa é o ACV.

As formas orais (comprimidos e suspensão) estão maioritariamente indicadas para o

tratamento de infecções causadas pelo HSV ao nível da pele e mucosas, incluindo herpes genital inicial e recorrente (exceto no tratamento de indivíduos recém-nascidos e crianças imunocomprometidas). Está também indicado para a supressão/prevenção de recorrências de infecções em doentes imunocompetentes e na profilaxia de doentes imunocomprometidos assim como no tratamento de infecções pelo VZV. Está ainda clinicamente provado o efeito benéfico das formas orais de ACV na diminuição da dor e na redução da incidência de nevralgias pós-herpéticas [33,36]. As formas tópicas de ACV estão maioritariamente indicadas no tratamento de infecções orofaciais causadas pelo HSV1 e HSV2 na cicatrização de lesões, na atenuação da dor e no tratamento do herpes labial recorrente [18,35,37].

Os comprimidos de Zovirax™ são compostos por 200 mg de ACV, contendo como principais excipientes celulose microcristalina, carboximetilamida sódica, povidona K 30, estearato de magnésio e lactose anidra [33]. A posologia do ACV no tratamento do herpes varia de acordo com o estágio da doença e o estado do doente. A posologia mais comum para infecções causadas pelo HSV1 e HSV2 em adultos imunocompetentes é de 200 mg, cinco vezes por dia em intervalos de 4 horas (omitindo o tratamento de noite), durante 5 dias, no entanto em infecções graves pode ser considerado o seu prolongamento. Em doentes imunocomprometidos ou com baixa absorção intestinal a dose deve ser duplicada para 400 mg, com o mesmo esquema de tratamento. Em casos mais graves pode optar-se pela administração intravenosa. Para tratamentos profiláticos os esquemas de tratamento podem ser alterados. Em doentes imunocomprometidos, é aconselhada uma dose de 200 mg quatro vezes por dia, com intervalos de 6 horas; em formas avançadas da doença a dose pode ser duplicada. Como alternativa pode optar-se pela administração intravenosa de ACV. A duração da administração profilática é determinada pela duração do período de infeção. Para o tratamento de infecções de VZV a indicação padrão, para adultos, é de 800 mg, cinco vezes por dia (exceto durante os períodos noturnos) durante 7 dias. Em doentes imunocomprometidos o esquema de tratamento é de 800 mg, quatro vezes por dia, com intervalo de 6 horas [33,36]. Nestes doentes imunocomprometidos ou com absorção intestinal deficiente a administração intravenosa deve ser considerada. Em crianças imunocomprometidas com mais de 2 anos o tratamento por infecções contra o HSV1 e HSV2 é de 40 a 80 mg Kg⁻¹ dia⁻¹, divididos entre 3 a 4 tomas, num máximo de 100 mg Kg⁻¹ dia⁻¹. Em crianças com menos de 2 anos deve ser administrada metade da dose indicada para o adulto. Para o tratamento de VZV, as recomendações são: para crianças com idade superior a 6 anos, 800 mg, quatro vezes por dia;

para crianças entre 2 e 6 anos, 400 mg quatro vezes por dia, e para crianças com menos de 2 anos, 200 mg, quatro vezes por dia. Em todos os casos o tratamento deve ser mantido por 5 dias [33].

Na forma farmacêutica de pomada oftálmica o Zovirax™ 30 mg g⁻¹ está unicamente indicado no tratamento de queratite causada pelo HSV1 e pelo HSV2. Na sua composição contém 3 % p/p de ACV e tem como excipiente principal a vaselina branca. A posologia é igual para todas as idades, uma tira de pomada com cerca de 1 cm deve ser colocada na face interna do saco conjuntival inferior cinco vezes por dia, com intervalos de 4 horas. O tratamento deve ser mantido pelo menos até 3 dias após a cicatrização [34].

A suspensão oral de Zovirax™ contém em cada mililitro de suspensão: 80 mg de ACV, sorbitol (E 420) a 450 mg mL⁻¹ sob a forma de solução de sorbitol a 70 %, hidroxibenzoato de metilo (E 218) a 1 mg mL⁻¹ e hidroxibenzoato de propilo (E 216) a 0,2 mg mL⁻¹. Outros excipientes incluem glicerol, celulose microcristalina, aroma de laranja e água purificada [33].

Por último, o Zovirax™ creme contém 50 mg g⁻¹ de ACV (5 % p/p aciclovir). Outros excipientes incluem, poloxamero, álcool cetosteárico, laurilsulfato de sódio, vaselina branca, monoestearatoglicerilo, propilenoglicol (E1520), água purificada, dimeticona, estearato de polietilenoglicol 100 e parafina líquida. Em adultos e crianças com idade igual ou superior a 12 anos, o Zovirax™ creme deve ser aplicado cinco vezes por dia, em intervalos de 4 horas (omitindo o período noturno), durante 4 dias. Se após este período não tiver ocorrido a cicatrização completa, o tratamento poderá ser prolongado até aos 10 dias. Não é recomendado a aplicação do Zovirax™ creme nas membranas mucosas, cavidade oral, olhos nem no tratamento do herpes genital, assim como é desaconselhado em doentes gravemente imunocomprometidos. Nestes casos deverá optar-se pela administração por outra via [35]. Os efeitos indesejados do ACV relatados em fetos ou recém-nascidos são nulos e a interação com outros medicamentos é insignificante [27].

2.3.5. Aciclovir: problemas Farmacocinéticos

O termo “farmacocinética” foi introduzido pelo alemão F. H. Dost, em 1953 e é utilizado para prever o comportamento e as interações de uma determinada substância no organismo, sendo geralmente utilizada na sua definição a expressão: *‘o que o corpo faz ao fármaco’*. A farmacocinética compreende as etapas de absorção, distribuição, metabolização e eliminação de

determinada substância no organismo tendo o seu estudo, como principal objetivo, identificar as propriedades de um fármaco *in vivo*, prever o seu transporte e distribuição e assim prever os efeitos do fármaco no organismo [38].

A absorção dum fármaco depende da concentração de substância administrada, da forma farmacêutica, do fluxo sanguíneo local, da superfície de absorção e das propriedades físico químicas do fármaco. Em alguns casos, a administração pela via oral está sujeita ao efeito de primeira passagem (metabolização pelo fígado e da microflora intestinal) pelo que o fármaco é metabolizado precocemente e apenas uma pequena dose entra na circulação sistémica sendo absorvida. Numa administração tópica o fármaco pode penetrar o tecido cutâneo que é mais permeável no local da lesão, ou pode atravessar o estrato córneo e as diferentes camadas da pele e atingir a circulação sistémica sendo também absorvido. No caso de o fármaco ser administrado por via intravenosa ou intra-arterial entrará diretamente na corrente sanguínea, pelo que a absorção neste caso é máxima. A absorção de um fármaco é portanto dependente da via de administração e das barreiras fisiológicas que cada via de administração oferece à passagem do fármaco para a corrente sanguínea. Um parâmetro que indica se um fármaco é bem ou mal absorvido é a biodisponibilidade. A biodisponibilidade de um fármaco no organismo é uma medida que indica a quantidade de fármaco, na forma intacta, que chega à corrente sanguínea, sendo normalmente calculada para cada via de administração em comparação com a administração intra-venosa ou intra-arterial. Um fármaco muito biodisponível será portanto aquele que, após uma determinada via de administração, apresenta uma absorção elevada e próxima da conseguida por via intravenosa ou via intra-arterial [38].

A etapa de distribuição de um fármaco ocorre após a entrada na corrente sanguínea, sendo um processo feito em fases: inicialmente o fármaco é distribuído por órgãos com maior vasculatura e aporte sanguíneo, tais como o sistema nervoso central, pulmões e coração e posteriormente por regiões com menor fluxo sanguíneo tais como o tecido adiposo. A distribuição do fármaco no organismo depende do grau de partição plasma/tecido, cujo valor condiciona que o fármaco se desloque na corrente sanguínea na forma livre ou ligado a componentes sanguíneos (como as proteínas plasmáticas). Este grau de partição é por isso um parâmetro importante para avaliar a resposta farmacológica, pois apenas os fármacos na forma livre podem atravessar os tecidos por difusão passiva e ser distribuídos pelos órgãos alvo. Por outro lado, o grau de partição também é importante na avaliação dos efeitos tóxicos de determinada substância, uma vez que

os fármacos altamente ligados às proteínas plasmáticas permanecem muito tempo em circulação podendo ser tóxicos por bioacumulação. A distribuição de um fármaco no organismo pode também ser medida através da biodisponibilidade do mesmo sendo influenciada por três fatores principais: i) volume de distribuição (que inclui os fluidos corporais, dentro e fora dos órgãos), ii) a depuração renal (que reflete a quantidade de fármaco depurada pelos rins, ou seja a quantidade que é excretada e devolvida à circulação sistêmica) e iii) tempo de meia vida, que reflete o tempo que decorre, após a administração, até o organismo eliminar metade da concentração administrada [38].

A metabolização corresponde à etapa em que o fármaco é modificado (por exemplo por reações enzimáticas) tendo como resultado uma inativação parcial ou total do mesmo. No entanto, nem sempre a metabolização é um processo que termina a ação terapêutica dos fármacos. Por exemplo, no caso de pró-fármacos (no qual se insere o ACV) a metabolização é essencial à atividade terapêutica pois a forma metabolizada é a que corresponde à forma ativa (no caso do ACV, a forma ativa é o ACV trifosfato). A metabolização de um fármaco não é idêntica em todas as pessoas e está dependente de muitos fatores, onde se inclui a idade, o sexo, patologias associadas, uso de outros fármacos, entre outros [38].

Por último ocorre a etapa de eliminação ou excreção do fármaco do organismo, que tem como principais vias a eliminação através da urina, das fezes, do suor, das lágrimas e de produtos resultantes da respiração [38].

Uma vez que o conhecimento da farmacocinética de um fármaco é essencial para prever as interações deste com o organismo e portanto para prever a sua ação terapêutica e os seus efeitos tóxicos, foi criado um Sistema de Classificação Biofarmacêutica para permitir classificar os fármacos de acordo com a probabilidade de apresentarem características farmacocinéticas desejáveis ou indesejáveis. Este sistema de classificação divide os fármacos em 4 classes (Figura 5), de acordo com a sua solubilidade em água e a sua permeabilidade ao nível da membrana intestinal. Assim, os fármacos pertencentes à classe I apresentam elevada solubilidade em meio aquoso e são rapidamente transportados através da membrana intestinal, pelo que regra geral estes fármacos não necessitam de nenhuma estratégia de formulação para aumentar a sua absorção. Os fármacos pertencentes à classe II apresentam boa permeabilidade, mas uma baixa solubilidade em água e, deste modo, a estratégia para este tipo de fármacos passa por aumentar a quantidade de fármaco no local da absorção. Os fármacos pertencentes à classe III têm baixa

permeabilidade e boa solubilidade em água. Neste grupo de fármacos a estratégia passa por aumentar a permeabilidade da membrana ao fármaco, sendo que esta depende do uso de estratégias que favoreçam o mecanismo de transporte do fármaco através da membrana, quer seja pela via transcelular quer seja pela via paracelular. Por último, fármacos pertencentes à classe IV apresentam baixa permeabilidade através da membrana e baixa solubilidade. Aqui as estratégias passam por tentar modificar o fármaco ou formulações de forma a aumentar a permeabilidade membranar ao fármaco e também usar estratégias que promovam um aumento da concentração de fármaco [36].

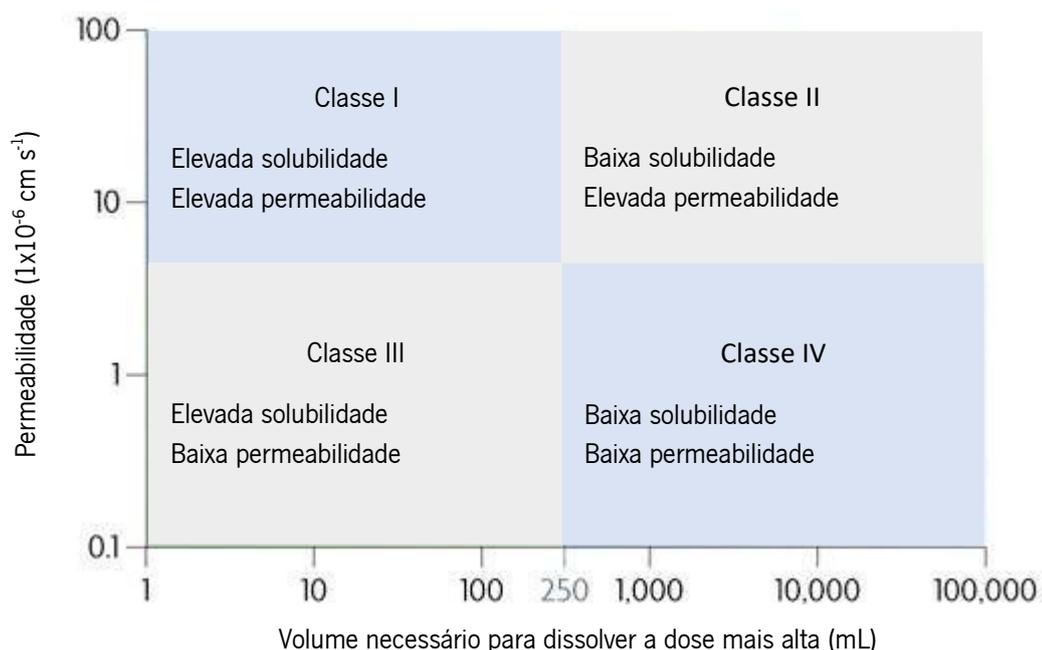


Figura 5 – Sistema de classificação farmacêutica de fármacos segundo a solubilidade em água e a permeabilidade membranar dos mesmos.

Tendo por base diretrizes da Organização Mundial de Saúde, o ACV pode ser classificado como um fármaco de classe III, contudo no caso de regimes posológicos em que são administradas doses mais altas de ACV (800 mg dia^{-1}) este pode ser classificado como de classe IV [27]. A classificação do ACV tem por bases as suas propriedades físico-químicas intrínsecas, apresentadas no ponto 2.3.2., tais como a sua relativamente baixa solubilidade em água e a sua fraca permeação membranar ($0,12 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) [39]. Esta classificação biofarmacêutica do ACV é indicativa de que o fármaco poderá apresentar problemas que afetem o seu desempenho terapêutico e de facto os estudos farmacocinéticos do ACV confirmam estes problemas.

A absorção do ACV no ser humano, ao nível do trato gastrointestinal é baixa o que indica que a biodisponibilidade oral do ACV é baixa (cerca de 15 a 30 %) e diminui com o aumento da dosagem. Este facto deve-se à baixa solubilidade, propriedades de partição lipídica ineficientes e baixo tempo de trânsito gastrointestinal [29]. A concentração máxima obtida ocorre aproximadamente 1,5 a 2 horas após a administração oral. A semi-vida plasmática é de 2-3 horas em indivíduos com função renal normal. Em pacientes anúricos (com pouca produção de urina) a semi-vida plasmática do ACV pode chegar às 20 horas. Os parâmetros farmacocinéticos do ACV em crianças (com mais de 1 ano) são similares aos dos adultos. Em recém-nascidos a semi-vida plasmática do ACV é ligeiramente superior, podendo alcançar as 4 horas [31].

A absorção sistémica do ACV após aplicação tópica também é baixa. Após a administração tópica de 5 % de ACV num excipiente de polietilenoglicol para o tratamento do herpes genital, o ACV não é detetado no plasma. Em determinados casos a administração tópica pode ser detetada na circulação sanguínea, ainda que em concentrações pequenas, mesmo em indivíduos com função renal normal [31].

O ACV é distribuído em praticamente todos os tecidos. Esta extensa distribuição também pode ser explicada pela baixa ligação do ACV às proteínas plasmáticas (9 a 22 %) que é independente da concentração do fármaco [31]. Apesar do ACV se distribuir por todos os tecidos, a sua distribuição não é homogénea. As maiores concentrações de ACV encontram-se nos rins, (10 % mais elevada que a concentração plasmática) enquanto que as menores concentrações se encontram no tecido cerebral (onde atinge apenas 10 a 33 % da concentração plasmática entre 0,5 a 6 horas após administração) [31].

A excreção ao nível renal é a principal fonte de eliminação do ACV, sendo este eliminado por filtração glomerular ativa ao nível dos túbulos renais, em doentes com uma função renal normal. Alguns fármacos como a penicilina, as cefalosporinas, a probenecida, a cimetidina e o ácido para-amino-hipúrico (PAH) são também eliminados por filtração glomerular ativa ao nível dos túbulos renais e quando administrados concomitantemente com o ACV podem competir com este retardando a sua eliminação e aumentando o tempo de permanência do fármaco no organismo [31,33]. Após uma administração intravenosa, o ACV é maioritariamente excretado na forma inalterada. O principal metabolito do ACV identificado é o 9-carboximetoximetilguanina, que corresponde a 8,5 a 14 % da dose total de fármaco administrada [31].

Do exposto se conclui que os principais problemas farmacocinéticos do ACV são a sua baixa absorção após administração oral ou tópica e conseqüentemente a sua baixa biodisponibilidade que conjugados com um baixo tempo de semi-vida implicam baixas concentrações de fármaco a atingirem os locais de ação terapêutica. Estes problemas têm sido contornados ou minorados pela adoção de regimes posológicos que consistem numa administração continuada de elevadas doses de ACV, muito superiores ao IC_{50} requerido para um efeito anti-viral (ver secção 2.3.4.) No entanto, a adoção de regimes posológicos que se baseiam no uso continuado de ACV em elevadas doses aumenta a possibilidade do agente patogénico criar resistência ao fármaco. Foi demonstrado, *in vitro*, que a resistência ao ACV pode ser devida à redução da quantidade de TQV (a enzima responsável pelo primeiro passo da ativação do ACV) ou ao seu desaparecimento e substituição por análogos destas enzimas não sensíveis ao ACV. Esta situação não é clinicamente relevante em doentes imunocompetentes, mas assume particular importância em doentes imunodeprimidos após tratamento prolongado. Outros mecanismos de resistência podem ocorrer devido à formação de uma TQV com especificidade alterada para o ACV ou à ocorrência de uma mutação na DNA polimerase viral tornando-a inacessível ao trifosfato de ACV [5].

2.4. Ácidos gordos ómega-3 – um nutracêutico essencial

2.4.1. Ácidos gordos ómega-3: origem e seus derivados

Historicamente os produtos de origem animal e vegetal, assim como os seus derivados, constituem a base da alimentação humana, sendo as gorduras e os óleos reconhecidos como nutrientes essenciais na alimentação humana e animal e a fonte mais concentrada de energia. A importância dos ácidos gordos foi descrita pela primeira vez por Burr em 1929, e resulta da impossibilidade dos animais sintetizarem estes compostos a partir de precursores estruturalmente mais simples. Designam-se assim por ácidos gordos essenciais exatamente por não poderem ser sintetizados, nem pelo homem, nem pelos mamíferos, mas serem imprescindíveis numa dieta equilibrada [40].

Os ácidos gordos são compostos orgânicos formados a partir de uma estrutura de átomos de carbono dispostos numa cadeia hidrocarbonada e um grupo carboxílico terminal ($\text{HO}-\text{C}=\text{O}$) (Figura 6) [41].

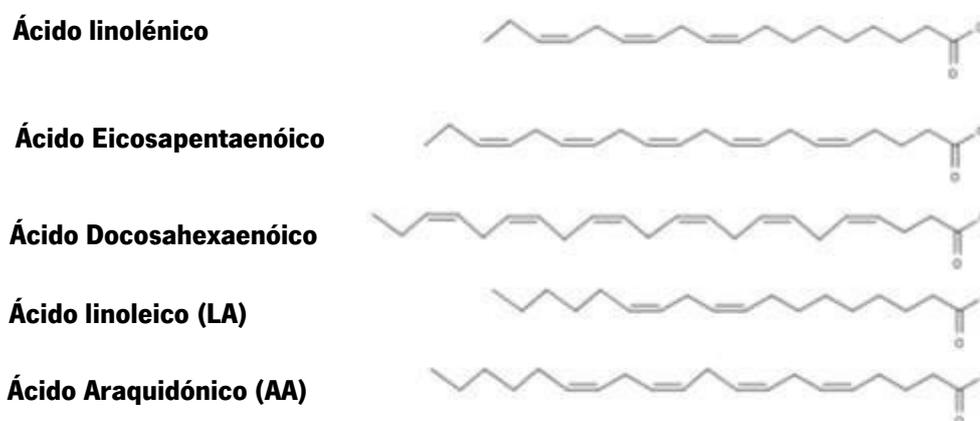


Figura 6 – Estrutura dos diferentes ácidos gordos ómega 3 e 6.
Desenhado no *software MarvinSketch64*.

Os ácidos gordos fazem parte da estrutura de grande parte dos lípidos e desempenham quatro funções principais: i) são componentes estruturais das membranas biológicas; ii) atuam como precursores de mensageiros intracelulares; iii) são uma importante fonte de energia pela produção de adenosina trifosfato (ATP), como resultado da sua oxidação e iv) providenciam

isolamento térmico e elétrico [40,41]. De entre os ácidos gordos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), são os que possuem maior atividade na promoção da saúde. São constituídos por três famílias, classificadas de acordo com o ácido gordo que a constitui: ômega-3 (ácido linolénico ou ácido *cis-9-cis-12-cis-15*-octadecadienoico, designado abreviadamente por ALA), ômega-6 (ácido linoleico ou ácido *cis-9-cis-12*-octadecadienoico designado abreviadamente por LA) e ômega-9 (ácido oleico ou *cis-9*-octadecadienoico). Estes compostos, por sua vez, dão origem a outros ácidos essenciais de cadeias mais longas, chamados ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) [40], como representado na Figura 7.

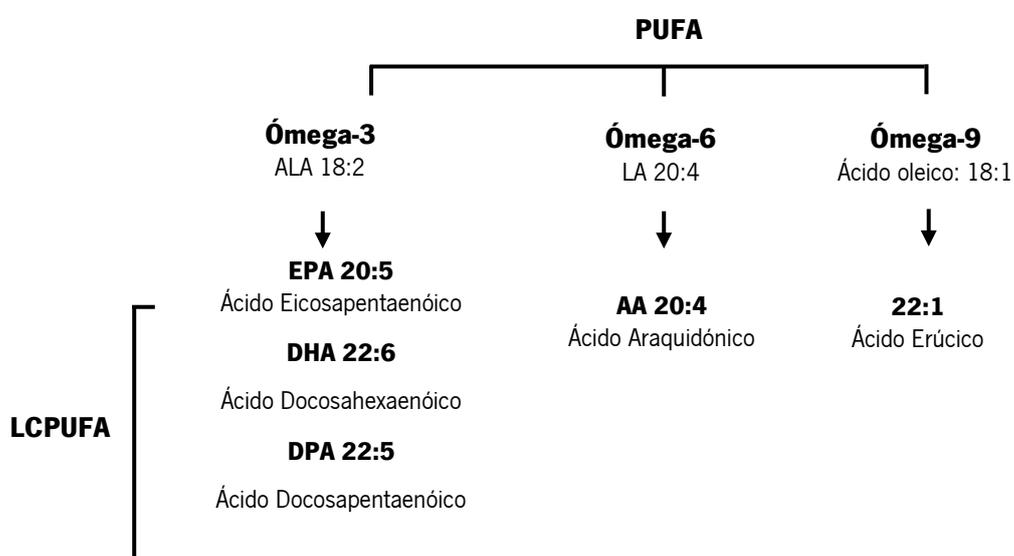


Figura 7 – Principais ácidos gordos das famílias ômega 3, 6 e 9. Conversão de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFA). O primeiro número identifica o número de carbonos presentes na cadeia hidrocarbonada e o segundo identifica o número de ligações duplas do composto. Adaptado de Teixeira M. (2016) [41].

Os ácidos gordos estão presentes em vegetais terrestres e marinhos. Estes organismos podem sintetizar ácidos gordos a partir de precursores mais simples. Os peixes e outros animais apenas podem alongar e desnaturar os ácidos gordos em PUFA. Em contrapartida os mamíferos, apesar de possuírem a capacidade de alongar os PUFA em LCPUFA, apenas o podem fazer se os precursores já estiverem presentes na dieta. No organismo humano os LCPUFA são sujeitos a uma série de reações de modo a entrarem na circulação sanguínea. São hidrolisados, e posteriormente sujeitos a processos de isomerização e biohidrogenação. A isomerização consiste na conversão das conformações geométricas de algumas ligações *cis* em configurações *trans*. A

biohidrogenação por sua vez consiste na adição de hidrogénio nos locais com ligação dupla de modo a aumentar a saturação do composto e a permitir uma maior absorção ao nível do intestino [40].

A fonte principal de ácidos gordos ómega-3 são os peixes gordurosos como o salmão e o atum. Podem também ser extraídos a partir do óleo de canola e de nozes, estando presentes sobretudo em vegetais de folhas verdes como o feijão. Quanto ao ómega-6, este está presente na maioria dos grãos e sementes tais como o milho, o cártamo, o girassol e o algodão, assim como em óleos vegetais [42] (Tabela 2).

Tabela 2 – Ácidos gordos essenciais predominantes em óleos comuns.
Adaptado de Covington, M. (2004) [42]

Óleos ricos em ácidos gordos ómega-3	Óleos ricos em ácidos gordos ómega-6
Óleo de canola	Óleo de borragem
Óleo de peixe	Óleo de milho
Óleo de linhaça	Óleo de algodão
Óleo de noz	Óleo de uva
Óleo de soja*	Óleo amendoim
	Óleo de cártamo
	Óleo de gergelim
	Óleo de girassol
	Óleo de soja*

* O óleo de soja está incluído em ambas as categorias, embora seja mais rico em ácidos gordos ómega-6.

2.4.2. Ácidos gordos ómega-3 na promoção da saúde

A primeira evidência da importância da ingestão de PUFA numa dieta saudável deriva de observações epidemiológicas na população da Gronelândia. Verifica-se nesta população uma baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias, bem como a total ausência de casos de esclerose múltipla, quando comparada com grupos populacionais do mesmo género e idade na Dinamarca. Outros dados indicam que países com elevada ingestão de PUFA a partir de alimentos marinhos, como a Gronelândia ou o Japão, têm baixa incidência de casos de enfarte do miocárdio e distúrbios crónicos inflamatórios ou autoimunes em comparação com os países ocidentais [43].

Ao longo da última década, tem havido um interesse crescente na utilização dos PUFA na alimentação e na indústria farmacêutica. Este interesse deve-se aos benefícios para a saúde que têm sido associados aos PUFA, nomeadamente ao nível da prevenção de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, distúrbios imunológicos e prevenção de determinados tipos de cancro, como cólon, mama e próstata. Estudos apontam ainda para um impacto positivo no desenvolvimento neuronal infantil e na prevenção de patologias psiquiátricas em crianças [44].

A atividade biológica dos PUFA deve-se muito ao facto de os ácidos gordos ómega-3, em particular o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), representarem um grupo de precursores de eicosanóides, [42,43,45]. Os eicosanóides são produzidos no fígado a partir dos ácidos ómega-3 após estimulação hormonal e atuam como mediadores bioativos, tendo um papel de destaque na sinalização celular, interferindo nas respostas autoimunes e inflamatórias. Em resposta a um processo inflamatório o ácido araquidónico (AA) é libertado das membranas celulares originando eicosanóides pró-inflamatórios e pró-agregantes, tais como as prostaglandinas (PG), os tromboxanos (TX) entre outros. Por outro lado, a metabolização do DHA e do EPA leva à formação de mediadores com propriedades anti-inflamatórias, tais como as resolvinas e as protectinas [41].

Os PUFA também contribuem para o processo de reparação tecidual, atuando como agentes de proteção, aumentando a hidratação dos tecidos e acelerando o processo de cicatrização. Em específico, o LA ou ómega-6 tem um papel importante na quimiotaxia dos macrófagos, regulando o sistema fibrinolítico e a produção de colagenase. Favorecem o desbridamento autolítico das feridas contribuindo para a produção de metaloproteínas, induzindo a granulação e acelerando o processo de cicatrização. Por outro lado, o ALA ou ómega-3 está presente em maior quantidade na camada epidérmica estando envolvido (i) no transporte de gorduras e nutrição celular local; (ii) na proteção e manutenção da integridade da barreira de permeabilidade epidérmica e (iii) na aceleração dos processos de cicatrização. O ALA ou ómega-3 atua como modulador da membrana celular, protegendo-a contra agentes químicos, enzimáticos e patogénicos e protegendo a pele de lesões macerativas. Adicionalmente o ALA ou ómega-3 atua como agente restaurador dos tecidos ao promover a quimiotaxia e a angiogénese através da manutenção de um ambiente húmido e próximo da temperatura fisiológica, o que ajuda na regulação da perda de água pela pele [46]. Dadas estas propriedades descritas ao nível da proteção cutânea, o uso dos PUFA poderá, devido à sua ação anti-bacteriana, substituir pomadas

contendo antibióticos, garantindo ainda um ambiente adequado ao processo de cicatrização onde é possível abdicar do uso de pensos ou outras coberturas passivas normalmente usadas em curativos [47].

Finalmente, os PUFA, e em particular os ácidos gordos ómega-3, contribuem para a redução dos níveis plasmáticos de triglicéridos e de colesterol devido à inibição da síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Num estudo randomizado com indivíduos com hiperglicemia foram comparados dois grupos. O primeiro grupo recebeu uma dose diária de 10 a 40 mg de sinvastatina (fármaco utilizado no controlo dos níveis de colesterol) e 4 g de Omacor (produto que contém 90 % de ácidos gordos ómega-3: 840 mg de EPA e DHA por cápsula). O segundo grupo recebeu a mesma dose de sinvastatina e um placebo. Os resultados indicam que no primeiro grupo houve uma redução de 20 a 30 % das VLDL quando comparado com o segundo grupo, contudo não houve uma diminuição nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) [42]. Dada a relação verificada entre a redução de VLDL e a redução dos níveis plasmáticos de triglicéridos e de colesterol, que se considera essencial na prevenção de doenças cardiovasculares, a American Heart Association (AHA) recomenda o consumo de peixe, como o salmão ou atum (com elevado teor em ácidos gordos ómega-3). O consumo aconselhado é de duas porções semanais em indivíduos sem doença coronária e uma porção diária para indivíduos com doença cardíaca conhecida. É também recomendado o consumo de cerca de 1 g por dia de EPA e DHA para obter cardioproteção. Doses mais elevadas (2 a 4 g diárias) podem reduzir os níveis elevados de triglicéridos; enquanto doses de pelo menos 3 g por dia podem reduzir a rigidez articular em doentes com artrite reumatoide e baixar a pressão arterial. Apesar das recomendações da AHA e das propriedades benéficas dos ácidos gordos ómega-3 provenientes de fontes marinhas, a elevada propensão de contaminação destes alimentos com poluentes ambientais (mercúrio e outros tóxicos) leva a FDA a recomendar um limite estabelecendo que o seu consumo é seguro até doses diárias de 3 g (dose GRAS ou 'geralmente reconhecidas com seguras') [42]. Além disso, impõe-se um limite no consumo dos ácidos gordos ómega-3, pois apesar destes serem geralmente bem tolerados, foram descritos alguns efeitos adversos associados ao seu uso excessivo. Elevadas doses de óleo de peixe podem aumentar os níveis de colesterol LDL embora este aumento não esteja clinicamente comprovado. Também pode ocorrer uma ligeira alteração da velocidade de sedimentação globular (associada a pequenas alterações

dos níveis de glicose e de hemoglobina) e distúrbios gastrointestinais (por exemplo náuseas, inchaço) [42].

Em resumo, os PUFA e em particular os ácidos gordos ómega-3 são bem tolerados e possuem diversas ações biológicas benéficas (ação antitrombótica, anti-inflamatória, vasodilatadora, anti-lipidémica, cicatrizante) sendo utilizados para tratar um amplo conjunto de patologias, tais como doenças cardíacas, hiperlipidemia, hipertensão, diabetes, assim com doenças inflamatórias e autoimunes como a artrite reumatóide, doença de Crohn, úlceras, psoríase, lúpus, esclerose múltipla e enxaquecas [42,43]. Além disso, os ácidos gordos ómega-3 revelaram ainda uma redução significativa no risco de morte súbita causada por arritmias cardíacas e na mortalidade em pacientes com doença coronária [42].

Pelo facto de possuírem ações biológicas benéficas e por serem obtidos de alimentos, os ácidos gordos ómega-3 têm sido usados como nutracêuticos, ou seja, como suplementos dietéticos que foram extraídos dos alimentos, mas que são apresentados na forma não alimentar e fornecidos numa determinada forma farmacêutica (por exemplo, pó, cápsulas, comprimidos). O nutracêutico ómega-3 está disponível no mercado na sua forma líquida ou em cápsulas. Na sua forma líquida concentrada é aconselhada a toma de 1 colher de chá por dia. A maioria das cápsulas comerciais de óleo de peixe contêm 1 g de óleo com cerca de 180 mg de EPA e 120 mg de DHA [42].

2.4.3. Ácidos gordos ómega-3: problemas galénicos

Apesar dos benefícios para a saúde atribuídos aos ácidos gordos ómega-3, estes apresentam alguns problemas:

(i) O efeito mais negativo universalmente associado à toma de óleos de peixe ricos em ácidos gordos essenciais é o seu cheiro e sabor desagradáveis [42];

(ii) os ácidos gordos essenciais ómega-3 precisam de ser ingeridos na dieta alimentar uma vez que, como já foi referido, no organismo ocorre uma ineficiente conversão de ALA (menor que 1 %) nos seus produtos – o EPA (20 carbonos), o DHA (22 carbonos) e o DPA (22 carbonos) [42];

(iii) os ácidos gordos ómega-3 sofrem de instabilidade química pois contêm ligações insaturadas carbono-carbono que tornam estes compostos muito suscetíveis à oxidação quando expostos ao oxigénio e à luz, com consequente perda do valor nutricional [44].

Assim, existe um interesse crescente na indústria alimentar e farmacêutica no desenvolvimento de alimentos enriquecidos em ómega-3 ou no desenvolvimento de suplementos de ómega-3 que contemplem estratégias que permitam ultrapassar os problemas acima referidos [44]. Deste modo, têm sido desenvolvidos nanossistemas e microssistemas de entrega destes ácidos gordos de modo a protegê-los da ação de pro-oxidantes e de forma a simultaneamente mascarar o seu cheiro e sabor. O sistema mais comum tem sido a veiculação dos ácidos gordos ómega-3 em nanoemulsões ou microemulsões em alimentos líquidos ou semi-líquidos. Outra abordagem é a inclusão em alimentos ou suplementos de ácidos gordos ómega-3 microencapsulados produzidos por secagem por pulverização. Esta abordagem permite uma maior estabilidade oxidativa, quando comparada com o uso de ácidos gordos ómega-3 não encapsulados, contudo ainda é limitada a produtos alimentares secos (por exemplo lactose em pó) devido à baixa solubilidade [45]. Outra abordagem possível para encapsular os óleos de peixe e outros compostos lipofílicos, tais como o β -caroteno, são as nanofibras produzidas por *electrospinning* a partir de soluções poliméricas, como é o caso do álcool polivinílico (PVA) [45] ou da proteína constituinte do milho (*zeína*) [44].

Capítulo 3

Encapsulamento de Compostos Bioativos por *Electrospinning*

3. Encapsulamento de Compostos Bioativos por *Electrospinning*

Os processos de eletrofiação, com base na utilização de campos elétricos intensos, permitem a produção e o controlo de micro e nanomateriais, a partir de soluções poliméricas. Através da seleção adequada dos parâmetros de produção é possível obter nanopartículas (pela técnica de *electrospray*) ou nanofibras (pela técnica de *electrospinning*) [48]. As técnicas têm um método comum, uma vez que ambas utilizam uma alta tensão de forma a induzir a formação de jatos líquidos de polímero que são depositados no coletor na forma sólida pela evaporação do solvente. A principal diferença entre as duas técnicas é que no *electrospinning* há a produção de fibras de um modo contínuo à medida que o jato polimérico é depositado no coletor; enquanto que no *electrosprays* são formadas pequenas gotas pela ruptura do jato eletrificado [49].

O *electrospinning* pode então ser descrito como um método eficiente de produção de fibras, à escala nanométrica e com morfologia e superfície controlada. De acordo com a aplicação pretendida e através da seleção adequada dos parâmetros de produção (descritos com pormenor posteriormente) é possível obter nanofibras com diferentes propriedades e diferentes funcionalidades [49]. De facto, a técnica de *electrospinning* é extremamente versátil e permite obter nanofibras com as mais variadas utilizações, dependendo apenas da imaginação e do interesse industrial. As nanofibras produzidas por *electrospinning* podem ser utilizadas em processos de filtração, na confecção de vestuário militar, desportivo ou outros, na conversão e armazenamento de energia, em nanossensores, na construção de materiais eletrónicos e semi-condutores e ainda nas áreas alimentar, médica e farmacêutica. De entre todas as aplicações das nanofibras poliméricas, as que apresentam maior expressão (maior número de publicações recentes) são as aplicações biomédicas, quer seja em *scaffolds* para engenharia de tecidos, quer seja para o uso das nanofibras poliméricas na entrega de fármacos e outros compostos bioativos [20].

As nanofibras produzidas por *electrospinning* apresentam vantagens relativamente às produzidas por outros métodos, pois apresentam propriedades morfológicas (elevada área superficial e elevada porosidade) que lhes conferem uma elevada eficiência de encapsulamento permitindo a incorporação de fármacos ou compostos bioativos no interior da matriz polimérica ou a adsorção destes à sua superfície. Esta grande capacidade de carga associada a boas propriedades mecânicas permite muitas vezes obter concentrações locais elevadas de fármaco

permitindo assim minorar alguns problemas farmacocinéticos, nomeadamente ao nível da biodisponibilidade e da absorção do fármaco. Outra vantagem das nanofibras poliméricas é poderem ser produzidas de modo a favorecer uma libertação imediata ou mais retardada e sustentada do fármaco de acordo com a opção terapêutica. Para este efeito a escolha criteriosa do polímero ou dos co-polímeros e/ou a sua funcionalização é decisiva. Finalmente, uma outra grande vantagem da técnica de *electrospinning* é que permite a produção de fibras sem qualquer tipo de aquecimento, o que é muito vantajoso para o processamento dos compostos ativos encapsulados que assim podem ser utilizados na indústria alimentar e/ou farmacêutica sem o perigo de sofrerem deterioração [7,45,50,51].

O primeiro estudo que conseguimos identificar em que se usam nanofibras poliméricas especificamente para libertação controlada de fármacos foi efetuado por Kenawy *et al.* [52]. Neste estudo foi utilizada a tetraciclina, como fármaco modelo e o poli (ácido láctico) (PLA) e o poli (acetato de etileno-co-vinilo) (PEVA) como polímeros. A partir deste trabalho pioneiro as características únicas das nanofibras poliméricas têm sido extensivamente usadas e encontram-se referências bibliográficas reportando o encapsulamento e posterior libertação de todos os tipos de fármacos e compostos bioativos. De entre os compostos encapsulados em nanofibras poliméricas encontram-se, por exemplo, proteínas, DNA, ácido ribonucleico (RNA) [20], antibióticos (rifampicina) [53], agentes anticancerígenos (doxorrubicina) [54], enzimas (lípsases e catálases) [55], anticorpos e proteínas (Imunoglobulina G e albumina do soro bovino, respetivamente) [56] e agentes antibacterianos, (como o gluconato de clorexidina) [57], entre outros.

3.1. Origem e desenvolvimento do *electrospinning*

O termo *electrospinning* deriva da junção de '*electrostatic spinning*' que significa rotação/fiação eletrostática. A sua origem remonta a 1897 ano em que Rayleigh descreveu a utilização de forças eletrostáticas para formar fibras, sendo os detalhes investigados no início do século XX por Zeleny [56]. No entanto, só em 1934 é que Formhals patenteou esta técnica. Formhals reportou então a fiação de fibras de acetato de celulose a partir de uma solução polimérica colocada entre dois elétrodos de polaridade oposta. Num dos elétrodos era colocada a solução e no outro um coletor. Os filamentos de polímero eram formados pela ejeção de um jato polimérico entre os dois elétrodos. Neste percurso ocorria a evaporação do solvente e a deposição

da fibra no coletor. Em abordagens posteriores Formhals otimizou este processo permitindo que a distância entre a solução e o dispositivo coletor das fibras pudesse ser alterada, permitindo uma maior ou menor evaporação do solvente [49]. Na década de 1960 o processo de formação do jato foi intensamente estudado por Sir Geoffrey Ingram Taylor, que estudou a formação da gota de polímero na ponta da agulha, induzida por campos elétricos de diferentes intensidades. O seu contributo foi de tal forma importante que hoje em dia, no processo de *electrospinning*, a estrutura que se forma na ponta do tubo capilar (agulha) por aplicação de uma diferença de potencial entre os dois eléctodos, é designada por “cone de Taylor”. Apesar dos inúmeros avanços da técnica foi apenas na década de 1980 que o *electrospinning* ganhou novo destaque pelo seu potencial contributo para a nanotecnologia, uma vez que as estruturas formadas têm dimensões submicrométricas e nanométricas [49,51].

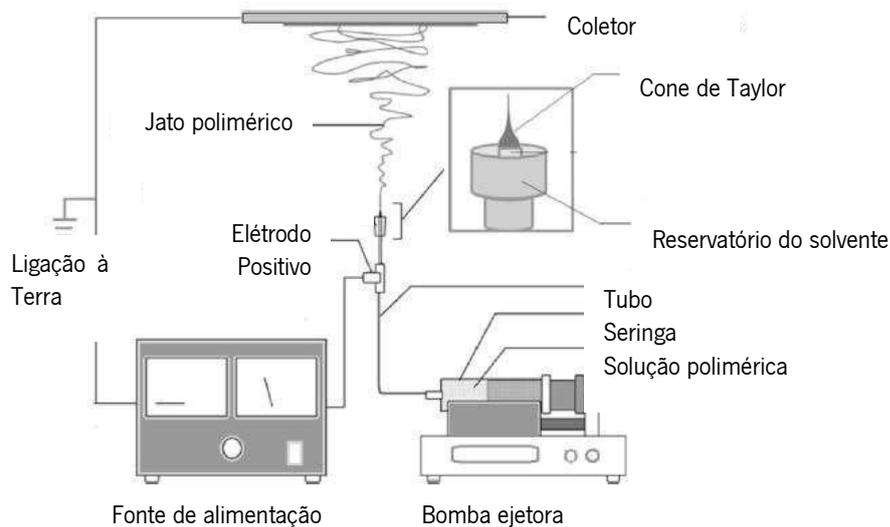


Figura 8 – Representação esquemática da técnica de *electrospinning* vertical. Adaptado de Moomand *et al.* (2015) [58].

Um equipamento típico de *electrospinning* consiste em três componentes principais: i) um tubo capilar ou agulha de pequeno diâmetro onde se encontra acoplada uma seringa ou reservatório contendo a solução polimérica (podendo ou não ter uma bomba ejetora); ii) uma fonte de alta tensão e iii) um dispositivo coletor de metal [20]. O processo de *electrospinning* pode ser realizado com controlo de temperatura e humidade e em duas configurações, vertical ou horizontal [49]. A Figura 8 ilustra uma configuração de *electrospinning* comum. Inicialmente é aplicada uma pressão constante na seringa que contém a solução polimérica e que se encontra a uma distância

fixa do coletor. Com a indução de uma diferença de potencial entre a agulha da seringa e o coletor (da ordem dos quilovolts (kV), geralmente entre 1 e 30 kV) a solução é conduzida para a ponta da agulha e pode ser ejetada em direção a um coletor, ocorrendo a evaporação do solvente no percurso entre a ponta da agulha e o coletor [7,20].

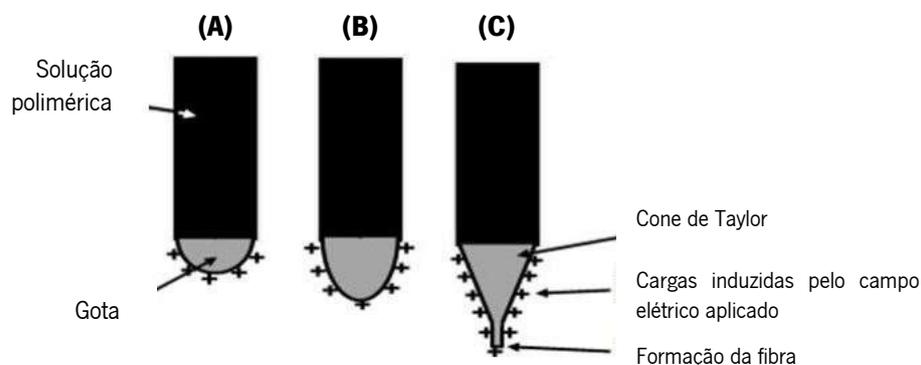


Figura 9 – Esquema da formação do cone de Taylor. Adaptado de Lima, R. (2013) [7]. A – Formação da semiesfera na base do tubo capilar; B – Alongamento da gota e distribuição de cargas ao longo da sua superfície; C – Formação do cone de Taylor pela interação da força de repulsão entre as cargas.

Para a solução polimérica ser ejetada tem de se formar, na extremidade da agulha, uma gota com uma determinada tensão superficial. Quando esta gota é submetida a um campo elétrico, fica eletricamente carregada e são induzidas cargas positivas, uniformemente distribuídas, na sua superfície. A repulsão entre estas cargas positivas origina uma nova força oposta à tensão superficial do líquido. À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, a semiesfera superficial de líquido na ponta da agulha alonga, formando uma estrutura em forma cônica designada por cone de Taylor (Figura 9) [51].

Quando o valor do campo elétrico é superior ao valor da repulsão entre as cargas, ultrapassa-se o valor crítico da tensão superficial do polímero e ocorre a formação de um jato, que é então ejetado a partir da ponta da agulha, em direção ao coletor. Neste percurso o jato sofre um processo de instabilidade, alonga e torna-se fino. Antes de atingir o coletor o filamento solidifica, pela evaporação do solvente. As fibras são recolhidas no coletor com uma orientação aleatória. A orientação das fibras pode ser induzida com recurso a um coletor em rotação [7,20].

A literatura reporta mais de 50 polímeros que foram testados e a partir dos quais se produziram nanofibras com diâmetros que vão desde os 3 nm até 1 mm. Na Tabela 3 estão enumerados exemplos de vários destes polímeros, com os quais é possível produzir nanofibras, assim como os respetivos solventes [51].

Tabela 3 – Exemplos de alguns polímeros e solventes usados para a produção de nanofibras e respetiva aplicação. Adaptado de Huang *et al.* (2003) [51].

Polímero	Solvente	Concentração	Aplicação
Nylon 6,6	Ácido fórmico	10 wt %	Vestuário
PU	DMF	10 wt %	Vestuário e filtros de eletrodomésticos
PBI	Dimetilacetamida	10 wt %	Vestuário
PC	DMF:tetrahidrofurano (1:1)	10 wt %	Proteção de vestuário, sensores e filtros
	Diclorometano	15 wt %	
PAN	DMF	-	Nanofibras de carbono
PLA	DMF	-	Cirurgia e sistemas de entrega de fármacos
PEVA	-	14 wt %	Sistemas de entrega de fármacos
PEVA/PLA	-	14 wt %	Sistemas de entrega de fármacos
PEO	Água destilada	7-10 wt %	Microeletrónica
	Água destilada:etanol (3:2)	4 wt %	
Colagénio/PEO	Ácido clorídrico	1-2 wt %	Cicatrização de feridas, engenharia de tecidos, agentes hemostáticos
PANI/PS	Clorofórmio	-	Fibras condutoras
PA	Dimetilacetamida	-	Processos de filtração
PCL	Clorofórmio:metanol (3:1), tolueno:metanol (1:1), diclorometano:metanol (3:1)	-	Sistemas de entrega de fármacos
PAN/TiO ₂			Polímeros condutores e fotovoltaicos
PCL/metais			Cosmética
Poli (álcool de etileno-co-vinilo)	Isopropanol:água (70:30)	2,2-20 wv%	Biomédica
PLGA	Tetraidrofurano:DMF	1g/20MI	<i>Scaffold</i> para engenharia de tecidos

Abreviaturas: Poli (acetato de etileno-co-vinilo) (PEVA); Poli (ácido láctico) (PLA); Dimetilformamida (DMF); Poli (óxido de etileno) (PEO); Poliacrilonitrila (PAN); Polianilina (PANI); Poliamina (PA); Polibenzimidazol (PBI); Policaprolactona (PCL); Policarbonato (PC); Poliestireno (PS) e Poliuretano (PU);

3.2. Parâmetros do *electrospinning*

Como já se disse, o processo de *electrospinning* está dependente de vários parâmetros de processamento que determinam a qualidade das nanofibras obtidas. De acordo com Mit-uppatham os parâmetros a controlar no processo de produção das fibras estão associados à solução polimérica, ao processamento propriamente dito e aos parâmetros ambientais, tal como esquematizado na Tabela 4. Perceber estes parâmetros e o modo como eles influenciam a estrutura e a qualidade final das nanofibras é de extrema importância, pois pretende-se que o processo de *electrospinning* permita controlar o diâmetro das fibras obtidas, que estas tenham uma dispersão de tamanhos pequena, que apresentem uma superfície contínua e sem defeitos e que todo o processo seja reproduzível [49].

Tabela 4 – Parâmetros envolvidos no processo de *electrospinning*.
Adaptado de Mit-uppatham *et al.* (2004) [59].

Parâmetros associados à solução polimérica	Parâmetros de processamento	Parâmetros ambientais
Estrutura do polímero	Intensidade do campo elétrico	Temperatura
Concentração	Taxa de fluxo	Humidade relativa
Massa molecular	Distância agulha-coletor	Velocidade do fluxo de ar
Viscosidade	Pressão hidrostática	
Condutividade	Velocidade de rotação do coletor (caso exista)	
Tensão superficial		

3.2.1. Parâmetros associados à solução polimérica

Os parâmetros associados às propriedades da solução polimérica dependem do par polímero/solvente, da estrutura do polímero, da massa molecular, da concentração, da viscosidade, da tensão superficial da solução e da condutividade elétrica [49,51].

A primeira etapa na produção de nanofibras por *electrospinning* é a solubilização do polímero num dado solvente com uma determinada concentração. Assim, diferentes polímeros exigem diferentes solventes, implicando alterações nos restantes parâmetros [59]. O solvente deve ser capaz de dissolver o polímero assim como os compostos que se pretende veicular. A

solubilidade de um composto está relacionada com a sua estrutura molecular e com a temperatura podendo ser promovida pelo aquecimento e agitação constantes da solução. Outra das características imputadas ao solvente é a constante dielétrica. Esta afeta a morfologia das fibras uma vez que permite o transporte de cargas potenciando o alongamento contínuo e fluido do jato. Lima, R. estudou a influência do uso de diferentes solventes na produção de fibras de PEO por *electrospinning* tendo verificado que quanto maior a constante dielétrica do solvente, menor é o tamanho na fibra produzida [7]. Na Tabela 5 encontra-se uma lista de polímeros com os quais é possível produzir nanofibras por *electrospinning* assim como os solventes utilizados e respetivas constantes dielétricas.

Tabela 5 – Constantes dielétricas para diversos solventes, adaptado de Lima, R. (2013) [7].

Solvente	Constante Dielétrica (ϵ) (a 25 °C)
Água destilada	80,20
Dimetilformamida	36,71
Metanol	32,60
Etanol	24,55
Acetona	20,70
2-propanol	18,30
Diclorometano	8,93
Ácido acético	6,15
Clorofórmio	4,80

Para além do solvente, um dos parâmetros mais significativos e que mais influencia o processo de produção das fibras é a viscosidade da solução polimérica que afeta quer a morfologia das nanofibras, quer o seu diâmetro [51]. A viscosidade, a concentração e a massa molecular do polímero são aliás três parâmetros que não podem ser analisados separadamente uma vez que estão relacionados uns com os outros. De um modo geral a viscosidade de uma solução é ajustada pela concentração do polímero na mesma. Assim, quando um polímero é dissolvido num solvente, verifica-se que a viscosidade da solução aumenta com o aumento da concentração do polímero. Sabe-se ainda que um aumento da viscosidade leva a um aumento no diâmetro das nanofibras. Demir *et al.* mostrou que, em certas condições, o diâmetro das nanofibras é proporcional ao cubo da concentração [49,51]. A Figura 10 ilustra a formação de nanofibras de PCL a partir de soluções

de ácido acético com concentrações crescentes de PCL entre 14 a 26 wt% (A-E). Na mesma imagem é possível observar o aspecto de nanofibras de PCL obtidas a partir de uma solução de PCL em clorofórmio a 8 wt % (F).

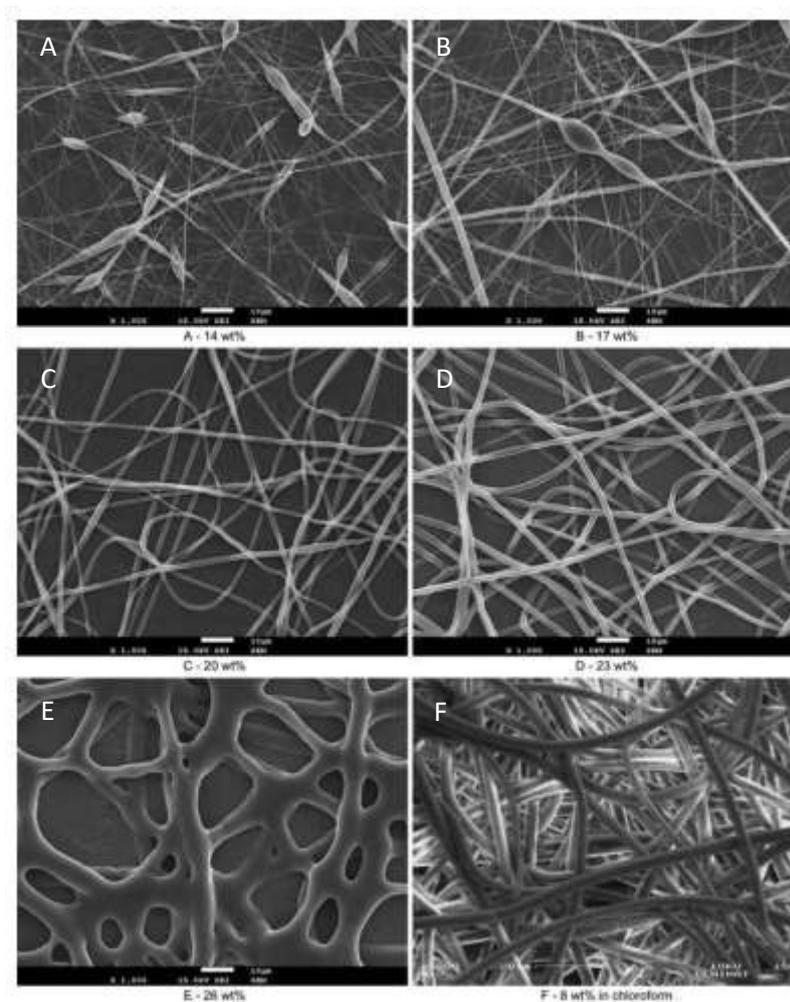


Figura 10 – Efeito da concentração de PCL na morfologia das nanofibras. (A) solução de ácido acético a 14 wt%; (B) solução de ácido acético a 17 wt%; (C) solução de ácido acético a 20 wt%, (D) solução de ácido acético a 23 wt %; (E) solução de ácido acético a 26 wt% e (F) clorofórmio a 8 wt%.

Adaptado de Ferreira *et al.* (2014).

Em conclusão, para cada polímero deve ser otimizada a concentração que permita obter uma solução polimérica de viscosidade adequada à produção de fibras com a dimensão e morfologias pretendidas. Concentrações muito baixas, que originam soluções poliméricas de viscosidade muito baixa (inferior a 1 poise), impossibilitam a obtenção de fibras e levam à deposição de pequenas esferas (*beads*) associadas ao *electrospraying*. Concentrações muito altas

originam soluções poliméricas de viscosidade elevada, o que resulta numa menor formação de fibras por dificuldade de ejeção do jato de solução polimérica.

Outro dos parâmetros que é influenciado pela concentração da solução polimérica é a sua tensão superficial, sendo que a tensão superficial é um fator muito importante em soluções com baixa viscosidade. Uma solução mais concentrada resulta num maior valor de tensão superficial e por isso o campo elétrico aplicado terá de ser também mais elevado para se iniciar o processo de formação da fibra [60]. A tensão superficial por sua vez é fortemente influenciada pelo solvente utilizado. Regra geral, a redução da tensão superficial contribui para a formação de nanofibras com maior qualidade, contudo valores baixos de tensão nem sempre possibilitam a produção de nanofibras. Yang *et al.* estudou o efeito da tensão superficial na superfície de nanofibras de polivinilpirrolidona (PVP), com diferentes solventes (etanol, DMF) e verificou, que a tensão superficial é dependente do solvente, obtendo nanofibras com melhor qualidade por redução da tensão superficial [49].

A condutividade e a tensão superficial de uma solução são determinadas pela combinação de polímero/solvente e pela presença de sais ionizáveis na solução. De uma forma geral, os polímeros são maioritariamente não condutores mas podem apresentar grupos ionizáveis. A presença destes grupos ionizáveis influenciam o transporte das cargas no jato resultando numa maior ou menor tensão superficial [7]. Geralmente soluções com maior condutividade levam a uma melhoria no rendimento do processo de *electrospinning*, favorecendo a recolha das fibras do coletor e a formação de nanofibras de menor diâmetro. A adição de sais na solução aumenta a sua condutividade e a tensão superficial da solução, sendo os sais mais utilizados o KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 e o NaCl [49]. Estudos indicam que 1 wt% de sais resulta numa maior densidade de carga na superfície do jato, favorecendo o alongamento do jato, tendo como resultado a diminuição do número de agregados e a diminuição do diâmetro da fibra [51].

A massa molecular do polímero também é um importante parâmetro uma vez que este afeta a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. Para uma concentração fixa, polímeros com baixa massa molecular formam soluções menos viscosas e tendem a formar grânulos em vez de fibras; por outro lado, polímeros com elevada massa molecular formam soluções mais viscosas e tendem a dar origem a fibras com um grande diâmetro. A Figura 11 mostra diferentes estruturas obtidas a partir de fibras produzidas a partir do mesmo polímero e com a mesma concentração, mas com diferentes massas moleculares [49].

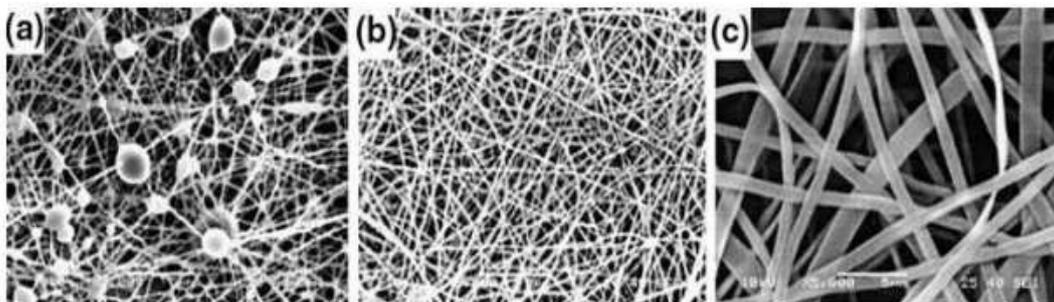


Figura 11 – Imagens de SEM de nanofibras obtidas a partir de soluções de PCL de igual concentração (25 wt%) mas diferentes massas moleculares: (a) 9.000-10.999 g mol⁻¹, (b) 13.000-23.000 g mol⁻¹ e (c) 31.000-50.000 g mol⁻¹. Adaptado de Karakas, H. (2015) [49].

3.2.2. Parâmetros de processamento

Os parâmetros de processamento incluem a intensidade do campo elétrico aplicado, a taxa de fluxo, a distância agulha-coletor, a pressão hidrostática no capilar e a velocidade de rotação do coletor (caso não seja um coletor fixo) [49,51].

A tensão aplicada é um fator importante no processo de *electrospinning*, uma vez que deve ser superior à tensão superficial de modo a que ocorra a formação do jato a partir do cone de Taylor [49]. Apesar de ser um parâmetro amplamente estudado, não há consenso entre a comunidade científica quanto à influência da tensão aplicada pelo campo elétrico na produção de nanofibras por *electrospinning*. Reneker *et al.* mostrou que a tensão aplicada não é um fator determinante para o diâmetro das fibras, desde que esta seja suficiente para que ocorra a ejeção do jato polimérico. Por outro lado Zhang *et al.* mostrou que para voltagens mais elevadas há uma maior ejeção de polímero resultando na formação de nanofibras de maior diâmetro. Outros autores referem ainda que o aumento da tensão favorece a formação de nanofibras com menor diâmetro. Desde modo deve ser encontrado um valor ótimo de tensão aplicada que permita a formação do jato polimérico e evite o gotejamento da solução [49]. Este valor de tensão está diretamente relacionado com a distância entre a agulha e o coletor: o aumento da distância requer uma maior tensão aplicada. O aumento da distância também favorece a evaporação do solvente e a redução do diâmetro das fibras [7].

A taxa de fluxo do polímero controla a formação da gota a partir da qual se forma o cone de Taylor e está relacionada com a velocidade de esvaziamento da seringa. Assim, quanto maior

for a gota formada maior será a área de superficial do cone de Taylor, levando a uma maior dispersão das cargas. Consequentemente ocorrerá instabilidade da estrutura polimérica potenciando a formação de agregados e o aumento do diâmetro das fibras [7]. A taxa de fluxo deve ser ajustada de forma a permitir o esvaziamento contínuo da seringa (devendo ser ajustada de acordo com a viscosidade da solução, o campo elétrico e o diâmetro da agulha). Este esvaziamento depende maioritariamente do solvente utilizado. Uma taxa de fluxo mais lenta favorece uma maior evaporação do solvente, contudo a taxa de fluxo também não deve ser demasiado lenta de modo a impedir que o polímero solidifique na extremidade da agulha [49].

O diâmetro interno da agulha também influencia o tamanho da gota formada, e deve ser de tal forma que possibilite a formação de um jato contínuo. Um diâmetro interno de agulha muito elevado vai levar à formação de uma gota com elevada área superficial e portanto originará fibras de maior diâmetro. Já um diâmetro interno da agulha muito baixo impede a formação de um fluido contínuo favorecendo a solidificação do polímero no interior da agulha [7].

Por último, um outro parâmetro de processamento a ter em conta é o coletor, ou seja, o substrato onde será depositada a fibra. É possível utilizar um coletor com uma superfície plana onde a fibra se deposita numa ordem aleatória e sem orientação preferencial. Para uma determinada aplicação quando é necessária uma arquitetura da fibra com uma determinada direção (alinhamento), pode ser utilizado um coletor com rotação (cilindro) de forma a induzir o alinhamento das fibras. Deste modo é necessário ajustar a velocidade do coletor de acordo com a taxa de fluxo. Uma elevada taxa de rotação do coletor pode levar à rutura da fibra [20,49].

3.2.3. Parâmetros ambientais

Os parâmetros ambientais nomeadamente a temperatura, a humidade relativa e o fluxo de ar são de extrema importância afetando não só o diâmetro, mas como também a morfologia da fibra.

A temperatura tem uma relação inversa com a tensão superficial e a viscosidade da solução, por outro lado o aumento da temperatura aumenta a condutividade da solução. A temperatura afeta diretamente a taxa de evaporação do solvente, assim um aumento da temperatura pode apresentar-se vantajoso para solventes com elevado ponto de ebulição, no entanto, para solventes mais voláteis, como o caso do metanol ou do clorofórmio o aumento da

temperatura (acima da temperatura ambiente) pode inviabilizar a produção de nanofibras pela rápida evaporação do solvente [7].

A humidade tem um efeito similar à temperatura uma vez que condiciona a evaporação do solvente. Uma percentagem baixa de humidade promove uma melhor evaporação do solvente, contudo se for extremamente baixa provoca a solidificação do polímero no interior da agulha. Por outro lado, uma elevada humidade relativa promove uma adsorção das moléculas de água junto ao cone de Taylor devido às diferenças de pressão, inviabilizando o processo de formação de fibras [7]. Foi descrito que uma humidade relativa inferior a 35 % é a ideal para executar esta técnica. Uma humidade superior a 35 % torna difícil a formação de um jato polimérico contínuo [20,49].

O fluxo de ar na câmara de *electrospinning* não se relaciona de modo significativo com a produção das nanofibras mas com a sua deposição no coletor. A espessura das fibras é da ordem dos nanómetros pelo que a sua massa é baixa e qualquer fluxo de ar na câmara de *electrospinning* pode provocar uma interrupção na deposição das fibras [7].

3.3. Polímeros/biopolímeros aprovados pela FDA para veiculação de compostos

Como referido, existe um interesse crescente no uso de nanofibras para aplicações biomédicas, nomeadamente para a veiculação de fármacos já que estes sistemas apresentam algumas vantagens: facilidade de produção; elevada capacidade de carga (possibilitando a entrega simultânea de mais que um fármaco ou composto bioativo); possibilidade de controlo da libertação do composto ativo, e facilidade na entrega de fármacos em aplicações tópicas (exemplo em feridas e locas cirúrgicas) [20]. Perante uma aplicação biomédica é necessário um cuidado especial com os polímeros e biopolímeros usados de forma a assegurar a biocompatibilidade das nanofibras produzidas. Têm sido estudados vários polímeros, incluindo polímeros naturais (também designados biopolímeros) ou polímeros sintéticos, biodegradáveis ou não, ou uma mistura de ambos. De um modo geral os polímeros sintéticos permitem uma grande flexibilização na síntese e na modificação da sua estrutura apresentando em contrapartida baixa afinidade para as células. Por outro lado, os polímeros naturais tendem a apresentar uma boa biocompatibilidade (e conseqüente baixa toxicidade). Exemplos de polímeros sintéticos são o ácido láctico (PLA), a policaprolactona (PCL), o poli (óxido de etileno) (PEO), o poli (ácido glicólico) (PGA) e copolímeros como o poli (ácido láctico-co-caprolactona) (PCLA), o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), entre

outros. Destes polímeros, os poliésteres (PLA, PGA, PLGA e o PCL) são os mais utilizados para obter uma libertação sustentada de fármacos e/ou compostos bioativos [61]. Os polímeros naturais mais estudados incluem polissacarídeos (ex: celulose, quitina e quitosano) e proteínas (ex: colagénio, seda, proteínas do milho) quer de origem animal, quer de origem vegetal.

Tabela 6 – Exemplos de fármacos/compostos encapsulados em nanofibras produzidas por *electrospinning*. Adaptado de Pillay *et al.* (2013) [8] e Hu *et al.* (2014) [20].

Polímero	Fármaco/Composto	Solvente
PLA, PEVA e PLA/PEVA	Cloridrato de tetraciclina	Clorofórmio
PLA/PCL	Cloridrato de tetraciclina	Clorofórmio e DMF
PCLEEP	siRNA	Água sem RNase
PCL	siRNA	TFE
PCL	Resveratrol, gentamicina	DCM/metanol (7:3)
PCL-co-PCLEEP	GDNF	DCM
PCL-co-PCLEEP	NGF	DCM
PLGA	Ácido fusídico e rifampicina	THF e DMF
EC e PVP	Cloridrato de tetraciclina	Etanol aquoso
PLGA e quitosano	Ibuprofeno	DMF
PVP/zeína	Cetoprofeno	Etanol aquoso
PLGA	Paclitaxel	DCM e DMF
PLGA	Cefoxitina	DMF
PLLA	Doxorrubicina	Clorofórmio e DMSO
PLA/PLGA	Cisplatina	DCM

Abreviaturas: Poli (acetato de etileno-co-vinilo (PEVA); Poli (ácido láctico) (PLA); Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA); Diclorometano (DCM); Dimetilformamida (DMF); Dimetilsulfóxido (DMSO); Etil celulose (EC); Fator de crescimento nervoso humano β (NGF); Fator neurotrófico derivado de células da glia humanas (GDNF); Policaprolactona (PCL); Poli(fosfato- ϵ -caprolactona-co-etil) etileno (PCLEEP); Polivinilpirrolidona (PVP); Tetrahydrofurano (THF); 2,2,2-trifluoroetanol (TFE);

Os antibióticos são os fármacos mais comumente veiculados em nanofibras, tais como o cloridrato de tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, cloreto de benzalcónio (BC) e nanopartículas de ácido fusídico ou prata. Os fármacos anticancerígenos são outro grande grupo de fármacos encapsulados em nanofibras como agentes de quimioterapia local, nomeadamente a doxorrubicina, o paclitaxel e a cisplatina. Outros agentes encapsulados em nanofibras poliméricas incluem moléculas bioativas como proteínas, DNA, RNA e fatores de crescimento. Na Tabela 6

estão representados alguns exemplos, dos mais representativos da literatura, de polímeros e solventes usados para a produção de nanofibras para entrega de fármacos ou moléculas bioativas [8,20].

Neste trabalho produziram-se dois tipos de nanofibras, constituídas por um polímero sintético (PCL) e por um biopolímero (zeína), cujas propriedades a seguir se descrevem.

3.3.1. Policaprolactona

O PCL é um polímero sintético da família dos poliésteres alifáticos. Apresenta uma estrutura semi-cristalina e linear com baixo ponto de fusão (58-63 °C) e uma temperatura de decomposição térmica superior a 300 °C. Apresenta uma temperatura de transição vítrea aos - 65 a - 60 °C, uma elevada ductilidade e plasticidade, com uma elongação de 300 a 500 %. Os principais solventes do PCL são a acetona, o clorofórmio, o cloreto de metileno e o hexafluoropropanol. O método principal para a síntese de PCL é a polimerização do anel ϵ -caprolactona com um álcool e o 2-etilhexanoato ($C_{16}H_{30}O_4Sn$) como catalisador (Figura 12) [6,62-64].

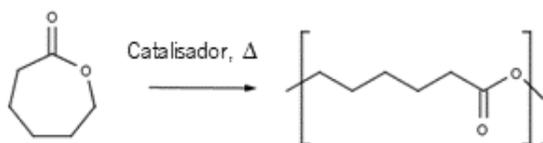


Figura 12 – Síntese de PCL pela polimerização do anel ϵ -caprolactona. Desenhado no *software MarvinSketch64*. Adaptado de Hasan *et al.* (2014) [64].

Devido ao seu estado semi-cristalino e natureza hidrofóbica, o PCL exibe uma taxa de degradação lenta (entre 2 a 4 anos, dependendo da massa molecular, geralmente entre 3.000 a 100.000 $g \cdot mol^{-1}$). Este polímero é no entanto considerado biodegradável e biocompatível e foi aprovado pela FDA desde a década de 1980 como dispositivo para a libertação de fármacos e material de sutura. Deste modo, o PCL e os seus copolímeros podem ser utilizados na produção de sistemas para administração de fármacos (na preparação de fibras por *electrospinning*, e em processos de fabrico de formas sólidas, como micro e nanopartículas) [63]. A principal

desvantagem do PCL é a sua hidrofobicidade que o torna insolúvel em solventes aquosos e que lhe confere baixa molhabilidade e baixa adesão celular. De facto, fibroblastos cultivados em contacto com nanofibras de PCL ou a partir de filmes de PCL mostraram uma fraca adesão celular, pelo que este não é o polímero ideal para a produção de *scaffolds* em engenharia de tecidos. Como forma de melhorar a adesão celular, as nanofibras de PCL podem ser sujeitas a processos de pós-produção com o objetivo de modificar a sua superfície através do revestimento com um material com hidrofobicidade adequada. A literatura descreve quatro principais modificações na superfície de nanofibras de PCL, que incluem: i) tratamento químico do PCL com hidróxido de sódio (NaOH) de forma a promover uma hidrólise alcalina; ii) revestimento ou adsorção de proteínas com o intuito de aumentar o reconhecimento e a interação celular; iii) tratamento com plasma de forma a melhorar lipofilicidade e a diminuir o ângulo de contacto com o meio, pela formação de grupos OH terminais, e iv) tratamento com compostos biologicamente ativos de forma a aumentar o reconhecimento celular. Assim é possível uma adesão melhorada e uma disposição homogénea por toda a superfície. O PCL pode ainda ser conjugado com outros polímeros de forma a melhorar as suas propriedades [60,63].

3.3.2. Zeína

A zeína é a principal proteína de armazenamento do milho (*Zea mays*), correspondendo a 40-50 % do total de proteínas desta planta [65,66]. Em 1821, Gorham isolou a zeína do milho, contudo a sua constituição foi apenas identificada em 1897. Trata-se de um polímero natural, com uma massa molecular de 35-40 kDa que exhibe propriedades anfifílicas uma vez que possui na sua composição igual número de aminoácidos hidrofílicos e lipofílicos (Figura 13). Para além da afinidade química que a zeína possui, quer para compostos hidrofílicos quer para compostos lipofílicos, estruturalmente este polímero também possui muitos espaços intramoleculares com elevado potencial para o encapsulamento e transporte de moléculas no seu interior [45,48].

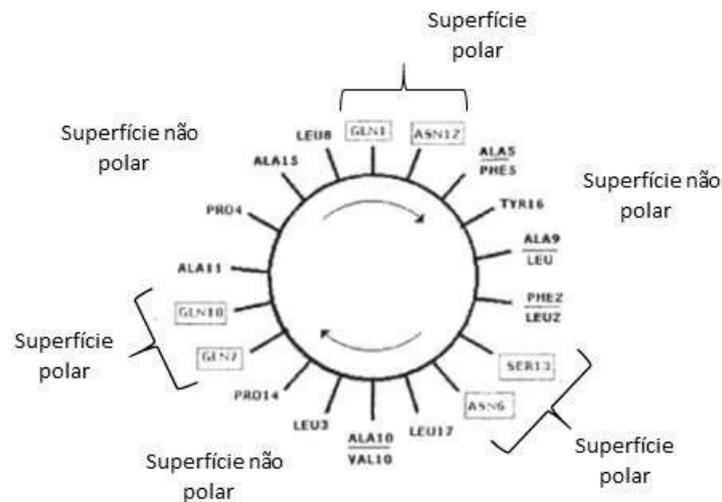


Figura 13 – Estrutura molecular da zeína. Adaptado de Sunguc, C. (2013)

As principais propriedades físico-químicas da zeína comercial encontram-se resumidas na Tabela 7 [66].

Tabela 7 – Resumo das principais propriedades da zeína comercial. Adaptado de Patel & Velikov (2014) [66]

Propriedades	Características
Aparência	Pó amarelo com forma amorfa
Massa molecular	≈ 35-40 kDa
Composição	Principais aminoácidos não-polares: Leucina (19,3 wt%), Prolina (9,0 wt%), Alanina (8,3 wt%), Principais aminoácidos polares: Ácido glutâmico (22,9 wt%), Serina (5,7 wt%) Tirosina (5,1 wt%)
Ponto iso-elétrico	pH 6,2
Temperatura de transição vítrea	165 °C
Temperatura de degradação térmica	320 °C
Solubilidade	Solventes primários: glicóis, éteres de glicol, amino-álcoois, ácidos nitro-álcool, amidas e aminas Solventes secundários: soluções aquosas de álcoois alifáticos e cetonas.

A zeína possui vantagens relativamente aos sistemas hidrofílicos, permitindo uma maior encapsulação de compostos (nutrientes, fármacos ou compostos bioativos), diminuindo a absorção de água e aumentando a vida útil destes compostos ao formar filmes que conferem proteção contra a luz, temperatura e oxidação. Outras vantagens da zeína são a sua elevada absorção e a baixa toxicidade dos produtos resultantes da sua degradação [48]. Por outro lado, a zeína é resistente às enzimas digestivas apresentando uma digestibilidade lenta ao nível do trato gastrointestinal. Relativamente aos sistemas lipofílicos (como o PCL), a zeína também apresenta uma maior adesão celular. Pelas suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, a zeína foi um dos poucos biopolímeros aprovados pela FDA para uso na indústria alimentar e farmacêutica apresentando inúmeras aplicações em engenharia de tecidos, na entrega controlada de fármacos, na cosmética e na embalagem de alimentos [48]. Na indústria alimentar, nanopartículas de zeína foram reconhecidas como seguras para incorporação de compostos em matrizes de alimentos [48,66]. Na investigação farmacêutica, Fu *et al.* reportaram a utilização de zeína na microencapsulação de insulina, ivermectina e heparina. No mesmo estudo os autores produziram microesferas de zeína para revestimento de antibióticos, como a ciprofloxacina, com aplicação na prevenção de infeções bacterianas [65]. Recentemente têm sido desenvolvidas nanofibras de zeína para a encapsulação de compostos bioativos. Yeum *et al.* descreve a produção de nanofibras de zeína com estratos naturais de sorgo (*Sorghum bicolor*). O sorgo é uma planta natural de reconhecida importância na cultura de cereais e fonte de fitoquímicos (taninos, ácidos fenólicos, antocianinas, fitoesteróis e policosanóis) que possuem importantes atividades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, antimicrobiana, efeitos anticancerígenos e impacto na redução do colesterol e no risco de doenças cardiovasculares [18].

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

O principal objetivo da presente dissertação é o desenvolvimento de um nanossistema polimérico, com encapsulação de dois compostos bioativos (o ACV e os ácidos gordos ómega-3) para aplicação tópica para o tratamento de infeções herpéticas. Os polímeros que compõem a matriz polimérica são os referidos nos pontos 3.3.1. e 3.3.2., o PCL e a proteína zeína, respetivamente. Numa primeira fase foram efetuados estudos de pré-formulação onde se pretendeu avaliar qual o sistema mais promissor, comparando-o com a formulação comercial Zovirax™ creme. Para tal procedeu-se à encapsulação de cada um dos compostos bioativos em cada uma das matrizes poliméricas referidas. Após uma análise preliminar foi selecionado o PCL como matriz polimérica mais promissora para os objetivos em vista. Deste modo, foi então efetuada a coencapsulação do ACV e dos ácidos gordos ómega-3 neste sistema polimérico, procedendo-se à sua caracterização. A metodologia desenvolvida ao longo da dissertação está esquematizada abaixo (Figura 14).

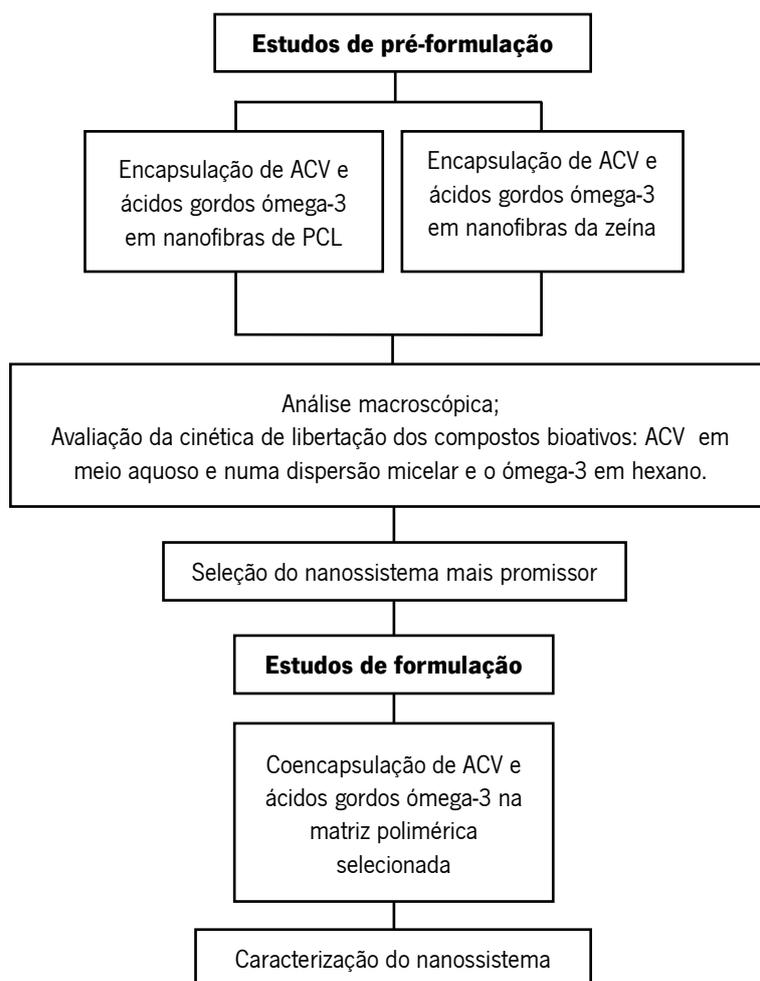


Figura 14 – Metodologia desenvolvida ao longo do trabalho.

4.1. Materiais e compostos químicos utilizados ao longo do trabalho

Na Tabela 8 listam-se os reagentes e os solventes usados na preparação das soluções poliméricas bem como os usados na preparação dos meios para a libertação dos princípios ativos.

Tabela 8 – Reagentes e solventes usados na preparação das soluções poliméricas e dos meios usados nos estudos de libertação controlada.

Composto químico	Características	Fornecedor
PCL	PM = 80.000 Da	Sigma Aldrich, Reino Unido-500G
zeína	_____	Sigma Aldrich, USA-500G
ACV	PM = 225,21 g mol ⁻¹	Oferta da Labesfal Genéricos, S.A.
ómega-3	_____	MyProtein The Hut Group, Reino Unido
Zovirax™ 50 mg g ⁻¹ creme	_____	GlaxoSmith Consumer Healthcare, Algés, Portugal.
clorofórmio	GP ≥ 99,5 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Alemanha
metanol	GP ≥ 99,8 %	Merck KGAA, 64271 Darmstadt, Alemanha
etanol	GP ≥ 99,8 %	VWR International S.A.S., França
hexano	GP ≥ 99 %	Sigma Aldrich, Alemanha-1L
sulfato de lauril e sódio	MM = 274,35 g mol ⁻¹	BHD Chemicals Ltd, Inglaterra
fosfato de sódio decahidratado	MM = 380,12 g mol ⁻¹	Sigma Aldrich, Alemanha-1 Kg
ácido bórico	MM = 61,83 g mol ⁻¹	Sigma Aldrich, USA-500 g
ácido cítrico	MM = 210,14 g mol ⁻¹	Sigma Aldrich, USA-500 g

GP – grau de pureza; MM – massa molecular;

Na Tabela 9 estão indicados os reagentes e os compostos utilizados na preparação do meio para o estudo de viabilidade celular, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza). Os frascos de cultura e as placas de cultura de tecidos de 96 poços foram fornecidos pela Corning Inc., EUA.

Tabela 9 – Reagentes e compostos utilizados na preparação do meio para o estudo de viabilidade celular.

Composto químico	Características	Fornecedor
soro fetal bovino	10 % (v/v)	FBS, Merck Millipore
penicilina	1 % (v/v) 100 U mL ⁻¹	Merck Millipore
estreptomicina	100 µg mL ⁻¹	Merck Millipore
aminoácidos não essenciais	1 % (v/v)	NEAA, Merck Millipore
brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio (MTT)	GP > 99,5 %	Sigma Aldrich
dimetilsulfóxido (DMSO)	GP > 99,7 %	Sigma Aldrich
Triton X-100	1 %	Spi-Chem

GP – grau de pureza.

4.2. Preparação das soluções poliméricas

Tendo por base o descrito por Ferreira *et al.* (2014) [60], que refere a preparação de soluções poliméricas de PCL em clorofórmio com uma concentração de 8 % m/m, prepararam-se soluções de PCL com uma concentração de 0,12 g de polímero por mL de solução. Prepararam-se ainda soluções de PCL, com igual concentração, num solvente misto clorofórmio/metanol, num rácio de 2:3 [63]. De modo a encapsular o ACV nas nanofibras de PCL, prepararam-se soluções com concentrações crescentes de fármaco, desde 1 % m/v até 4 % m/v. As soluções contendo ómega-3 foram preparadas tendo em conta o artigo de Moomand *et al.* (2014) [44] que refere uma concentração de óleos gordos de cerca de 30% em massa relativamente à massa do polímero. Assim, adicionaram-se sempre cerca de 0,2 g de ómega-3 às soluções poliméricas contendo 0,6 g de PCL. Estas condições estão sistematizadas na Tabela 10.

As soluções obtidas a partir da proteína zeína foram preparadas em misturas de etanol e água, tendo por base o diagrama de fases para a solubilidade da zeína que se mostra na Figura 15. Foram testadas várias concentrações de zeína e vários rácios etanol/água até nos fixarmos nas condições apresentadas na Tabela 11. Nas soluções de zeína com ómega-3, como a massa de polímero é de 1,25 g, para manter a mesma percentagem em massa (30 % relativamente à massa de polímero) adicionaram-se cerca de 0,375 g de ómega-3.

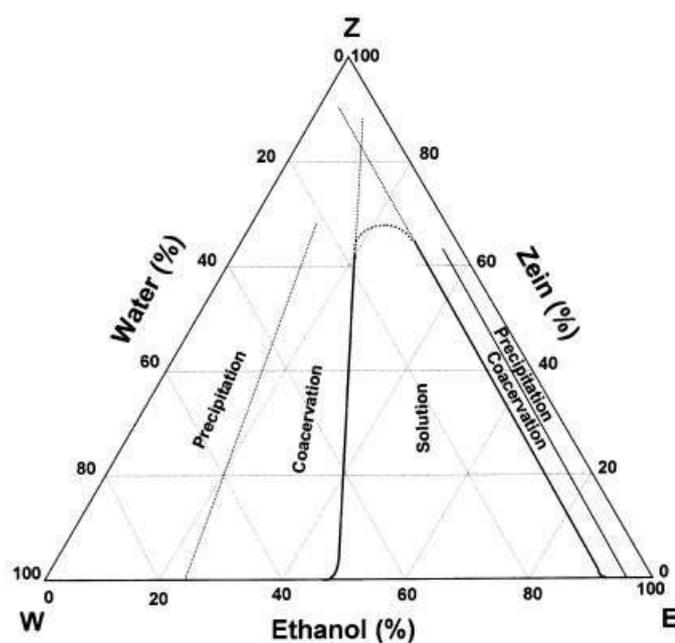


Figura 15 – Diagrama de fases para a solubilidade da zeína em etanol e água (adaptado de Shukla & Munir (2001) [67]).

Tabela 10 – Condições de preparação das soluções poliméricas.

	Polímero (massa, g)	Solventes (volume, mL)	Princípios ativos (massa, g)
1	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (5 mL)	————
2	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	————
3	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	ACV (0,05 g)
4	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	ACV (0,1 g)
5	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	ACV (0,2 g)
6	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	Ómega-3 (0,2 g)
7	Zeína (1,25 g)	CH ₃ CH ₂ OH (4 mL):H ₂ O (1 mL)	————
8	Zeína (1,25 g)	CH ₃ CH ₂ OH (4 mL):H ₂ O (1 mL)	ACV (0,15 g)
9	Zeína (1,25 g)	CH ₃ CH ₂ OH (4 mL):H ₂ O (1 mL)	Ómega-3 (0,375 g)
10	PCL (0,6 g)	CHCl ₃ (2 mL):CH ₃ OH (3 mL)	ACV (0,1 g) + Ómega-3 (0,2 g)

As soluções poliméricas de PCL foram preparadas adicionando lentamente e sob constante agitação magnética (200 rpm) o polímero ao solvente, de modo a promover a dissolução completa do polímero. Nas soluções em que se incorporou o ACV foi utilizada uma mistura de clorofórmio e metanol. O ACV foi adicionado lentamente ao mesmo tempo que o PCL. Nas soluções contendo ómega-3 este foi adicionado prévia e lentamente no solvente (mistura clorofórmio/metanol) e só depois se iniciou a adição do PCL.

As soluções poliméricas de zeína foram preparadas de modo idêntico dissolvendo-se o polímero, lentamente e sob agitação magnética, na mistura de solventes (etanol e água). A adição do ACV foi feita ao mesmo tempo da do polímero. O ómega-3 foi adicionado previamente aos solventes e só depois se adicionou a zeína.

Para além destas soluções foram ainda preparadas soluções de PCL com incorporação simultânea de ACV e do composto bioativo ómega-3. Para a preparação das soluções poliméricas de PCL com ACV e ómega-3, foram pesados 0,6 g de PCL, 0,1 g de ACV e 0,2 g de ómega-3, que foram dissolvidos, lentamente e sob agitação magnética, em 5 mL numa mistura de clorofórmio e metanol (2:3).

4.3. Produção das nanofibras poliméricas por *electrospinning*

No processo de *electrospinning*, já descrito anteriormente, há muitos parâmetros que podem ser alterados e que influenciam a qualidade das fibras produzidas. Sabe-se ainda que só certos conjuntos de condições de processamento permitem obter fibras. Noutras situações obtém-se gotejamento, ficando-se com um material polimérico em que o solvente não foi completamente evaporado e em que as pseudo fibras formadas se ligam umas às outras não permitindo a formação de uma matriz de fibras altamente porosas e com uma grande área superficial, típica dos materiais produzidos por esta técnica [52].

Assim, para cada tipo de solução polimérica foi necessário otimizar o processo fazendo variações e ajustes, com critério, dos parâmetros mais importantes do *electrospinning*, nomeadamente a diferença de potencial aplicada entre a agulha e o coletor, o diâmetro da agulha e a taxa de fluxo da solução polimérica

Na Figura 16 mostra-se uma fotografia do equipamento de *electrospinning* usado para a produção destas fibras. Este equipamento é *home made* e encontra-se no Departamento de Física

da Universidade do Minho. É formado por um sistema com uma bomba ejetora (WPI (World Precision Instruments), Reino Unido, modelo SP100Z Syringe Pump) ligada a uma seringa e um coletor que neste caso é um cilindro rotativo, que se reveste com uma folha de papel de alumínio, onde são recolhidas as fibras que se vão formando. Entre a ponta da agulha da seringa e o coletor é aplicada uma diferença de potencial elevada, da ordem dos kV. A aplicação desta diferença de potencial é controlada por um *software* específico desenvolvido em LabVIEW. A fonte de alta tensão foi adquirida à Spellman-High Voltage Electronics Corporation, Reino Unido, modelo CZE2000. A fonte de tensão para promover a rotação do cilindro foi adquirida à TT Instruments, Reino Unido, modelo 450-0942. O substrato de alumínio foi obtido à WP (Western PLastics), USA, código 285.

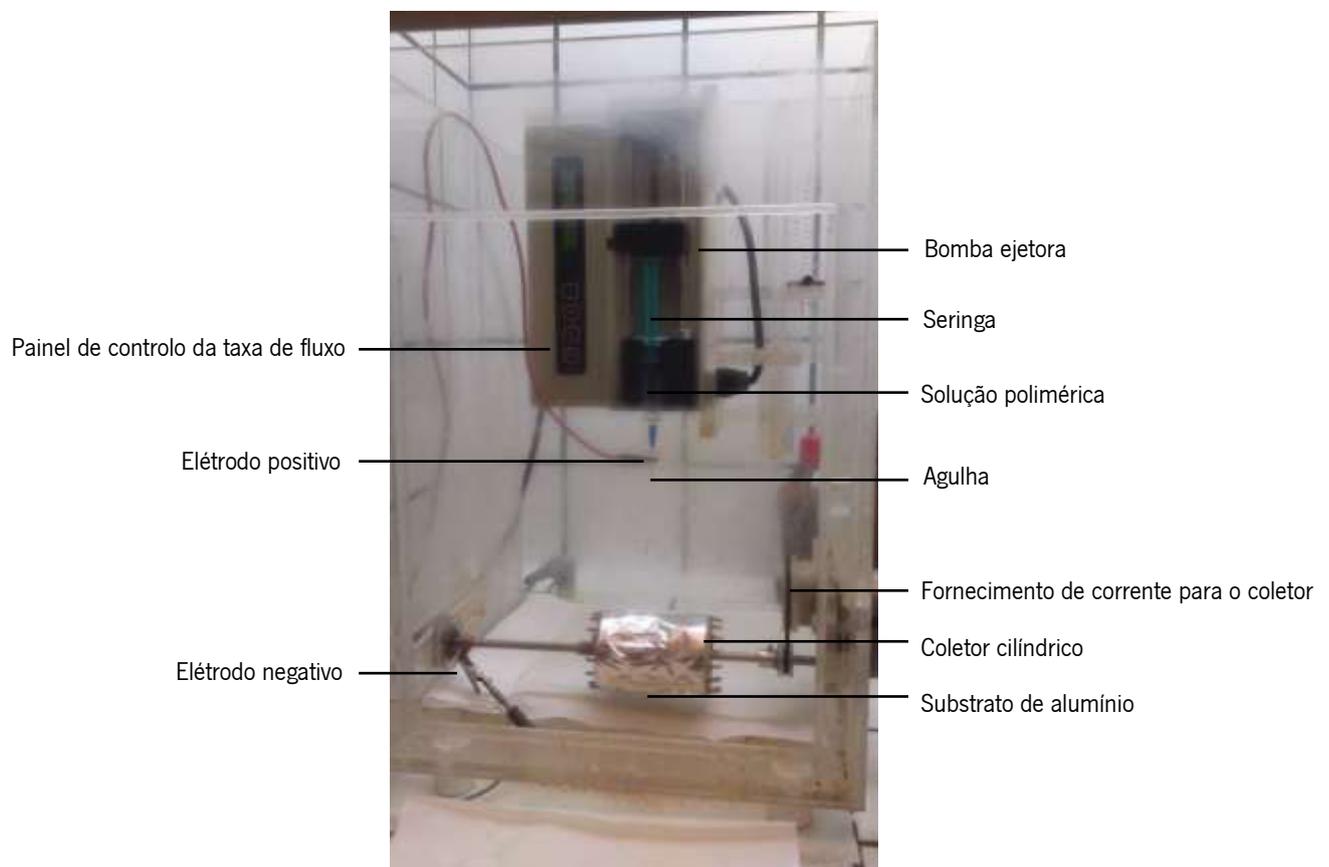


Figura 16 – Fotografia do equipamento de *electrospinning* do Departamento de Física da Universidade do Minho.

Como se vê pela figura, neste equipamento o *electrospinning* é executado na vertical. A solução polimérica é colocada numa seringa descartável de 5 mL (Injekt® da B. Braun) com um diâmetro previamente escolhido e é aplicado, através da bomba ejetora, um fluxo constante

também previamente ajustado. Aplica-se a diferença de potencial desejada e o processo inicia-se com a formação do cone de Taylor e a consequente deposição das fibras no coletor.

Na Tabela 11 podem-se ver as condições finais em que foram obtidas as nanofibras estudadas neste trabalho. Refira-se que, para chegar a estes parâmetros ideais, foram feitas muitas tentativas e muitos ajustes quer na diferença de potencial aplicada entre a agulha e o coletor, quer no diâmetro da agulha, quer no valor do fluxo. Como estes parâmetros não são independentes uns dos outros este foi um processo demorado, mas essencial para se produzirem nanofibras com a qualidade final desejada.

Tabela 11 – Condições de produção das nanofibras poliméricas.

	Diferença de potencial	Diâmetro da agulha	Taxa de fluxo da solução polimérica
Fibras de PCL	15 kV	23 Gauge (0,6 mm)	0,6 mL h ⁻¹
Fibras de zeína	20 kV	23 Gauge (0,6 mm)	1,0 mL h ⁻¹

As restantes condições do processo de *electrospinning* foram mantidas constantes (distância agulha-coletor de cerca de 12 cm, temperatura entre 18 e 22 °C e humidade relativa de cerca de 50 %).

4.4. Preparação dos meios para o estudo da libertação dos princípios ativos

A cinética de libertação do ACV das fibras de PCL e de zeína foi estudada colocando as fibras numa solução tampão a pH \approx 5,5, inicialmente numa solução aquosa e depois numa dispersão micelar.

A solução tampão foi preparada a partir de uma solução básica de fosfato de sódio decahidratado com concentração de 0,1 M e de uma solução ácida composta por ácido bórico com concentração de 0,02 M e ácido cítrico com concentração de 0,05 M [68]. Para obter 100 mL de uma solução tampão com pH \approx 5,5 juntaram-se inicialmente 37 mL da solução básica com 63 mL da solução ácida, conforme o protocolo descrito. Posteriormente o pH foi medido e ajustado, se necessário, para o valor desejado com um medidor de pH (Orion Research modelo SA 250, USA).

A dispersão micelar foi preparada com uma concentração de 16 mM em lauril sulfato de sódio (SLS) em tampão pH \approx 5,5. Esta concentração foi escolhida porque está acima da c.m.c.

do tensoativo [69] e garante por isso a presença de micelas no meio. O SLS é um tensoativo aniônico que consiste numa cadeia hidrocarbonada de 12 carbonos ligados a um grupo sulfato, como se mostra na Figura 17.

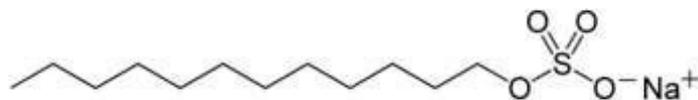


Figura 17 – Estrutura do lauril sulfato de sódio.

A cinética de libertação do ómega-3 das fibras poliméricas foi estudada em hexano, solvente orgânico que dissolve o ómega-3 e que mimetiza a parte hidrofóbica da membrana celular.

4.5. Doseamento dos princípios ativos por espectroscopia de absorção UV/Vis

O estudo da cinética de libertação do ACV e do ómega-3 das fibras poliméricas foi feito recorrendo à espectroscopia de absorção UV-Vis.

Relativamente ao ACV, mediram-se, a intervalos de tempo adequados, os espectros de absorção de alíquotas do meio (solução tampão de pH \approx 5,5 ou uma solução micelar de SLS ao mesmo pH) contendo o fármaco libertado. Usando o coeficiente de extinção molar $\epsilon(\lambda)$ do ACV, previamente determinado nestes meios, doseou-se o fármaco ao longo do tempo.

Relativamente ao ómega-3 o procedimento foi semelhante só que neste caso usou-se como meio um solvente orgânico, o hexano. Foi determinado previamente o coeficiente de extinção molar do ómega-3 em hexano que se usou depois para ir doseando o composto ao longo do tempo.

O procedimento seguido em todos os ensaios de libertação controlada dos compostos ativos nos meios escolhidos foi semelhante: mediu-se uma dada quantidade de fibra (de PCL ou de zeína) com ACV ou ómega-3 ou ambos os compostos ativos incorporados. Na maior parte dos ensaios esta fibra foi colocada dentro de uma manga de diálise (*cut-off* de 3,5 kDa) e noutros foi colocada diretamente no meio. O meio foi mantido a 37°C sob agitação magnética. Tipicamente usaram-se 90 mL de meio, definido como um volume adequado para garantir a solubilidade do ACV libertado. A intervalos de tempo determinados retiraram-se alíquotas de 1 mL de meio

repondo-se o mesmo volume retirado com meio fresco. De cada uma das alíquotas retiradas foi medido o espectro de absorção.

Dum modo semelhante foi também estudada a libertação do ACV da formulação comercial Zovirax™ Creme para comparação com as cinéticas obtidas a partir das nanofibras produzidas. Nestes ensaios foi colocada uma massa definida de creme numa manga de diálise, sendo o doseamento efetuado nos dois meios: tampão e meio micelar (pH 5,5).

4.6. Espectroscopia de absorção UV/Vis

Os espectros de absorção foram medidos num espectrofotómetro comercial de duplo feixe, SHIMADZU UV-2501 PC (Figura 18) do Departamento de Física da Universidade do Minho, que permite a obtenção de espectros na gama 190 nm a 900 nm. Este espectrofotómetro tem duas fontes de radiação, uma lâmpada de halogéneo de 50 W para a zona do visível e infravermelho próximo e uma lâmpada de deutério para a zona do ultravioleta. A radiação passa por um sistema de monocromação formado por redes de difração e espelhos e é depois dividida em dois feixes iguais que são encaminhados um para a célula de referência e o outro para a da amostra. A radiação transmitida incide então no detetor, um fotomultiplicador R-928 para a região do ultravioleta e visível e uma célula de PbS para a zona do infravermelho próximo. A aquisição do espectro é controlada por um computador usando o *software* UVProbe 2.10



Figura 18 – Espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC.

Na Figura 19 esquematiza-se o modo de funcionamento dum espectrofotómetro de duplo feixe. Os espectros foram medidos na gama de comprimentos de onda de 200 nm a 600 nm, com

incrementos de 1 nm e uma velocidade de varrimento de 200 nm min⁻¹. A resolução deste espectrofotômetro, nas condições utilizadas, é de 0,1 nm. Todos os espectros foram medidos à temperatura ambiente, em células de quartzo com 1 cm de percurso ótico.

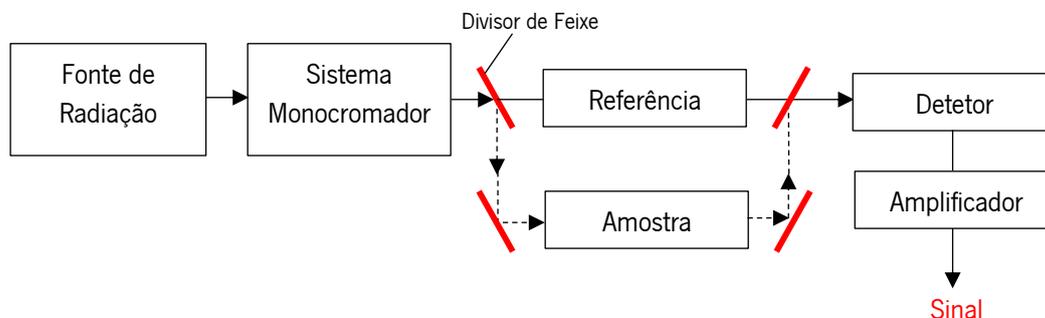


Figura 19 – Diagrama de blocos de um espectrofotômetro convencional de duplo feixe.

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa um meio absorvente a quantidade de luz absorvida depende da concentração das espécies absorventes, do coeficiente de extinção molar da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação no interior da amostra. Varrendo uma gama adequada de comprimentos de onda obtém-se informação sobre onde e quanto é que a espécie presente na solução absorve. À representação da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente chama-se espectro de absorção. Este espectro permite a identificação e a determinação quantitativa de substâncias químicas, o estudo de cinéticas de reações em solução, a determinação do grau de pureza de um composto entre outros [70].

A intensidade de um feixe de radiação eletromagnética é atenuada ao atravessar um dado meio com uma determinada espécie absorvente. A atenuação do feixe dá-se por sucessivos fenómenos de absorção, reflexão nas paredes da célula e fenómenos de difusão. Desprezando as reflexões, é possível relacionar a intensidade do feixe transmitido, $I_{(\lambda)}$ com a intensidade do feixe incidente, $I_{0(\lambda)}$ pela equação [71]:

$$I_{(\lambda)} = I_{0(\lambda)} e^{-\alpha(\lambda)L}$$

sendo $\alpha(\lambda)$ o coeficiente de absorção da espécie, habitualmente expresso em cm⁻¹ e L o percurso ótico da radiação no meio. Na presença de soluções líquidas esta lei exponencial da absorção pode-se escrever em termos da concentração molar da espécie absorvente, C, e do seu coeficiente de extinção molar, ϵ ao comprimento de onda λ :

$$I_{(\lambda)} = I_{0(\lambda)} 10^{-\epsilon(\lambda)CL}$$

Se o percurso ótico for expresso em centímetros e a concentração da espécie absorvente em molaridade, o coeficiente de extinção molar é expresso em $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Sendo a transmitância a razão entre a intensidade transmitida e a intensidade incidente num dado comprimento de onda, e definindo-se a absorvância como o logaritmo decimal do inverso da transmitância, obtém-se a equação:

$$Abs = \log \frac{1}{T} = \varepsilon_{(\lambda)} C$$

relação conhecida por lei de Lambert-Beer.

Através desta relação quantitativa foi possível, preparando soluções rigorosas de ACV e medindo a sua absorvância, calcular o coeficiente de extinção molar do ACV em cada um dos meios, tampão pH $\approx 5,5$ e dispersão micelar ao mesmo pH, nos comprimentos de onda selecionados. Estes espectros assim como o cálculo dos respetivos coeficientes de extinção molar encontram-se no Anexo 2.

Da mesma forma calculou-se o coeficiente de extinção molar do ómega-3 preparando soluções de concentrações conhecidas em hexano e medindo os seus espectros de absorção. Estes resultados podem ser consultados no Anexo 3.

4.7. Técnicas de caracterização das nanofibras de PCL com ACV e ácidos gordos ómega-3

4.7.1. Microscopia eletrónica de varrimento com dispersão de raios-X (SEM-EDS)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é uma técnica de análise não destrutiva que se baseia no varrimento sequencial da superfície da amostra por um feixe de eletrões acelerados e altamente focados. O SEM permite a observação da topografia e morfologia (forma e tamanho) dos materiais a partir da radiação que estes transmitem ou emitem, em resultado da sua interação com o feixe de eletrões acelerados [72]. Da interação deste feixe de eletrões com os eletrões periféricos da superfície da amostra resulta a emissão de uma série de sinais: eletrões retrodifundidos, eletrões secundários, eletrões Auger, raios-X, etc, como se ilustra na Figura 20 [73].

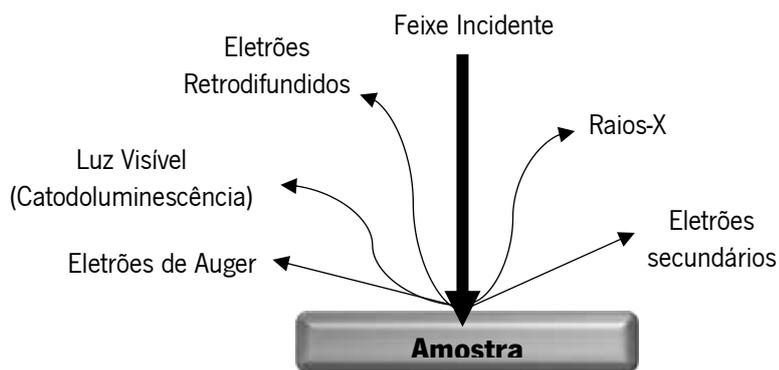


Figura 20 – Representação esquemática do princípio de funcionamento da técnica de SEM.

Estas interações são detetadas por um conjunto de detetores e processadas de modo a formar uma imagem. O processamento do sinal difere consoante a análise requerida pelo utilizador [72]. O microscópio eletrónico pode estar acoplado a um sistema de microanálise, usando um espectrómetro de dispersão de energias de raios-X (EDS). Na análise por EDS o feixe de elétrons foca na amostra ‘ponto a ponto’ numa área escolhida pelo utilizador, dentro do campo de visão. O EDS é capaz de detetar os elementos atómicos de uma amostra. A intensidade dos picos de EDS, não é uma medida quantitativa da concentração do elemento na amostra, mas pode ser obtida uma quantificação relativa a partir das intensidades relativas dos picos [73,74].

As imagens de SEM foram obtidas num equipamento Phenom ProX com detetor EDS (Paralab, Portugal). A análise foi feita usando os elétrons retrodifundidos (BSE) pela superfície da amostra. Estes elétrons resultam de choques elásticos e têm, portanto, energias semelhantes à energia do feixe incidente. Na imagem formada os vários tons de cinzento estão relacionados com a composição química da amostra. Foi usado um *software* de análise de imagem, o *digimizer*, que permite fazer medições manuais e precisas de distâncias. Com este *software* fez-se a medição do diâmetro médio das fibras e construiu-se um histograma representando a distribuição de tamanhos em torno do valor médio.

Foram obtidas imagens de nanofibras de PCL e de PCL com concentrações crescentes de ACV. Para as fibras com ACV foi ainda feita análise por EDS com o objetivo de confirmar a presença do fármaco nas fibras poliméricas detetando-se a presença de azoto, elemento que não existe na molécula de PCL.

4.7.2. Difração de raios-X

A difração de raios-X (XRD) é uma técnica não destrutiva que permite fazer a caracterização da estrutura cristalina do material em estudo.

Nesta técnica, os raios-X (radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 0,01 e 10 nm e energia de 10^{-3} a 10^1 keV [75]) incidem numa amostra e podem ocorrer fenómenos de difração destes fótons em todas as direções, dado que o comprimento de onda dos fótons incidentes é da ordem de grandeza das distâncias interatómicas [76]. Na geometria mais convencional, a que foi usada nas medições realizadas, faz-se incidir na amostra um feixe monocromático de raios-X segundo um dado ângulo θ , variável, e analisa-se a radiação difratada pela amostra numa direção que faz um ângulo de 2θ com a direção do feixe incidente. Se a amostra for cristalina existirão valores de 2θ para os quais se observam picos nos difratogramas, que correspondem a situações em que existe interferência construtiva entre a radiação difratada em dois ou mais planos cristalográficos consecutivos como se ilustra na Figura 21 [76,77].

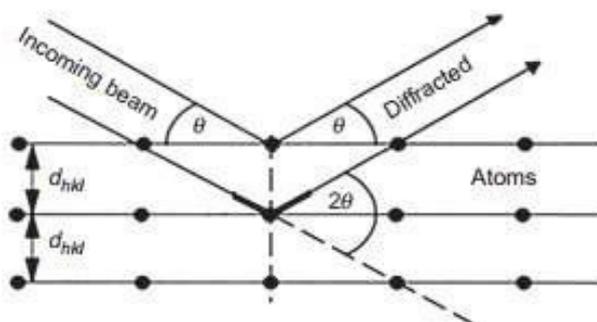


Figura 21 – Esquema ilustrando a difração de raios-X por uma família de planos paralelos com espaçamento interplanar d e os raios-X a incidirem segundo um ângulo θ . Adaptado de Epp (2016) [78].

A comparação das posições e intensidades relativas dos picos de difração com valores tabelados permite identificar a estrutura cristalina do material em estudo, detetar orientações preferenciais de alguns planos cristalográficos e avaliar o tamanho médio das cristalites. A partir da localização dos picos de difração (valores de θ) podem-se calcular as distâncias entre os planos cristalográficos difratores, d_{hkl} usando a lei de Bragg,

$$2 d_{hkl} \sin \theta = n \lambda$$

onde n é um inteiro que indica a ordem de difração e λ é o comprimento de onda dos raios-X incidentes na amostra [76].

Os espectros de difração de raios-X foram realizados no Departamento de Ciências da Terra da Universidade do Minho, no Campus de Gualtar, com recurso a um equipamento Philips Diffractometer, modelo PW 1710. A radiação utilizada é monocromática, proveniente da emissão K_{α} do cobre, com comprimento de onda de 1,54 Å.

4.7.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica de análise térmica que mede o fluxo de energia calorífica, associado a transições de primeira e segunda ordem nos materiais, em função da temperatura. As transições de primeira ordem apresentam variações de entalpia endotérmicas (exemplos: fusão, perda de água, dessorção) ou exotérmicas (exemplos: cristalização, polimerização, adsorção) e dão origem à formação de picos nas curvas de DSC. As transições de segunda ordem (exemplos: transição vítrea e relaxação de tensões térmicas da cadeia polimérica) caracterizam-se pela variação da capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia e não originam picos nas curvas de DSC, apresentando-se como um deslocamento da linha de base. Analisando como é que estas trocas de energia calorífica são modificadas pela presença de fármacos nas amostras é possível obter informação sobre a forma como estes se ligam à matriz polimérica [77].

As análises térmicas foram efetuadas num calorímetro diferencial de varrimento do tipo fluxo de energia calorífica da marca DSC 3+ Mettler Toledo (Figura 22) localizado no Departamento de Física da Universidade do Minho, Campus de Azurém. Neste equipamento a amostra e a referência são colocadas em fornos individuais, sob uma atmosfera controlada, sendo fornecida energia térmica exatamente igual aos dois sistemas através de blocos de aquecimento. Quando o bloco de aquecimento é aquecido ou arrefecido, a uma velocidade programada, as temperaturas da amostra e da referência aumentam ou diminuem, uniformemente. Durante uma transformação (transição de fase, reação química, fusão, etc.) a amostra liberta ou absorve energia calorífica o que provoca alterações do fluxo de energia calorífica e, conseqüentemente, variações na diferença de temperatura entre a amostra e a referência permitindo a estimativa da entalpia associada a essa transformação [77].

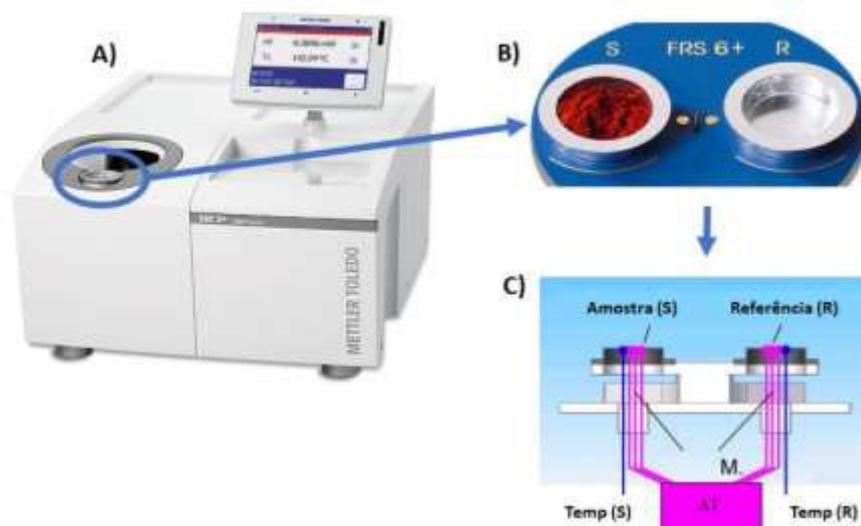


Figura 22 – Calorímetro diferencial de varrimento do tipo fluxo de energia calorífica da marca DSC 3+ Mettler Toledo (A); (B) – pormenor dos fornos da amostra (S) e da referência (R) e (C) – esquema do processo de fornecimento de energia térmica aos dois fornos onde o fluxo é medido através dos sensores de temperatura posicionados sob cada cadinho, obtendo-se assim um sinal proporcional à diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência.

Nos gráficos de DSC são registadas estas variações no fluxo de energia calorífica e quando ocorre um processo endotérmico na amostra (absorção de calor) surge um pico negativo, uma vez que a célula da amostra deve dissipar o calor absorvido para manter a temperatura igual à da referência. Nos processos exotérmicos ocorre o efeito inverso, sendo registado um pico positivo, como se ilustra na Figura 23 [79].

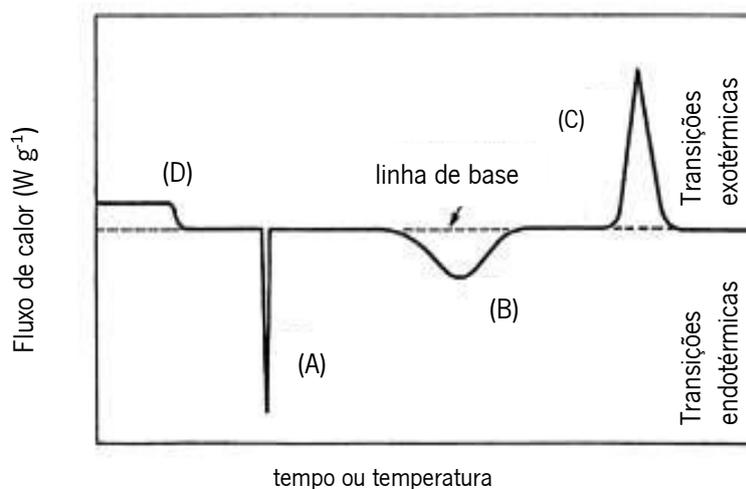


Figura 23 – Curva modelo de DSC representando transições de 1ª ordem: (A) e (B) picos endotérmicos e (C) pico exotérmico e transições de 2ª ordem (D). Adaptado de Bernal *et al.* (2002) [79].

Apesar de na Figura 23 apresentar as formas estabelecidas de representação das curvas de DSC, na maioria dos casos estas curvas apresentam-se invertidas, ou seja os picos de transição endotérmica como picos positivos e conseqüentemente os picos exotérmicos como picos negativos. Para clarificar o tipo de transição, nesta dissertação foi devidamente assinalado, no eixo das ordenadas, o sentido em que ocorre a absorção da energia.

As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera de azoto (20 mL min^{-1}). Para a análise de todas as amostras (exceto ACV), o programa térmico contemplou um aquecimento dos 20 aos 100 °C, seguido de um arrefecimento até aos 20 °C (com uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$), seguida de uma isotérmica durante 5 minutos e, posteriormente, um segundo aquecimento dos 20 aos 100 °C. As análises dos resultados foram efetuadas apenas no segundo ciclo para eliminar o efeito de memória térmica.

Para a análise do ACV, o programa térmico contemplou apenas um aquecimento dos 50 aos 300 °C (com uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$). Neste caso não se procedeu a um segundo ciclo de temperatura pois a temperatura de fusão do ACV é um processo irreversível.

4.7.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, usando a técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IR) baseia-se na absorção de radiação eletromagnética pelas moléculas na região do infravermelho do espectro eletromagnético. As energias absorvidas correspondem a energias de transição entre níveis vibracionais, associadas a deformações nas ligações químicas, resultando numa variação no momento dipolar da molécula. Esta técnica permite deste modo a análise de estruturas moleculares (grupos funcionais da amostra) tendo por base o espectro de vibração das ligações químicas [77].

Na técnica de FTIR, faz-se incidir sobre a amostra a gama total de comprimentos de onda da região dos infravermelhos que se pretende analisar e os sinais incidente e transmitido são detetados por um interferómetro. Aplicando transformadas de Fourier (FT) ao interferograma obtido podem-se obter os picos de absorção da amostra em função da frequência da radiação incidente.

O modo ATR acoplado ao FTIR é um modo muito prático uma vez que permite medir amostras sólidas sem qualquer preparação prévia. A amostra é apenas colocada sobre um

pequeno cristal de índice de refração elevado (superior ao da amostra) e de baixa absorção no IR, como se ilustra no esquema da Figura 24. O feixe de radiação infravermelha incide, segundo um dado ângulo θ , maior do que o ângulo crítico, na interface cristal amostra e é refletido internamente. A onda evanescente associada propaga-se na amostra e é absorvida seletivamente por esta permitindo obter informação sobre os seus níveis vibracionais

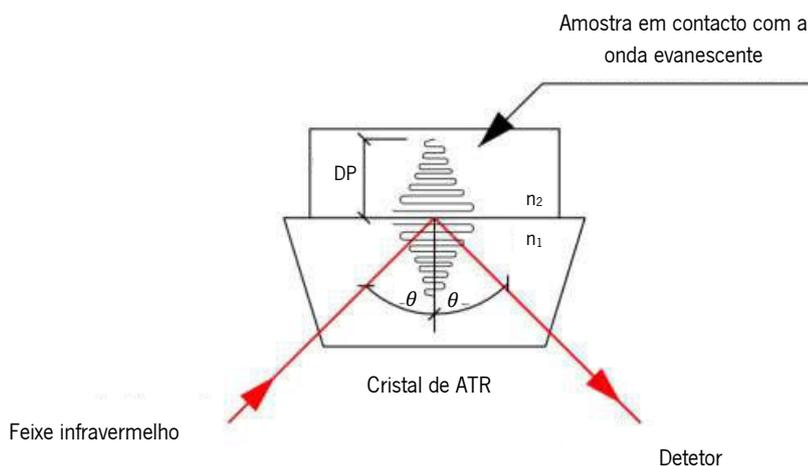


Figura 24 – Representação esquemática do modo de funcionamento do ATR-FTIR.

Um cristal de elevado índice de refração fica em contato direto com a amostra. Dá-se a reflexão interna total do feixe IR e o aparecimento de uma onda evanescente. A atenuação desta onda dá-se por absorção de alguns comprimentos de onda do feixe IR.

A profundidade de penetração (DP) da onda evanescente na amostra é sempre muito pequena e depende essencialmente da diferença entre os índices de refração do cristal (n_1) e da amostra (n_2), podendo ser calculada pela relação:

$$DP = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{\text{sen}^2\theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

onde λ representa o comprimento de onda da radiação incidente e θ o ângulo de incidência na amostra [79].

As medidas de ATR-FTIR foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade do Minho, no Campus de Gualtar, num Perkin-Elmer, Spectrum Two Spetrometer (Figura 25) equipado com um acessório de ATR com um cristal de diamante (índice de refração 2,4 e profundidade de penetração da ordem de 1,66 μm). Os espectros foram medidos na região 400-4000 cm^{-1} , com incrementos de 4 cm^{-1} e fazendo 16 varrimentos para cada espectro.



Figura 25 – Espectômetro ART-FTIR da marca Perkin-Elmer, Spectrum Two Spetrometer.

4.7.5. Resistência mecânica à tração

O comportamento mecânico (resposta à tração) das nanofibras foi estudado utilizando um equipamento AGS-X Shimadzu 500 N (Departamento de Física da Universidade do Minho, Campus de Gualtar) com uma célula de carga de 10 N e uma velocidade de 10 mm min^{-1} à temperatura ambiente (Figura 26).



Figura 26 – Equipamento AGS-X Shimadzu 500 N usado para determinação da resistência mecânica das fibras à tração.

As nanofibras foram cortadas em pedaços retangulares (cerca de 20 x 12 mm) e a caracterização mecânica foi expressa em termos da percentagem de alongação da fibra em função da tensão aplicada por unidade de área (secção da fibra).

4.7.6. Ângulo de contacto

Quando uma gota de líquido é colocada sobre uma superfície sólida forma-se uma interface tripla entre o sólido (superfície), o líquido (gota) e o vapor. O ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido no ponto de contacto com o sólido é definido como o ângulo de contacto (Figura 27). A molhabilidade da superfície é definida a partir do valor do ângulo de contacto e mede a tendência que um líquido tem em se espalhar ou não sobre uma determinada superfície [80,81].

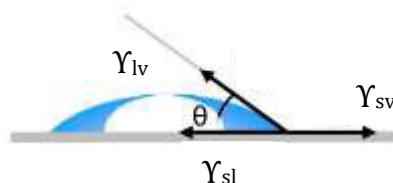


Figura 27 – Ângulo de contacto de uma gota numa superfície sólida: θ é o ângulo de contacto: γ_{lv} representa a interface líquido vapor; γ_{sv} representa a interface sólido vapor e γ_{sl} representa a interface sólido líquido. Adaptado de Bracco *et al.* (2013) [81].

De modo a identificar a molhabilidade das nanofibras de PCL e PCL com ACV e ómega-3 foi colocada uma gota (0,4 μ L) de uma solução aquosa a pH \approx 5,5 e de uma dispersão micelar de SLS ao mesmo pH sobre a superfície dos sistemas seleccionados, sendo registado o ângulo de contacto.

4.8. Ensaio de viabilidade dos sistemas terapêuticos

4.8.1. Ensaio de oclusão

A oclusão da pele consiste na formação de um filme sobre o estrato córneo quer por deposição de alguns excipientes emolientes (exemplo: óleos e vaselina), quer pela deposição de partículas de tamanhos reduzidos (exemplo: nanofilmes, nanofibras, nanopartículas) [82,83]. Este filme impedirá a perda de água da pele sendo um importante fator para a sua hidratação. Um aumento de água ao nível cutâneo também pode favorecer a difusão de compostos bioativos através do estrato córneo, pois a água retida ao nível da camada lipídica do estrato córneo irá proporcionar uma hidratação dos grupos polares das membranas lipídicas deste estrato, favorecendo a sua permeabilização [84]. Nos ensaios de oclusão levados a cabo pretende-se verificar se o revestimento da pele com as nanoformulações desenvolvidas dá origem a uma boa oclusividade.

Para este ensaio foram usados copos de vidro onde foram colocados 50 g de água ultrapura. A boca de cada copo foi tapada, ou apenas com um filtro de microfibras de celulose Whatman (controlo) ou colocando por cima do filtro o sistema terapêutico em estudo (nanofibras poliméricas). Os ensaios foram feitos em triplicado. Foi também testada a formulação comercial Zovirax™ creme 50 mg g⁻¹ espalhando uniformemente uma massa definida de creme sobre o filtro. Cada sistema foi colocado numa estufa a 37°C e a intervalos de tempo definidos foi medida rigorosamente a sua massa. Na Figura 28 mostra-se o sistema utilizado neste ensaio



Figura 28 – Fotografia do sistema utilizado no teste de oclusividade.

Este ensaio permitiu calcular o fator de oclusão (F) definido como a percentagem de variação do fluxo de água, sem e com o sistema, cuja oclusividade se pretende testar (neste caso as nanofibras ou a formulação comercial de ACV) [72,73]:

$$F = \frac{A - B}{A} \times 100$$

sendo A a percentagem de perda de água, a cada tempo, só com o filtro e B a mesma percentagem num sistema com filtro e nanofibras poliméricas ou formulação comercial.

4.8.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT

Para avaliar *in vitro* a citotoxicidade de compostos, utilizam-se técnicas laboratoriais, como o teste de exclusão de Trypan Blue, que determina a viabilidade através das lesões causadas na membrana celular, o ensaio de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica que só se liberta se as células morrerem por ruptura da sua membrana plasmática e o ensaio por brometo de ((3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio), MTT, que mede a função mitocondrial da célula, ou seja, avalia o nível de funcionalidade da célula e não a sua estrutura. Neste trabalho a viabilidade celular será estudada pelo ensaio MTT realizado no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s) da Universidade do Porto. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelos componentes das nanofibras em estudo (polímero e compostos bioativos) no metabolismo celular dos açúcares, usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Se

os componentes testados não causarem danos às células, estas apresentarão um metabolismo celular funcional e as desidrogenases mitocondriais estarão ativas. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela capacidade que as desidrogenases mitocondriais celulares têm de reduzir o MTT convertendo-o em formazano [85] (Figura 29).

Desta forma, a redução do MTT (sal de coloração amarela solúvel em água) a formazano, (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. Os cristais de formazano formados podem ser solubilizados e quantificados espectrofotometricamente num comprimento de onda de 570 nm.

O ensaio MTT para avaliação da viabilidade celular após exposição aos componentes das nanofibras teve início numa primeira etapa de extração dos componentes a avaliar de acordo com o descrito na norma ISO 10993-5: 2009 e orientação da ISO 10993-12: 2012. Para isso, as massas das nanofibras (de PCL e de PCL com ACV e ómega-3) foram medidas sendo posteriormente cortadas em pequenos pedaços (de modo a aumentar a superfície de extração) e adicionadas ao meio de cultura celular completo. A extração foi realizada a 37 °C durante 24 h a uma concentração de 100 mg de nanofibras por mL de meio sob agitação magnética (100 rpm). Fibras de gaze hidrófila consideradas como inócuas para as células e usadas como um controlo negativo neste ensaio foram submetidas ao mesmo procedimento de extração.

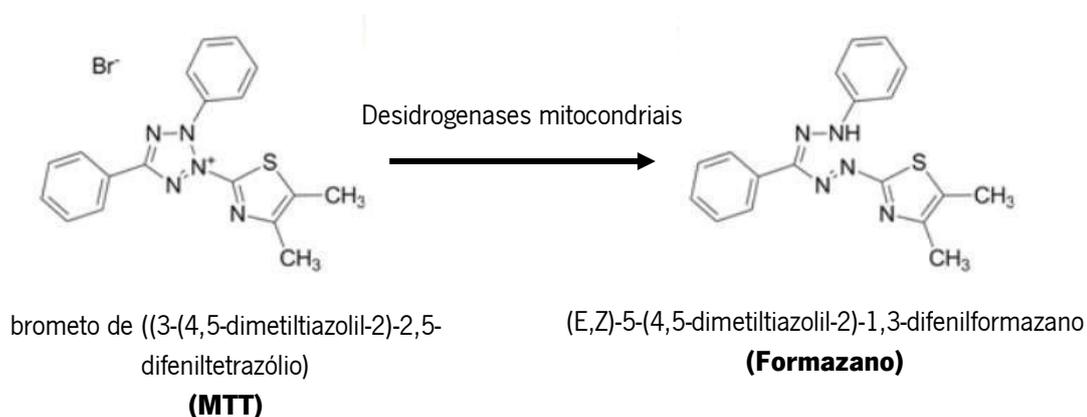


Figura 29 – Conversão do MTT em formazano. Adaptado de Riss *et al.* (2016) [86].

Após a etapa de extração, o ensaio MTT decorreu em duas linhas celulares cutâneas: queratinócitos epidérmicos (HaCaT) e fibroblastos do prepúcio humano (HFF-1), ambas adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC, EUA), sendo plaqueadas aproximadamente 10^4 células/poço em placa de 96 poços. As células foram mantidas com o meio específico para cada

tipo celular e 10 % de soro fetal bovino (SFB) em cultura numa incubadora (ESCO Incubadora de CO₂ CelCulture®, Singapura) à temperatura de 37 °C, numa atmosfera saturada de água e com 5 % de CO₂, até atingirem 90 % de confluência. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão de fosfato-salino (PBS) de pH 7,4, sendo substituído por meio fresco contendo diferentes concentrações dos extratos das amostras (100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 mg mL⁻¹). Um controlo positivo, capaz de lisar as células e portanto capaz de reduzir drasticamente a viabilidade celular (Triton X-100 a 1 %) e um controlo negativo (contendo apenas meio de incubação celular) foram também adicionados às células na placa. Após 24 h de incubação, o meio foi novamente descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Finalmente, foi adicionada a solução de MTT (concentração final de 0,5 mg mL⁻¹) deixando as células incubadas por mais 24 h no escuro para que ocorresse a incorporação do MTT e a consequente formação dos cristais de formazano. Por último, todo o meio foi retirado e os cristais de formazano formados foram solubilizados em DMSO durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 570 nm num leitor de placas multi-modo (Biotek Synergy 2, EUA). Os resultados foram analisados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{(\text{Abs compostos a testar} - \text{Abs controlo negativo})}{(\text{Abs controlo positivo} - \text{Abs controlo negativo})} \times 100$$

4.8.3. Estudos de permeação cutânea

Os estudos de permeação cutânea têm como objetivo avaliar como é que um determinado fármaco ou composto bioativo sofre difusão através da pele. Estes estudos podem ser feitos *in vitro* ou *ex vivo*. Nos estudos *in vitro*, os que foram realizados neste trabalho, usa-se uma célula de difusão, ou célula de Franz (Figura 30) e mede-se a cinética de difusão do composto bioativo para um reservatório, usando pele não viável ou membranas sintéticas simuladoras de pele. A célula de Franz é um sistema composto por duas câmaras, separadas pela membrana utilizada no ensaio. Na câmara superior é colocada a amostra a testar (nanofibras com os compostos bioativos incorporados) e na câmara inferior é colocada o meio recetor [87,88].

Neste trabalho foi avaliada a difusão do fármaco através de uma membrana de polissulfona (PSO) e também através de um excisado de pele de porco. Para isso colocou-se uma amostra de fibras poliméricas de PCL com ACV e ómega-3 na câmara superior da célula de Franz

e na câmara recetora colocaram-se 5 mL da dispersão micelar a pH 5,5. Seguidamente, foram retiradas alíquotas do meio recetor (0,4 mL), a diferentes tempos, onde foi quantificado o ACV por espectrofotometria de absorção UV/Vis (no caso das membranas de PSO) ou pelo método derivativo dos espectros de absorção UV/Vis (no caso do excisado de pele), permitindo assim obter a cinética de difusão do fármaco. Também foi avaliada a difusão cutânea de ACV a partir da formulação comercial Zovirax™ creme.



Figura 30 – Célula de difusão de Franz. A câmara dadora localiza-se no topo enquanto que a câmara recetora se encontra na base. Entre as duas câmaras é colocada a membrana ou pele utilizada no ensaio. A amostra contendo o fármaco é colocada na câmara dadora e a solução receptora é colocada na câmara inferior. O tubo inclinado (localizado à direita na imagem) é o local por onde é retirada a amostragem aos diferentes tempos e por onde é feita a reposição de volume. Os dois tubos horizontais permitem a entrada e saída de água para controlar a temperatura do sistema.

Adaptado de Ansel, Popovich & Nicholas (1989) [87].

No caso dos ensaios com excisado de pele foi necessário recorrer à derivação dos espectros de absorção UV/Vis devido à libertação para o meio receptor de produtos de degradação da pele. O doseamento de compostos por espectroscopia derivativa (ED) é um método que permite individualizar os constituintes de uma mistura eliminando a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e produtos da degradação, assim como interferências da dispersão e de outros compostos absorventes [89]. Assim, após a obtenção dos espectros de absorção das alíquotas recolhidas e de modo a eliminar as interferências de outros componentes que não o ACV (presumivelmente produtos resultantes da degradação da pele) foi traçada a 1ª derivada dos espectros de absorção medidos (Anexo 2). Foi efetuado o mesmo processo de derivação aos espectros de absorção dos padrões de ACV de concentração conhecida. Após se verificar que os

picos observados nos espectros da derivada dos espectros de absorção das diversas alíquotas recolhidas (que se podem ver no Anexo 6) coincidem com os da derivada dos espectros de absorção dos padrões, seleccionou-se o pico localizado no comprimento de onda de 287 nm para se fazer o doseamento do ACV. Traçou-se um gráfico da amplitude da primeira derivada nesse comprimento de onda para cada solução padrão, em função da respetiva concentração e usou-se o declive desse gráfico para dosear o ACV.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados, analisados e discutidos todos os resultados experimentais obtidos, quer os referentes aos sistemas iniciais em que se incorporou um composto bioativo de cada vez, ACV ou ómega-3, em cada um dos polímeros selecionados, PCL e proteína zeína, quer os seguintes em que se fez a coencapsulação dos dois princípios ativos em fibras de PCL.

5.1. Soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas tal como descrito na Tabela 10.

As soluções de PCL em clorofórmio e na mistura clorofórmio/metanol, soluções 1 e 2 da Tabela 10, apresentam-se homogéneas, transparentes e pouco viscosas como se mostra na Figura 31-A. As soluções poliméricas com o ACV incorporado (Tabela 10, soluções 3, 4 e 5) não são completamente homogéneas. O fármaco não se dissolve totalmente, mas forma uma microemulsão estável, de aspeto leitoso, como se pode ver na Figura 31-B.

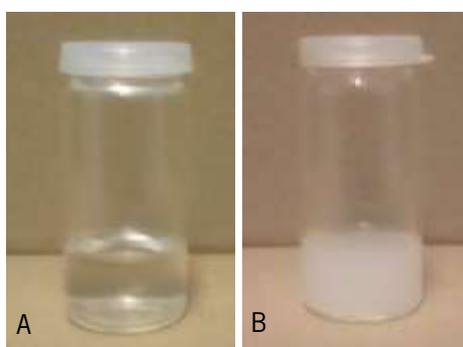


Figura 31 – Soluções poliméricas de PCL.

- A – Solução de PCL num solvente misto de clorofórmio:metanol, num rácio de 2:3
- B – Solução de PCL com ACV a 2 % (m/v) em clorofórmio:metanol, num rácio de 2:3.

A preparação da solução de PCL com os ácidos gordos ómega-3 foi feita como descrito na linha 6 da Tabela 10. A solução final apresenta-se homogénea, transparente e pouco viscosa.

As soluções da proteína zeína foram preparadas também como descrito na Tabela 10. A linha 7 diz respeito à solução da proteína zeína sozinha e as linhas 8 e 9 incluem a incorporação dos princípios ativos. A dissolução da proteína zeína na mistura etanol:água é completa, obtendo-

-se uma solução amarela. A dissolução do ACV na mesma mistura de solventes não é completa e por isso o que se obtém é uma microemulsão estável, de aspeto amarelado. A adição de ómega-3 à zeína (Tabela 10, linha 9) resulta numa solução homogénea, amarela e um pouco viscosa.

As misturas com vista à incorporação dos dois princípios ativos em simultâneo foram preparadas como descrito na linha 10 da Tabela 10. Apresentam-se esbranquiçadas devido ao ACV, formando uma microemulsão estável e de aspeto homogéneo.

5.2. Nanofibras produzidas por *electrospinning*

As nanofibras de PCL e de zeína foram preparadas por *electrospinning* de acordo com as condições apresentadas na Tabela 11.

As nanofibras de PCL apresentam-se relativamente homogéneas, brancas, resistentes e fáceis de retirar do coletor de alumínio sobre o qual são depositadas, como se vê na fotografia mostrada na Figura 32-A. As nanofibras de PCL com o ACV incorporado têm um aspeto idêntico (ver fotografia da Figura 32-B).

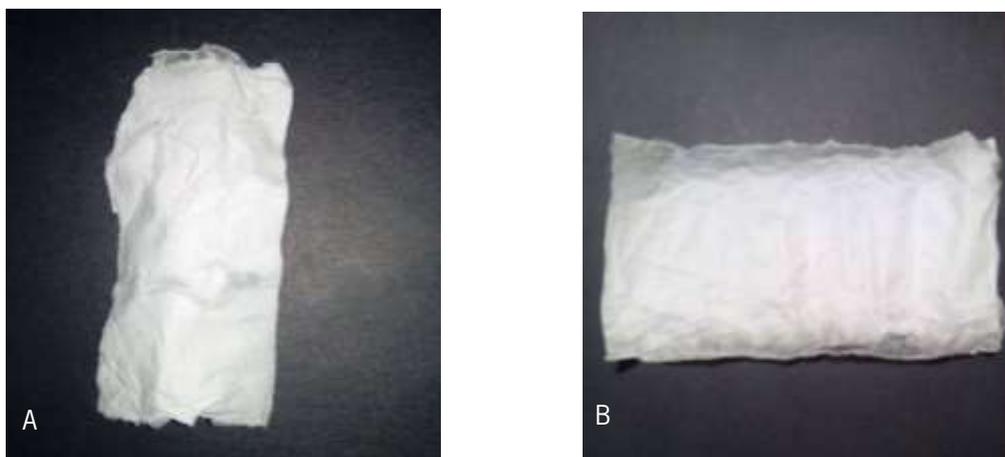


Figura 32 – Fotografia das nanofibras de PCL (A) e de PCL com ACV (B) produzidas por *electrospinning*.

Também as nanofibras de PCL com ómega-3 mantêm um aspeto idêntico ao das anteriores, são brancas, homogéneas, resistentes e fáceis de retirar do coletor de alumínio. Na Figura 34 mostra-se uma fotografia destas fibras.



Figura 33 – Fotografia das nanofibras de PCL com ómega-3 produzidas por *electrospinning*

As nanofibras de zeína recolhidas do coletor apresentam uma tonalidade ligeiramente amarelada (devido à cor do polímero) e um aspeto quebradiço e frágil, sendo difícil a recolha de um tapete contínuo. A Figura 34 mostra uma fotografia destas fibras.



Figura 34 – Nanofibras de zeína produzidas por *electrospinning* a partir de soluções de zeína a 30 % (m/m) num solvente misto de etanol:água (8:2).

Para tentar melhorar a qualidade mecânica destas fibras e impedir a rápida evaporação do solvente e conseqüente entupimento da agulha foi colocado um reservatório de etanol a envolver a ponta da agulha como se mostra esquematicamente na Figura 35. De acordo com um estudo anterior, em que os autores produziram nanofibras de zeína [90], esta estratégia proporcionaria uma maior pressão de vapor ao redor do cone de Taylor permitindo a formação de

um jato mais contínuo Contudo não se verificaram melhorias significativas nas propriedades mecânicas das fibras e estas mantiveram o seu aspeto frágil e quebradiço.

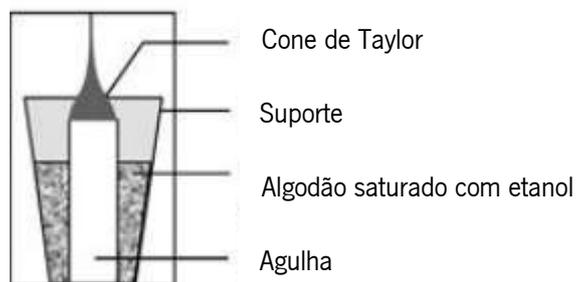


Figura 35 – Esquema de *electrospinning* para nanofibras de zeína, com o reservatório de etanol. Adaptado de Li, Lim & Kakuda (2009) [90].

As nanofibras de zeína com incorporação de ACV e de ómega-3 mantêm o mesmo aspeto frágil e quebradiço, apresentando-se algo heterogêneas, com zonas mais amareladas do que outras, sugerindo que os compostos bioativos não estarão uniformemente distribuídos nestas fibras. A Figura 36 mostra fotografias destas fibras.

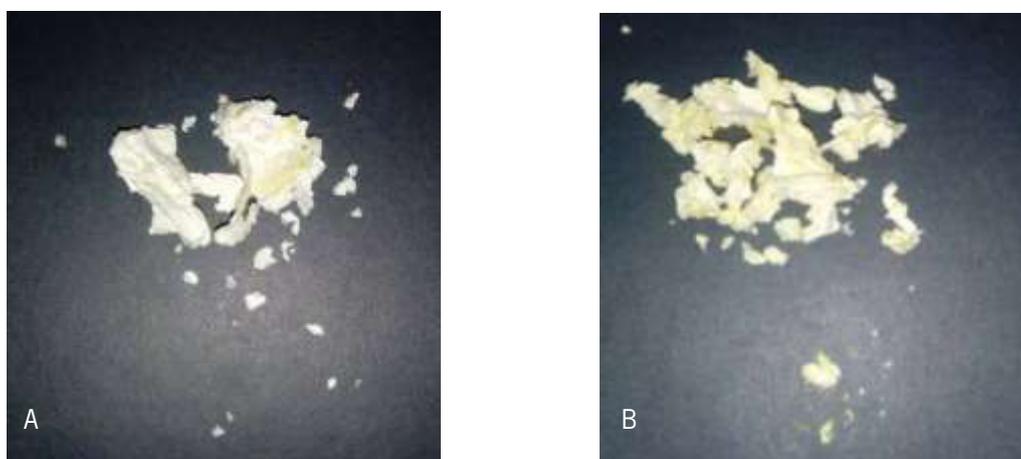


Figura 36 – Nanofibras da proteína zeína produzidas por *electrospinning*, com incorporação de ACV (A) e com incorporação de ómega-3 (B).

Como as fibras poliméricas preparadas a partir da proteína zeína não apresentaram as características mecânicas desejadas, optou-se por fazer a coencapsulação dos dois princípios ativos, ACV e ómega-3, apenas em PCL. Estas fibras foram preparadas como indicado na Tabela

11. Apresentam-se brancas, uniformes, resistentes e fáceis de retirar do coletor. Na Figura 37 mostra-se uma fotografia destas fibras.



Figura 37 – Nanofibras de PCL com ACV e ómega-3, preparadas por *electrospinning*.

5.3. Doseamento espectrofotométrico dos compostos bioativos

O doseamento dos princípios ativos foi feito como descrito em 4.5. Em todos os ensaios foi considerada uma distribuição homogênea dos princípios ativos nas soluções poliméricas e nas fibras resultantes. Assim, o teor nominal de composto bioativo na massa de fibra usada em cada ensaio de liberação foi calculado assumindo que se mantém a proporção massa de polímero/massa de composto bioativo da solução polimérica.

5.3.1. Doseamento do ACV nas fibras poliméricas

A Figura 38 mostra os resultados obtidos a partir de fibras de PCL com encapsulação de diferentes concentrações de ACV. O ensaio foi feito em tampão pH \approx 5,5 colocando as fibras no interior da manga de diálise e decorreu durante 145 horas. Observa-se uma rápida liberação inicial (primeiras 10 horas) seguida de uma liberação mais lenta e sustentada. Provavelmente a liberação inicial corresponde ao ACV que se encontra mais periféricamente ligado ao PCL. O aumento da concentração de ACV nas fibras diminui a importância do *burst* inicial, mantendo-se uma liberação lenta e sustentada ao longo das 145 horas do ensaio.

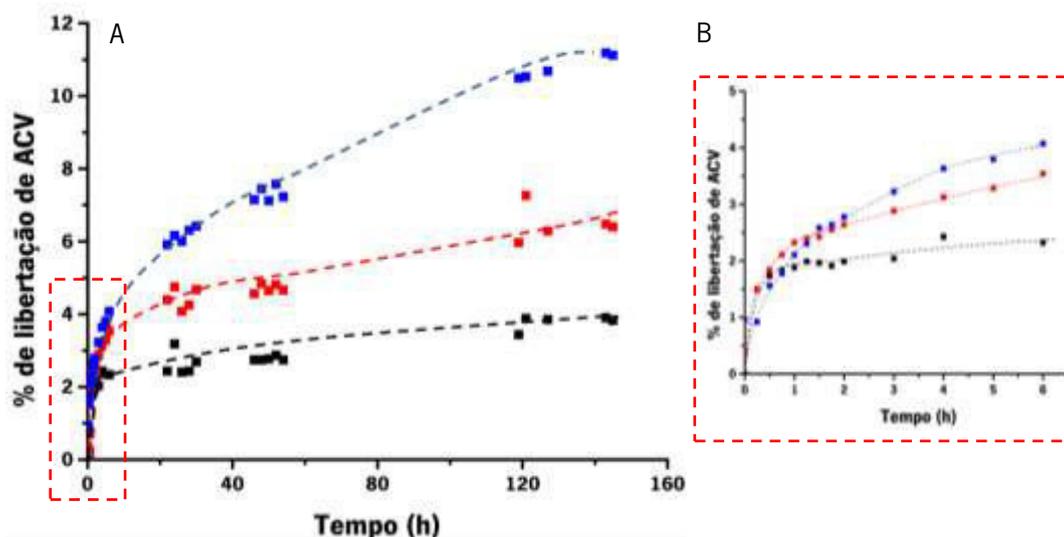


Figura 38 – Perfil de libertação do ACV de nanofibras de PCL em tampão pH \approx 5,5. (A) ao fim de 145 horas e (B) ao fim de 6 horas. Legenda: ■ Nanofibras de PCL com 1 % de ACV (m/v); ■ Nanofibras de PCL com 2 % de ACV (m/v) e ■ Nanofibras de PCL com 4 % de ACV (m/v).

Na Figura 39 apresentam-se os resultados obtidos quando a cinética de libertação do ACV de fibras poliméricas de PCL é estudada em meio micelar. Nesta figura estão representadas quatro réplicas em que a concentração de ACV nas fibras de PCL é de 2 % (m/v) e é possível observar uma grande variabilidade nos resultados obtidos. Esta grande variabilidade poderá ter várias justificações possíveis. Poderá ser devida a heterogeneidades intrínsecas ao processo de produção, resultando em fibras que não têm a mesma espessura e/ou o mesmo teor de fármaco. Como já foi referido, existem vários parâmetros que afetam a produção das fibras e que, para garantir a sua homogeneidade, devem ser mantidos constantes. Neste trabalho não foi possível garantir a constância do valor da temperatura e humidade relativa, uma vez que o *homemade set-up* não possui estes controlos ficando assim estes parâmetros dependentes das condições de temperatura e humidade do próprio laboratório. Outra possível contribuição para a ocorrência de variabilidade entre réplicas poderá estar associada à forma como as fibras se dispõem dentro da manga de diálise, o que pode alterar a acessibilidade do meio às fibras. No entanto, apesar da variabilidade observada para as várias réplicas, verificou-se que, em termos médios, a percentagem de libertação do ACV no meio micelar é significativamente maior, 85-95 %, quando comparada com os cerca de 6 % libertados das nanofibras em presença de um meio aquoso.

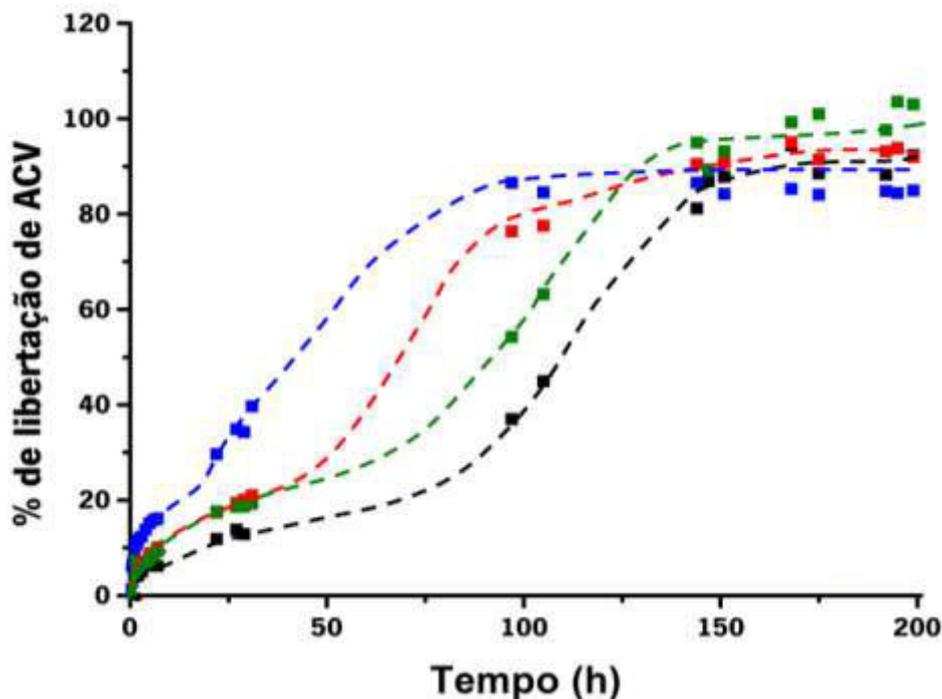


Figura 39 – Perfil de liberação do ACV de nanofibras de PCL em meio micelar (pH ≈ 5,5).
 Legenda: ■ Réplica 1; ■ Réplica 2; ■ Réplica 3 e ■ Réplica 4.

Na Figura 40 é possível comparar a liberação do ACV das nanofibras nos dois meios (micelar e aquoso), sendo clara a diferença entre os dois perfis de liberação do fármaco. Uma razão possível para tal diferença poderá ser explicada pelas características físico-químicas do fármaco enunciadas em 2.3.5. Conforme descrito, os problemas farmacocinéticos do ACV parecem estar relacionados com a sua relativamente baixa solubilidade em água e baixa lipofilicidade. Assim, a baixa solubilidade deste fármaco em água explica a sua menor liberação quando o meio é uma solução aquosa tamponada. Por outro lado, a baixa lipofilicidade do fármaco poderia levar a crer que a sua liberação num meio micelar também não fosse elevada. No entanto, apesar de os valores de LogP octanol/água do ACV reportados na literatura serem extremamente baixos, a partição deste fármaco em sistemas bifásicos mais semelhantes ao ambiente biológico (LogP lipossoma/água) é descrita como 3000 vezes superior ao valor obtido em sistemas bifásicos simples octanol/água [91]. Uma explicação para este facto reside no tipo de solvente que é utilizado para representar a fase apolar. Ao contrário do octanol, as bicamadas lipídicas possuem moléculas anfífilas cujas cabeças polares permitem o estabelecimento de interações com os

fármacos. O mesmo se observa no meio micelar de SLS onde a cabeça polar do tensoativo carregada negativamente mimetiza melhor o ambiente polar das membranas também carregadas negativamente [92]. Assim, o meio micelar oferece oportunidades de ligação mais extensa ao ACV uma vez que este fármaco ao pH cutâneo ligeiramente ácido tem tendência a protonar-se ao nível do azoto do anel imidazólico [93] e assim efetuar interações eletroestáticas com a superfície micelar.

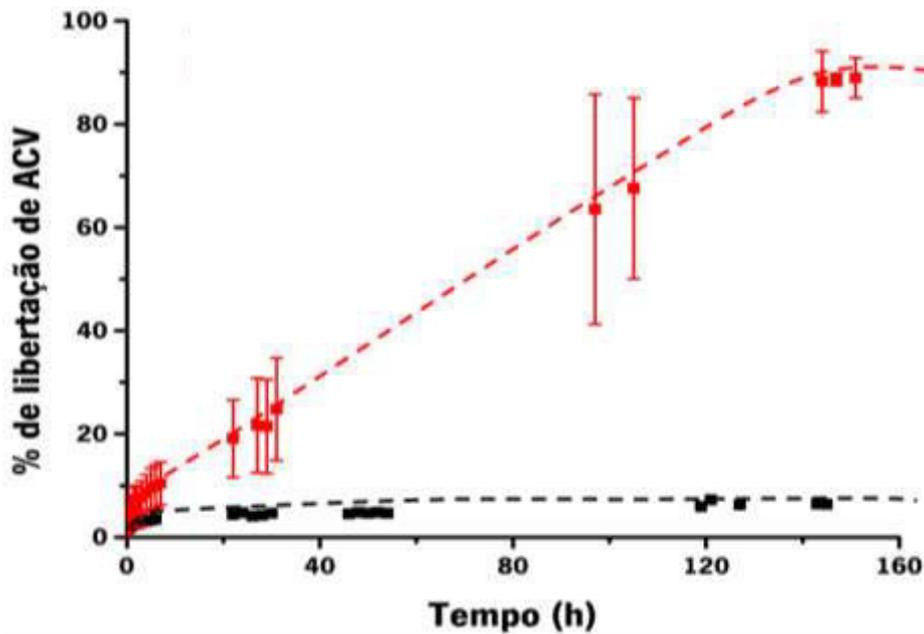


Figura 40 – Comparação do perfil de liberação do ACV das fibras de PCL.

Legenda: ■ em meio aquoso e ■ em meio micelar. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

No meio micelar a percentagem de liberação do ACV é maior desde o início mas é também mais sustentada porque o *burst* inicial é bastante reduzido face ao valor final. Enquanto que em tampão a liberação às 10 horas é mais de 50 % da final, em meio micelar a liberação de ACV é de cerca de 10 %.

As fibras de zeína com ACV foram estudadas de modo semelhante comparando a liberação do fármaco nos dois meios (aquoso e micelar). Nas fibras de zeína a concentração de ACV é de 3 % (m/v). O ensaio foi feito colocando as fibras (três réplicas) dentro da manga de diálise e usando como meio uma solução tampão pH \approx 5,5. Tal como anteriormente, continua-se a verificar uma grande variabilidade de resultados entre as várias réplicas, como se mostra na Figura 41 mas, apesar disso, é possível perceber um comportamento geral no perfil de liberação.

O ACV liberta-se continuamente e sustentadamente ao longo das 50 horas do ensaio. Apesar de a libertação nas primeiras 10 horas de ensaio corresponder aproximadamente a 50 % da obtida ao fim das 50 horas, a percentagem final libertada é muito maior do que nas fibras de PCL. Estes resultados poderão indicar que o ACV tem maior afinidade para o PCL do que para a zeína embora também seja de considerar o facto de as fibras de zeína serem muito frágeis e se apresentarem em pedaços muito pequenos, o que pode aumentar a área de contacto das fibras com o meio favorecendo assim a libertação do ACV.

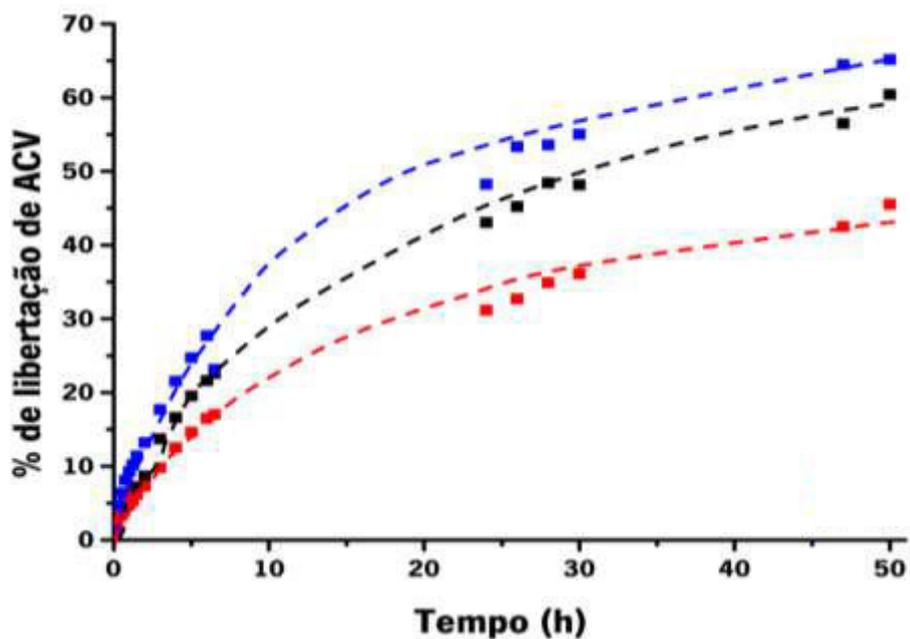


Figura 41 – Perfil de libertação do ACV de nanofibras de zeína em tampão pH \approx 5,5.
Legenda: ■ Réplica 1; ■ Réplica 2 e ■ Réplica 3.

Na Figura 42 é possível observar também os resultados obtidos com as mesmas fibras de zeína com ACV, mas neste caso o ensaio de libertação do fármaco foi feito em meio micelar. O perfil de libertação é idêntico, observando-se apenas que a libertação é mais rápida e mais eficiente no meio micelar, uma vez que ao fim das 50 horas mais de 90 % do ACV se libertou das fibras.

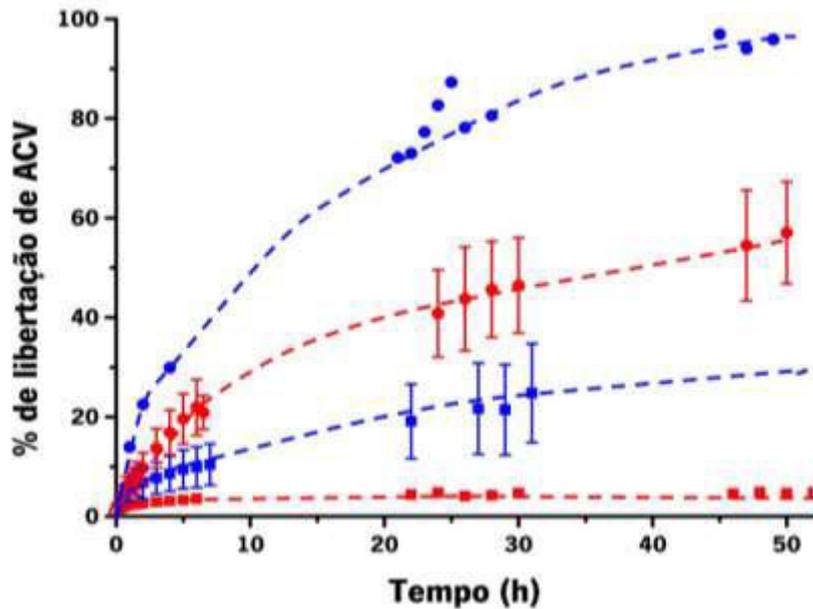


Figura 42 – Comparação dos perfis de liberação do ACV.

Legenda: **vermelho** – meio aquoso: ■ nanofibras de PCL e ● nanofibras de zeína;
azul – meio micelar: ■ nanofibras de PCL e ● nanofibras de zeína.
 As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

Comparando a forma como o ACV, em meio micelar, se liberta das fibras de zeína e das fibras de PCL (Figura 43) verifica-se que a liberação é mais rápida a partir das fibras de zeína, indicando que as fibras de zeína favorecem a liberação do ACV provavelmente por serem frágeis e mais solúveis em água, como era expectável pela sua natureza anfifílica [45].

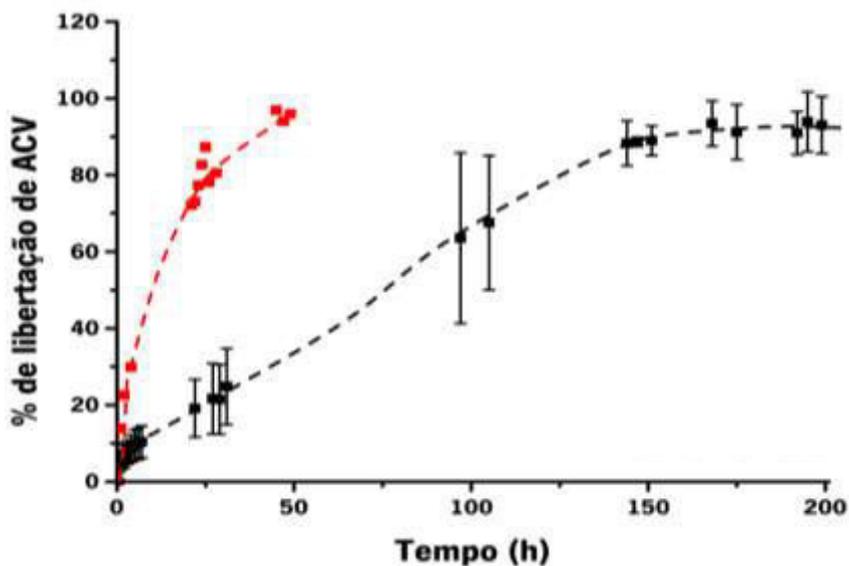


Figura 43 – Comparação dos perfis de liberação do ACV das fibras em meio micelar. Legenda: ■ nanofibras de PCL e ● nanofibras de zeína. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

Como já se referiu, foram também produzidas fibras poliméricas de PCL coencapsulando os dois princípios ativos. Na Figura 44 mostram-se os resultados obtidos para a libertação controlada do ACV destas fibras.

Este ensaio foi feito em meio micelar, colocando as fibras dentro de uma manga de diálise (*cut off* de 3,5 kDa). Uma vez que nos estudos anteriores se verificou alguma variabilidade entre as réplicas da mesma fibra e uma vez que uma possível razão apontada para esta variabilidade foi a forma como a fibra é exposta ao meio, este ensaio foi feito otimizando a forma como se colocam as fibras dentro da manga de diálise, tendo especial cuidado em colocar as fibras esticadas para assegurar, dentro do possível, que a área de contacto das fibras com o meio é idêntica nas três réplicas. Efetivamente a variabilidade dos resultados é menor quando comparada com a que foi observada nas fibras de PCL apenas com ACV, mostrada na Figura 39.

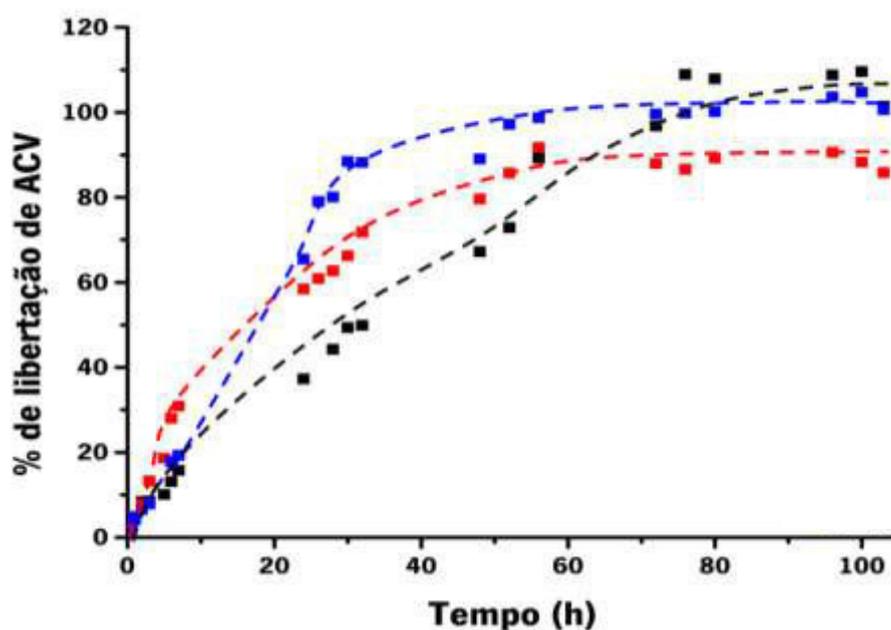


Figura 44 – Perfil de libertação do ACV a partir de nanofibras de PCL com ACV e ômega-3 em meio micelar.

Legenda: ■ Réplica 1; ■ Réplica 2 e ■ Réplica 3.

Os perfis da Figura 45 foram submetidos a um ajuste com diferentes modelos matemáticos [94,95], para melhor compreender o mecanismo de libertação do ACV. Nas Tabelas A5 do Anexo 5 apresentam-se os valores dos vários parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos matemáticos que apresentaram maior valor do coeficiente de determinação, R^2 (Modelos

de 1ª ordem, Korsmeyer-Peppas com ou sem efeito burst e Gallagher-Corrigan). Através do valor do R^2 é possível avaliar a qualidade do ajuste. No entanto, geralmente, esse valor tende a aumentar com a adição de mais parâmetros do modelo, independentemente do significado da variável adicionada. Ao comparar modelos com diferentes números de parâmetros, o coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$) é mais significativo:

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1-R^2)$$

em que n é o número de pontos experimentais e p é o número de parâmetros do modelo.

Através do cálculo de $R^2_{ajustado}$, (Tabelas A5 do Anexo 5) é possível afirmar que o modelo de Gallagher-Corrigan é aquele que proporciona um melhor ajuste aos pontos experimentais, sendo este ajuste o representado na Figura 45.

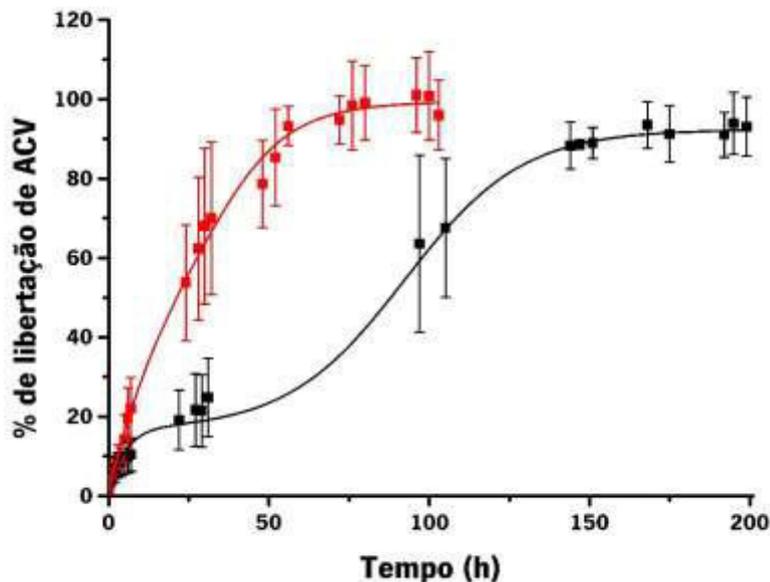


Figura 45 – Comparação do perfil de liberação do ACV a partir de PCL.

Legenda: ■ perfil de liberação do ACV a partir de nanofibras de PCL (fibras dispostas aleatoriamente dentro da manga) e ■ perfil de liberação do ACV a partir de nanofibras com a coencapsulação de ACV e ômega-3 (fibras dispostas esticadas dentro da manga). A linha representa o ajuste da cinética de liberação ao modelo de Gallagher-Corrigan. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

Segundo este modelo, a liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas apresenta muitas vezes um comportamento bifásico indicativo de uma fase inicial em que ocorre uma liberação mais rápida do fármaco adsorvido à superfície e de uma segunda fase onde o fármaco, mais profundamente imerso na matriz polimérica porosa, se vai libertar devido ao fenómeno

simultâneo de *swelling* (inchaço em contacto com o meio aquoso) e/ou erosão da matriz polimérica (Figura 46).



Figura 46 – Representação esquemática da libertação do fármaco ACV da matriz polimérica das nanofibras que justifica uma cinética bifásica ajustada pelo modelo de Gallagher-Corrigan.

A distinção das duas fases é particularmente notória no ensaio em que as fibras estão dispostas ao acaso dentro da manga (Figura 45 a cor preto) confirmando a necessidade de melhorar a acessibilidade da fibra ao meio de libertação. De facto, se a fibra não se encontra toda esticada e igualmente acessível ao meio, a libertação do fármaco dá-se por etapas que refletem uma libertação mais rápida das zonas mais acessíveis seguida de uma libertação mais lenta das zonas menos expostas ao meio. No ensaio em que as fibras foram colocadas esticadas dentro da manga, a distinção das duas fases foi atenuada, pois a acessibilidade da fibra ao meio de libertação é mais uniformemente controlada. Ainda assim verifica-se um comportamento bifásico característico da libertação de fármacos de matrizes poliméricas tal como referido para vários sistemas de entrega de fármacos de matriz polimérica [96-99]. Destes trabalhos reportados, um estudo de libertação de fármaco a partir de nanofibras poliméricas de PLA por *eletrospinning* refere precisamente que o comportamento de libertação controlada pode ser faseado dependendo das características da fibra, nomeadamente da sua porosidade, e da distribuição da malha polimérica (forma como várias camadas da matriz polimérica se sobrepõem condicionando uma libertação distinta entre o fármaco à superfície e o fármaco distribuído no interior da fibra) [100].

5.3.2. Doseamento do aciclovir na formulação comercial Zovirax™ creme

Para se poder comparar a cinética de libertação do ACV a partir das nanofibras produzidas com a cinética de libertação do ACV a partir de uma formulação comercial (Zovirax™ creme), foi

feito o doseamento do fármaco ao longo do tempo, numa forma idêntica à descrita anteriormente. Assim, uma massa previamente conhecida de creme foi espalhada no interior da manga de diálise e foi feito o ensaio de libertação, como habitualmente, em meio aquoso e micelar, a pH \approx 5,5. A Figura 47 mostra o resultado destes ensaios.

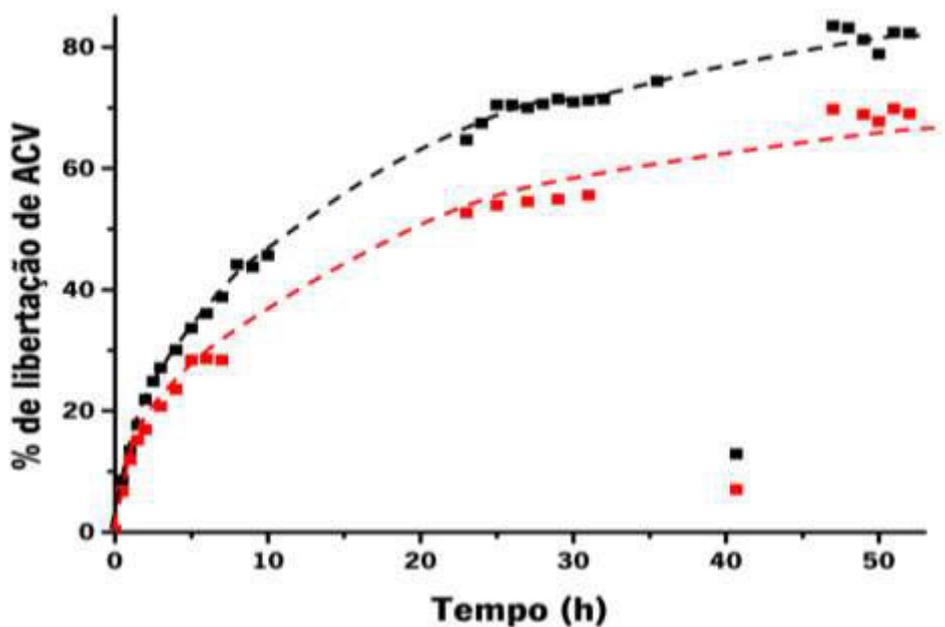


Figura 47 – Perfil de libertação do ACV da formulação comercial Zovirax™ Creme.

Legenda: ■ meio aquoso e ■ meio micelar.

Contrariamente ao que acontece com as fibras poliméricas, neste ensaio com a formulação comercial a libertação do ACV é mais eficiente no meio aquoso do que no meio micelar. Tal pode ser devido ao facto de, na formulação comercial, a estabilidade da emulsão O/A ser afetada na presença do meio aquoso que pode alterar o efeito do agente emulsificante por diminuição da sua concentração. O meio micelar, por sua vez, contendo tensoativos pode contribuir para a maior estabilização da emulsão O/A diminuindo assim a libertação do ACV. Para facilitar a comparação, na Figura 48 apresentam-se os resultados da libertação de ACV obtidos com as fibras poliméricas e com a formulação comercial, em meio micelar.

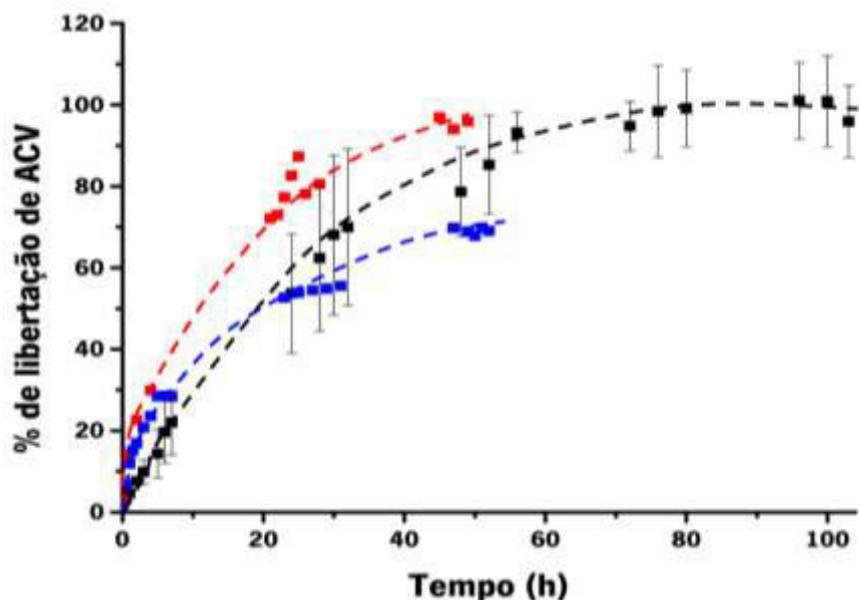


Figura 48 – Comparação dos perfis de liberação do ACV das nanofibras produzidas e da formulação comercial em meio micelar. Legenda: ■ nanofibras de PCL, ■ nanofibras de zeína e ■ Zovirax™ creme. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

5.3.3. Doseamento do ómega-3 nas fibras poliméricas

O estudo da liberação dos ácidos gordos ómega-3 a partir das fibras de zeína ou de PCL, bem como a partir das fibras de PCL contendo os dois princípios ativos incorporados em simultâneo, foi feito em hexano (Figura 49). Nestes ensaios as fibras foram colocadas diretamente em contacto com 10 mL do solvente.

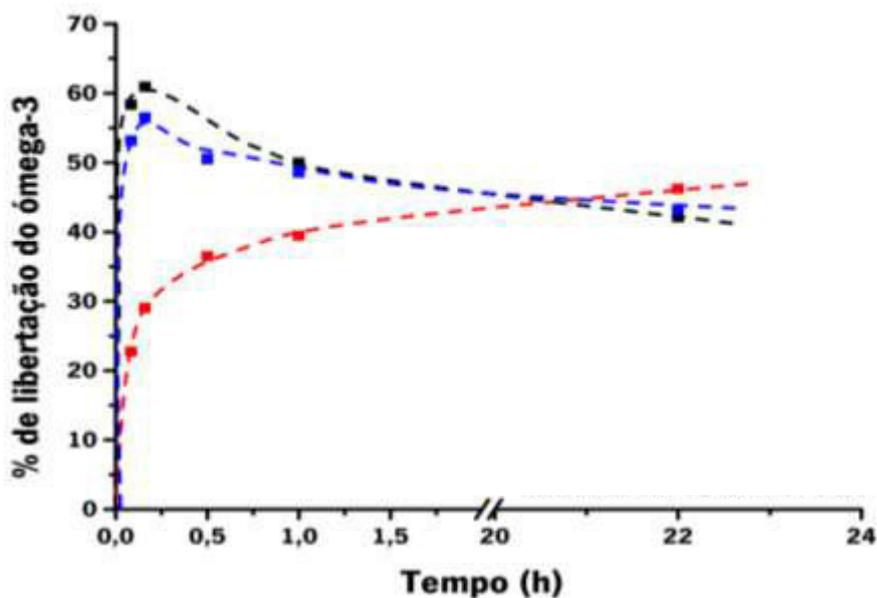


Figura 49 – Perfil de liberação do ômega-3 em hexano. Legenda: ■ nanofibras de PCL, ■ nanofibras de zeína e ■ nanofibras de PCL com coencapsulação de ACV e ômega-3.

O estudo da liberação dos ácidos gordos ômega-3 a partir das fibras de zeína revelou uma liberação imediata de cerca de 35 % durante a 1ª hora de contacto com o solvente e uma liberação mais lenta até cerca dos 45 % no final de 22 h de imersão da fibra no solvente. Já nas fibras de PCL com ou sem ACV incorporado a liberação de ômega-3 atingiu cerca de 60 % logo ao fim de 10 min de contacto da fibra com o solvente diminuindo até cerca de 40 % no final de 22h de ensaio. As diferenças observadas nos dois tipos de fibras dizem respeito aos diferentes graus de lipofilicidade dos polímeros que as constituem. A zeína, sendo um polímero anfifílico demonstra afinidade para compostos lipofílicos e hidrofílicos. Assim, a zeína ($\text{LogP}=1,39$, calculado com o software Chemaxon[®]) é capaz de encapsular compostos de elevada lipofilia como os ácidos gordos ômega-3 ($\text{LogP}=6,10$ calculado com o software Chemaxon[®]). No entanto o hexano possui maior lipofilia que a zeína ($\text{LogP}=3,90$) [101], o que justifica a rápida liberação do ômega-3 para este solvente. A liberação a partir das fibras de zeína não foi completa durante o período de avaliação, provavelmente porque ocorreu apenas a liberação do ômega-3 mais acessível ao solvente. O PCL é descrito como um polímero muito lipofílico ($\text{LogP}=4,03$) [102] capaz de encapsular fármacos fracamente solúveis em água. A afinidade do ômega-3 para o PCL e para o hexano deve ser muito semelhante, uma vez que o solvente e o polímero apresentam valores de LogP muito próximos. Tal justifica que, inicialmente, se dê uma liberação rápida do ácido gordo

ômega-3 por contacto com o solvente, mas que depois haja um decréscimo da quantidade de ácidos gordos presentes no meio, provavelmente por reabsorção do composto bioativo à matriz polimérica com a qual apresenta grande afinidade.

Na Figura 50 comparam-se os perfis de libertação do ACV a partir de fibras de PCL com os dois compostos bioativos encapsulados, pretendendo-se mostrar o efeito do envelhecimento das fibras. Este efeito é sobretudo devido à oxidação ao ar e à luz do ômega-3. Assim, as fibras produzidas há mais tempo, expostas ao ar e à luz, revelaram uma oxidação progressiva com alterações macroscópicas visíveis: cor amarela e maior rigidez ao tato (Figura 51). Esta rigidez advém do facto de os ácidos gordos polinsaturados e portanto muito fluidos (devido à falta de empacotamento que as ligações duplas proporcionam nas cadeias hidrocarbonadas) sofrerem peroxidação e originarem derivados saturados mais rígidos (maior empacotamento das cadeias hidrocarbonadas) [103]. Os produtos da peroxidação dos ácidos gordos insaturados conferem à fibra oxidada regiões mais rígidas e ordenadas que poderão assim explicar uma menor libertação (cerca de 8 %) ou uma libertação mais lenta do ACV encapsulado nestas fibras, comparativamente às fibras não oxidadas. A rigidez da matriz polimérica após oxidação também poderá provocar uma menor molhabilidade da fibra diminuindo a acessibilidade ao meio, justificando assim a menor libertação de fármaco observada. Este efeito está de acordo com o reportado acerca de polímeros com regiões mais cristalinas que têm taxas de libertação mais lentas em comparação com regiões amorfas devido à absorção de água muito baixa em matrizes tridimensionais ordenadas [104].

Efetivamente, as constantes de libertação k_1 e k_2 (ver Tabela 5-3 do Anexo 5) são maiores nas fibras recém produzidas ($0,049 \pm 0,010$ e $0,092 \pm 0,0099 \text{ h}^{-1}$) do que nas fibras mais envelhecidas ($0,0289 \pm 0,013$ e $0,074 \pm 0,0098 \text{ h}^{-1}$, respetivamente). Assim, nas nanofibras recém preparadas, atinge-se cerca de 66 % de libertação do ACV ao fim de 36 horas, e apenas de 37 % ao fim de 56 horas nas fibras oxidadas. A segunda fase de libertação de ACV é mais pronunciada nas fibras oxidadas (visível através da relação entre F_{max} e Fb), uma vez que ao fim de 100 horas as percentagens tendem a aproximar-se dos 100 %.

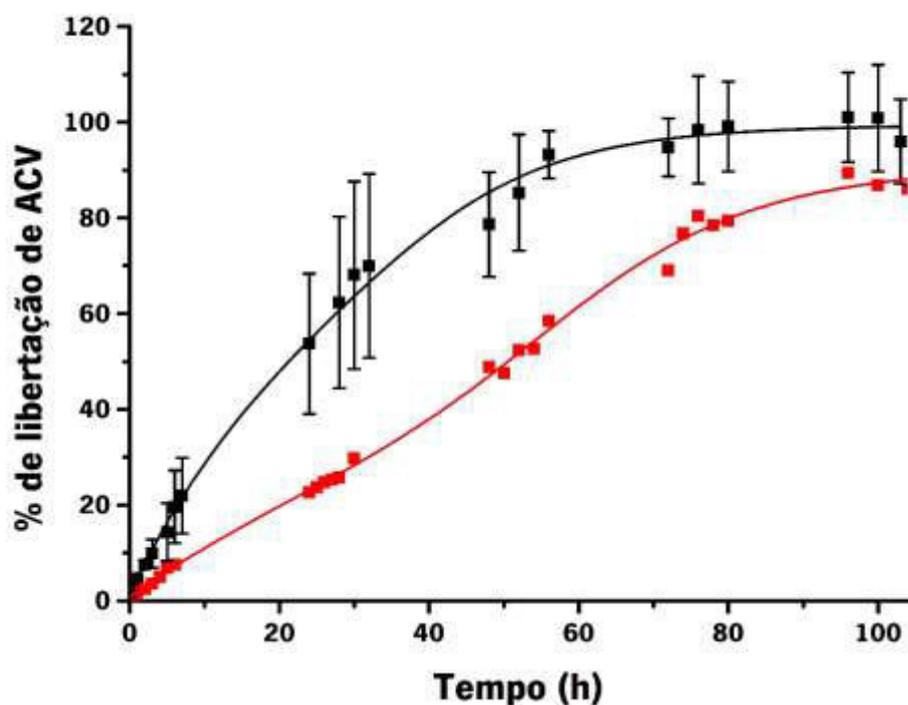


Figura 50 – Comparação do perfil de liberação de ACV das nanofibras de PCL com ACV e ômega-3 com diferentes estados de oxidação. Legenda: ■ nanofibras não oxidadas (recém produzidas) e ■ nanofibras oxidadas (produzidas há 4 meses). Ambos os ensaios foram realizados em meio micelar. A linha representa o ajuste da cinética de liberação ao modelo de Gallagher-Corrigan. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.



Figura 51 – Fotografia de nanofibras de PCL com ômega-3 com diferentes estados de oxidação. À esquerda nanofibras de PCL com ômega-3 recém produzidas. À direita nanofibras de PCL com ômega-3 4 meses após a produção.

5.4. Caracterização das nanofibras de PCL com a coencapsulação de ACV e ácidos gordos ômega-3

5.4.1. Microscopia eletrônica de varrimento com dispersão de raios-X (SEM-EDS)

As nanofibras de PCL (Figura 52) e de PCL com ACV, com diferentes percentagens de ACV (Figura 53), foram observadas no microscópio eletrônico. O diâmetro médio das fibras foi medido através do *software* de imagem *Digimazer*.

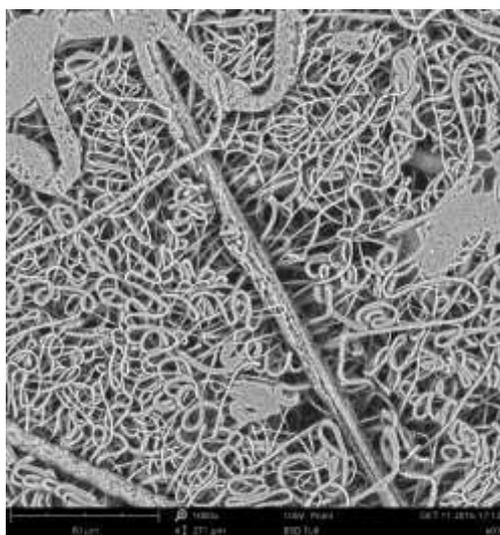


Figura 52 – Visualização por microscopia eletrônica de varrimento, de nanofibras de PCL com uma ampliação de 1000X.

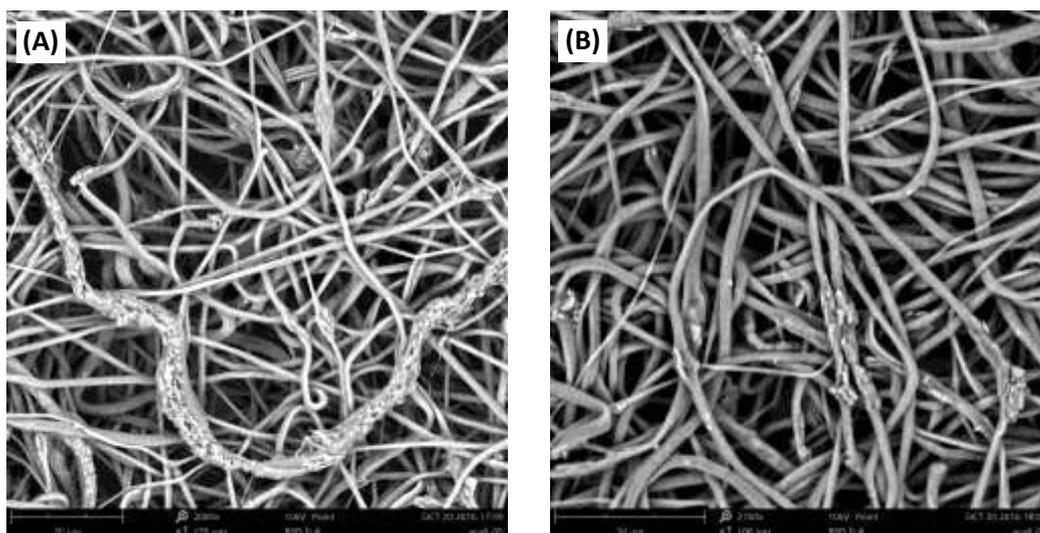


Figura 53 – Visualização por microscopia eletrônica de varrimento de nanofibras de PCL com ACV. (A) – com 2 % ACV (m/v) e ampliação de 2000X; (B) – com 4 % ACV (m/v) e ampliação de 2700X.

As nanofibras produzidas apresentam, microscopicamente, uma morfologia heterogênea com grande variabilidade de diâmetros e orientação aleatória. Podem ser identificados, na Figura 52, aglomerados de nanofibras de PCL. Na Figura 53(A) é possível observar uma estrutura mais grossa, que atravessa toda a imagem, em cujo interior parecem existir nanofibras de menor diâmetro.

Numa tentativa de perceber a origem do aspeto das fibras mostradas na Figura 52, obtiveram-se duas imagens, exatamente nas mesmas condições (ampliação de 2000X) e da mesma matriz de nanofibras de PCL com ACV e ómega-3. Estas imagens mostram-se na Figura 54 sendo que na parte (A) se observa a face superior da fibra e na parte (B) a face inferior da fibra, ou seja, a face que ficou agarrada ao coletor, papel de alumínio.

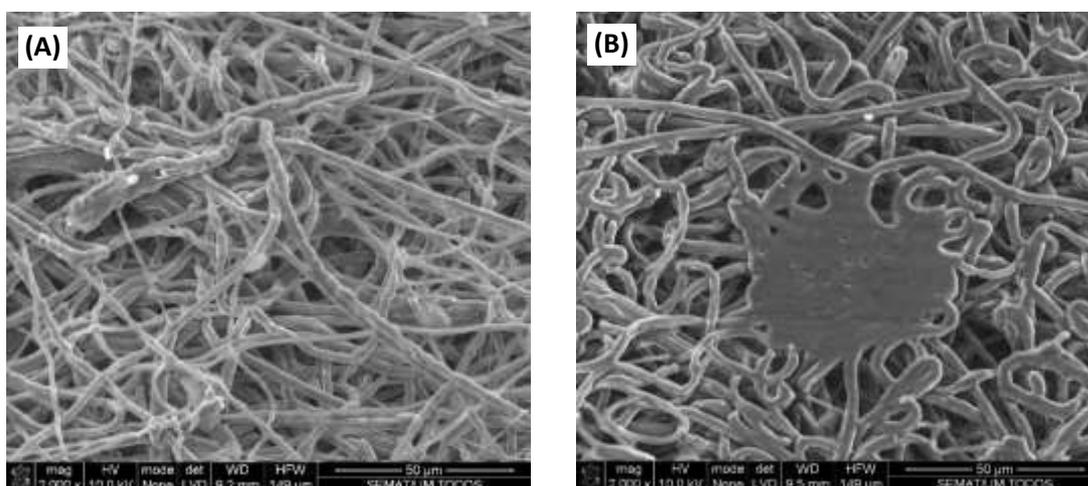


Figura 54 – Visualização por microscopia eletrónica de varrimento. de nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 (ampliação de 2000X).
(A) – face superior; (B) – face inferior

Estas imagens confirmam que, tal como esperado, as fibras são muito pouco densas, muito porosas, e por isso, o facto de se depositarem sobre a superfície lisa do coletor (papel de alumínio) faz com que coalesçam e percam rugosidade superficial na face inferior que fica em contacto com o coletor. Mesmo a olho nu consegue-se observar que as duas faces da fibra são diferentes tendo a face inferior mais brilho, o que indica ser mais lisa, menos rugosa do que a face superior. Podemos assim afirmar que a imagem mostrada na Figura 52 (B) deverá ser da face inferior da fibra.

Usando o software *Digimazer* foram medidos, a partir das imagens obtidas, os diâmetros de 1000 fibras e foi feito o histograma representativo da distribuição de tamanhos. Os histogramas

obtidos apresentam-se na Figura 55. O diâmetro médio das fibras de PCL é de 1,75 μm com um desvio padrão de 37,7 % (0,66 μm). As nanofibras de PCL com 2 % ACV apresentam um diâmetro médio ligeiramente superior, cerca de 1,87 μm com um desvio padrão da ordem dos 56,7 % (1,06 μm).

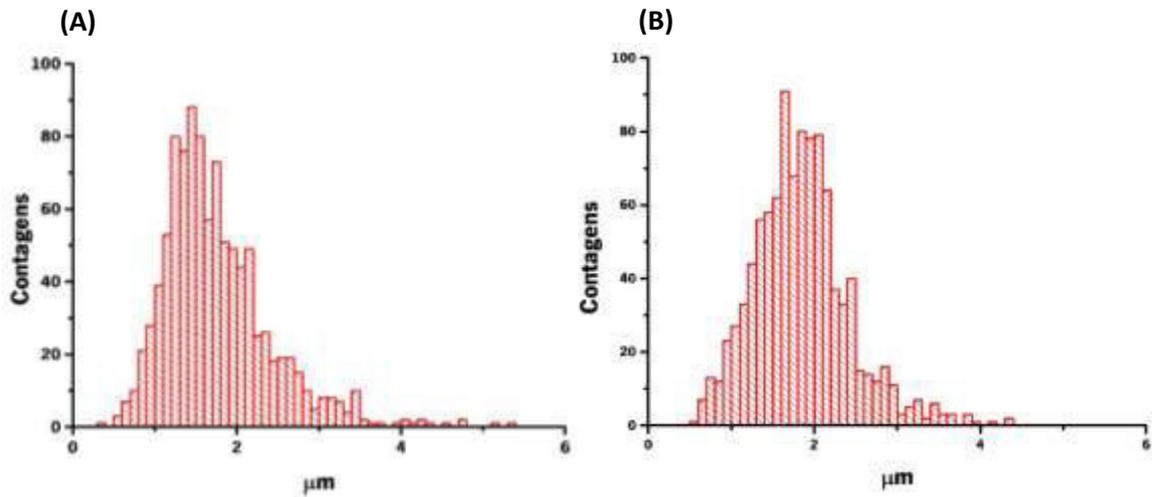


Figura 55 – Histogramas representativos da distribuição dos diâmetros das fibras.

(A) – nanofibras de PCL e (B) – nanofibras de PCL com 2 % ACV (m/v).

Para confirmar que a matriz polimérica é efetivamente muito porosa, tentou-se medir a sua espessura através de uma imagem de SEM. Procedeu-se então ao congelamento em azoto líquido de um pedaço de fibra e corte com faca micrométrica para evitar deformação na margem de corte. Com este procedimento conseguiu-se obter a imagem que se mostra na Figura 56, podendo-se ver que esta amostra tem uma espessura de aproximadamente 315 μm .

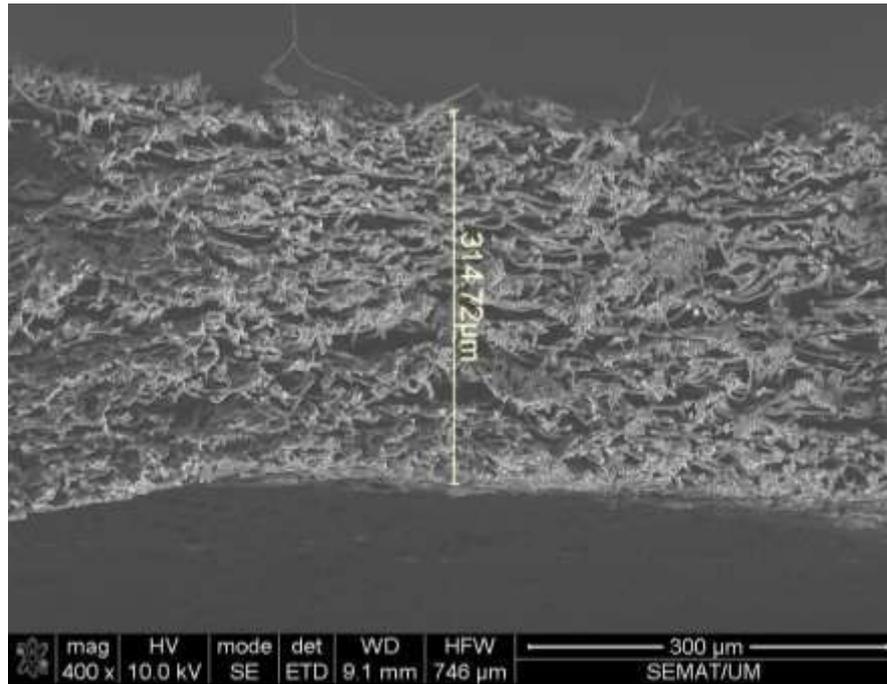


Figura 56 – Imagem de microscopia eletrônica de varrimento de um corte lateral de uma matriz polimérica de fibras de PCL contendo ACV e ômega-3 realizado com ultramicrótomo após congelamento em azoto líquido da amostra. A espessura da matriz polimérica é de cerca de 315 μm.

Pegando numa amostra de fibra idêntica a esta, pesando-a rigorosamente e medindo o seu comprimento e largura, foi possível estimar a porosidade desta amostra. O que se fez foi calcular a massa volúmica da amostra ($\rho_{PCL, fibras}$) dividindo a sua massa pelo seu volume, usando a espessura obtida por SEM. Comparando esta massa volúmica com a do PCL em *bulk* ($1,145 \text{ g cm}^{-3}$) estimou-se a porosidade (p) da amostra fazendo [60]:

$$p = 1 - \left(\frac{\rho_{PCL, fibras}}{\rho_{PCL, bulk}} \right)$$

O valor obtido obtido foi $p = 0,74$, o que significa que cerca de 74 % do volume da fibra serão espaços vazios, confirmando-se a elevada porosidade das fibras produzidas.

Para além da observação da morfologia das fibras, foi também analisada a sua composição elementar por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDS). A análise EDS foi efetuada em três pontos de uma amostra de fibras de PCL contendo ACV, assinalados na Figura 57. O espectro obtido mostra-se também nesta figura.

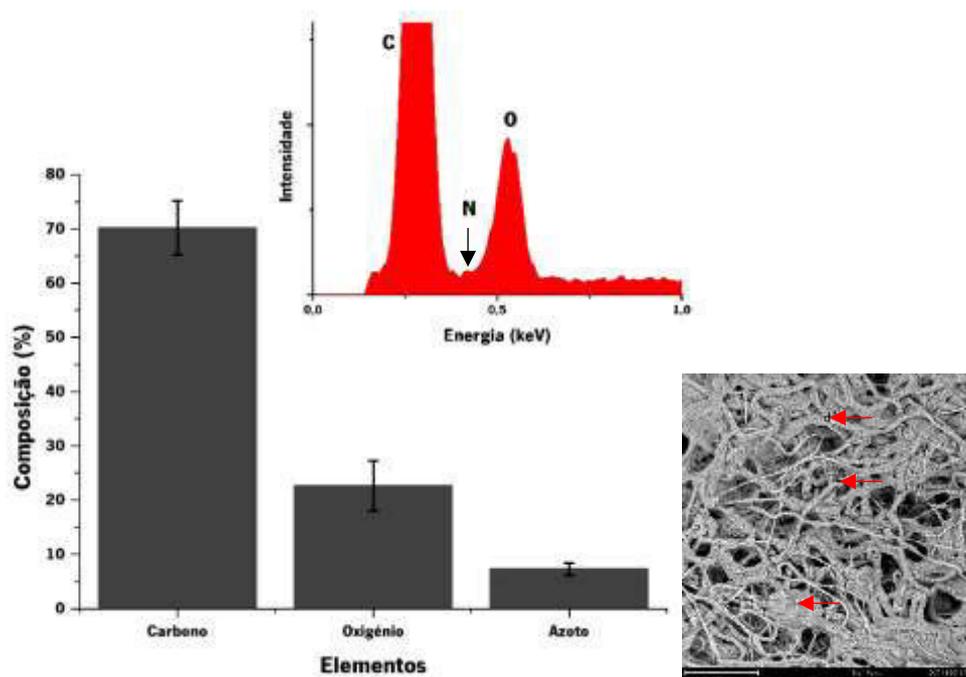


Figura 57 – Espectro de EDS de uma amostra de fibras de PCL com ACV mostrando a presença dos elementos azoto (N), carbono (C) e oxigénio (O). As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

O polímero PCL apresenta uma composição elementar à base de carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) nas proporções indicadas pela sua fórmula molecular: $C_6H_{10}O_2$. A molécula de ACV apresenta uma composição elementar também à base de C, H e O, apresentando adicionalmente o elemento azoto (N) e uma proporção elementar indicada na sua fórmula molecular: $C_8H_{11}N_5O_3$. Da análise da composição elementar das nanofibras de PCL com ACV é possível verificar que o elemento presente em maior percentagem é o carbono, com $70,2 \pm 5,0$ %, seguindo-se o oxigénio com uma percentagem de $22,6 \pm 4,6$ %. Os elementos C e O existem quer nas moléculas de ACV quer nas moléculas de PCL constituintes da fibra. No entanto, o azoto, que está presente na fibra analisada numa percentagem de $7,2 \pm 1,2$ %, permite confirmar a encapsulação de ACV na matriz polimérica de PCL, uma vez que este elemento apenas existe na molécula do fármaco. Se considerarmos que o N presente no espectro de EDS provém somente do ACV, podemos através da % de N determinada na fibra e da fórmula molecular do ACV inferir as percentagens de carbono ($8/5 \times 7,2\% = 11,5\%$) e de oxigénio ($3/5 \times 7,2\% = 4,3\%$) provenientes do ACV. Sabendo estas percentagens e considerando que as percentagens dos elementos carbono e oxigénio determinadas na fibra de PCL com ACV foram muito superiores, conseguimos calcular, pela diferença dos dois valores, qual a percentagem de carbono e de oxigénio correspondentes

somente à fibra de PCL ($70,2\% - 11,5\% = 58,7\%$ de C; $22,6\% - 4,3\% = 18,3\%$ de O). Estes valores vêm mais uma vez confirmar a proporção elementar encontrada no espectro de EDS uma vez que o rácio C:O obtido para o PCL é de cerca de 3 (C:O = $58,7\%:22,6\%$), que é o rácio teórico indicado pela fórmula molecular deste polímero (6:2).

5.4.2. Difração de raios-X

Para perceber o efeito da técnica de *eletrospinning* na estrutura cristalina do polímero PCL, foi feita a análise comparativa do difratograma do PCL em grânulos com o difratograma do PCL em nanofibras (Figura 58).

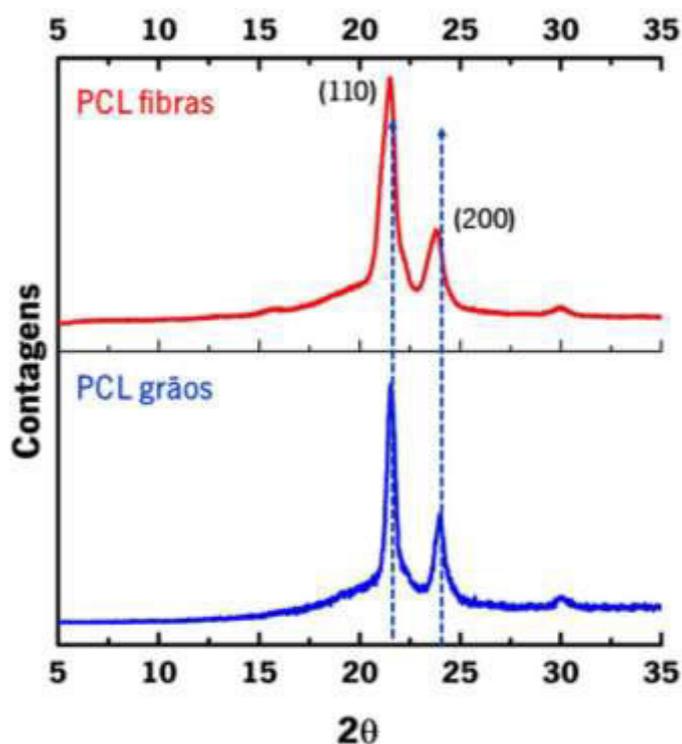


Figura 58 – Difratograma de raios-X de nanofibras de PCL (vermelho) e de PCL em grânulos (azul). As linhas verticais indicam as posições dos picos de difração do PCL em grânulos e permitem identificar um desvio de ambos os picos no difratograma de PCL nas nanofibras. (110) e (200) correspondem aos índices de Miller (hkl) e identificam os planos de difração do PCL usados para o cálculo do tamanho das cristalites.

Por observação da figura verificamos que em ambos difratogramas o PCL apresenta uma estrutura cristalina com dois picos mais intensos situados em $2\theta = 21,55^\circ$ e $24,01^\circ$ para o PCL em grânulos e em $2\theta = 21,47^\circ$ e $23,77^\circ$ para o PCL em fibras (Tabela 12). Estes dois picos estão de acordo com o reportado na literatura como correspondentes aos planos de difração (110) e

(200) e indicam uma estrutura cristalina ortorrômbica do polímero [105-107]. O desvio dos picos de Bragg, para menores ângulos de θ , quando o polímero de PCL se encontra nas nanofibras pode ser atribuído a uma tensão de estiramento [108] a que o polímero é sujeito durante o processo de fabrico por *eletrospinning*.

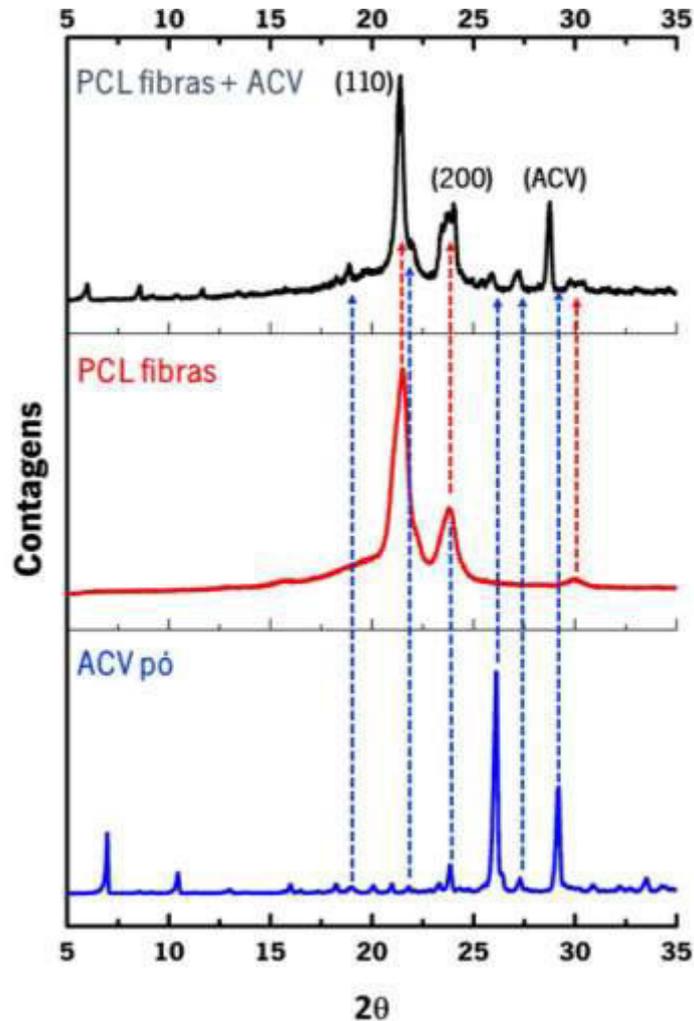


Figura 59 – Difratoograma de raios-X de ACV pó (azul), nanofibras de PCL (vermelho) e nanofibras de PCL com 4 % de ACV (preto). As linhas verticais azuis indicam as posições dos picos de difração do ACV pó e permitem identificar a posição destes picos quando o ACV se encontra nas nanofibras. As linhas verticais vermelhas indicam as posições dos picos de difração das nanofibras de PCL e permitem identificar a posição destes quando o PCL se encontra nas nanofibras contendo ACV. (110) e (200) correspondem aos índices de Miller (hkl) e identificam os planos de difração do PCL usados para o cálculo do tamanho das cristalites de PCL. (ACV) identifica o pico de Bragg usado para o cálculo da cristalite de ACV.

Foram também analisados por XRD, o ACV em estado sólido (pó), as nanofibras de PCL assim como as nanofibras de PCL com 4 % de ACV (Figura 59).

Por análise da figura é possível identificar claramente o ACV nas fibras de PCL pela presença de picos de difração adicionais que não correspondem ao polímero e que são atribuídos ao fármaco por comparação com o espectro de difração do ACV pó. No entanto a comparação com as posições dos picos de difração do ACV pó permite identificar um desvio destes picos, para menores valores de θ , quando o ACV se encontra nas nanofibras. Este desvio pode ser mais uma vez atribuído à tensão de estiramento [108] a que o ACV é sujeito durante o processo de fabrico das nanofibras de PCL.

Adicionalmente foram estimados os tamanhos das cristalites (Tabela 12) através da equação de Scherrer:

$$\langle L \rangle_{hkl} = \frac{K\lambda}{\cos \theta}$$

onde $\langle L \rangle_{hkl}$ é o tamanho da cristalite estimado, k é a constante de Scherrer (0,94) e λ é o comprimento de onda da radiação (raios-X) incidente (1,54 Å), Δ é a largura a meia altura (em radianos) do pico de difração considerado e θ é a sua posição angular (em graus).

Tabela 12 – Quadro resumo dos parâmetros do XRD para as diferentes amostras analisadas

Amostras analisadas	2 θ (°)			Tamanho estimado da cristalite (nm)
	(110)	(200)	(ACV)	
ACV em pó	-	-	29,2	52,3
PCL grãos	21,6	24,0	-	19,3±1,8
Nanofibras de PCL	21,5	23,8	-	13,0±0,4
Nanofibras de PCL com ACV	21,4	23,8		19,1±2,6
	-	-	28,7	44,6

(110) e (200) referem-se aos picos mais intensos do PCL e (ACV) refere-se ao pico mais intenso do ACV nas nanofibras poliméricas (ver Figura 59).

Verifica-se que o PCL nas nanofibras apresenta um tamanho de cristalite menor que o PCL em grânulos. Tal pode ser igualmente devido à tensão de estiramento que provoca um alinhamento das cadeias moleculares de PCL ao longo do eixo da fibra. É descrito na literatura que estas cadeias esticadas de PCL podem atuar como núcleos para subsequente cristalização e que os núcleos crescentes podem resultar numa diminuição no tamanho das cristalites [109].

No entanto, o tamanho estimado das cristalites de PCL aumenta quando o ACV é incluído nas nanofibras. Um aumento da cristalite nas fibras deste polímero foi reportado na literatura como correlacionável com uma diminuição do grau de cristalinidade das mesmas. [109]. Assim é possível concluir que a inclusão do fármaco ACV nas fibras de PCL provoca diminuição do seu grau de cristalinidade o que corrobora os resultados obtidos por DSC (ver secção 5.4.3.).

Relativamente ao tamanho das cristalites de ACV verifica-se que diminui quando o fármaco é incorporado nas nanofibras possivelmente em resultado da tensão de estiramento já referida. Adicionalmente esta tensão de estiramento terá provocado nos cristais de fármaco uma certa texturização, que se percebe analisando as intensidades relativas dos picos do ACV no pó e nas fibras. No ACV em pó, o difratograma obtido é o resultado da distribuição aleatória de um grande número de pequenos cristais. Nos difratogramas das fibras o que se observa é também o resultado estatístico de um grande número de pequenos cristais, mas que não possuem necessariamente orientações relativas arbitrárias. Há, portanto, orientações preferenciais de crescimento dos cristais nas fibras poliméricas o que faz inverter completamente a relação de intensidades entre os picos situados a cerca de 26° e 29° , tornando-se este último o mais proeminente nas fibras, como se mostra na Figura 60 (nesta figura as setas azuis indicam picos de difração do ACV que sofreram inversão da intensidade relativa quando o ACV foi incluído na fibra).

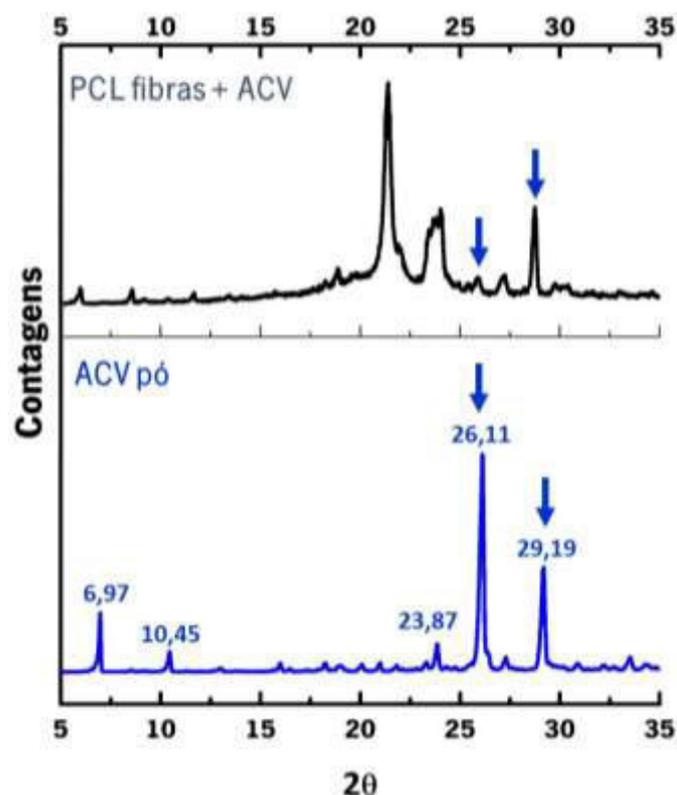


Figura 60 – Difratoograma de raios-X de ACV pó (azul) e nanofibras de PCL com 4 % de ACV (preto). As setas azuis assinalam dois picos cujas intensidades relativas sofreram inversão quando o ACV foi incluído nas fibras de PCL (texturização). No difratograma do ACV estão ainda assinaladas as posições (2θ em $^\circ$) dos principais picos de difração que indiciam tratar-se da forma polimórfica V.

A análise XRD do ACV pó permitiu ainda identificar a forma polimórfica do fármaco utilizado neste trabalho. A molécula de ACV pode apresentar 6 polimorfos sendo classificados de acordo com o teor em água, apresentando diferentes picos de difração [110]. Na Tabela 13 estão representados os principais picos de difração dos diferentes polimorfos de ACV (com intensidade superior a 50 %).

Tabela 13 – Picos de difração dos diferentes polimorfos de ACV.

Forma I	Forma II	Forma III	Forma IV	Forma V	Forma VI
2θ ($^\circ$)					
23,40	6,23	8,05	8,54	6,99	5,90
24,07	12,14	11,35	19,22	10,50	
28,74	18,71	22,70	22,54	23,92	
	19,72	27,70	27,03	26,14	
	23,88			29,26	
	25,67				
	27,69				

De acordo com a análise da tabela e por comparação com o difratograma de ACV obtido (Figura 60) é possível classificar o ACV utilizado neste trabalho, como sendo o polimorfo V, que é uma forma hidratada do fármaco (3:2) [110]

5.4.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

O DSC é uma técnica amplamente utilizada para estudar as propriedades térmicas de macromoléculas e estratos biológicos. Inicialmente o DSC foi desenvolvido para a indústria farmacêutica estudar os excipientes e os fármacos; atualmente é também utilizado para o estudo dos sistemas de administração de fármacos e para o estudo das interações destes sistemas com as membranas biomiméticas [111]. Desde modo foi efetuada uma análise por DSC às nanofibras de PCL, sem e com os compostos bioativos incorporados, de modo a inferir sobre a interação dos compostos bioativos com a matriz polimérica. Foi também feita uma caracterização térmica por DSC do aciclovir em pó.

Na Figura 61 está representada a curva calorimétrica do ACV na forma de pó onde é possível identificar três transições entálpicas de primeira ordem. A primeira transição ocorre a 137,4 °C com uma variação da entalpia (ΔH) de 116 J g⁻¹. Esta transição possivelmente corresponde à perda de água de hidratação. A segunda transição ocorre a 175,7 °C com um ΔH de 15,6 J g⁻¹. Esta transição, cuja variação entálpica é muito pequena, foi atribuída a uma possível alteração estrutural da molécula de ACV. Aos 253,5 °C dá-se a fusão do ACV ($\Delta H = 139,3$ J g⁻¹).

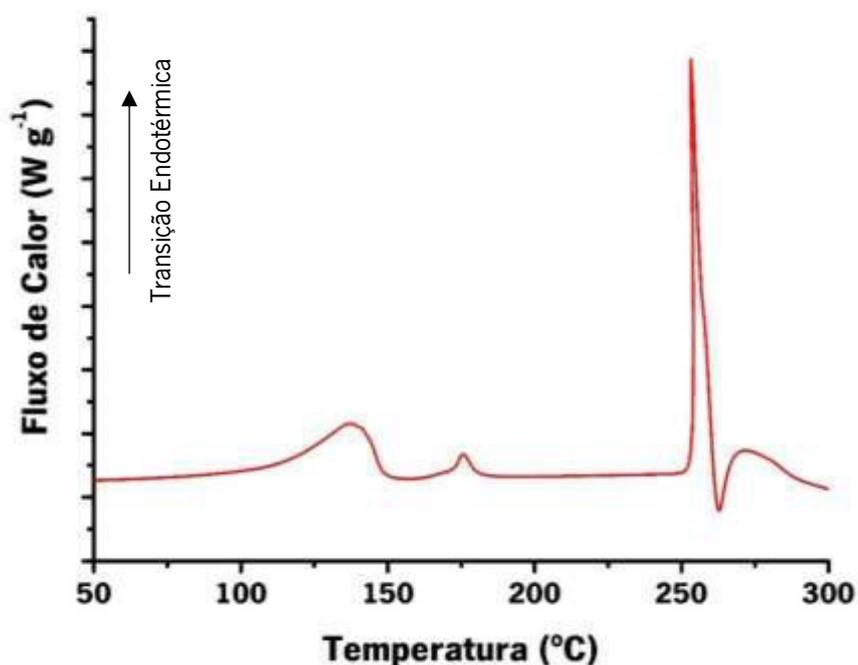


Figura 61 – Curva calorimétrica do ACV em pó a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto.

Os dados apresentados estão de acordo com os reportados na literatura. Deng-Guang Yu *et al.* (2010) reportam uma transição endotérmica do ACV na forma pura aos 257,1 °C ($\Delta H_f = 162,6 \text{ J g}^{-1}$) [112,113]. Através da análise de DSC é possível inferir que o ACV usado na presente dissertação não se encontra na forma pura sendo provavelmente uma forma polimórfica. De acordo com Lutket *et al.* (2011) pela técnica de DSC é possível identificar quatro formas polimórficas da molécula de ACV, descritas na Tabela 14 [110].

Tabela 14 – Comportamento térmico das diferentes formas polimórficas da molécula de ACV [110].

Forma I	Apresenta duas transições endotérmicas a 167 °C e 176 °C e uma temperatura de fusão a 248,8 °C (início aos 245 °C)
Forma II	Não exibe transições antes da temperatura de fusão a 260,1° C (início aos 257,6 °C)
Forma V	Exibe duas transições sobrepostas entre 148 °C e 179 °C e uma temperatura de fusão aos 247,4 °C (início de 240,0 °C)
Forma VI	Exibe uma transição entre 50 °C e 90 °C e uma nova transição a 170 °C. A temperatura de fusão é aos 252,9 °C (início em 250,0 °C)

Por comparação da curva de DSC mostrada na Figura 61 com os dados da Tabela 14 é possível concluir que o ACV utilizado neste trabalho corresponde à forma V, na qual o ACV se encontra na forma hidratada.

Na Figura 62 é possível comparar as curvas de DSC do PCL (em grãos) com o PCL na forma de nanofibras. O PCL granulado apresenta uma temperatura de fusão (T_f) aos 57,9 °C com uma ΔH de 48,9 J g⁻¹, enquanto que o PCL na forma de nanofibras apresenta uma temperatura de fusão ligeiramente menor (56,7 °C) e uma ΔH de 56,3 J g⁻¹. Na amostra de PCL granulado a transição de fase ocorre de forma mais heterogênea, com menor cooperatividade, resultando num pico mais largo. Na amostra de PCL sob a forma de nanofibras, as moléculas de PCL estão mais organizadas pelo que a transição ocorre de modo mais cooperativo, resultando num pico mais estreito. Em ambos os casos a T_f do PCL está próxima da reportada na literatura. Para uma taxa de aquecimento de 9 °C por minuto (a mais próxima à utilizada nesta dissertação) a T_f do PCL granulado é de 57,5 °C [114]. Por outro lado a T_f do PCL em nanofibras é de 61 °C para uma taxa de aquecimento de 5 °C por minuto [105]. É necessário referir que as diferenças encontradas para a T_f podem ser devidas a diversos fatores nomeadamente a diferenças nas taxas de aquecimento utilizadas durante o varrimento de temperaturas. Por exemplo, Rusu, Ursu & Rusu *et al.* (2011) reportam diferenças na T_f do PCL (em pó) entre 57,5°C e 60,8°C com diferentes taxas de aquecimento (desde 9 °C a 36 °C por minuto). Assim, relativamente ao reportado são aceitáveis as diferenças obtidas neste estudo para as T_f do PCL, quer em fibras quer em grânulos, uma vez que as taxas de aquecimento utilizadas neste estudo diferem um pouco das reportadas na literatura. Outros fatores que justificam diferenças em relação à T_f reportada são a orientação das fibras (fibras cujo grau de orientação é maior apresentam uma maior T_f) [115] e o ciclo calorimétrico de aquecimento no qual foi efetuada a análise (regra geral no 1º ciclo de aquecimento o PCL apresenta um maior valor de T_f que resulta de uma maior cristalinidade) [116].

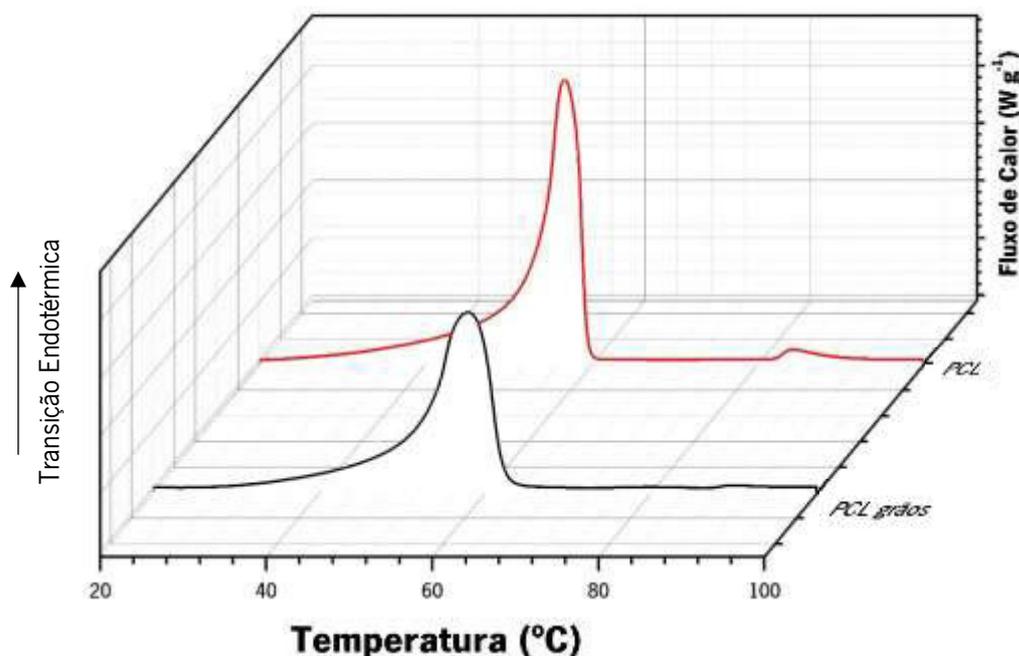


Figura 62 – Curva calorimétrica do PCL em grãos (preto) e na forma de nanofibras (vermelho). A taxa de aquecimento foi de 10 °C por minuto.

Na Figura 63 estão representadas as curvas calorimétricas das nanofibras de PCL com e sem os compostos bioativos incorporados, assim a curva calorimétrica do pó de ACV. A curva calorimétrica do ACV não apresenta nenhuma transição abaixo dos 100 °C, pelo que a transição localizada a cerca de 57 °C das nanofibras de PCL+ACV deve-se unicamente à fusão do PCL. Deste modo comparando a transição que ocorre nas nanofibras de PCL com a das nanofibras de PCL+ACV; de PCL+ômega-3 e de PCL+ACV+ômega-3 (Figura 63 e Tabela 15), é possível afirmar que a T_f não varia de um modo significativo, o que indica que os compostos bioativos adicionados à fibra não comprometem a sua estrutura. No entanto a incorporação dos compostos bioativos na fibra resulta numa diminuição da ΔH em cerca de 19 J g⁻¹. Isto indica que a incorporação do ACV e do ômega-3, apesar de não comprometerem a integridade estrutural da fibra, tornam a sua matriz polimérica mais desordenada, isto é, diminuem a sua cristalinidade (Tabela 15, coluna 4). A diminuição da cristalinidade de nanofibras de PCL por inclusão de aditivos é também reportada na literatura [117].

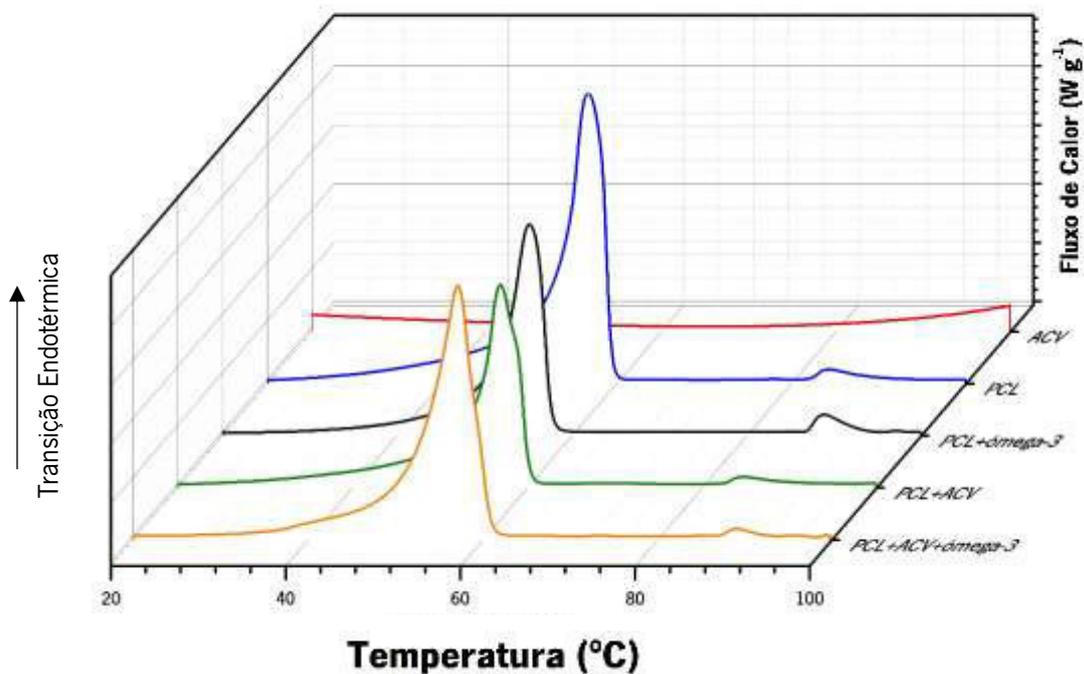


Figura 63 – Curvas calorimétricas das nanofibras de PCL com e sem os compostos bioativos assim como do ACV.

Tabela 15 – Quadro resumo dos parâmetros do DSC para as diferentes amostras analisadas.

	T_f (°C) ^a	ΔH (J g ⁻¹) ^b	Perda de Cristalinidade (%) ^c
ACV em pó	253,5	139,4	
PCL grãos	57,9	48,9	
Nanofibras de PCL	56,7	56,3	
Nanofibras de PCL com ACV	56,9	38,2	32,1
Nanofibras de PCL com ómega-3	55,1	35,7	36,6
Nanofibras de PCL com ACV e ómega-3	57,1	37,2	33,9

^a T_f é a temperatura de fusão; ^b ΔH é a variação de entalpia associada à transição;

^c Perda de Cristalinidade (%) = $((\Delta H_{nanofibras\ PCL} - \Delta H) / \Delta H_{nanofibras\ PCL}) 100$

5.4.4. Espectroscopia de infravermelho de reflexão total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Foi efetuada uma análise de ATR-FTIR de modo a identificar os modos de vibração das ligações químicas dos compostos bioativos e das nanofibras de PCL com e sem a coencapsulação

do ACV e do ómega-3. Na Figura 64 mostram-se os espectros obtidos a partir das diferentes amostras analisadas.

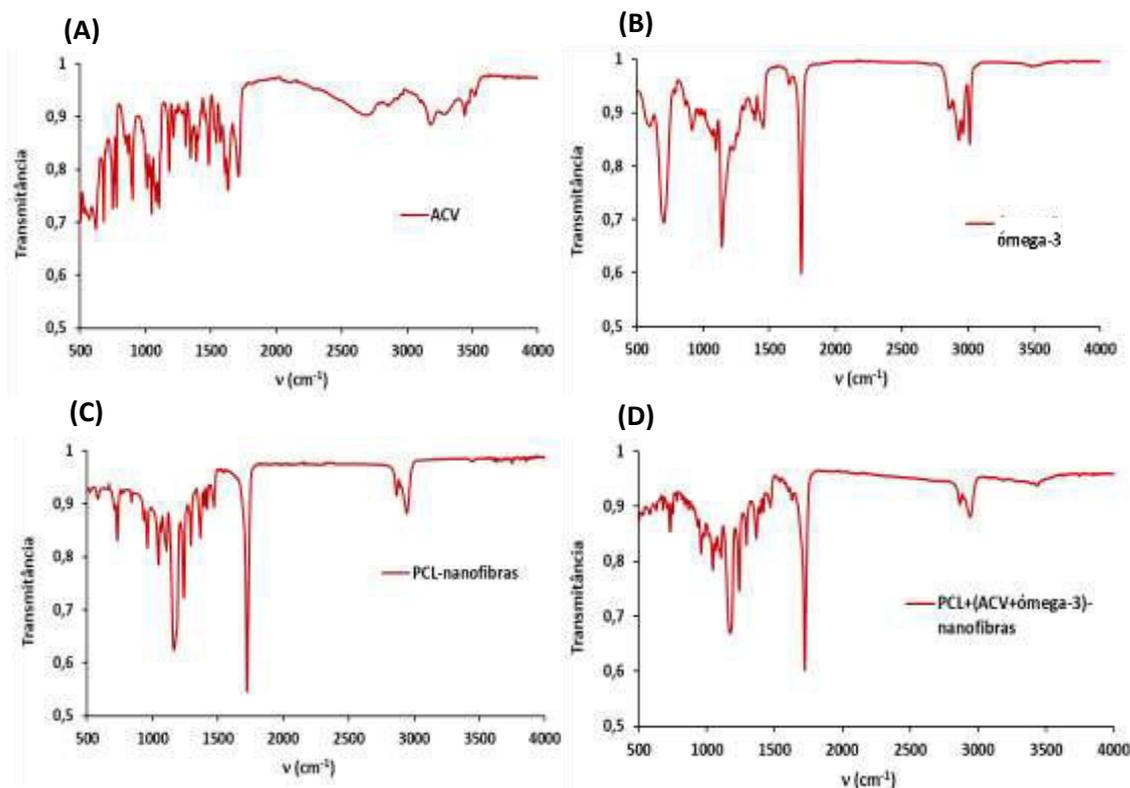


Figura 64 – Espectros de transmitância de ATR-FTIR obtidos a partir das diferentes amostras analisadas. (A) ACV em pó; (B) ómega-3; (C) nanofibras de PCL e (D) nanofibras de PCL com os dois compostos bioativos encapsulados

Nas Tabela 16 e Tabela 17 apresentam-se os valores dos picos observados experimentalmente (retirados dos gráficos da Figura 64-A e B para o ACV em pó e para o ómega-3, respetivamente, assim como os valores da literatura, para comparação. Do mesmo modo, na Tabela 18 listam-se os valores de número de onda correspondentes aos picos observados experimentalmente no espectro das fibras de PCL (Figura 64-C) assim como os valores da literatura para comparação. Como se pode verificar a maior parte dos picos referidos na literatura foram observados experimentalmente podendo-se em alguns casos associar à respetiva vibração.

Tabela 16 – Comparação da localização dos picos de transmitância do ACV (pó) obtidos experimentalmente por ATR-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Yu *et al.* (2011) [113].

Número de onda em cm^{-1} (da literatura)	Vibração	Número de onda em cm^{-1} (experimentais)
3441		3440
3179		3179
2725		Não identificado
1698	Vibração de estiramento -C=O	1712 (deslocado)
1632	Vibração de estiramento -C=O	1631
1485		1484
1109		1104
899		901
786		780

Tabela 17 – Comparação da localização dos picos de transmitância do ácido gordo ômega-3 obtidos experimentalmente por ATT-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Zhang (2009) [118].

Número de onda cm^{-1}	Dados experimentais
3012	3013
2921	2930
2852	2857
1743	1742
1457	1456
1376	1375 (ténue)
1143	1140
1097	1094
914	917
719	704 (deslocado)
586	593 (deslocado)
457	460

Tabela 18 – Comparação da localização dos picos de transmitância das nanofibras de PCL obtidos experimentalmente por ART-FTIR com os reportados na literatura. Adaptado de Naghashzargar *et al.* (2016) [119].

Número de onda em cm⁻¹ (da literatura)	Vibração	Número de onda em cm⁻¹ (experimentais)
2943-2865	Vibração de estiramento CH ₂	2946 e 2866
1722	Vibração de estiramento –C=O	1722
1293	Vibração de estiramento (fase cristalina) –C–O– e –C–C–	1297
1239-1164	Vibração de estiramento do grupo –C–O–C–	1242 e 1166

Comparando os espectros das nanofibras poliméricas de PCL com os espectros das nanofibras PCL com os dois compostos bioativos encapsulados são visíveis as diferenças. Na Figura 65 mostram-se estes dois espectros sobrepostos assim como o espectro do ACV em pó, em toda a gama de números de onda. Na mesma figura, são selecionadas zonas específicas, para se evidenciarem melhor as diferenças.

As diferenças entre os espectros das fibras PCL (Figura 65 linha vermelha) e das fibras com os compostos bioativos (linha azul) manifestam-se em todas as gamas de números de onda embora sejam mais facilmente associadas à presença do ACV nas fibras, na chamada zona de “impressão digital”, números de onda entre 600-1300 cm⁻¹. O número de picos nesta região é muito elevado quer no espectro do PCL quer no do ACV mas as diferenças, entre os dois espectros (regiões assinaladas com as ovas tracejadas), indicam a incorporação do ACV na matriz polimérica. Também na região 1550-1650 cm⁻¹ é visível a presença do ACV, podendo-se identificar, no espectro das fibras com os compostos ativos, vários picos do fármaco. Também na região de maiores números de onda, 3100-3600 cm⁻¹, se podem ver diferenças significativas entre os dois espectros das fibras, podendo-se mais uma vez associar estas diferenças à presença do ACV, sendo esta região característica das vibrações –N–H das amins primárias e secundárias.

A presença dos ácidos gordos ómega-3 nas fibras é muito mais difícil de se verificar como é perceptível através da análise da Figura 66. Nesta figura mostra-se como os picos característicos destes ácidos gordos aparecem nas mesmas regiões dos picos do PCL, tornando assim praticamente impossível, por este método, provar a sua presença nas fibras.

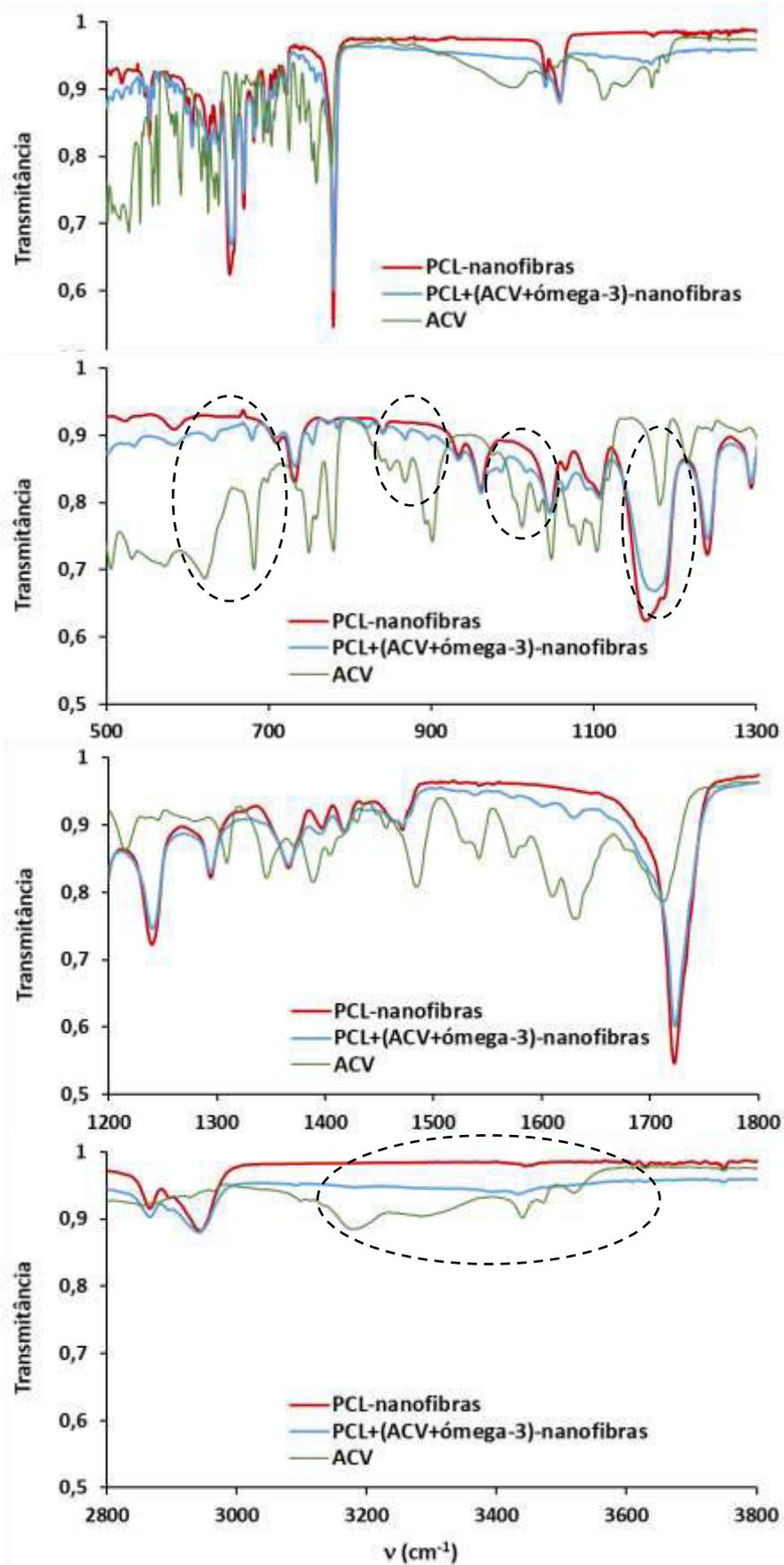


Figura 65 – Espetros de transmitância de ATR-FTIR do ACV em pó das nanofibras de PCL e das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3.

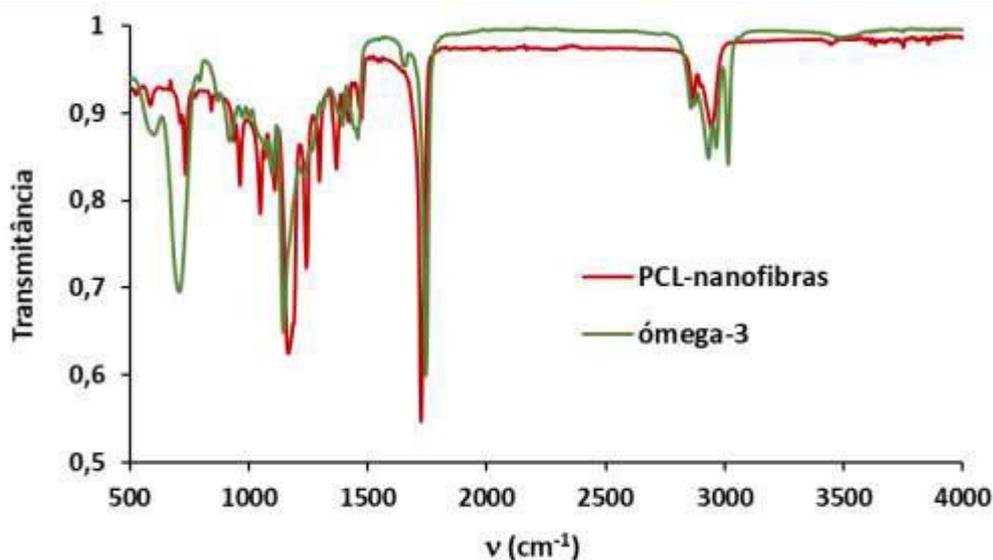


Figura 66 – Espectros de transmitância de ATR-FTIR do ómega-3 e das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3.

Também é possível que os ácidos gordos ómega-3, atendendo à sua grande lipofilia [120,121], se liguem mais fortemente e mais profundamente ao PCL, o que contribuirá também para não serem detetados por ATR-FTIR, uma vez que a penetração da onda evanescente na amostra a analisar, nesta técnica, é de apenas cerca de 2 μm .

A pequena profundidade de penetração da onda evanescente no interior das amostras é uma das limitações da técnica de ATR-FTIR, que assim permite apenas analisar as camadas mais superficiais das amostras [122,122].

5.4.5. Comportamento mecânico à tração

As propriedades mecânicas são um dos parâmetros mais importantes na caracterização de *scaffolds* para aplicação cutânea. Quando se trata de nanofibras, as propriedades mecânicas dependem principalmente da escolha do polímero e das propriedades da solução [123].

Neste ensaio foi medida a elongação da fibra em resposta a uma tensão aplicada. Para cada amostra (nanofibras de PCL e nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 em diferentes estados de envelhecimento) foram registados os valores relativos à espessura da fibra, a largura da mesma e a distância entre as garras (comprimento da amostra em estudo). A representação gráfica da percentagem de elongação da fibra (tendo como referência a distância inicial entre as garras) em função da tensão aplicada mostra-se nas Figura 67 a 69.

Na Figura 67 mostram-se os resultados obtidos em nanofibras de PCL. Fizeram-se quatro réplicas e os resultados são bastante diferentes entre si podendo-se no entanto perceber que as fibras são muito resistentes à tração uniaxial, registrando-se percentagens de alongação entre 85 e 110 % para tensões aplicadas entre 4 e 8 MPa, antes da perda total de propriedades elásticas da fibra.

Na literatura podem-se encontrar resultados que confirmam a elevada resistência das fibras poliméricas de PCL à tração mecânica uniaxial. Mohammadi & Bahrami (2015) reportam valores de aproximadamente 1 MPa e uma alongação de aproximadamente 85 %, valores estes que baixam consideravelmente quando o PCL está misturado com um polímero natural, passando para 0,4 MPa e 28,3 %, respetivamente [91]. Croisier *et al.* (2012), reporta valores de resistência à tração de nanofibras de PCL superiores, com uma média de $3,8 \pm 0,8$ MPa, e uma alongação média de 170 ± 10 % em nanofibras de PCL produzidas a partir de uma solução de THF:DMF 1:1 (m/m) [124]. Doustgani *et al.* (2012) reporta uma tensão de cerca de 5 MPa e um alongamento de 125 % para nanofibras de PCL com 7,5 % de nHA (nanohidroxiapatite), preparadas a partir de uma solução de clorofórmio:DMF 85:15 (v/v) [125].

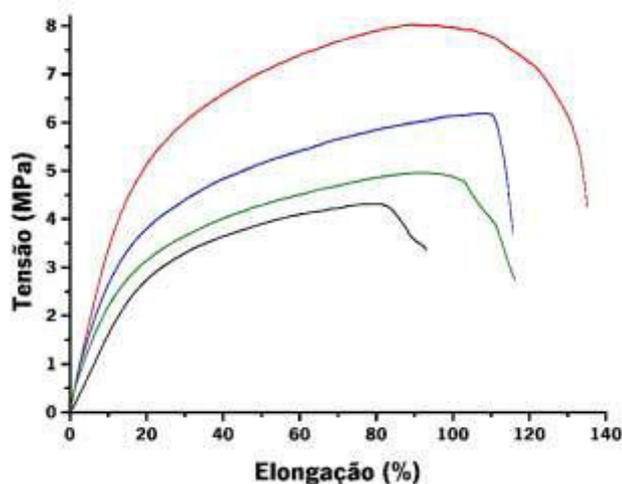


Figura 67 – Curvas de tensão em função da percentagem de alongação para as nanofibras de PCL.
Legenda: ■ Réplica 1; ■ Réplica 2; ■ Réplica 3 e ■ Réplica 4.

Na Figura 68 estão representadas as curvas relativas ao comportamento mecânico das nanofibras de PCL com os compostos bioativos incorporados (três réplicas).

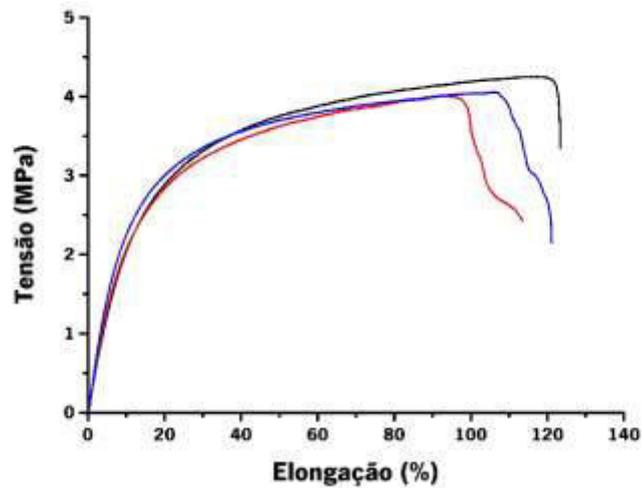


Figura 68 – Curvas de tensão em função da percentagem de alongamento para as nanofibras de PCL com os compostos bioativos incorporados.
 Legenda: ■ Réplica 1; ■ Réplica 2 e ■ Réplica 3.

Na Figura 69 pretende-se mostrar o efeito da oxidação das fibras nas suas propriedades mecânicas. Por observação direta, ao fim de algum tempo ao ar, as fibras ficam amareladas e mais rígidas, devido à oxidação do ômega-3. As medidas efetuadas confirmam a perda da capacidade de deformação das fibras com o envelhecimento das mesmas.

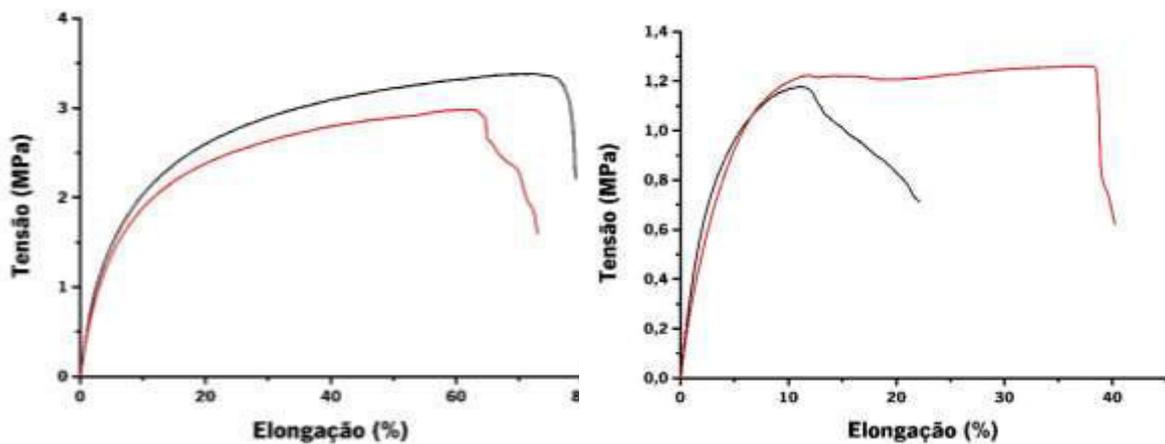


Figura 69 – Curvas de tensão em função da percentagem de alongamento para as nanofibras de PCL com os compostos bioativos incorporados, em diferentes estados de oxidação.
 (A) nanofibras com duas semanas de envelhecimento; e
 (B) nanofibras com dois meses de envelhecimento.

5.4.6. Ângulo de contacto e molhabilidade

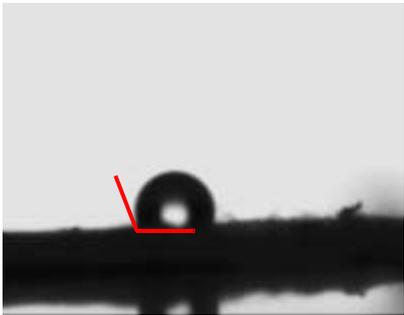
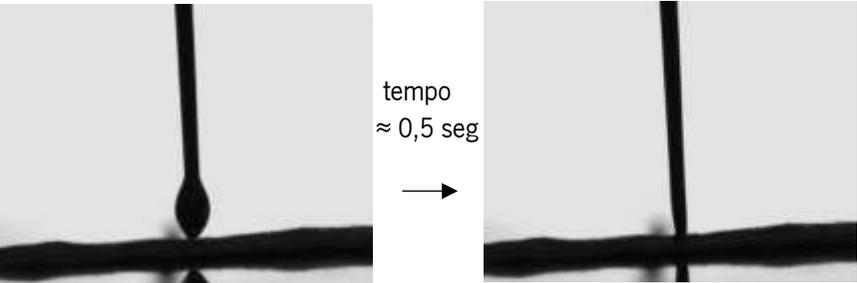
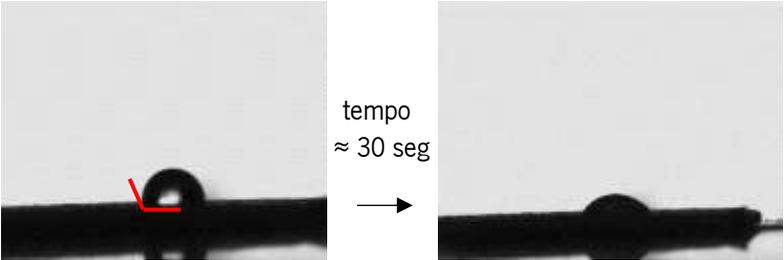
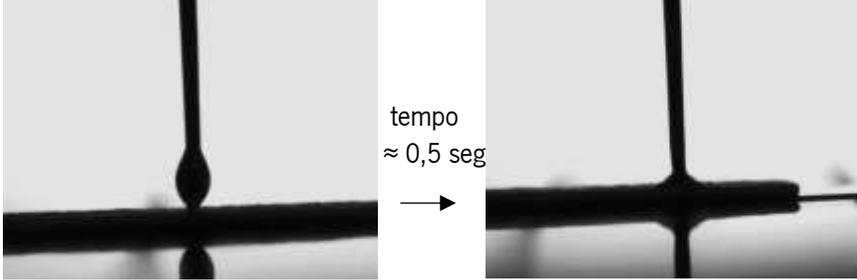
Como descrito em 4.7.6., foram medidos os ângulos de contacto entre as fibras em estudo (nanofibras de PCL e nanofibras de PCL com ACV e ómega-3) e os dois meios usados nos ensaios de libertação controlada (solução aquosa tamponada e dispersão micelar).

Na Tabela 19 mostram-se as fotografias obtidas. Como se pode ver a molhabilidade das fibras por uma gota de água é muito baixa. Os valores obtidos para o ângulo de contacto foram de $129,7 \pm 2,3^\circ$ e de $129,2 \pm 1,6^\circ$, respetivamente para as fibras de PCL e de PCL com os compostos ativos encapsulados. Mostra-se ainda que a gota demora mais de 30 segundos a ser “absorvida” pela fibra, penetrando nela através dos poros e capilares. Este valor elevado do ângulo de contacto reflete a grande hidrofobicidade do PCL, não existindo forças de adesão elevadas entre os grupos polares da água e a superfície apolar do polímero. Estes resultados vão de encontro ao descrito na literatura. Mohammadi *et al.* (2014) [123] reporta valores de $124,9 \pm 2^\circ$ como sendo o ângulo de contacto de nanofibras de PCL com água. Por outro lado Dias *et al.* (2013) reporta valores ligeiramente menores, mas o solvente utilizado para preparar as nanofibras também é diferente e é sabido que diferentes solventes providenciam diferentes níveis de rugosidade das nanofibras e consequentemente diferentes tensões superficiais [126].

Pelo contrário, quando é deixada cair sobre as fibras poliméricas uma gota da dispersão micelar, a “absorção” desta gota pelas fibras é imediata, não permitindo medir nenhum valor para o ângulo de contacto. Como é sabido, quando se formam as micelas, a tensão superficial (forças de coesão que mantêm a gota com a sua forma esférica) baixa drasticamente [127] e o balanço entre as forças de coesão e as forças de adesão passa a ser dominado pelas forças de adesão à superfície. As fotografias mostradas provam que efetivamente a gota é imediatamente desfeita. No caso das micelas, embora a parte exterior seja polar, existem regiões apolares às quais as nanofibras terão acesso, aumentando as forças de adesão.

A molhabilidade de uma dada superfície por um dado meio e consequentemente o ângulo de contacto é essencialmente determinada pela composição química da superfície e pela sua rugosidade [80]. Quando muda o meio, mantendo-se a superfície a molhabilidade é essencialmente condicionada pelo valor da tensão superficial do líquido. Na Figura 70 mostra-se um esquema que relaciona o ângulo de contacto com a molhabilidade de uma superfície.

Tabela 19 – Quadro resumo do ensaio do ângulo de contacto.

	Gota de H ₂ O	Gota de uma dispersão micelar de SLS
Nanofibras de PCL		
Nanofibras de PCL com ACV e ómega-3		

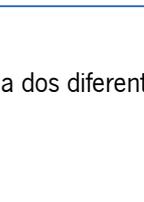
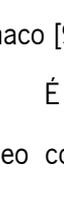
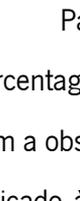
	Molhabilidade total	Molhabilidade elevada	Molhabilidade baixa	Ausência de molhabilidade
Forma da Gota				
Ângulo de Contacto	$\theta < 5^\circ$ (em menos de 0,5 segundos)	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$

Figura 70 – Diagrama dos diferentes graus de molhabilidade e os ângulos de contacto correspondentes. Adaptado de Ferreira (2013) [80].

5.4.7. Viabilidade do sistema terapêutico

5.4.7.1. Determinação do fator de oclusão

A administração transdérmica de fármacos apresenta várias vantagens em comparação com a administração oral ou parentérica. No entanto, na via transdérmica a absorção do fármaco é limitada pela penetração do mesmo ao longo do estrato córneo, embora se possa melhorar a absorção usando potenciadores da absorção ou melhorando as propriedades de difusão do fármaco [94,128].

É sabido que uma das estratégias para aumentar a absorção do fármaco pelo estrato córneo consiste em aumentar a quantidade de água à superfície da pele, aumentando a permeação dos compostos bioativos. A este processo de retenção da água, diminuindo as perdas por evaporação, chama-se oclusão.

Para avaliar o efeito oclusivo das nanofibras desenvolvidas efetuou-se a comparação da percentagem de perda de água através das nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 (três réplicas) com a observada num sistema de referência (papel de filtro). O mesmo tipo de ensaio foi também aplicado à formulação comercial Zovirax™ creme. Na Figura 71 representam-se os valores do fator de oclusão (F), obtido para as nanofibras, como descrito em 4.7.6., definido como a percentagem de variação do fluxo de água sem e com o sistema cuja oclusividade se pretende testar, em função do tempo.

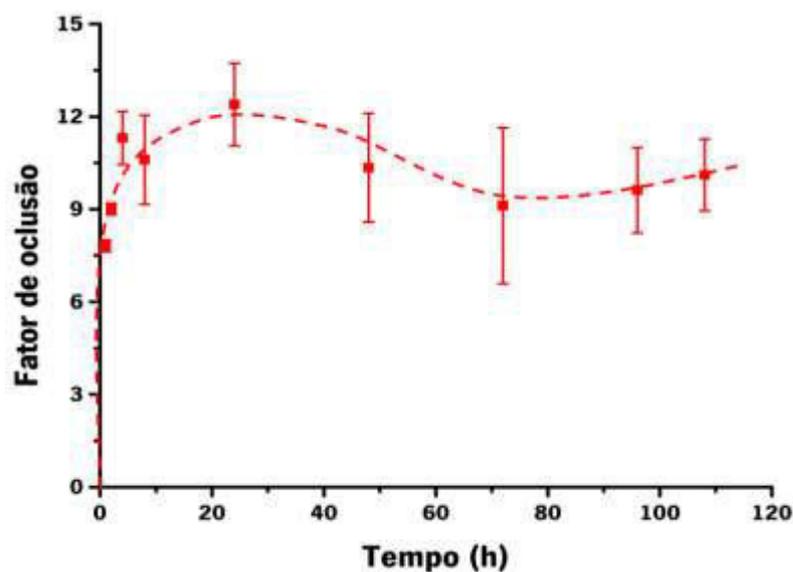


Figura 71 – Representação do fator de oclusão em função do tempo para as de nanofibras poliméricas de PCL com ACV+ômega-3. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.

Verifica-se que o fator de oclusão se situa à volta de 10 % significando que a retenção de água num sistema recoberto com as fibras é cerca de 10 % mais eficiente do que num sistema idêntico mas sem as fibras.

Relativamente ao ensaio feito cobrindo o filtro (sistema de referência) com o formulação comercial de Zovirax™ creme, os resultados não são passíveis de ser comparados com os das fibras. Efetivamente estes ensaios foram feitos, medindo sempre a massa do sistema total (frasco com água + suporte + filtro + nanofibras) ou (frasco com água + suporte + filtro + creme) ao fim de vários tempos. Quando o sistema tem o ACV em creme, verifica-se, durante as primeiras horas, uma diminuição muito acentuada de massa essencialmente por evaporação da fase aquosa da emulsão óleo/água do creme, não se podendo por isso comparar este ensaio com o das fibras.

5.4.7.2. Viabilidade celular determinada por MT

Com o objetivo de testar a biocompatibilidade das nanofibras de PCL com ACV e ácidos gordos ômega-3 foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro*. Os resultados de viabilidade celular após 24 horas de incubação são representados na Figura 72. De acordo com a ISO 10993-5: 2009, um material para ser considerado não citotóxico tem de apresentar uma viabilidade igual ou superior a 70 % do controlo positivo quando aplicado em concentrações até 100 mg mL⁻¹.

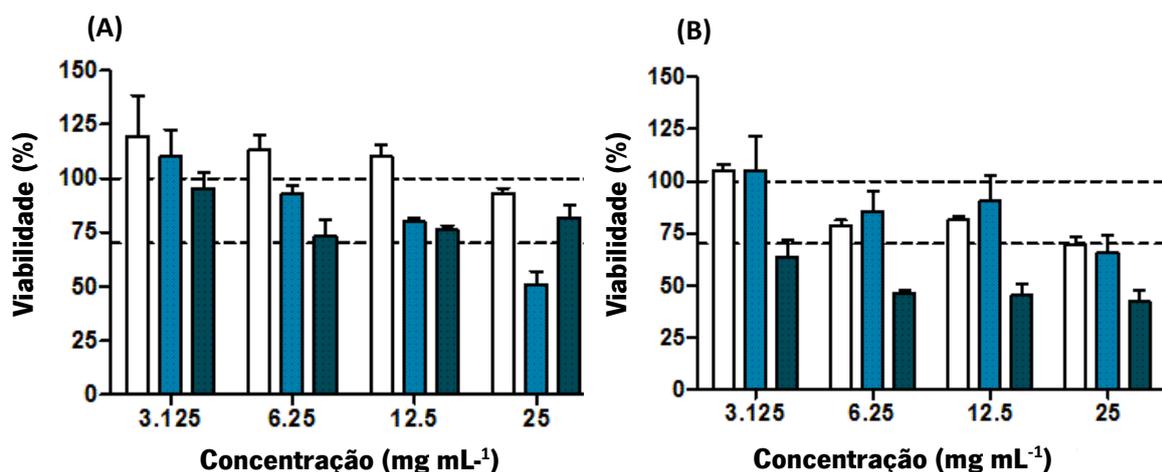


Figura 72 – Viabilidade das células HaCaT (A) e HFF-1 (B) avaliadas pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação com extratos de fibras PCL e gaze hidrofílica. As colunas representam valores médios e as barras de erro o padrão desvio, n = 3. Legenda: □ gaze hidrofílica, ■ nanofibras de PCL 2 % de ACV (m/v) e ■ nanofibras de PCL.

Face aos resultados apresentados e de acordo com ISO 10993-5: 2009, é possível verificar que a viabilidade celular das nanofibras de PCL é diferente de acordo com as linhas celulares estudadas. Para a linha celular HaCaT, o PCL não apresenta toxicidade e a viabilidade celular é superior a 70 % para o intervalo de concentrações testadas. Estes resultados estão de acordo com a literatura, já que para a mesma linha celular, Ravanan *et al.* (2016) reportam a pouca ou baixa toxicidade de nanofibras de PCL [129]. Resultados similares são reportados por Prasad *et al.* (2015) [130].

Por outro lado, para a linha celular HFF-1 as nanofibras de PCL apresentam um potencial citotóxico para todo o intervalo de concentrações testadas. Merrella *et al.* (2009) reporta igualmente uma diminuição da viabilidade celular das células HFF-1 quando expostas a extratos de nanofibras de PCL, contudo apesar da diminuição verificada, os valores estão ainda dentro dos limites definidos na ISO e deste modo o PCL é considerado não citotóxico [131]. No caso dos estudos realizados no âmbito deste trabalho, a citotoxicidade observada poderá ser devida à incompleta evaporação do solvente durante o processo de *electrospinning* o que poderá motivar a existência de resíduos de metanol (solvente menos volátil que o clorofórmio) que poderão ser a explicação para a toxicidade das nanofibras.

Apesar de, dependendo da linha celular testada, as nanofibras de PCL com ACV apresentarem diferentes efeitos na viabilidade celular, estas podem considerar-se não tóxicas

(viabilidade maior que 70 %) até à concentração de 12,5 mg mL⁻¹. Após esta concentração as nanofibras apresentam um comportamento citotóxico, em especial na linha celular HaCaT.

5.4.7.3. Permeação cutânea

A permeabilidade cutânea e a absorção percutânea de fármacos têm sido amplamente estudadas na aplicação de fármacos pela via transdérmica [87]. Deste modo foram colocadas nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 em células de Franz e avaliada a difusão do fármaco através de membranas de PSO e através de excisados de pele de porco. Paralelamente também foi estudada a difusão de ACV da formulação comercial ZoviraxTM creme na pele de porco.

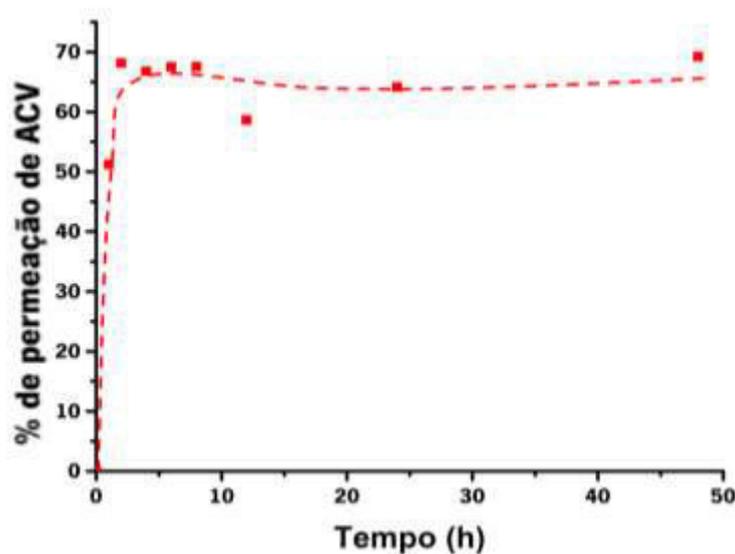


Figura 73 – Perfil de difusão do ACV a partir de nanofibras de PCL com ACV e ómega-3 através de uma membrana de PSO.

A membrana de PSO é amplamente utilizada em estudos de difusão devido à sua rigidez, elevada resistência mecânica possuindo elevada estabilidade térmica e resistência à oxidação [132]. Deste modo foi utilizada, como modelo inicial para prever/estimar a difusão do ACV.

A difusão do ACV através da membrana de PSO a partir da matriz polimérica (representada na Figura 73) é rápida, atingindo uma libertação próxima aos 70 % ao fim de 2 horas, estabilizando posteriormente. O elevado valor registado, logo ao fim de 1 hora deve-se ao contacto quase direto das nanofibras com o meio recetor, uma vez que após a colocação das nanofibras sobre a

membrana estas, por capilaridade, ficaram totalmente molhadas, facilitando a rápida difusão do ACV.

Para os ensaios de permeação realizados com excisados de pele de porco foi efetuado o mesmo procedimento. Na leitura das absorvância das alíquotas do meio recetor aos diferentes tempos verificou-se que os espectros apresentavam uma elevada difusão e que esta afetava o doseamento do ACV. De modo a eliminar as interferências espectrais de outros componentes que não o ACV (presumivelmente devidas a produtos resultantes da degradação da pele) efetuou-se a derivação dos espectros (Anexo 6). A partir da derivação dos espectros foi possível eliminar as interferências e traçar a cinética de difusão do ACV (Figura 74).

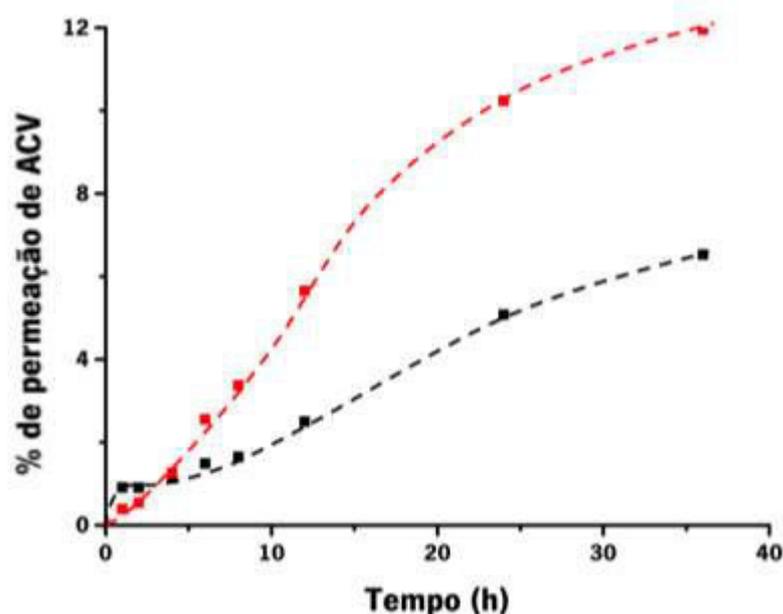


Figura 74 – Cinética de difusão cutânea do ACV num excisado de pele de porco.
Legenda: ■ nanofibras de PCL com ACV e ■ formulação comercial Zovirax™ creme.

Na Figura 74 verifica-se que a formulação comercial é a que apresenta uma maior percentagem de difusão do ACV. Contudo se analisarmos apenas as primeiras 4 horas, verificamos que a difusão do ACV a partir das nanofibras é superior à da formulação comercial. Por exemplo, às 2 h a percentagem de difusão do ACV das fibras é de 1,0 % sensivelmente o dobro da da formulação comercial. Às 4 horas ambas as formulações apresentam uma percentagem de difusão semelhante.

Capítulo 6

Conclusão

6. Conclusão

Os sistemas poliméricos e em particular as nanofibras produzidas por *electrospinning* têm sido na última década objeto de grande interesse por parte da comunidade científica (visível através do aumento crescente de publicações científicas com este tópico) devido às suas propriedades intrínsecas, tais como a flexibilidade, a resistência mecânica, a elevada relação superfície-volume e a elevada porosidade. A estes fatores acresce a elevada capacidade de encapsulação de fármacos (consequência do elevado número de poros) que permite deste modo a aplicação destes nanossistemas na área biomédica e farmacêutica, como potenciais sistemas para encapsulação, transporte e libertação controlada de fármacos.

Neste sentido, e tendo em conta o objetivo desta dissertação, procedeu-se à coencapsulação de dois compostos bioativos, o aciclovir (fármaco antiviral) e os ácidos gordos ómega-3 (composto nutracêutico com propriedades cicatrizantes) em matrizes poliméricas selecionadas, para aplicação cutânea para o tratamento de infeções herpéticas. Com a coencapsulação destes dois compostos bioativos em nanossistemas poliméricos, pretende-se por um lado um tratamento sinérgico, tirando partido das propriedades antivirais do ACV e cicatrizantes do ómega-3, e por outro lado ultrapassar os problemas farmacocinéticos dos mesmos e assim garantir um maior sucesso terapêutico. Os nanossistemas foram produzidos pela técnica de *electrospinning*.

Foram selecionados dois polímeros com lipofilicidade e características mecânicas diferentes, o PCL, polímero sintético e lipofílico, e a proteína zeína, polímero natural e hidrofílico, para a encapsulação do ACV e dos ácidos gordos ómega-3. Após um processo de otimização, que envolveu o procura dos melhores solventes para os polímeros e dos melhores parâmetros para o processamento por *electrospinning*, foi possível a produção de nanofibras de PCL e de zeína com a encapsulação dos compostos referidos.

Os perfis de libertação do ACV dos nanossistemas foram estudados em dois meios, meio aquoso e numa dispersão micelar e revelaram-se muito diferentes. A libertação do ACV das nanofibras de PCL é muito aumentada quando o meio é uma dispersão micelar comparativamente com a libertação num meio aquoso. Pelo contrário, nas nanofibras de zeína, a libertação do ACV foi maior em meio aquoso. Estudar a libertação do ACV num meio micelar foi uma estratégia adotada com o objetivo de tentar mimetizar, duma forma simples, a interface membrana, devido

à natureza anfipática das micelas. O perfil de libertação do ómega-3 foi relativamente semelhante nos dois nanossistemas produzidos, atingindo percentagens de libertação idênticas (40-50%) ao fim de 22 horas.

Do ponto de vista mecânico, os dois nanossistemas produzidos apresentaram características muito distintas. As nanofibras de PCL mostraram-se flexíveis, resistentes e homogêneas enquanto que as nanofibras de zeína exibiram menor resistência, não tendo sido possível (para as condições de *electrospinning* utilizadas) fazer a recolha de um tapete contínuo do coletor, apresentando-se deste modo muito fragmentadas. Assim, dos dois sistemas produzidos, foi selecionado o PCL como a matriz polimérica mais promissora face ao objetivo da dissertação.

Procedeu-se então à coencapsulação do ACV e do ómega-3 em matrizes poliméricas de PCL onde se estudaram com mais detalhe os perfis de libertação dos compostos bioativos, nomeadamente do ponto de vista cinético, pela aplicação de vários modelos matemáticos de ajuste (cinética de 1^a ordem, Korsmeyer-Peppas com ou sem efeito burst e Gallagher-Corrigan) e pela seleção do modelo mais adequado tendo em conta o melhor coeficiente de determinação do ajuste. O estudo da cinética de libertação do ACV foi otimizado dispondo as fibras esticadas, sem qualquer dobra, dentro da manga de diálise, obtendo-se assim menor variabilidade entre as diversas réplicas. Pelas diferenças de perfis de libertação de acordo com a exposição da fibra ao meio foi possível concluir que a molhabilidade da fibra tem um papel importante na libertação do fármaco, sendo afetada pela superfície de contacto exposta ao meio e pelo tipo de meio. Através da medição do ângulo de contacto foi comprovada a molhabilidade total da matriz polimérica de PCL quando exposta a um meio micelar e a molhabilidade muito baixa (ângulo de contacto de cerca de 130°) quando exposta a um meio aquoso, o que justifica as grandes diferenças relativamente às percentagens de libertação do ACV nestes dois meios. Perante estes resultados e sendo o meio micelar um meio mimético mais apropriado a simular o ambiente encontrado pelos nanossistemas, procedeu-se aos estudos das cinéticas de libertação final do ACV no meio micelar. A cinética de libertação do ACV foi ajustada ao modelo de Gallagher-Corrigan onde é possível identificar duas fases distintas para a libertação do fármaco, a primeira correspondendo certamente à libertação do ACV adsorvido à superfície do nanossistema e a segunda devida à libertação do ACV contido nos poros. Foi também estudada, nas mesmas condições, a cinética de libertação do ACV da formulação comercial. Verificou-se que a percentagem de libertação do fármaco é maior a partir das nanofibras de PCL do que da formulação comercial (cerca de 90%

ao fim de 45 horas). A percentagem de libertação do ómega-3 em hexano foi de aproximadamente 45 % ao fim de 22 horas.

As fibras poliméricas de PCL com ACV e ómega-3 foram caracterizadas por diversas técnicas, quer analisando a sua estrutura física, química e morfológica, quer ainda fazendo alguns ensaios para testar a sua eficácia terapêutica.

Através da técnica de SEM foi possível verificar a disposição aleatória das nanofibras e medir o seu diâmetro médio ($\approx 1,9 \mu\text{m}$). Foi também medida a espessura duma matriz de fibras, ($\approx 315 \mu\text{m}$) o que possibilitou fazer-se a estimativa da porosidade das mesmas (cerca de 74 %). Pelas técnicas de EDS e de ATR-FTIR foi possível confirmar a presença do ACV nas fibras. Por EDS detetou-se a presença de azoto, elemento que não existe na matriz polimérica de PCL e por ATR-FTIR, detetaram-se modos de vibração característicos do ACV. Pelas técnicas de XRD e DSC foi possível concluir que a presença de ACV nas fibras de PCL provoca diminuição do seu grau de cristalinidade tornando a matriz polimérica mais desordenada, sem, no entanto, comprometer a sua integridade estrutural.

O comportamento mecânico das fibras foi avaliado submetendo-as a uma tensão constante em função da sua elongação tendo sido comprovada a elevada resistência destes nanossistemas obtendo-se uma elongação próxima dos 100 % antes da rutura.

Foram ainda realizados alguns estudos com o objetivo de avaliar o interesse terapêutico dos sistemas desenvolvidos. O teste de oclusividade revelou um fator de oclusão de cerca de 10 % indicando que as nanofibras são uma estratégia promissora para o aumento da permeabilidade da pele aos compostos bioativos pela prevenção/retenção da água à sua superfície. Os estudos de permeação cutânea em membranas artificiais de polissulfona revelaram uma libertação de ACV próxima aos 70 % ao fim de 2 horas. O ensaio de viabilidade celular por MTT revelou uma viabilidade celular para os nanossistemas de PCL com ACV e ómega-3 acima dos 70 % para a linha celular HaCaT.

Face aos objetivos propostos para esta dissertação e face aos resultados atingidos, pode-se concluir que estes foram alcançados. O sistema desenvolvido mostra-se promissor para um possível tratamento sinérgico de infeções herpéticas, apresentando um comportamento comparável, e em alguns casos superior, à formulação comercial.

No entanto, refira-se que há ainda coisas a melhorar. Em primeiro lugar é necessário melhorar as condições de produção das fibras, garantindo um controlo efetivo de todos os

parâmetros de que depende o processo de *electrospinning*, nomeadamente da temperatura e da humidade, pois estes parâmetros condicionam muito a qualidade final das fibras e a sua reprodutibilidade e não podem, de momento, ser bem controlados.

Relativamente ao nanossistema desenvolvido, futuramente poderão ser feitos mais ensaios para avaliar melhor o seu real interesse terapêutico. As cinéticas de libertação em meio micelar são muito promissoras, porque são longas e sustentadas no tempo, mas é necessário complementar e aprofundar os estudos de permeação cutânea. Também os ensaios de viabilidade celular devem ser repetidos testando fibras produzidas usando diferentes solventes e técnicas mais eficazes da eliminação dos mesmos (como o aquecimento prolongado após produção a temperaturas superiores ao ponto de evaporação dos solventes e inferiores ao ponto de fusão do polímero). Pode-se ainda modificar a superfície do sistema com a associação de um penso de modo a melhorar a adesão à pele e conseqüentemente melhorar a permeação cutânea. Devido às limitações de tempo apenas foi possível avaliar a estabilidade das nanofibras ao longo de 4 meses; no futuro pretende-se aumentar este intervalo de tempo e avaliar a sua estabilidade em armazenamento durante um período de tempo mais longo.

Capítulo 7

Bibliografía

7. Bibliografia

- [1] M. Javad, M. Reza, D. Simin, E. Ahmed, B. Bahram e H. Azadeh, "Preparation and Evaluation of the Antiviral Activity of Acyclovir Loaded Nano-Niosomes Against Herpes Simplex Virus Type 1", *Pharmacophore*, vol. 5, no. 4, pp. 483–493, 2014.
- [2] K. J. Looker, A. S. Magaret, K. M. E. Turner, P. Vickerman, S. L. Gottlieb, e L. M. Newman, "Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012", *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–17, 2015.
- [3] P. A. Santos, "Infeções Herpéticas", Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- [4] T. W. F. Azambuja, F. Bercini, e T. W. Furlanetto, "Herpes Simples: revisão da literatura", *R. Fac. Odonto*, vol. 45, no. 2, pp. 43–46, 2004.
- [5] G. B. Elion, "Acyclovir: Discovery, Mechanism of Action and Selectivity", *J. Med. Virol.*, vol. 1, pp. 2–6, 1993.
- [6] A. J. Sawdon e C. A. Peng, "Polymeric micelles for acyclovir drug delivery", *Colloids and Surfaces B*, vol. 122, pp. 738–745, 2014.
- [7] R. B. Lima, "Nanofibras de Materiais Biológicos", Tese de Mestrado, Escola de Engenharia Universidade do Minho, Braga, 2013.
- [8] V. Pillay, C. Dott, Y. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L. Toit e V. M. Ndesendo, "A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications", *J. Nanomater.*, vol. 2013, pp. 1–22, 2013.
- [9] M. Mustafa, E. M. Illzam, R. K. Muniandy, A. M. Sharifah, M. K. Nang, e B. Ramesh, "Herpes simplex virus infections, Pathophysiology and Management", *J. Dent. Med. Sci.*, vol. 15, no. 7, pp. 85–91, 2016.
- [10] J. W. Alexander e D. M. Supp, "Role of Arginine and Omega-3 Fatty Acids in Wound Healing and Infection", *Adv. Wound Care*, vol. 3, no. 11, pp. 682–690, 2014.
- [11] J. C. Gonçalves, "Nanotecnologia Aplicada à Pele", Tese de Mestrado, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa 2014.
- [12] E. F. Marques, "Da nanociência à nanotecnologia: A realidade do futuro", *Rev. da Ciência Elem.*, vol. 2, pp. 1–5, 2014.
- [13] N. Taniguchi, "One the Basic Concept of 'NanoTechnology' ", *Japan Soc. Precis. Eng.*, vol. II, pp. 18–23, 1974.
- [14] A. B. Coimbra, "Nanotecnologia na Saúde: Aplicações e Perspetivas", Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- [15] A. P. Nikalje, "Nanotechnology and its Applications in Medicine", *Med. Chem.*, vol. 5, pp. 81–89, 2015.
- [16] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, e J. C. Murray, "Nanomedicine: current status and future prospects", *FASEB J.*, vol. 19, no. 3, pp. 311–330, 2005.
- [17] N. A. Franco, "Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas: O Estado da Arte", Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- [18] J. H. Yeum, S. M. Park, S. B. Yang, Y. Sabina, Y. H. Kim, e J. C. Shin, "Novel Natural Polymer/Medicinal Plant Extract Electrospun Nanofiber for Cosmeceutical Application", *InTechOpen*, vol. 6, pp. 107–125, 2016.
- [19] M. S. Fernandes, "Nanotecnologia na dermofarmácia: Aplicação ao tratamento da acne", Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade do Algarve, Algarve, 2016.
- [20] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, e X. Jing, "Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications", *J. Control. Release*, vol. 185, no. 1, pp. 12–21, 2014.
- [21] A. B. Viggosson, "A Review of the First Specific Anti-Viral Agent: Aciclovir", Uppsala University, Uppsala 2011.

- [22] A. J. Davison, "Herpes virus systematics", *Vet. Microbiol.*, vol. 143, no. 1, pp. 52–69, 2010.
- [23] B. A. Fonseca, "Infecções Herpéticas." Departamento de Clínica Médica FMRP - USP, São Paulo, n/d.
- [24] A. Consolaro e F. M. Consolaro, "Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica", *R. Dent. Press Ortodon Ortop Facial*, vol. 14, no. 3, pp. 16–24, 2009.
- [25] K. J. Looker, A. S. Magaret, K. M. E. Turner, P. Vickerman, S. L. Gottlieb, e L. M. Newman, "Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012", *PLoS One*, vol. 10, no. 1, pp. 1–23, 2015.
- [26] J. Silva, "Desenvolvimento de uma formulação dermocosmética para o tratamento e prevenção de infecções herpéticas", Tese de Mestrado, Escola de Ciências, Universidade do Minho, Braga, 2017.
- [27] R. D. Durai, "Drug delivery approaches of an antiviral drug: A comprehensive review", *Asian Journal Pharm.*, pp. 1–12, 2015.
- [28] A. Rompalo, G. Mertz, L. Davis, J. Benedetti, C. Crichlow, W. Stamm e L. Corey "Oral Acyclovir for Treatment of First-Episode Herpes Simplex Virus Proctitis", *JAMA*, vol. 259, no. 19, pp. 2879–2881, 1988.
- [29] T. Degim, B. Eglen e O. Ocak, "A sustained release dosage form of acyclovir for buccal application: An experimental study in dogs", *J. Drug Target.*, vol. 14, pp. 35–44, 2006.
- [30] J. W. Gnann, N. H. Barton, e R. J. Whitley, "Acyclovir: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Safety and Clinical Applications", *Pharmacotherapy*, vol. 3, pp. 275–283, 1983.
- [31] O. L. Laskin, "Clinical Pharmacokinetics of Acyclovir", *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 8, pp. 187–201, 1983.
- [32] CIMED Indústria de Medicamento LDTA, "Aciclovir", *Grupo CIMED*, 1999. [Online]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/firmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16808322016&pIdAnexo=3426006. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [33] Aspen Bad Oldesloe GmbH, "Resumo das Características do Medicamento: Zovirax 200 mg Comprimidos e Zovirax 80 mg/ml Suspensão Oral", *Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.*, 2013. [Online]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9506&tipo_doc=rcm. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [34] Glaxo Operations UK Ltd., "Resumo das Características do Medicamento: Zovirax 30 mg/g Pomada Oftálmica", *Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.*, 2012. [Online]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9510&tipo_doc=rcm. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [35] L. Glaxo Wellcome Operations Uk, "Resumo das Características do Medicamento: Zovirax 50mg/g Creme", *GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Produtos para a Saúde e Higiene, Lda.*, 2013. [Online]. Disponível em : http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9508&tipo_doc=rcm. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [36] Aspen Bad Oldesloe GmbH, "Folheto Informativo: Informação para o Utilizador Zovirax 200 mg Comprimidos e Zovirax 80 mg/ml Suspensão Oral", *Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.*, 2013. [Online]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9506&tipo_doc=fi. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [37] L. Glaxo Wellcome Operations Uk, "Folheto Informativo: Informação para o Doente Zovirax 50mg/g Creme", *GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Produtos para a Saúde e Higiene, Lda.*, 2013. [Online]. Disponível em : http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9508&tipo_doc=fi. [Acedido em 18 agosto de 2017].
- [38] A. H. Cavalheiro e L. Comarella, "Farmacocinética: Modelos e Conceitos - Uma revisão da literatura", *Rev. Saúde e Desenv.*, vol. 10, no. 5, pp. 72–84, 2016.
- [39] H. Almeida, "Métodos para o Incremento da Solubilidade de Substâncias Activas Pouco Solúveis (BCS – Classe II)", Tede de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

- [40] L. F. Aires, “Ácidos Graxos Ômega 3 e Ômega 6: Importância no Metabolismo e na Nutrição”, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- [41] M. Teixeira, “Vetores lipídicos contendo ácidos gordos naturais”, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.
- [42] M. B. Covington, “Omega-3 Fatty Acids”, *Am. Fam. Physician*, vol. 70, no. 1, pp. 133–140, 2004.
- [43] A. P. Simopoulos e A. P. Simopoulos, “Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases”, *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 21, no. 6, pp. 37–41, 2013.
- [44] K. Moomand e L. Lim, “Properties of Encapsulated Fish Oil in Electrospun Zein Fibres Under Simulated In Vitro Conditions”, *Food Bioprocess Technol.*, vol. 8, pp. 431–444, 2015.
- [45] G. Moreno, P. Jesús, B. Stephansen, M. Emilia e S. Ioannis, “Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability”, *J. Food Eng.*, vol. 183, pp. 39–49, 2016.
- [46] A. M. Ferreira, B. M. Vieira, M. A. Rigotti, M. Rolan e D. Loureiro, “Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional”, *Rev. da Esc. Enferm. da USP*, vol. 46, pp. 752–760, 2012.
- [47] E. L. Borges, M. T. V. Donoso e F. Ferreira, “Revisão Integrativa do Uso de Ácidos Graxos Essenciais no Tratamento de Lesão Cutânea”, *Rev. Enferm. do Cent. Oeste Min.*, vol. 1, no. 1, pp. 121–130, 2011.
- [48] C. Sunguc, “Encapsulation of Sarcopoterim spinosum Extract in Zein Particle by Usin a Electro Spray Method”, Tese de Mestrado, Escola de Engenharia e Ciências, Instituto de Tecnologia de Esmirna, Esmirna, 2013.
- [49] H. Karakas, “Electrospinning of nanofibers and Their Applications”, Universidade Técnica de Istambul, Istambul, 2015.
- [50] L. Oliveira, “Automatização e controlo de um sistema de electrospinning: Estado da arte e modelação de alguns componentes”, Tese de Mestrado, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães, 2011.
- [51] Z. Huang, Y. Zhang, M. Kotaki, e S. Ramakrishna, “A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites”, *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, pp. 2223–2253, 2003.
- [52] E. Kenawy, G. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D. Simpson, E. Sanders e G. Wnek, “Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend”, *J. Control. Release*, vol. 81, no. 1–2, pp. 57–64, 2002.
- [53] L. Dicks e T. D. Heunis, “Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections”, *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 1, pp. 1–10, 2010.
- [54] Z. Chen, Z. Chen, A. Zhang, J. Hu, X. Wang e Z. Yang, “Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy”, *Biomater. Sci.*, vol. 4, pp. 922–932, 2016.
- [55] Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang e Z. K. Xu, “Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview”, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 56, no. 4, pp. 189–195, 2009.
- [56] M. Gandi, R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis e R. A. Gemeinhart, “Mechanistic Examination of Protein Release from Polymer Nanofibers”, *Mol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 4, pp. 646–656, 2013.
- [57] J. G. Fernandes, D. M. Correia, G. Botelho, J. Padrão, F. Dourado, C. Ribeiro, S. Lanceros-Méndez e V. Sencadas, “PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications”, *Polym. Test.*, vol. 34, pp. 64–71, 2014.
- [58] K. Moomand e L.-T. Lim, “Properties of Encapsulated Fish Oil in Electrospun Zein Fibres Under Simulated In Vitro Conditions”, *Food Bioprocess Technol.*, vol. 8, pp. 431–444, 2015.
- [59] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul e P. Supaphol, “Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers : Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter”, *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 6, pp. 2327–2338, 2004.
- [60] J. L. Ferreira, S. Gomes, C. Henriques, J. P. Borges e J. C. Silva, “Electrospinning polycaprolactone

- dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and In Vitro evaluation”, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 41068, pp. 37–39, 2014.
- [61] S. Chou, D. Carson e K. A. Woodrow, “Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers”, *J. Control. Release*, vol. 220, no. 1, pp. 584–591, 2015.
- [62] C.-M. Hsu, “Electrospinning of Poly(ϵ -Caprolactone)”, Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Worcester, Worcester, 2003.
- [63] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton e D. W. Huttmacher, “Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review”, *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 26, pp. 1539–1550, 2011.
- [64] M. Hasan, K. A. Nayem, M. B. Hossain e S. Nahar, “Production of Tissue Engineering Scaffolds from Poly Caprolactone (PCL) and Its Microscopic Analysis”, *Int. J. Text. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 39–43, 2014.
- [65] J. Fu, H. Wang, Y. Zhou e J. Wang, “Antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded zein microsphere films”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, pp. 1161–1166, 2009.
- [66] A. R. Patel e K. P. Velikov, “Zein as a source of functional colloidal nano-and microstructures”, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 19, no. 5, pp. 450–458, 2014.
- [67] R. Shukla e M. Cheryan, “Zein: The industrial protein from corn”, *Ind. Crops Prod.*, vol. 13, no. 3, pp. 171–192, 2001.
- [68] D. D. Perrin e B. Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, 1nd ed, Chapman and Hall, Londres, Reino Unido, 1974.
- [69] R. Saha, A. Ghosh e B. Saha, “Kinetics of micellar catalysis on oxidation of p-anisaldehyde to p-anisic acid in aqueous medium at room temperature”, *Chem. Eng. Sci.*, vol. 99, pp. 23–27, 2013.
- [70] B. Rodney, *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*, 2nd ed., no. 2, Estados Unidos da América, 2012.
- [71] J. M. Martinho, “Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível”, *Bol. da Soc. Port. Química*, vol. 52, no. 3, pp. 44–46, 1994.
- [72] B. Voutou e E. Stefanaki, "Electron Microscopy: The Basics", Universidade Aristóteles de Salonica, 2008.
- [73] D. E. Newbury e N. W. M. Ritchie, “Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative?”, *Scanning*, vol. 35, no. 3, pp. 141–168, 2013.
- [74] B. G. Kutchko e A. G. Kim, “Fly ash characterization by SEM-EDS”, *Fuel*, vol. 85, no. 17–18, pp. 2537–2544, 2006.
- [75] S. Rouzière, D. Bazin e M. Daudon, “In-lab X-ray fluorescence and diffraction techniques for pathological calcifications”, *Comptes Rendus Chim.*, pp. 1–12, 2015.
- [76] A. C. T. North, *X-Ray Crystallography of Macromolecules, Theory and Methods*, 2010.
- [77] A. L. F. Rodrigues, “Bicalutamida: um contributo para a investigação do processo de cristalização e de co-cristalização”, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.
- [78] J. Epp, *X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization*, Alemanha, 2016.
- [79] C. Bernal, A. Boldarini Couto, S. Trazzi Breviglieri, e É. T. Gomes Cavalheiro, “Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC”, *Quim. Nova*, vol. 25, no. 5, pp. 849–855, 2002.
- [80] L. M. V. Ferreira, “Revestimentos Hidrofóbicos”, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.
- [81] G. Bracco e B. Holst, "Contact Angle and Wetting Properties" *Surface Science Techniques*, Berlim, 2013, ch. 1 pp. 3-34.
- [82] P. Kamble, B. Sadarani, A. Majumdar e S. Bhullar, “Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach”, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 41, pp. 124–133, 2017.
- [83] J. J. Chávez, R. Torres, I. Cruz, C. Delgado, R. Morales, E. Anguiano e L. Contreras, “Nanocarriers for transdermal drug delivery”, *Res. Reports Transdermal Drug Deliv.*, vol. 1, pp. 3–17, 2012.

- [84] S. A. Wissing, A. Lippacher e R. H. Muller, "Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN)", *J. Cosmet. Sci.*, vol. 52, pp. 313–324, 2001.
- [85] G. Ciapetti, E. Cenni, L. Pratelli e A. Pizzoferrato, "In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay", *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 359–364, 1993.
- [86] T. L. Riss, R. Moravec, A. Niles, S. Duellman, H. Benink, T. Worzella e L. Minor, "Cell Viability Assays", *Assay Guid. Man. [Internet]*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, 2013.
- [87] H. C. Ansel, N. G. Popovich e L. V. Allen, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th ed. Filadélfia, Estados Unidos da América, 2011.
- [88] OECD/OCDE, "Skin Absorption: in vitro Method", *OECD Guidel. Test. Chem.*, vol. 428, no. April, pp. 1–8, 2004.
- [89] T. Owen, *Fundamentals of UV-Vis spectroscopy*, Alemanha, 2000.
- [90] Y. Li, L. T. Lim e Y. Kakuda, "Electrospun zein fibers as carriers to stabilize (-)-epigallocatechin gallate", *J. Food Sci.*, vol. 74, no. 3, pp. 233–240, 2009.
- [91] A. Avdeef, "Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state)", *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 1, no. 4, pp. 277–351, 2001.
- [92] B. Hammouda, "Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water", *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 118, pp. 151–167, 2013.
- [93] A. Kristl, A. Mrhar e F. Kozjek, "The ionisation properties of acyclovir and deoxyacyclovir", *Int. J. Pharm.*, vol. 99, no. 1, pp. 79–82, 1993.
- [94] K. M. Gallagher e O. I. Corrigan, "Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers", *J. Control. Release*, vol. 69, no. 2, pp. 261–272, 2000.
- [95] P. Costa e J. M. S. Lobo, "Modeling and comparison of dissolution profile", *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 13, pp. 123–133, 2001.
- [96] L. Mayol, A. Borzacchiello, V. Guarino, C. Serri, M. Biondi, e L. Ambrosio, "Design of electrospayed non-spherical poly (l-lactide-co-glicolide) microdevices for sustained drug delivery", *J Mater Sci: Mater Med.*, vol. 25, pp. 383–390, 2014.
- [97] D. J. Hines e D. L. Kaplan, "Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights", *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 30, no. 3, pp. 257–76, 2013.
- [98] J. B. Gówny e M. Mucha, "Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosane", *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.*, vol. 15, pp. 117–126, 2010.
- [99] A. Mashak, H. Mobedi e H. Mahdavi, "A comparative study of progesterone and lidocaine hydrochloride release from poly(l-lactide) films", *Pharm. Sci.*, vol. 21, no. 2, pp. 77–85, 2015.
- [100] W. Cui, X. Li, X. Zhu, G. Yu, S. Zhou e J. Weng, "Investigation of Drug Release and Matrix Degradation of Electrospun Poly (DL-lactide) Fibers with Paracetamol Inoculation", *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1623–1629, 2006.
- [101] C. Hansch, A. Leo e D. Hoekman, *Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, 1st ed. Washington DC, Estados Unidos da América, 1996.
- [102] A. J. D. Magenau, J. A. Richards, M. A. Pasquinelli, D. A. Savin e R. T. Mathers, "Systematic Insights from Medicinal Chemistry To Discern the Nature of Polymer Hydrophobicity", *Macromolecules*, vol. 48, no. 19, pp. 7230–7236, 2015.
- [103] Á. Catalá, "Lipid peroxidation modifies the assembly of biological membranes 'The Lipid Whisker Model' ", *Front. Physiol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 1–5, 2015.
- [104] S. Thakkar e M. Misra, "Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery", *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 107, pp. 148–167, 2017.
- [105] M. Borjigin, C. Eskridge, R. Niamat, B. Strouse, P. Bialk e E. B. Kmiec, "Electrospun fiber membranes enable proliferation of genetically modified cells", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 855–864, 2013.
- [106] Y. Qian, Z. Zhang, L. Zheng, R. Song e Y. Zhao, "Fabrication and Characterization of Electrospun Polycaprolactone Blended with Chitosan-Gelatin Complex Nanofibrous Mats", *J. Nanomater.*, vol. 2014, pp. 1–7, 2014.

- [107] M. S. Kamath, S. S. S. J. Ahmed, M. Dhanasekaran e S. Winkins Santosh, "Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: Therapeutic enhancement in bone tissue engineering", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 183–195, 2013.
- [108] A. Khorsand Zak, W. H. Abd. Majid, M. E. Abrishami e R. Yousefi, "X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods", *Solid State Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 251–256, 2011.
- [109] X. Wang, H. Zhao, L. S. Turng e Q. Li, "Crystalline morphology of electrospun poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibers", *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 13, pp. 4939–4949, 2013.
- [110] M. Walker, J. G. Kublin e J. R. Zunt, "Polymorphs and Hidrates of Acyclovir", *J. Pharm. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 115–125, 2009.
- [111] P. Gill, T. T. Moghadam e B. Ranjbar, "Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience", *J. Biomol. Tech.*, vol. 21, no. 4, pp. 167–93, 2010.
- [112] D. G. Yu, C. Branford-White, L. Li, X. Wu e L. Zhu, "The Compatibility of Acyclovir with Polyacrylonitrile in the Electrospun Drug-Loaded Nanofiber", *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 177, no. 7, pp. 1509–1515, 2010.
- [113] D. G. Yu, L. Zhu, C. Branford-White, J. Yang, X. Wanh, Y. Li e W. Qian, "Solid dispersions in the form of electrospun core-sheath nanofibers", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 3271–3280, 2011.
- [114] M. Rusu, M. Ursu e D. Rusu, "Poly(vinyl chloride) and Poly(ϵ -caprolactone) Blends for Medical Use", *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, vol. 19, no. 2, pp. 173–190, 2006.
- [115] X. Wang, H. Zhao, L. Turng e Q. Li, "Crystalline Morphology of Electrospun Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Nanofibers", *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 4939–4949, 2013.
- [116] N. Aliah e M. Ansari, "Thermal analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering", *Int. J. Sci. Res. Eng. Technol.*, vol. 6, no. 2, pp. 76–80, 2017.
- [117] C. P. Fonseca, F. Cavalcante, F. A. Amaral, C. A. Zani Souza e S. Neves, "Thermal and Conduction Properties of a PCL-biodegradable Gel Polymer Electrolyte with LiClO₄, LiF₃CSO₃, and LiBF₄ Salts", *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 2, pp. 52–63, 2007.
- [118] J. Zhang, "Analysis and Characterization of Consumer Products by FTIR, Raman, Chemometrics and to Dimensional ATR-FTIR Correlation Spectroscopy", Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Nova Jersey, Nova Jersey 2009.
- [119] E. Naghashzargar, S. Farè, V. Catto, S. Bertoldi, D. Semnani, S. Karbasi e M. Tanzi, "Nano/micro hybrid scaffold of PCL or P₃HB nanofibers combined with silk fibroin for tendon and ligament tissue engineering", *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, vol. 13, no. 2, pp. 159–168, 2015.
- [120] J. A. Matta, R. L. Miyares e G. P. Ahern, "TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids", *J. Physiol.*, vol. 578, no. 2, pp. 397–411, 2007.
- [121] S. N. Warnakulasuriya e H. P. V. Rupasinghe, "Long chain fatty acid acylated derivatives of Quercetin-3-O-glucoside as antioxidants to prevent lipid oxidation", *Biomolecules*, vol. 4, no. 4, pp. 980–993, 2014.
- [122] L. Chen, Y. Tian, B. Sun, C. Cai, R. Ma e Z. Jin, "Measurement and characterization of external oil in the fried waxy maize starch granules using ATR-FTIR and XRD", *Food Chem.*, vol. 242, pp. 131–138, 2018.
- [123] M. Ranjbar-Mohammadi e S. H. Bahrami, "Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly (ϵ -caprolactone) for application as skin scaffolds", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 71–79, 2015.
- [124] F. Croisier, A. Duwez, C. Jérôme, A. Léonard, K. Van der Werf, P. Dijkstra e M. Bennink, "Mechanical testing of electrospun PCL fibers", *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 218–224, 2012.
- [125] A. Doustgani, E. Vashghani-Farahani, M. Soleimani e S. Hashemi-Najafabadi, "Optimizing the mechanical properties of electrospun polycaprolactone and nanohydroxyapatite composite nanofibers", *Compos.*, vol. 43, pp. 1830–1836, 2012.
- [126] J. Dias e P. Bártolo, "Morphological characteristics of electrospun PCL meshes - The influence of solvent type and concentration", *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 216–221, 2013.

- [127] K. Tsubone, Y. Arakawa e M. J. Rosen, "Structural effects on surface and micellar properties of alkanediyl- α,ω -bis(sodium N -acyl- β -alaninate) gemini surfactants", *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 262, no. 2, pp. 516–524, 2003.
- [128] J. Kemken, A. Ziegler e B. W. Muller, "Investigations into the Pharmacodynamic Effects of Dermally Administered Microemulsions Containing β -Blockers", *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 43, no. 10, pp. 679–684, 1991.
- [129] S. Ramanan, A. A. Prema, R. J. Xavier e P. A. Sahayaraj, "Anti-cancer activity (A431 cancer cells) and cytotoxic efficiency (HaCaT skin cells) of Curcumin/Neem loaded polycaprolactone (PCL) nanofibres", vol. 8, no. 6, pp. 104–111, 2016.
- [130] T. Prasad, E. A. Shabeena, D. Vinod, T. V. Kumary e P. R. Anil Kumar, "Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [131] J. Merrell, S. McLaughlin, L. Tie, C. Laurencin, A. Chen e L. Nair, "Curcumin loaded poly (ϵ -Caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties", *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1149–1156, 2009.
- [132] H. L. Huang e S. Yang, "Filtration characteristics of polysulfone membrane filters", *J. Aerosol Sci.*, vol. 37, no. 10, pp. 1198–1208, 2006.

Capítulo 8

Anexos

8. Anexos

Anexo 1

**Lista de medicamentos aprovados pelo INFARMED (em agosto de 2017) cuja substância ativa (denominação internacional comum) é o ACV
(adaptado de <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento>)**

Nome do medicamento	Laboratório	Forma farmacêutica	Dosagem	Tamanho da embalagem	Via de Administração
Aciclovir Ciclum	Cicum Farma Unipessoal, Lda.	Comprimido	200 mg	25 unidade(s)	Oral
Aciclovir Generis 200 mg Comprimidos	Generis Farmacêutica, S.A.	Comprimido	200 mg	25 unidade(s)	Oral
Aciclovir Labesfal 200 mg Comprimidos	Labesfal - Laboratórios Almiro, S.A.	Comprimido	200 mg	25 unidade(s)	Oral
Aciclovir ratiopharm	Ratiopharm - Comércio e Indústria de Produtos Farmacêuticos, Lda	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica
Hermix-Sofex	Sofex Farmacêutica, Lda	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica
Aciclovir ratiopharm	Ratiopharm - Comércio e Indústria de Produtos Farmacêuticos, Lda	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Pomada oftálmica	30 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 4.5 g	Ocular
Aciclovir Ciclum	Cicum Farma Unipessoal, Lda	Comprimido	800 mg	35 unidade(s)	Oral
Aciclovir Ciclum	Cicum Farma Unipessoal, Lda	Comprimido	800 mg	25 unidade(s)	Oral

Aciclovir Cinfa 800 mg Comprimidos Dispersíveis	Cinfa Portugal, Lda	Comprimido dispersível	800 mg	25 unidade(s)	Oral
Aciclovir Generis 800 mg Comprimidos	Generis Farmacêutica, S.A.	Comprimido	800 mg	25 unidade(s)	Oral
Aciclovir Generis 800 mg Comprimidos	Generis Farmacêutica, S.A.	Comprimido	800 mg	35 unidade(s)	Oral
Aciclovir Labesfal 800 mg Comprimidos	Labesfal - Laboratórios Almiro, S.A.	Comprimido	800 mg	35 unidade(s)	Oral
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Suspensão oral	80 mg mL ⁻¹	1 unidade(s) - 100 ml	Oral
Cicloviral	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Comprimido	200 mg	25 unidade(s)	Oral
Cicloviral	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Comprimido	400 mg	25 unidade(s)	Oral
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Comprimido	200 mg	25 unidade(s)	Oral
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Suspensão oral	80 mg mL ⁻¹	1 unidade(s) - 200 ml	Oral
Cicloviral	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Comprimido	800 mg	35 unidade(s)	Oral
Zov 800		Comprimido	800 mg	25 unidade(s)	Oral
Cicloviral	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Comprimido	800 mg	25 unidade(s)	Oral
Zov 800		Comprimido	800 mg	35 unidade(s)	Oral

Cicloviral IV	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Pó para solução para perfusão	250 mg	5 unidade(s)	Intravenosa
Aciclosina	Laboratórios Atral, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica
Aciclosina	Laboratórios Atral, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Aciclovir Generis	Generis Farmacêutica, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Aciclovir Germed		Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Aciclovir Germed		Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica
Aciclovir Labesfal	Labesfal - Laboratórios Almiro, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Aciclovir Labesfal	Labesfal - Laboratórios Almiro, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica
Cicloviral	Laboratório Medinfar - Produtos Farmacêuticos, S.A.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 10 g	Tópica
Zovirax	Laboratórios Wellcome de Portugal, Lda.	Creme	50 mg g ⁻¹	1 unidade(s) - 2 g	Tópica

Anexo 2

Reta de calibração do ACV em meio aquoso e em meio micelar a pH \approx 5,5

Para traçar a reta de calibração e obter o coeficiente de extinção molar do ACV prepararam-se, por diluição a partir de uma solução *stock* de concentração rigorosa, várias soluções padrão de concentrações conhecidas.

A solução *stock* de ACV, foi preparada dissolvendo 2,201 mg de fármaco (pesados numa microbalança Sartorius M5P) em 100 mL de uma solução aquosa a pH \approx 5,5, obtendo-se uma solução com concentração de $9,773 \times 10^{-5}$ M. A partir desta solução *stock*, por diluição foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações de ACV entre $9,773 \times 10^{-6}$ M e $9,773 \times 10^{-5}$ M.

De forma a mimetizar a interface biológica foi preparada uma solução *stock* de ACV, dissolvendo 2,284 mg de fármaco numa solução 16 mM de sulfato de lauril de sódio (SLS) a pH de 5,5. A partir desta solução de concentração rigorosa $1,01 \times 10^{-4}$ M prepararam-se por diluição seis soluções-padrão com concentrações entre $1,01 \times 10^{-5}$ M e $1,01 \times 10^{-3}$ M.

Os espectros de absorção foram traçados num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2501 PC, entre 220 e 350 nm, usando cuvetes de quartzo de volume reduzido (1 mL) com percurso ótico de 1 cm.

Os espectros obtidos mostram-se na Figura A2-1, podendo-se observar duas bandas de absorção no ultravioleta, uma centrada em 252 nm (comprimento de onda selecionado para fazer o doseamento) e outra centrada em cerca de 280 nm.

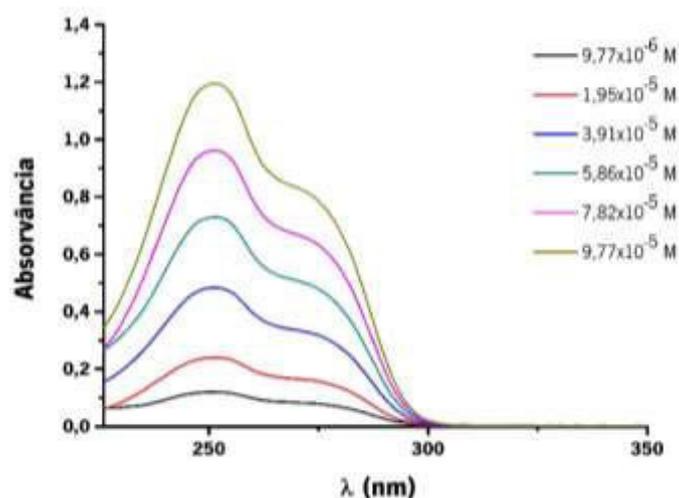


Figura A2-1 – Espectros de absorção UV/VIS de soluções padrão aquosas de ACV.

Na Figura A2-2 representam-se os valores de absorvância das soluções padrão no comprimento de onda selecionado, em função da concentração, como proposto pela Lei de Beer,

$$Abs = \varepsilon_{(\lambda)} C$$

observando-se a linearidade esperada e obtendo-se, a partir da reta de regressão, o valor experimental do coeficiente de extinção molar do ACV neste meio e neste comprimento de onda, $\varepsilon = 12286,50 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

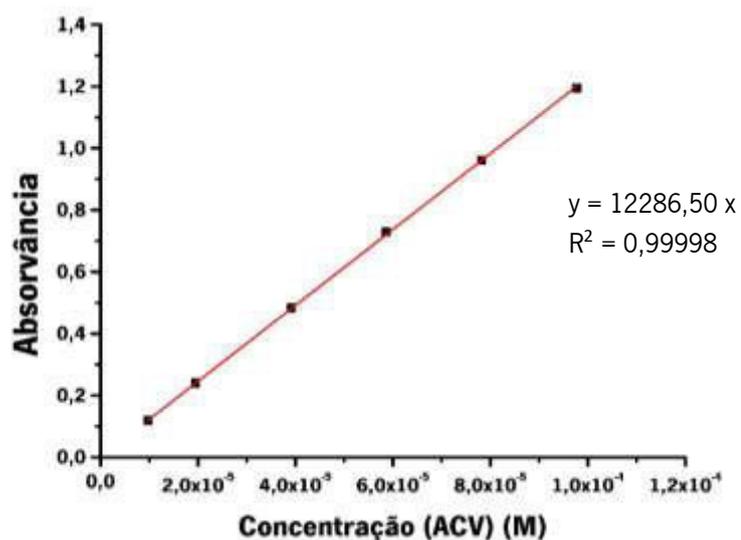


Figura A2-2 – Reta de calibração do ACV em meio aquoso para $\lambda = 252 \text{ nm}$.

O mesmo procedimento foi seguido para as soluções padrão preparadas em meio micelar. Os espectros medidos mostram-se na Figura A2-3. Pode-se ver que a forma do espectro é semelhante à das soluções aquosas.

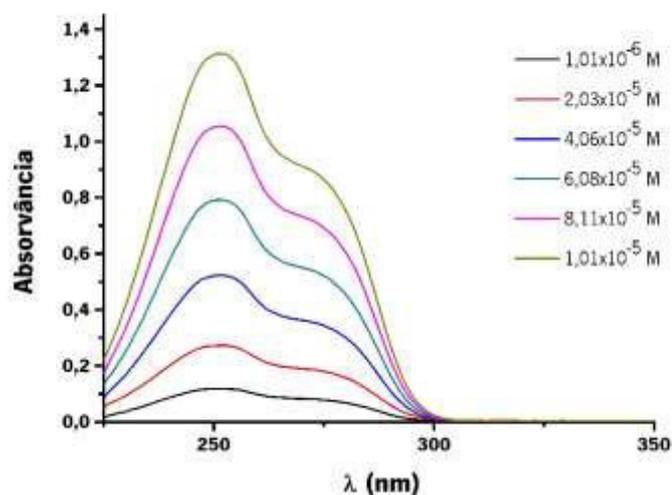


Figura A2-3 – Espectros de absorção UV/VIV de soluções padrão de ACV em meio micelar.

A representação da absorvância medida no comprimento de onda de 252 nm em função da concentração (Figura A2-4) permite determinar o valor do coeficiente de extinção molar do ACV neste comprimento de onda em micelas de SLS, $\epsilon = 12960,97 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Verifica-se que o valor é idêntico ao obtido em meio aquoso.

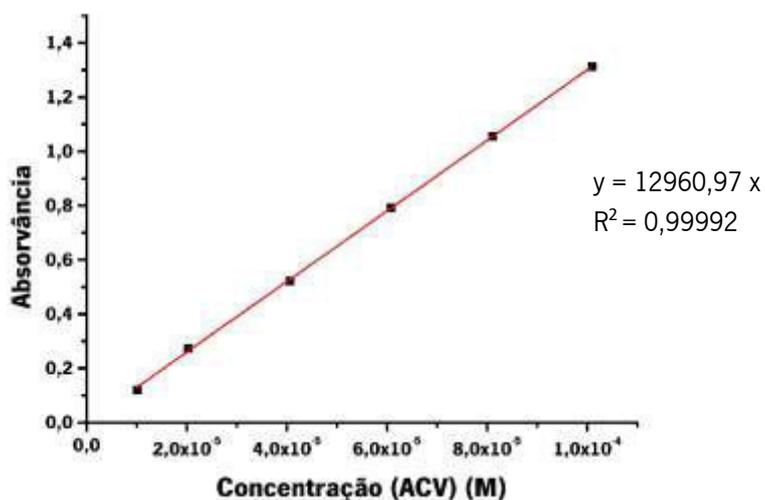


Figura A2-4 – Retas de calibração do ACV em meio micelar para $\lambda = 252 \text{ nm}$.

De modo a proceder ao doseamento do ACV pelo método de espectroscopia derivativa começou-se por determinar a primeira derivada dos espectros de absorção UV/Vis dos padrões ACV em meio micelar. Na Figura A2-5 está representada a 1ª derivada desses espectros.

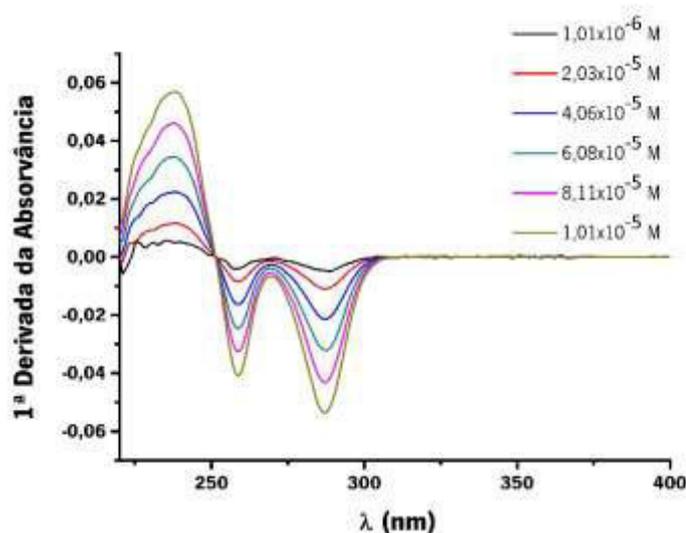


Figura A2-5 – Primeira derivada dos espectros de absorção UV/VIS de soluções padrão de ACV em meio micelar.

Na 1ª derivada dos espectros selecionou-se o pico localizado no comprimento de onda de 287 nm para se fazer o doseamento do ACV. De seguida traçou-se um gráfico da amplitude da primeira derivada nesse comprimento de onda para cada solução padrão, em função da respetiva concentração e usou-se o declive desse gráfico (-531,94) para dosear o ACV (Figura A2-6).

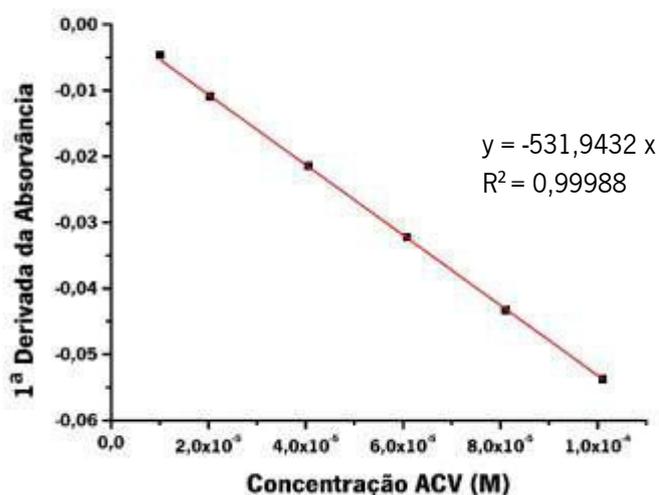


Figura A2-6 – Relação entre os valores da 1ª derivada dos espectros de absorvância a $\lambda = 287$ nm e a concentração do ACV em meio micelar.

Anexo 3

Reta de calibração do ómega-3 em hexano

A solução *stock* de ácidos gordos ómega-3, foi preparada pela dissolução de 0,0153 g de ómega-3 em 5 mL de hexano obtendo-se uma solução com concentração rigorosa de 3,06 g L⁻¹. A partir da solução *stock*, por diluição foram preparadas cinco soluções-padrão com concentrações de ómega-3 entre 0,0612 g L⁻¹ e 0,612 g L⁻¹.

Os espectros foram medidos nas mesmas condições experimentais dos do ACV e apresentam-se na Figura A3-1. Podem-se identificar quatro bandas de absorção no UV a cerca de 245 nm, 258 nm, 269 nm e 280 nm. O comprimento de onda selecionado para fazer o doseamento foi o de 269 nm. Na Figura A3-2 mostra-se a representação gráfica da absorvância medida neste comprimento de onda em função da concentração das soluções padrão. Como se observa, terá havido um erro experimental na preparação da solução padrão de concentração 0,153 g L⁻¹. Desprezando esta concentração foi possível obter o valor do coeficiente de extinção molar do ómega-3 em hexano, neste comprimento de onda, $\epsilon = 2,0764 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

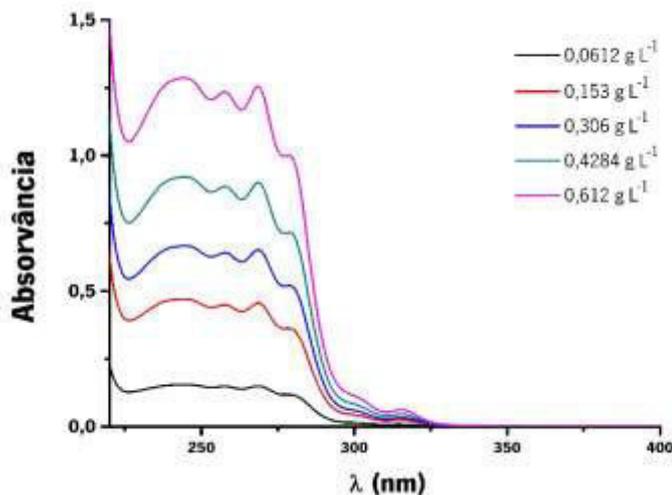


Figura A3-1 – Espectros de absorção UV/VIS de soluções padrão de ácidos gordos ómega-3 em hexano.

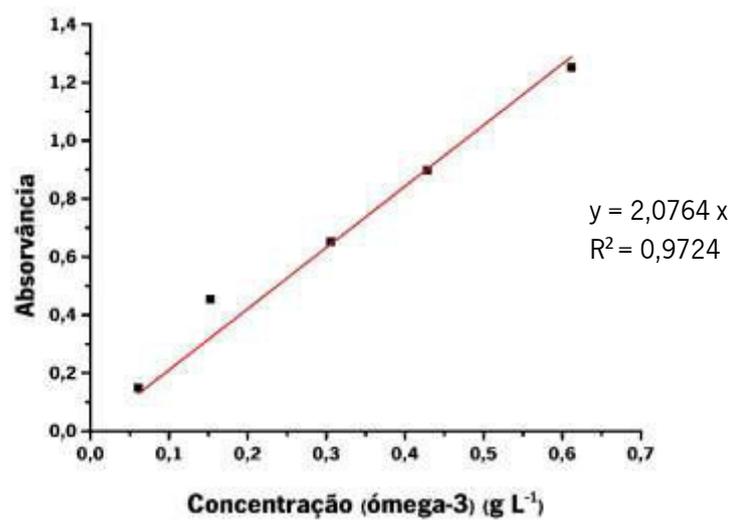


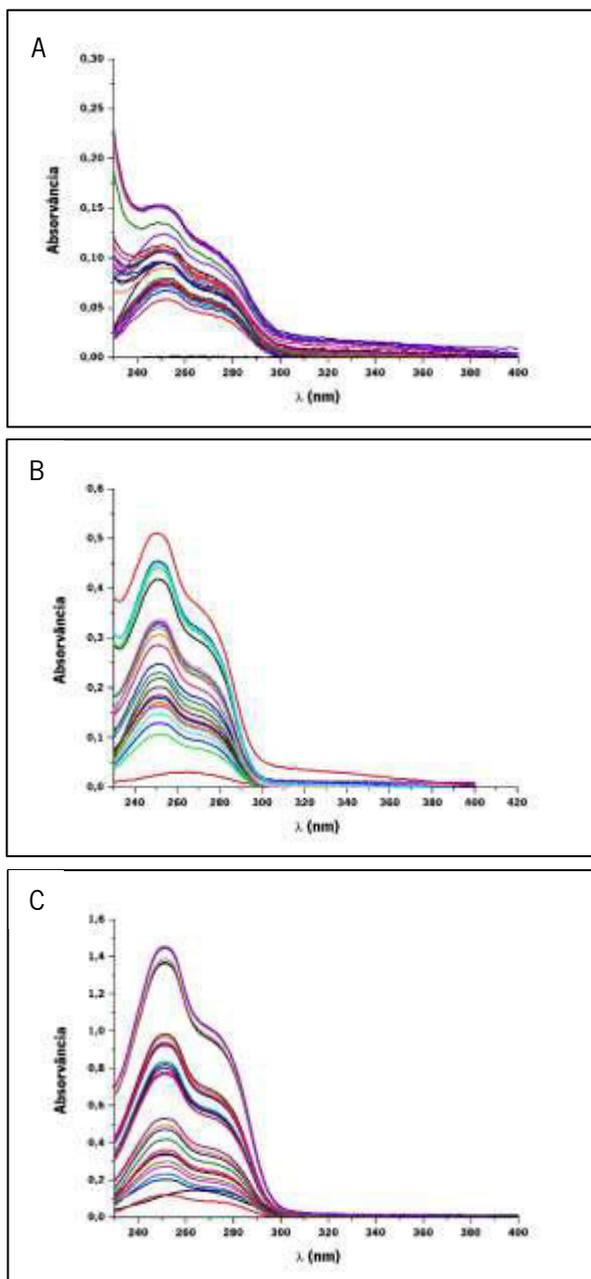
Figura A3-2 – Reta de calibração do ómega-3 em hexano para $\lambda = 269$ nm.

Anexo 4

Espetros de absorção associados aos ensaios de libertação controlada

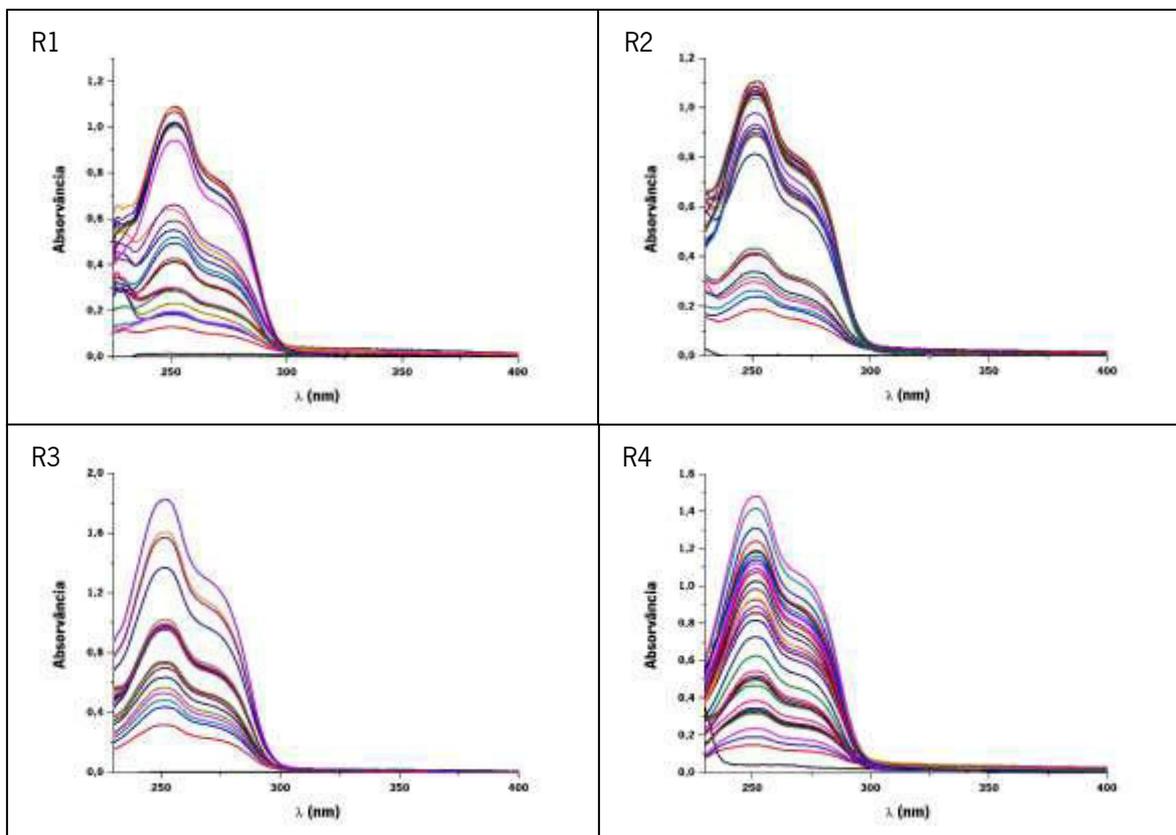
1 – Espetros de absorção associados ao ensaio de libertação controlada do aciclovir a partir de nanofibras de PCL-ACV com diferentes concentrações de ACV, em meio aquoso, pH \approx 5,5:

(A) PCL-ACV (1 % m/v); (B) PCL-ACV (2 % m/v); (C) PCL-ACV (4 % m/v)
Mostram-se os espetros aos diferentes tempos.

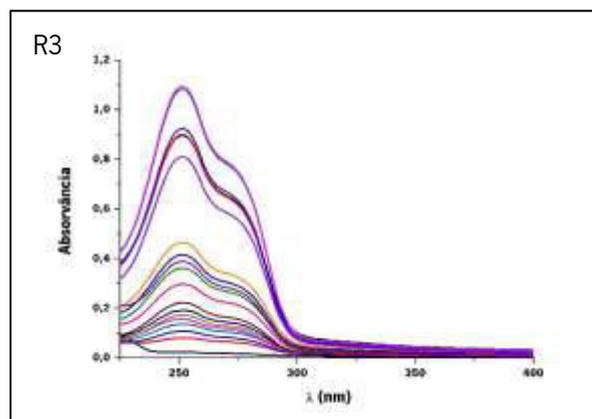
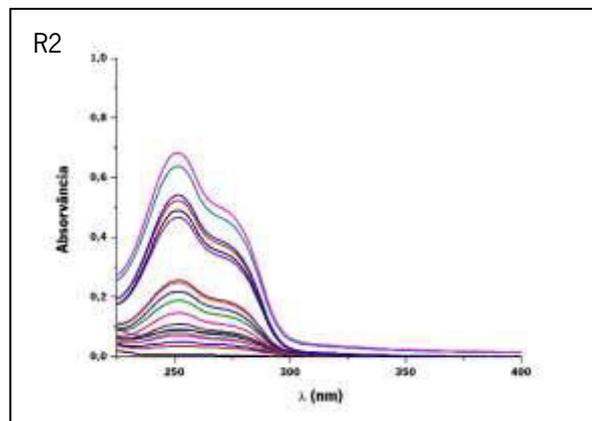
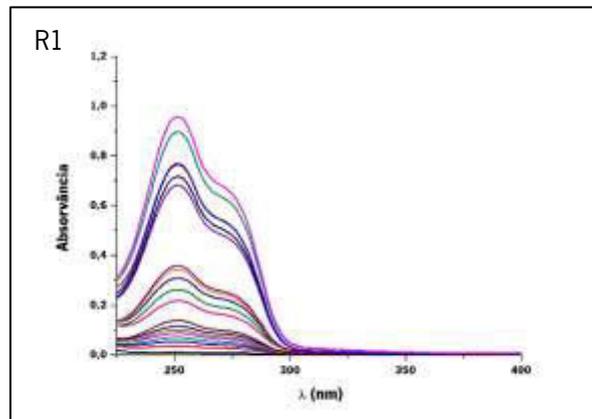


2 – Espectros de absorção associados aos ensaios de libertação controlada do aciclovir a partir de nanofibras de PCL-ACV (2 % m/v) em meio micelar, pH \approx 5,5.

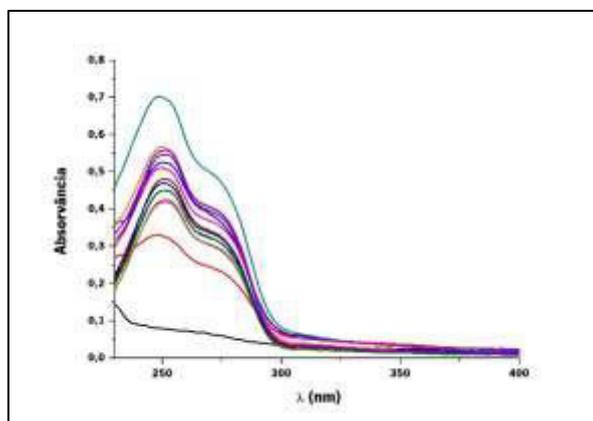
Mostram-se os espectros aos diferentes tempos de quatro réplicas, R1 a R4.



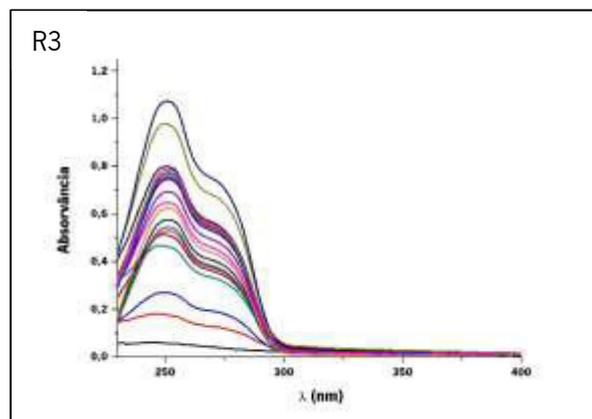
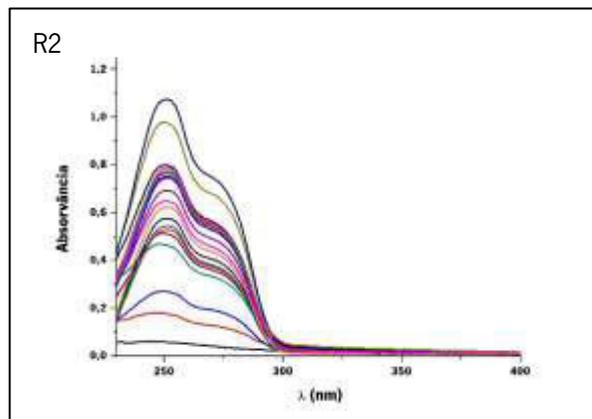
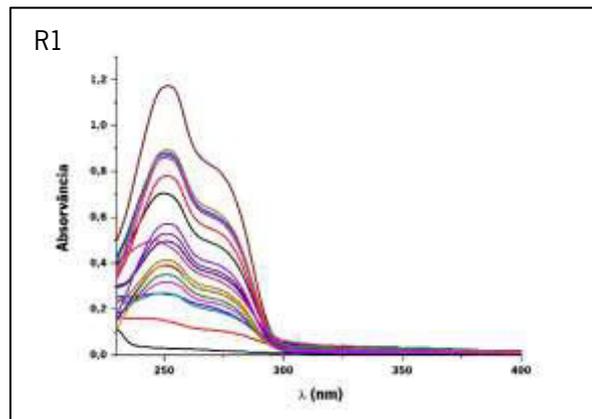
3 – Espectros de absorção associados aos ensaios de libertação controlada do ACV a partir de nanofibras de Zeína-ACV (12 % m/m) em meio aquoso, pH \approx 5,5. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos de três réplicas, R1 a R3.



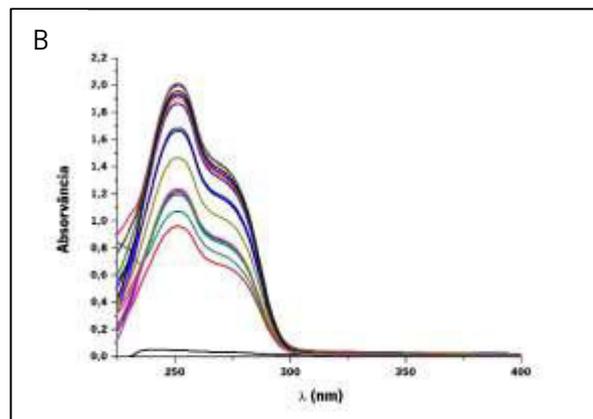
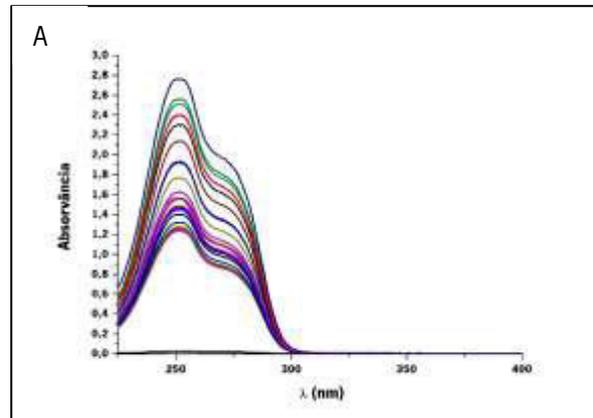
4 – Espectros de absorção associados aos ensaios de liberação controlada do aciclovir a partir de nanofibras de Zeína-ACV (12 % m/m) em meio micelar e pH \approx 5,5. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.



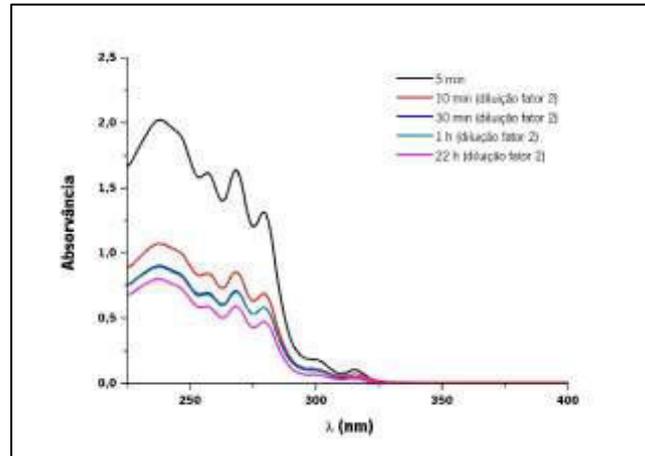
5 – Espectros de absorção associados aos ensaios de libertação controlada do ACV a partir de nanofibras de PCL-ACV(1:6 m/m)- Ω 3(2:6 m/m) em meio micelar, pH \approx 5,5. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos de três réplicas, R1 a R3.



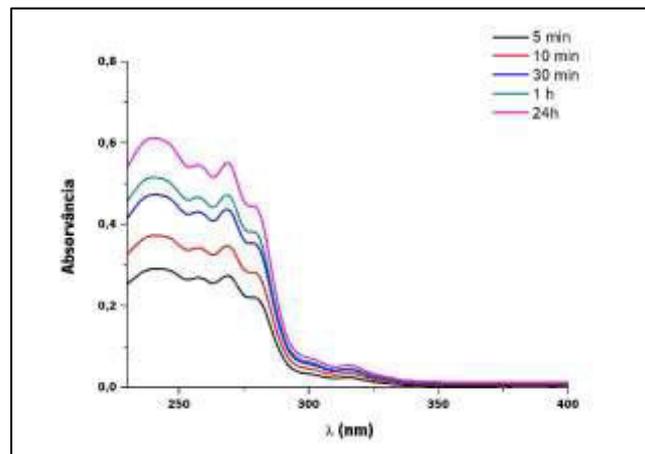
6 – Espectros de absorção associados ao ensaio de libertação controlada do ACV da formulação comercial Zovirax™ creme em meio aquoso (A) e em meio micelar (B), ambos a pH ≈ 5,5. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.



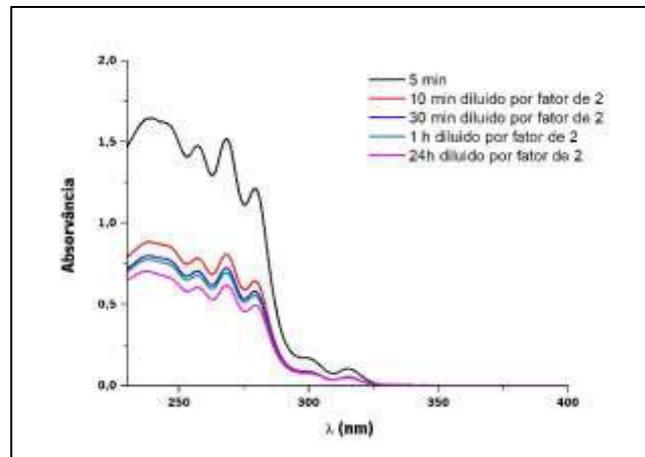
7 – Espectros de absorção associados ao ensaio de libertação controlada do ómega-3 a partir de nanofibras de PCL- Ω 3 (1:3 m/m) em hexano.
Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.



8 – Espectros de absorção associados ao ensaio de libertação controlada do ómega-3 a partir de nanofibras de zeína- Ω 3 (30 % m/m) em hexano.
Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.



9 – Espectros de absorção associados aos ensaios de liberação controlada do ômega-3 a partir de nanofibras de PCL:ACV (1:6 m/m) PCL:ômega-3 (2:6 m/m) em hexano. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.



(B)

Anexo 5

Ajuste das cinéticas de liberação de ACV aos modelos matemáticos

Tabela A5-1 – Ajustes das cinéticas de liberação de ACV das nanofibras de PCL em meio micelar aos modelos matemáticos.

Cinética de 1ª ordem

		Parâmetros	R²	R² ajustado
$F_{max}(1 - e^{-kt})$	Ensaio de liberação não otimizado	$F_{max} = 100$ $k = 0,015 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$	0,99682	0,99682
	Ensaio de liberação otimizado	$F_{max} = 100,5 \pm 3,3$ $k = 0,042 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$	0,98711	0,98643

F_{max} é a quantidade total de fármaco libertada e k é a constante de liberação de primeira ordem.

Modelo Korsmeyer–Peppas

		Parâmetros	R²	R² ajustado
at^n	Ensaio de liberação não otimizado	$a = 4,02 \pm 0,60$ $n = 0,62 \pm 0,03$	0,99707	0,99693
	Ensaio de liberação otimizado	$a = 4,97 \pm 0,45$ $n = 0,69 \pm 0,02$	0,96906	0,96743

a é constante de incorporação geométrica e estrutural que tem em conta a forma farmacêutica; n é um de liberação que representa o mecanismo de difusão do fármaco, sendo baseado na lei de Fick, (um valor de n igual ou menor que 0,5 indica uma difusão Fickiana, para valores entre 0,5 e 1 indica um transporte não Fickiano).

Tabela A5-2 – Ajustes das cinéticas de liberação de ACV das nanofibras de PCL em meio micelar aos modelos matemáticos.

Modelo Korsmeyer–Peppas com burst

		Parâmetros	R²	R² ajustado
$at^n + b$	Ensaio de liberação não otimizado	$a = 3,82 \pm 0,62$ $n = 0,62 \pm 0,03$ $b = 0,35 \pm 0,33$	0,99708	0,99680
	Ensaio de liberação otimizado	$a = 4,21 \pm 0,59$ $n = 0,72 \pm 0,03$ $b = 0,84 \pm 0,47$	0,97431	0,96851

b representa o efeito do *burst*.

Tabela A5-3 – Ajustes das cinéticas de libertação de ACV das nanofibras de PCL em meio micelar aos modelos matemáticos

Modelo Gallagher-Corrigan

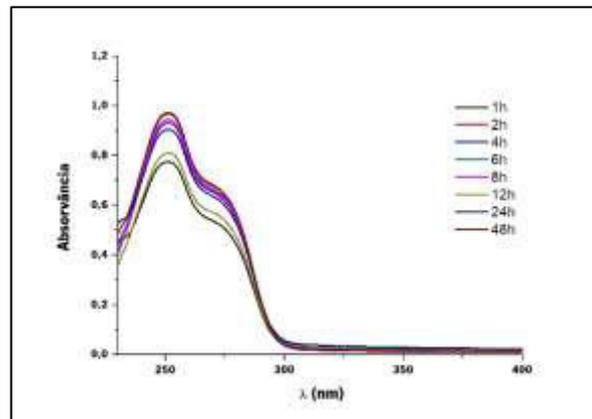
		Parâmetros	R²	R² ajustado
$Fb(1 - e^{-k_1 t}) + (F_{max} - Fb) \left(\frac{e^{-k_2 t - k_2 t_{max}}}{1 + e^{-k_2 t - k_2 t_{max}}} \right)$	Ensaio de libertação não otimizado	$Fb = 16,65 \pm 2,23$ $k_1 = 0,199 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ $F_{max} = 92,36 \pm 1,50$ $k_2 = 0,055 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ $t_{max} = 92,37 \pm 5,21 \text{ h}$	0,99913	0,99895
	Ensaio de libertação otimizado – Nanofibras recém produzidas (não oxidadas)	$Fb = 65,8 \pm 12,6$ $k_1 = 0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ $F_{max} = 99,56 \pm 1,75$ $k_2 = 0,09 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ $t_{max} = 35,51 \pm 3,22 \text{ t}$	0,99844	0,99805
	Ensaio de libertação otimizado – Nanofibras envelhecidas (oxidadas)	$Fb = 37,51 \pm 15,64$ $k_1 = 0,03 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ $F_{max} = 91,49 \pm 3,53$ $k_2 = 0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ $t_{max} = 56,31 \pm 1,85 \text{ h}$	0,9970	0,99643

Fb é a quantidade de fármaco libertado diretamente da superfície do nanossistema (no *burst* inicial); F_{max} representa a quantidade de fármaco libertado durante o processo t_{max} representa o tempo em que ocorre a libertação máxima do fármaco da superfície do nanossistema (após o *burst* inicial); k_1 e k_2 são constantes de libertação da primeira e segunda fases, respetivamente.

Anexo 6

Espetros de absorção associados aos ensaios de difusão do ACV

1 – Espetros de absorção associados ao ensaio de difusão (com a membrana de PSO) do ACV a partir de nanofibras de PCL com ACV e ômega-3. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos



2 – Espetros da primeira derivada da absorção associados ao ensaio de difusão com modelo de pele de porco a partir de (A) nanofibras de PCL com ACV e ômega-3 e (B) da formulação ZoviraxTM creme. Mostram-se os espectros aos diferentes tempos.

