

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Margarida Paulo da Costa

Estudo da Libertação de Compostos Adsorvidos em Polímeros pH-responsivos

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação da
Mestre Ana Patrícia da Rocha Cardoso
e da
Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Margarida Paulo da Costa

Título da dissertação: Estudo da Libertação de Compostos Adsorvidos em Polímeros pH-responsivos

Orientadoras: Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues

Mestre Ana Patrícia da Rocha Cardoso

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura:

*“Eu sei o preço do sucesso: dedicação, trabalho duro e uma incessante
devoção às coisas que você quer ver acontecer.”*

Frank Lloyd Wright

AGRADECIMENTOS

Esta é a página mais sincera e ao mesmo tempo mais difícil de escrever, dizem que é nela que se deve incluir um agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação, e ainda mais contribuíram para a conclusão com sucesso destes 5 anos de estudos, no entanto não é assim tão fácil quanto parece.

Desde já tenho de agradecer à minha orientadora da universidade, professora Lígia Rodrigues pela ajuda e disponibilidade, que sempre demonstrou ao longo destes meses, perante as minhas dúvidas e preocupações, à minha orientadora do CeNTI, Ana Cardoso, pela compreensão e disponibilidade durante todo desenvolvimento da dissertação e ao meu “mentor”, o Ricardo Neto, pela ajuda a ambientar-me às dinâmicas laboratoriais do CeNTI e pela disponibilidade em discutir todas as minhas dúvidas e todos os obstáculos que foram surgindo durante o estágio.

Ao CeNTI e a todas as pessoas que constituem a empresa agradeço a simpatia e amabilidade com que me receberam durante estes 5 meses, tornando a minha passagem pelo CeNTI muito agradável. Dentro dessas pessoas tenho de destacar o grupo de estagiários, com eles foi bastante mais fácil ambientar-me. Foi possível partilhar experiências, uma vez que todos estávamos a trabalhar com o mesmo propósito, e desanuviar das frustrações diárias, que a investigação pode proporcionar, durante os pequenos lanchinhos diários.

Ao meu grupinho de quase-engenheiros só tenho duas coisas a dizer-lhes, obrigada por estes 5 anos! Estudar engenharia é um percurso longo e duro mas com vocês repetia tudo de novo, e parabéns a nós, melhor do que ninguém, nós sabemos o quão difícil foi este percurso para todos e reconhecemos todas as conquistas e derrotas que tivemos, por isso vamos embora ser felizes e bem-sucedidos recém-mestres! Obrigada Mary por seres a que, de todos, mais atura as minhas paranoias, almas gémeas para o bem e para o mal, diriam alguns, para o resto da vida, para mal de muitos. Ao quarteto fantástico obrigada por tudo, simplesmente vocês são os melhores de sempre. Às meninas que me acompanharam, tanta fofuice não termina aqui, a amizade que nos une não termina assim tão facilmente.

À minha família e familiares por afinidade, que me proporcionaram um bem-estar familiar que me permitiu simplesmente esquecer todos os problemas e stresses, com particular carinho aos meus pais, foram eles que, com muito esforço financeiro, me deram a possibilidade de estudar e tirar o curso superior que queria, sem eles seria nada, graças a eles hoje sou tudo aquilo que consigo sonhar e pretendo alcançar.

Por fim, a pessoa responsável por ter conseguido tudo isto, o meu João Carlos. Ele é a minha segunda pele, é o meu saco de boxe quando apenas a raiva e as frustrações me atormentam, é aquele que com um abraço faz o mundo parar de girar e torna o meu mundo num lugar melhor, é ele que faz de mim melhor pessoa e foi ele que durante 5 anos me ouviu, apoiou, acarinhou, deu força para que nunca desistisse e, ainda hoje, tenta que o pessimismo natural da minha pessoa desapareça. Obrigada por teres estado sempre aqui para me ouvir, mesmo sobre coisas que simplesmente não percebias, e obrigada por seres tu todos os dias da minha vida! Acabou um ciclo, mas contigo ele apenas está no início.

RESUMO

O desenvolvimento de aplicações e sistemas de libertação controlada emerge como uma área bastante promissora, surgindo nesse âmbito a aposta na utilização de polímeros responsivos capazes de responder às necessidades específicas de cada pessoa e de cada situação.

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do estágio realizado no CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes. Dentro da área de investigação dos materiais funcionais da empresa, surgiu a oportunidade de desenvolver um estudo sobre sistemas de libertação controlada baseados em polímeros pH-responsivos. Para tal, foi inicialmente estudado um procedimento de síntese para obter nanopartículas a partir de polímeros pH-responsivos disponíveis comercialmente (com e sem incorporação de fármaco), em seguida essas partículas foram sujeitas a técnicas de caracterização, e por fim, realizaram-se estudos de libertação do fármaco incorporado com as nanopartículas sintetizadas.

Na otimização do processo de síntese destacou-se uma melhoria no tamanho e estabilidade das nanopartículas sintetizadas recorrendo à utilização de Span® 85 em vez de álcool polivinílico e de velocidades de agitação mais elevadas durante a síntese.

Na caracterização das nanopartículas sintetizadas foi possível constatar que as mesmas possuíam tamanhos dentro dos limites aceitáveis para sistemas de libertação controlada e valores de potencial zeta indicadores da sua elevada estabilidade. No caso particular das nanopartículas com incorporação de ibuprofeno, demonstrou-se, através das análises de caracterização, que efetivamente o ibuprofeno havia sido incorporado, com exceção das nanopartículas de Eudragit® L100-55, nas quais não foi possível a incorporação do fármaco.

Através dos estudos de libertação com as nanopartículas de Eudragit® L100-55 obtidas pré- e pós-liofilização, demonstrou-se que não ocorreu libertação já que não existia ibuprofeno incorporado. Nos estudos com Eudragit® E PO demonstrou-se que, para as nanopartículas obtidas pré-liofilização, com o aumento de ibuprofeno nas partículas ocorreu um aumento da velocidade de libertação, sendo que a velocidade foi sempre maior para o estudo a pH 5,5. No caso das nanopartículas obtidas pós-liofilização, com o aumento de ibuprofeno nas partículas ocorreu a diminuição da velocidade da libertação, sendo que a velocidade foi maior para pH 6,8.

PALAVRAS-CHAVE

Nanopartículas, Eudragit®, ibuprofeno, síntese, estudos de libertação

ABSTRACT

The development of applications and drug delivery systems emerge as a quite promising area, arising within this context the potential use of responsive polymers capable of addressing the specific needs of each person and situation.

The present dissertation was developed under the scope of the internship performed at CeNTI - Centre for Nanotechnology and Smart Materials. Within the functional materials research area of the company, there was an opportunity to conduct a study about drug delivery systems based on pH-responsive polymers. Therefore, it was initially studied a synthesis procedure to obtain nanoparticles from pH responsive polymers commercially available (with or without drugs incorporated), then those particles were characterized using a number of techniques, and, at last drug release studies with the synthesized nanoparticles were developed.

In the optimization of the synthesis process, the synthesized nanoparticles size and stability was improved through the use of Span® 85 instead of poly(vinyl alcohol) and higher agitation velocities during the synthesis.

Throughout the characterization of the synthesized nanoparticles it was found that they possess sizes within the acceptable limits for drug delivery systems and exhibited zeta potential values that indicate their high stability. Regarding the nanoparticles loaded with ibuprofen it was shown, through characterization techniques, that the ibuprofen was indeed incorporated in the nanoparticles, with the exception of the Eudragit® L100-55 nanoparticles, in which the incorporation has not been possible.

From the release studies conducted with the Eudragit® L100-55 nanoparticles obtained before and after the freeze-drying procedure, it was shown that the release does not occur since there was no ibuprofen incorporated. In the studies with Eudragit® E PO, it was found that, regarding the nanoparticles obtained before freeze-drying, with the increase of ibuprofen in the particles there was an increase in the release velocity, wherein the velocity was always higher for the study at pH 5,5. On the other hand, when it comes to the case of the nanoparticles obtained after freeze-drying, with the increase of ibuprofen in the particles, it occurred the decrease of the release velocity, wherein the velocity was higher for the study at the pH 6,8.

KEYWORDS

Nanoparticles, Eudragit®, ibuprofen, synthesis, release studies

ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xxiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xxv
Nomenclatura.....	xxvii
1. Enquadramento	1
1.1 O CeNTI.....	2
1.2 Objetivos	2
1.3 Organização da Dissertação.....	2
2. Introdução Teórica	5
2.1 Polímeros Responsivos.....	6
2.1.1 Polímeros pH-responsivos.....	10
a. Eudragit® L100-55.....	13
b. Eudragit® E PO.....	14
2.1.2 Nanotransportadores como Sistemas de Liberação Controlada.....	15
2.2 Caracterização Física e Química de Polímeros Responsivos.....	18
2.2.1 Análise Termogravimétrica – TGA.....	18
2.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	20
2.2.3 Dispersão Dinâmica de Luz – DLS	22
2.2.4 Dispersão Eletroforética de Luz – ELS	23
2.2.5 Microscopia Eletrónica de Varrimento – SEM.....	24
2.3 Ibuprofeno	24
2.4 Aplicações de Nanopartículas como Sistemas de Liberação Controlada.....	27
2.4.1 Aplicação tópica e transdérmica de nanopartículas com Ibuprofeno.....	27
a. O pH da pele como estímulo	29
3. Metodologia	31
3.1 Materiais.....	31

3.2	Síntese de nanopartículas de Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO	32
3.3	Caracterização das nanopartículas de Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO	35
3.3.1	Análise Termogravimétrica	35
3.3.2	Análise de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier	35
3.3.3	Medição do tamanho das nanopartículas e potencial zeta.....	36
3.3.4	Análise de microscopia eletrônica de varrimento	36
3.4	Libertação de Ibuprofeno.....	37
3.4.1	Retas de Calibração.....	37
3.4.2	Preparação da solução tampão HCl/KCl (pH 1,2)	37
3.4.3	Preparação da solução tampão citrato (pH 5,5).....	38
3.4.4	Preparação da solução tampão fosfato (pH 6,8)	38
3.4.5	Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir da solução de nanopartículas em solução.....	38
3.4.6	Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas liofilizadas	39
4.	Resultados e Discussão.....	41
4.1	Otimização do Processo de Síntese de Nanopartículas	41
4.1.1	Ensaio de acordo com o procedimento experimental inicial.....	41
4.1.2	Ensaio realizado usando o procedimento de síntese modificado	47
4.2	Caracterização Física e Química das Nanopartículas	54
4.2.1	Análise Termogravimétrica.....	55
a.	Caracterização dos polímeros e fármaco puro.....	55
b.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO	58
c.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55	63
4.2.2	Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	66
a.	Caracterização dos polímeros e fármaco puro.....	66
b.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO	69
c.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55	74
4.2.3	Análise do tamanho das nanopartículas	76
a.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO	76

b.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55	78
4.2.4	Análise do potencial zeta das nanopartículas	81
a.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO	81
b.	Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55	83
4.2.5	Análise estrutural e morfológica por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	
	84	
4.3	Estudos de Libertação	87
4.3.1	Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas pré- liofilização	89
a.	Modelação cinética da libertação de ibuprofeno	92
4.3.2	Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas pós- liofilização	94
a.	Modelação cinética da libertação de ibuprofeno	97
5.	Conclusão e Recomendações	99
	Referências Bibliográficas	103
	Anexo I – Curvas de Calibração do Ibuprofeno por Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/visível	115
	Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaio Realizados ...	117
	Anexo III – Espectros de FTIR	122
	Anexo IV – Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X.....	123
	Anexo V – Espectro de UV/vis do Ibuprofeno	125
	Anexo VI – Exemplo de Cálculo da Quantidade de Ibuprofeno Libertada para o Estudo Pré- liofilização.....	126
	Anexo VII – Gráficos da Modelação Cinética de Ordem Zero dos Estudo de Libertação das Nanopartículas Pré-liofilização.....	127
	Anexo VIII – Gráficos da Modelação Cinética de Primeira Ordem dos Estudos de Libertação das Nanopartículas Pré-liofilização.....	131
	Anexo IX – Exemplo de Cálculo da Quantidade de Ibuprofeno Libertada para o Estudo Pós liofilização.....	136
	Anexo X – Gráficos da Modelação Cinética de Ordem Zero dos Estudos de Libertação das Nanopartículas Liofilizadas.....	138

Anexo XI – Gráficos da Modelação Cinética de Primeira Ordem dos Estudos de Libertação das Nanopartículas Liofilizadas.....	142
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Concentração de fármaco ao longo do tempo de acordo com os diferentes métodos de administração usados. Retirado de Fitzpatrick et al., 2012.	5
Figura 2 – Categorias dos polímeros responsivos de acordo com as propriedades físicas dos mesmos. Retirado de Panambur et al., n.d.....	8
Figura 3 – O intumescimento de (a) polímeros pH-responsivos aniônicos e (b) polímeros pH-responsivos catiónicos. Retirado de Bawa et al., 2009.....	11
Figura 4 – Estruturas dos polieletrólitos (a) poli(ácido acrílico) e (b) poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato). Retirado de Reyes-Ortega, 2008.....	12
Figura 5 – Estrutura química do Eudragit® L100-55. Retirado de Evonik Industries, 2012.....	13
Figura 6 – Estrutura química do polímero de Eudragit® E PO. Retirado de Evonik Industries, 2014.	14
Figura 7 – Diferentes formas de incorporar o fármaco nas (a) nanoesferas e (b) nanocápsulas. Retirado de Nagarwal et al., 2009.....	17
Figura 8 – Exemplo de uma curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a verde), com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T). Adaptado de PerkinElmer, 2010.....	19
Figura 9 – Localização aproximada de algumas bandas correspondentes a absorção por parte de diferentes tipos de ligações. Adaptado de Pavia et al., 2013.	21
Figura 10 – Relação entre o movimento das partículas e o tamanho das mesmas. Partículas mais pequenas deslocam-se mais rapidamente (a) e partículas maiores movem-se mais lentamente (b). Adaptado de Arzenšek, 2010.	22
Figura 11 – Estrutura química do (a) S-(+)-enantiómero de ibuprofeno, (b) R-(-)-enantiómero de ibuprofeno e (c) do ibuprofeno (C ₁₃ H ₁₈ O ₂). Adaptado de (Patel et al., 2013; Rainsford, 2012).	25
Figura 12 – Mecanismos de libertação de acordo com as diferentes formas de incorporação do fármaco, (a) difusão devido ao intumescimento da matriz, (b) difusão devido à erosão da matriz e (c) difusão por erosão ou dissolução do revestimento. Retirado de Higton, 1999.	26
Figura 13 – Representação esquemática do sistema de injeção da fase orgânica (polímero ou polímero + fármaco em metanol) na fase aquosa (PVA ou Span 85 em água).....	34

Figura 14 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em função das sucessivas centrifugações efetuadas à solução de nanopartículas dos ensaios 1 e 2. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.	42
Figura 15 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 3 e 4. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.	44
Figura 16 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 3 e 4. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.	45
Figura 17 – Nanopartículas sintetizadas no ensaio 3 após liofilização.	46
Figura 18 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 6, 7 e 8. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.	48
Figura 19 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 6, 7 e 8. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.	50
Figura 20 – Nanopartículas sintetizadas no ensaio 6 após liofilização.	51
Figura 21 – Nanopartículas sintetizadas nos ensaios 9, 10, 11 e 12 após liofilização (ensaios numerados da esquerda para a direita).	53
Figura 22 – Nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13, 14, 15, 16, 17 e 18 após liofilização.	54
Figura 23 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do Eudragit® L100-55, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).	56
Figura 24 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do Eudragit® E PO, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).	57
Figura 25 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do Ibuprofeno, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).	58
Figura 26 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® E PO e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 9 e 10, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).	59

Figura 27 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® E PO e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 13, 14, 15 e 16, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).	61
Figura 28 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® L100-55 e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 11 e 12, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).	63
Figura 29 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® L100-55 e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 17 e 18, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).	65
Figura 30 – Espectro de FTIR do Eudragit® L100-55 após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	67
Figura 31 – Espectro de FTIR do Eudragit® E PO após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	68
Figura 32 – Espectro de FTIR do Ibuprofeno após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	69
Figura 33 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 9 e 10, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	70
Figura 34 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 14, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	71
Figura 35 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 15, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	72
Figura 36 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 16, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.	73
Figura 37 – Espectros de FTIR do Eudragit® L100-55 e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 11 e 12, após 16 varrimentos.	74
Figura 38 – Espectros de FTIR do Eudragit® L100-55 e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 17 e 18, após 16 varrimentos.	75
Figura 39 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 13, 14, 15 e 16. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.	77
Figura 40 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.	79

Figura 41 – Tamanho médio das nanopartículas liofilizadas (nm) dispersas em água a 25 °C dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.....	80
Figura 42 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 13, 14, 15 e 16. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.....	82
Figura 43 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.....	83
Figura 44 – Potencial zeta das nanopartículas liofilizadas (mV) dispersas em água a 25 °C (concentração inferior a 0,05 g/mL) dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes ± desvio padrão.	84
Figura 45 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 13.	85
Figura 46 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 15.	85
Figura 47 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 17.	86
Figura 48 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 18.	86
Figura 49 – Perfis de libertação do ibuprofeno a pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8 para as nanopartículas obtidas nos ensaios 14, 15, 16 e 18.....	90
Figura 50 – Perfis de libertação do ibuprofeno a pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8 para as nanopartículas liofilizadas obtidas nos ensaios 14, 15, 16 e 18.	95
Figura Al.1 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 1,2 por espectroscopia de UV/vis.	115
Figura Al.2 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 5,5 por espectroscopia de UV/vis.	116
Figura Al.3 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 6,8 por espectroscopia de UV/vis.	116

Figura AII.1 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 9, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	117
Figura AII.2 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 10, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	117
Figura AII.3 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 11, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	118
Figura AII.4 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 12, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	118
Figura AII.5 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 13, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	119
Figura AII.6 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 14, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	119
Figura AII.7 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 15, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	120
Figura AII.8 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 16, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	120
Figura AII.9 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 17, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	121
Figura AII.10 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 18, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).....	121
Figura AIII.1 – Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 14, 15 e 16 após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.....	122

Figura AIV.1 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 13.....	123
Figura AIV.2 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 15.....	123
Figura AIV.3 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 17.....	124
Figura AIV.4 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 18.....	124
Figura AV.1 – Espectro característico de UV/vis para o ibuprofeno.	125
Figura AV.2 – Espectro de UV/vis para o ibuprofeno libertado das nanopartículas.	125
Figura AVII.1 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 1,2.	127
Figura AVII.2 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 5,5.	127
Figura AVII.3 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.....	128
Figura AVII.4 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 1,2.	128
Figura AVII.5 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 5,5.	128
Figura AVII.6 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 6,8.	129
Figura AVII.7 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 16 a pH 1,2.	129
Figura AVII.8 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.....	130
Figura AVII.9 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 16 a pH 6,8.	130
Figura AVIII.1 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 1,2.	131
Figura AVIII.2 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 14 a pH 5,5.	131
Figura AVIII.3 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.	132
Figura AVIII.4 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 1,2.	132

Figura AVIII.5 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 5,5.	133
Figura AVIII.6 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 6,8.	133
Figura AVIII.7 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 1,2.	134
Figura AVIII.8 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.	134
Figura AVIII.9 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.	135
Figura AX.1 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 14 a pH 1,2.....	138
Figura AX.2 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 5,5.....	138
Figura AX.3 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.....	139
Figura AX.4 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 15 a pH 1,2.....	139
Figura AX.5 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 15 a pH 5,5.....	139
Figura AX.6 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 15 a pH 6,8.....	140
Figura AX.7 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 16 a pH 1,2.....	140
Figura AX.8 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 16 a pH 5,5.....	141
Figura AX.9 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 16 a pH 6,8.....	141
Figura AXI.1 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 14 a pH 1,2.	142
Figura AXI.2 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 14 a pH 5,5.	142

Figura AXI.3 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.	143
Figura AXI.4 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 15 a pH 1,2.	143
Figura AXI.5 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 5,5.	144
Figura AXI.6 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 6,8.	144
Figura AXI.7 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 16 a pH 1,2.	145
Figura AXI.8 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.	145
Figura AXI.9 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 6,8.	146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos sistemas de liberação controlada. Adaptado de Bawa et al., 2009; Cabane et al., 2012; Coelho et al., 2010; Duarte et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2012; Torchilin, 2010; Wilczewska et al., 2012	6
Tabela 2 – Efeitos dos vários estímulos externos na liberação de um fármaco a partir de um hidrogel. Retirado de Bawa et al., 2009.....	9
Tabela 3 – Vantagens e limitações dos nanotransportadores como sistema de liberação controlada. Retirado de Danhier et al., 2010; National Cancer Institute, 2015; Peer et al., 2007; Rawat et al., 2006; Sagnella & Drummond, 2012	15
Tabela 4 – Aplicações do FTIR de acordo com a região do espectro de infravermelhos. Retirado de Rakesh & Rajesh, 2014	21
Tabela 5 – Solubilidade e permeabilidade do ibuprofeno em função do pH em água. Adaptado de (Hadgraft & Valenta, 2000)	25
Tabela 6 - Condições e polímeros utilizados em cada ensaio realizado de acordo com o primeiro procedimento experimental, assim como a massa pesada de cada polímero em cada síntese .	33
Tabela 7 – Condições e polímeros utilizados em cada ensaio realizado de acordo com o procedimento experimental final e ainda as massas pesadas de polímero e ibuprofeno	34
Tabela 8 – Massa de ibuprofeno pesada e respetiva concentração da solução-mãe resultante, utilizada para preparar as sucessivas diluições necessárias para construir a curva de calibração a diferentes valores de pH	37
Tabela 9 – Média dos valores de PDI associados a cada análise de DLS das nanopartículas resultantes das sucessivas centrifugações dos ensaios 1 e 2 e desvio padrão associado ao cálculo da média do PDI.....	42
Tabela 10 – Valores das variáveis do modelo cinético de ordem zero e de primeira ordem para os ensaios 14, 15, 16, para os três valores de pH estudados.....	93
Tabela 11 – Valores das variáveis do modelo cinético de ordem zero e de primeira ordem para os ensaios 14, 15, 16 para os três valores de pH estudados.....	98
Tabela AIX.1 – Dados utilizados para o cálculo da concentração de ibuprofeno incorporada nas nanopartículas.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

CEIIA – Centro para a Excelência e Inovação da Indústria Automóvel

CEMUP – Centro de Materiais da Universidade do Porto

CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes

CITEVE – Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz

DTGA – Diferencial da Curva de Análise Termogravimétrica

EDS – Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

ELS – Dispersão Eletroforética de Luz

FTIR – Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

IR – Radiação Infravermelha

NSAID – Anti-Inflamatório Não Esteróide

PAA – Poli(Ácido Acrílico)

PAAm – Poli(Acrilamida)

PDEAEMA – Poli(Dietilaminoetil Metacrilato)

PDMAEMA – Poli(N,N – Dimetilaminoetil Metacrilato)

PDI – Índice de Polidispersão

PEI – Poli(Etilenimina)

PLL – Poli(L-lisina)

PMAA – Poli(Ácido Metacrilato)

SEM – Microscopia Eletrónica de Varrimento

TGA – Análise Termogravimétrica

NOMENCLATURA

A – Absorvância

b – Ordenada na origem

d – Diâmetro médio

[Ibu] – Concentração de Ibuprofeno

k – Constante cinética de primeira ordem

k_0 – Constante cinética de ordem zero

m – massa de nanopartículas

ρ – Variação da massa da amostra em função da temperatura

q – quantidade cumulativa de ibuprofeno libertado

% T – Transmitância

t – Tempo

T – Temperatura

ZP – Potencial zeta

λ – Comprimento de onda

$\bar{\nu}$ – Número de Onda

1. ENQUADRAMENTO

Atualmente, o crescente desenvolvimento tecnológico possibilita à indústria e investigadores encontrar soluções para os problemas mais simples e corriqueiros do dia-a-dia do ser humano, nomeadamente, procurar o conforto da pessoa aquando da necessidade de tratamentos e cuidados de saúde. Nesse âmbito, os efeitos secundários, as flutuações da concentração de um determinado fármaco dentro do seu intervalo terapêutico e a toma de medicamentos de acordo com padrões estabelecidos e desenquadrados das necessidades individuais de cada pessoa correspondem aos maiores problemas com que estas têm de se confrontar regularmente. O desenvolvimento de aplicações e sistemas de libertação, que permitam solucionar estas problemáticas, apresenta-se como uma área de enorme interesse e alvo de pesquisa da comunidade científica atual.

A libertação controlada e eficaz de um fármaco permite eliminar todas as desvantagens associadas à toma de medicamentos da forma convencional, bem como adaptar a terapêutica às reais necessidades de cada indivíduo. O estudo de polímeros que, de acordo com as suas características, conseguem responder a estímulos externos através da modificação das suas propriedades, e assim libertar compostos adsorvidos na sua estrutura, apresenta-se como uma ideia aliciante, uma vez que o corpo humano de cada indivíduo é único, emitindo sinais específicos que funcionam como estímulos para esse tipo de polímeros. Assim, é possível através de um polímero-responsivo responder a necessidades específicas do organismo de cada indivíduo, sem que seja necessária uma monitorização constante.

No grupo de estímulos mais facilmente monitorizados e representativos no corpo humano encontra-se o pH, uma vez que as variações deste parâmetro são muitas vezes sintoma de doenças específicas, para além deste parâmetro variar significativamente no nosso organismo.

Apesar dos inúmeros estudos publicados e aplicações destes sistemas de polímeros pH-responsivos, o enorme interesse no desenvolvimento de sistemas de libertação constituídos por polímeros deste tipo não desvaneceu, dado que ainda existe uma indústria interessada em apostar no desenvolvimento de novos polímeros, surgindo por isso a necessidade de aprofundar o desenvolvimento e a formulação destes materiais.

1.1 O CeNTI

O Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes (CeNTI) foi a empresa onde o estágio, no âmbito da presente dissertação de mestrado, foi desenvolvido. Esta empresa encontra-se sediada em Vila Nova de Famalicão e a sua principal função é o desenvolvimento de novos materiais funcionais e inteligentes destinados a três grandes áreas, nomeadamente automóvel e aeronáutica, saúde, proteção e bem-estar, e arquitetura e construção.

O CeNTI foi fundado em 2006 pelo Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal (CITEVE), pelas Universidades do Minho, Porto e Aveiro e pelo Centro Tecnológico da Indústria do Couro, tendo, mais recentemente, também o Centro para a Excelência e Inovação da Indústria Automóvel (CEIIA) como associado (CeNTI, n.d.).

O CeNTI providencia investigação e desenvolvimento (I&D) nas mais variadas áreas de conhecimento, das engenharias (materiais, química, eletrónica e biológica) às ciências (química e física), sendo por isso composto por uma equipa multidisciplinar. Algumas competências do CeNTI baseiam-se no desenvolvimento de fibras multicomponentes, revestimentos multifuncionais, materiais e dispositivos inteligentes e sistemas eletrónicos orgânicos e incorporados (CeNTI, n.d.).

1.2 Objetivos

O principal objetivo da presente dissertação foi o desenvolvimento de um sistema de libertação controlada capaz de responder a variações de pH no corpo humano. Para tal, foi realizada uma pesquisa bibliográfica aprofundada sobre o tema; foi desenvolvido um sistema de libertação controlada na forma de nanopartículas; após a obtenção das nanopartículas, essas foram caracterizadas nos aspetos mais relevantes para utilização como sistema libertação; e por fim foi monitorizada e estudada a libertação de um fármaco modelo, previamente adsorvido nas nanopartículas, de acordo com o pH do meio.

1.3 Organização da Dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos principais, sendo que cada um deles se encontra organizado em subcapítulos.

Neste primeiro capítulo, denominado de “Enquadramento”, encontra-se o enquadramento de todo o trabalho desenvolvido, incluindo uma descrição do CeNTI e principais áreas de atuação da

empresa, os objetivos principais do trabalho desenvolvido e a organização da dissertação com os objetivos e enquadramento de cada capítulo.

No segundo capítulo, com o nome de “Introdução Teórica”, apresenta-se todo o enquadramento teórico subjacente ao tema da presente dissertação, permitindo assim compreender e contextualizar todo o trabalho desenvolvido, assim como, demonstrar a pertinência do presente estudo. Nesse sentido, este capítulo inclui os conceitos e definições subjacentes à temática dos sistemas de libertação controlada e métodos e/ou técnicas de caracterização de polímeros responsivos.

No capítulo três, designado de “Metodologia”, surgem os materiais, metodologias e técnicas aplicadas ao longo do trabalho experimental, incluindo a denominação e especificações de todos os equipamentos utilizados.

No quarto capítulo, denominado “Resultados e Discussão” são apresentados, como o próprio nome indica, os resultados e a discussão dos mesmos. Neste capítulo encontram-se os resultados da otimização do processo síntese de nanopartículas, da caracterização dos polímeros e ibuprofeno puros utilizados e das nanopartículas sintetizadas, e ainda os resultados dos estudos de libertação do ibuprofeno em meios com diferentes valores de pH.

No quinto capítulo, “Conclusões e Recomendações”, surgem as principais conclusões do trabalho desenvolvido, bem como recomendações para futuros trabalhos a desenvolver nesta área, nomeadamente explorar a possibilidade de incorporar outros compostos e desenvolver a aplicação real do sistema de libertação controlada desenvolvido.

2. INTRODUÇÃO TEÓRICA

O crescente desenvolvimento de novas terapias e fármacos tem levado a uma consequente procura por novas técnicas e métodos de libertação dos mesmos no corpo humano (Bawa et al., 2009). Os mecanismos convencionais de administração de fármacos têm como principal desvantagem o facto da sua administração promover a flutuação da concentração do fármaco no organismo, o que se traduz em picos de concentração, que em determinadas condições podem exceder a dose terapêutica aconselhada.

Idealmente, a concentração do fármaco no corpo humano deve manter-se constante (e na gama definida para se observar um efeito terapêutico) pelo período de tempo em que a sua ação é requerida, por forma a majorar o seu efeito, como se pode constatar pela Figura 1 (Coelho et al., 2010).

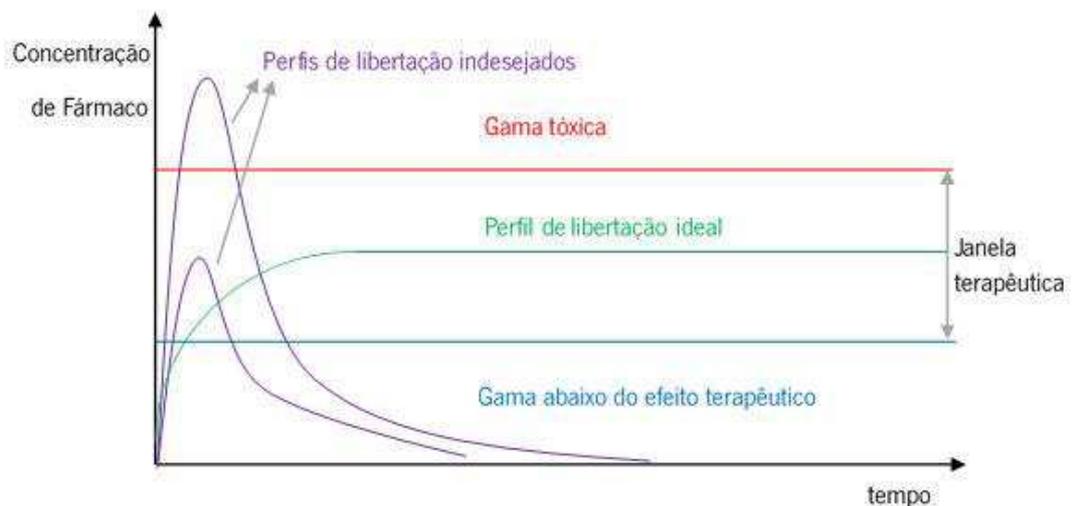


Figura 1 – Concentração de fármaco ao longo do tempo de acordo com os diferentes métodos de administração usados. Retirado de Fitzpatrick et al., 2012.

No caso particular da toma de uma única dose do fármaco atinge-se um pico de concentração superior à dose terapêutica, a qual decresce ao longo do tempo até valores abaixo do limite inferior da dose terapêutica recomendada antes do período de tempo em que a sua ação é pretendida. A toma de doses repetidas constitui um método de administração que garante a manutenção da concentração do fármaco na gama terapêutica, ainda que implique a sua flutuação.

Com o intuito de ultrapassar as limitações dos mecanismos convencionais de administração de fármacos, têm vindo a ser desenvolvidos sistemas de libertação de fármacos que permitem controlar parâmetros essenciais para a eficácia do tratamento em causa, nomeadamente, a cinética e o alvo de libertação do fármaco (Cabane et al., 2012; Wilczewska et al., 2012).

Na Tabela 1 encontram-se sumariadas as vantagens e desvantagens dos sistemas de libertação controlada.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos sistemas de libertação controlada. Adaptado de Bawa et al., 2009; Cabane et al., 2012; Coelho et al., 2010; Duarte et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2012; Torchilin, 2010; Wilczewska et al., 2012

Vantagens	Desvantagens
Manutenção da dosagem terapêutica adequada dentro do corpo humano com apenas uma toma do fármaco	Possível toxicidade dos materiais utilizados
Libertação específica e localizada	Degradação perigosa dos produtos
Aumento da aceitação por parte dos pacientes tendo em conta a redução de efeitos secundários	Possível necessidade de intervenção cirúrgica na aplicação ou remoção do sistema de libertação
Prolongamento da duração do efeito ativo e da biodisponibilidade	Desconforto dos pacientes
Melhor utilização do fármaco e promoção da diminuição das flutuações de concentração do fármaco no plasma	Elevados custos do produto final
Preservação de fármacos que fácil e rapidamente são destruídos pelo organismo quando administrados por outras vias	-

A libertação controlada de fármacos e a manutenção de uma concentração constante dentro do intervalo terapêutico desejado pode ser conseguida, de entre outras formas, utilizando polímeros responsivos (Bawa et al., 2009).

2.1 Polímeros Responsivos

Os polímeros responsivos ou polímeros “inteligentes” são materiais capazes de sofrer alterações significativas nas suas propriedades como resposta a um estímulo, representado por uma pequena variação nas condições do meio envolvente (Cabane et al., 2012). Assim, o modo de atuação dos polímeros responsivos como sistema de libertação controlada assemelha-se, em grande parte, ao processo natural fisiológico perante um estado de doença, no qual o fármaco é libertado quando exposto a uma necessidade ou alteração fisiológica (Bawa et al., 2009). O objetivo principal destes

materiais é a libertação adequada de compostos ativos num alvo desejado sem que os mesmos se degradem no processo de libertação (Coelho et al., 2010).

Os estímulos que podem originar alterações no polímero podem ser classificados de acordo com a sua natureza, em estímulos de origem física, química ou biológica. Os estímulos de origem física incluem a temperatura, a força iónica, radiação eletromagnética (luz UV e visível), ultrassons, campo elétrico, campo magnético, tensão (Kuckling et al., 2012) e solventes (Hoffman, 2013). Os estímulos de origem química compreendem o pH, iões específicos e agentes químicos e estímulos de origem biológica relacionam-se com substratos enzimáticos, recetores de reconhecimento de moléculas e outros agentes biomédicos (Kuckling et al., 2012).

As respostas do polímero responsivo que podem advir de um estímulo do meio envolvente podem envolver modificações químicas, na hidrofobicidade superficial, na permeabilidade (Fitzpatrick et al., 2012), nas propriedades óticas, mecânicas e elétricas (Coelho et al., 2010), alteração da forma ou cor do polímero (Hoogenboom, 2014) e separação de fases (Coelho et al., 2010). Um polímero responsivo pode responder a mais de que um estímulo, muitas vezes simultaneamente (Kuckling et al., 2012).

Pode produzir-se um sistema de libertação controlada utilizando polímeros naturais ou sintéticos, sendo que estes devem apresentar propriedades específicas de forma a poderem ser aplicados como sistema de libertação controlada, de entre as quais se destaca a sua biodegradabilidade. A biodegradabilidade permite eliminar a necessidade de efetuar a sua remoção ou manipulação posterior, além de assegurar que os produtos da degradação do material não são tóxicos e podem facilmente ser metabolizados e excretados pelo corpo humano (Coelho et al., 2010).

Dentro dos polímeros naturais podem destacar-se as proteínas, como o colagénio, a gelatina e a albumina, e os polissacarídeos como o quitosano (sob a forma de micro e nanopartículas), o ácido alginico e o dextrano (Coelho et al., 2010). Efetivamente, apesar das vantagens dos polímeros naturais no que respeita a sua elevada biodegradabilidade e biocompatibilidade (Reyes-Ortega, 2008), estes apresentam limitações como a antigenicidade, o risco de infeção viral e a variabilidade das suas propriedades em lotes de produção distintos. Os polímeros sintéticos surgem como uma forma de reduzir essas limitações, sendo obtidos através da modificação de propriedades específicas a nível químico, interfacial, mecânico e biológico das moléculas (Coelho et al., 2010).

Quando são utilizados polímeros responsivos, estes podem ser divididos em 3 categorias distintas de acordo com as suas propriedades físicas, estes podem encontrar-se em cadeias lineares livres

em solução (Figura 2.a), na forma de géis reversíveis reticulados (por exemplo os hidrogéis) (Figura 2.b) e na forma de cadeias adsorvidas ou enxertadas numa superfície (superfícies e membranas inteligentes) (Figura 2.c) (Panambur et al., n.d.).

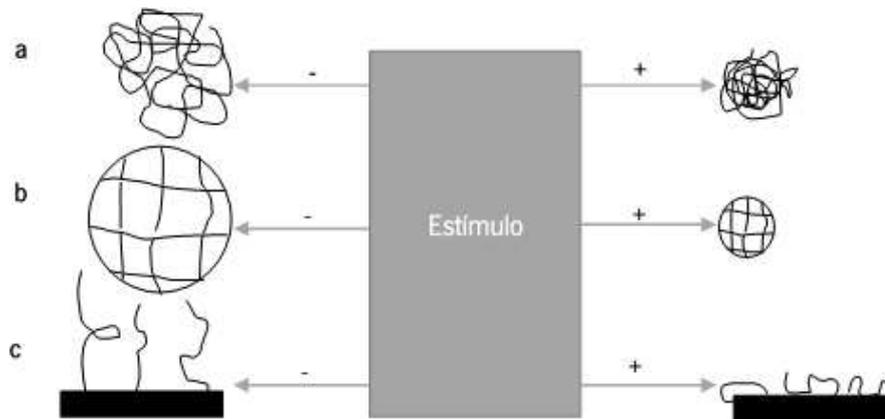


Figura 2 – Categorias dos polímeros responsivos de acordo com as propriedades físicas dos mesmos. Retirado de Panambur et al., n.d.

Dentro da primeira categoria encontram-se os polímeros que respondem colapsando reversivelmente. Com o aumento da hidrofobicidade, o polímero solúvel precipita na solução e forma uma fase insolúvel devido a uma redução das ligações de hidrogénio formadas entre o polímero e a água, ou devido à neutralização das cargas elétricas presentes na rede polimérica. (Bawa et al., 2009).

Na segunda categoria compreendem-se os hidrogéis que intumescem reversivelmente em meio aquoso e respondem rapidamente a pequenas alterações no meio (Bawa et al., 2009). Pela exposição a um estímulo, a modificação conformacional da cadeia irá resultar numa alteração das propriedades macroscópicas da rede polimérica (elasticidade, comportamento no intumescimento e turbidez) (Kuckling et al., 2012).

Nas superfícies e membranas inteligentes, a separação de fases ocorre apenas quando a macromolécula sofre uma modificação conformacional precisa, acompanhada de um aumento significativo da hidrofobicidade. As cadeias adsorvidas ou enxertadas intumescem ou colapsam reversivelmente na superfície quando parâmetros externos específicos são alterados, tais como pH, temperatura, etc. (Bawa et al., 2009).

Os polímeros maioritariamente utilizados para sistemas de libertação controlada são os hidrogéis, que se enquadram na segunda categoria enunciada anteriormente, uma vez que estes exibem uma resposta particularmente interessante a estímulos intrinsecamente relacionados com a fisiologia humana, nomeadamente a temperatura corporal e o pH (Bajpai et al., 2008).

Na Tabela 2 encontram-se descritas as modificações ocorridas nos diferentes tipos de polímeros, como resultado de uma alteração no meio envolvente (estímulo), que estão na base dos respetivos mecanismos de libertação. Tais modificações podem ser graduais e contínuas, ou repentinas e descontínuas, e de acordo com a natureza do sistema (Bawa et al., 2009).

Tabela 2 – Efeitos dos vários estímulos externos na libertação de um fármaco a partir de um hidrogel. Retirado de Bawa et al., 2009

Estímulo	Tipo de Hidrogel	Mecanismo de Libertação
pH	Ácido ou básico	A alteração do pH causa o intumescimento do hidrogel.
Força Iónica	Iónico	A alteração da força iónica causa uma alteração na concentração de iões dentro do gel provocando o intumescimento do mesmo.
Espécies Químicas	Grupos aceitadores de eletrões	Compostos dadores de eletrões provocam a transferência de carga provocando o intumescimento do hidrogel.
Substrato Enzimático	Enzimas imobilizadas	Enzimas atuam na conversão enzimática do substrato e o produto resultante provoca o intumescimento do hidrogel.
Magnético	Partículas magnéticas em microesferas	A aplicação de um campo magnético causa uma alteração nos poros do gel provocando o intumescimento do hidrogel.
Temperatura	Termo-responsivo	A alteração da temperatura causa uma modificação nas interações polímero-polímero e água-polímero provocando o intumescimento do hidrogel.
Elétrico	Polieletrólito	A aplicação de um campo elétrico provoca um aumento de cargas na membrana provocando o intumescimento do hidrogel.
Ultrassom	Etileno – Álcool vinílico	A irradiação de ultrassom causa o aumento da temperatura.

Entre todos os estímulos apresentados destacam-se o pH e a temperatura como sendo os mais importantes (Schmaljohann, 2006), por serem aqueles sobre os quais existem mais trabalhos e estudos elaborados. O principal motivo para tal, é o facto da temperatura e o pH no corpo humano

serem os parâmetros mais suscetíveis a alterações em caso de doença. A alteração destes parâmetros desencadeia rapidamente uma resposta dos polímeros, que se traduz na libertação do fármaco (Schmaljohann, 2006).

2.1.1 Polímeros pH-responsivos

No corpo humano ocorrem variações de pH evidentes, desde o pH do sangue que ronda os 7,5, ao pH do estômago que varia entre 1,0 e 3,0 (Almeida et al., 2012), enquanto o pH do duodeno apresenta valores mais alcalinos (pH 6,6 - 7,5) (Gao et al., 2010), passando pelo pH da pele que ronda o valor de 5,4 e 5,6 (Gethin, 2007) e o pH do suor com valores entre 4,5 e 7,5, variando de indivíduo para indivíduo (Mohan, 2006).

Diferentes órgãos, tecidos e compartimentos celulares em estados patológicos distintos são caracterizados pelo seu pH ou gradiente do mesmo (Gao et al., 2010). Estas condições realçam a manifesta importância de utilização dos polímeros pH-responsivos como sistemas de libertação controlada na área farmacêutica (Almeida et al., 2012).

No que diz respeito aos polímeros pH-responsivos, estes podem ser identificados como polieletrólitos, uma macromolécula que se pode dissociar doando iões quando dissolvido em água ou outros solventes, constituídos por grupos ácidos ou básicos que aceitam ou libertam prótons como resposta a uma alteração de pH no meio envolvente (Reyes-Ortega, 2008). Os grupos ácidos ou básicos dos polieletrólitos são passíveis de ser ionizáveis aquando da variação de pH, promovendo uma modificação conformacional do polímero e uma alteração no comportamento do intumescimento dos polímeros quando os grupos ionizáveis estão ligados à estrutura polimérica (Schmaljohann, 2006).

O intumescimento dos polímeros pH-responsivos depende do grau de ionização dos mesmos como se pode constatar pela Figura 3, a exposição a um meio aquoso com pH e força iónica adequada provoca a ionização de determinados grupos e o desenvolvimento de cargas na rede polimérica, originando forças repulsivas eletrostáticas entre as cargas da cadeia polimérica responsáveis pelo intumescimento ou não do polímero, que controla a libertação do fármaco (Bawa et al., 2009).

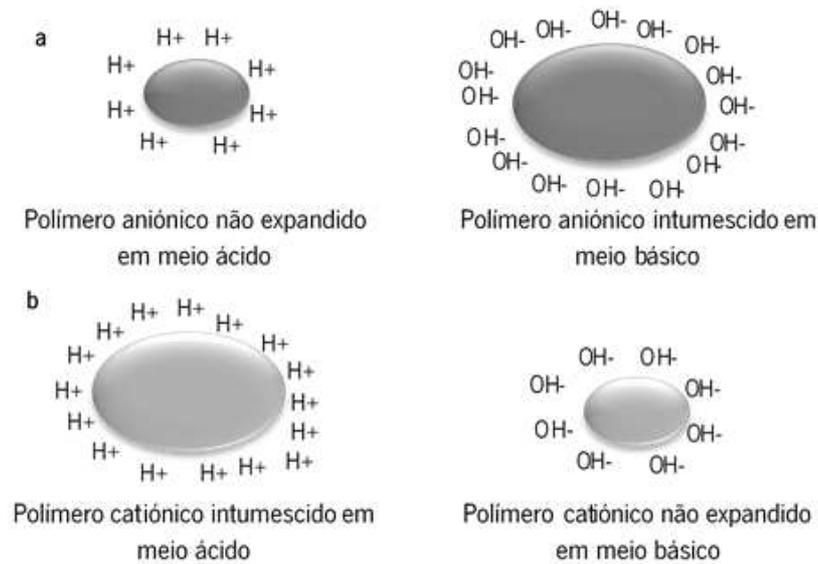


Figura 3 – O intumescimento de (a) polímeros pH-responsivos aniônicos e (b) polímeros pH-responsivos catiónicos. Retirado de Bawa et al., 2009.

A repulsão entre as cargas na cadeia polimérica causa a expansão do sistema quando o mesmo é ionizado num solvente adequado. Caso o solvente previna a ionização do polieletrólito, a cadeia dissolvida permanece compacta (Reyes-Ortega, 2008).

O ponto de transição no equilíbrio de protonação/desprotonação é o valor pKa do polímero, caso o pH se aproxime deste valor, o grau de ionização irá modificar-se drasticamente (Kuckling et al., 2012). O valor de pKa do polímero depende diretamente da composição do mesmo e do seu peso molecular (Almeida et al., 2012).

Os polímeros poliácidos não intumescem a pH baixos, uma vez que os grupos ácidos vão ser protonados e não ionizados, com o aumento do pH o polímero negativamente carregado vai intumescer. O comportamento oposto é verificado em polímeros polibásicos, uma vez que a ionização dos grupos aumenta com a diminuição do pH. Alguns exemplos de polímeros pH-responsivos com grupos aniônicos são os poli(ácidos carboxílicos) e polisulfonamidas, estes apresentam um pKa que varia entre 3,0 e 11,0, e por isso a pH inferiores os grupos são protonados e as interações hidrofóbicas são dominantes, conduzindo à diminuição do volume do polímero. Para valores superiores de pH, os grupos carboxílicos dissociam-se em iões carboxilato, resultando numa elevada densidade de cargas no polímero, provocando o intumescimento do mesmo (Reyes-Ortega, 2008).

Por outro lado, os polímeros pH-responsivos com grupos catiónicos podem ser por exemplo os poli(N,N-dialquilaminoetil metacrilatos), a poli(L-lisina) (PLL), a poli(etilenimina) (PEI) e o quitosano. Quando na presença de um meio com pH baixo, os grupos polibásicos são protonados,

aumentando as repulsões internas entre as cargas dos grupos, o que origina uma expansão das dimensões globais do polímero contendo esses mesmos grupos. Para valores de pH mais elevados, os grupos polibásicos tornam-se menos ionizáveis, ocorre uma diminuição das repulsões entre cargas e as interações polímero-polímero aumentam, conduzindo à diminuição global das dimensões do polímero (Reyes-Ortega, 2008).

Os polímeros que possuem grupos carboxílicos são os polímeros pH-responsivos mais utilizados, o pKa desses grupos encontra-se entre 5,0 e 6,0, sendo que para valores superiores de pH, esses grupos são desprotonados formando polieletrólitos, enquanto para valores de pH inferiores os grupos carboxílicos, aceitam prótons resultando numa molécula descarregada e hidrofóbica (Kuckling et al., 2012). O poli(ácido acrílico) (PAA) possui uma constante de dissociação de 4,25. Acima deste pH os grupos carboxílicos tornam-se ionizados (Figura 4.a), originando a repulsão eletrostática entre as cadeias que podem associar-se com a água e causar o intumescimento. Por outro lado, tem-se o polieletrólito catiónico poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) que sofre ionização a valores de pH inferiores (Figura 4.b) (Reyes-Ortega, 2008).

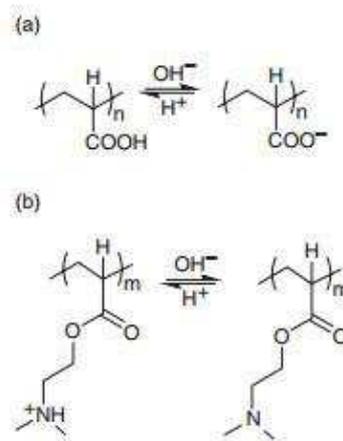


Figura 4 – Estruturas dos polieletrólitos (a) poli(ácido acrílico) e (b) poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato). Retirado de Reyes-Ortega, 2008.

Os polímeros pH-responsivos podem ser modificados pela manipulação de propriedades físicas tais como a conformação, configuração, solubilidade e volume da cadeia, por forma a ajustar a gama de valores de pH.

Pode ainda referir-se a existência de polímeros naturais que apresentam sensibilidade ao pH, sendo eles a albumina, a gelatina e o quitosano. O quitosano é um polissacarídeo catiónico derivado da quitina, biocompatível e reabsorvível (Almeida et al., 2012).

Os polímeros pH-responsivos mais utilizados são o poli(acrilamida) (PAAm), o poli(ácido acrílico) (PAA), o poli(ácido metacrílico) (PMAA), o poli(dietilaminoetil metacrilato) (PDEAEMA) e o poli(dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) (Bawa et al., 2009).

a. Eudragit® L100-55

O polímero Eudragit® L100-55 é o nome comercial do copolímero aniônico de ácido metacrílico-etil acrilato (1:1) cuja massa molecular relativa ronda os 320 000 g/mol e cuja estrutura química é apresentada na Figura 5 (Evonik Industries, 2012; Parikh, Gupta, Meena, & Serajuddin, 2014). Este polímero apresenta-se sob a forma de um pó branco com um odor característico e é praticamente insolúvel em água, assim como, em acetato de etilo, diclorometano e éter de petróleo, sendo apenas solúvel em metanol, etanol, álcool isopropílico, acetona e 1N hidróxido de sódio (Evonik Industries, 2012; Pecosky & Robinson, 1991; Thakral, Thakral, & Majumdar, 2013). O Eudragit® L100-55 em pó é dissolvido em solventes orgânicos recorrendo à agitação e à adição de um plastificante apropriado, originando uma solução limpa a opaca (Pecosky & Robinson, 1991). A sua densidade varia entre 0,821 g/cm³ e 0,841 g/cm³ enquanto a sua temperatura vítrea é de aproximadamente 110 °C (Thakral et al., 2013).

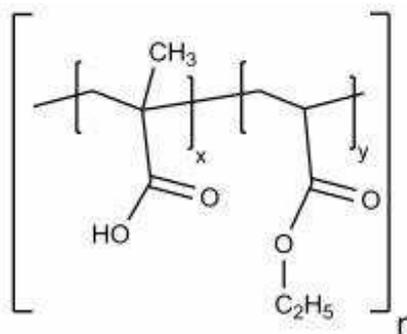


Figura 5 – Estrutura química do Eudragit® L100-55. Retirado de Evonik Industries, 2012.

O Eudragit® L100-55 caracteriza-se por ter uma solubilidade dependente do pH e por isso, o polímero é solúvel em meio aquoso a partir de pH 5,5 devido à ionização dos grupos carboxílicos (Sauer & McGinity, 2009). A dissolução do polímero depende diretamente do teor em grupos carboxílicos (Kiliçarslan & Baykara, 2004) mas também depende do pKa do componente ácido do polímero e da força iónica do meio de dissolução, podendo-se acelerar a dissolução com a presença de iões divalentes e trivalentes de fosfato e de citrato no meio (Sauer, 2008).

Trata-se de um polímero vastamente reconhecido na área farmacêutica, tendo sido aplicado extensivamente em formulações para dosagem e libertação controlada de fármacos, nomeadamente, como revestimentos de cápsulas, matrizes de cápsulas, microesferas e

nanopartículas (Shen et al., 2011). A erosão é o mecanismo principal da libertação do fármaco disperso no polímero (Al-Taani & Tashtoush, 2003).

b. Eudragit® E PO

O polímero Eudragit® E PO é a designação comercial atribuída ao copolímero catiónico composto por dimetilaminoetil metacrilato e ésteres metacrílicos neutros num rácio de 1:1 (Sauer & McGinity, 2009; Sauer, 2008). A massa molecular relativa deste polímero é de 47 000 g/mol e trata-se da substância sólida obtida a partir do Eudragit® E 100, possuindo um odor característico da presença de aminas (Evonik Industries, 2014; Parikh et al., 2014). Na Figura 6 é possível observar a estrutura química deste polímero.

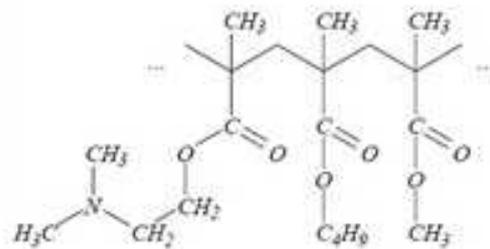


Figura 6 – Estrutura química do polímero de Eudragit® E PO. Retirado de Evonik Industries, 2014.

Em termos de solubilidade, é um polímero praticamente insolúvel em éter de petróleo e água, originando desde soluções lípidas a soluções ligeiramente opacas, quando dissolvido em metanol, etanol, álcool isopropílico, acetona, acetato de etilo, cloreto de metileno e 1N de ácido clorídrico (Evonik Industries, 2014). Tratando-se de um polímero pH-dependente, sofre modificações estruturais de acordo com o pH do meio. Assim, apresenta-se solúvel até pH 5,0 e acima deste valor de pH absorve água e intumescce devido à presença de grupos amino hidrofílicos que causam a desintegração da estrutura (Sauer & McGinity, 2009).

O polímero Eudragit® E PO possui uma densidade que varia entre os 0,811 e 0,821 g/cm³ e uma temperatura vítrea de aproximadamente 48 °C (Thakral et al., 2013), tendo sido vastamente aplicado em revestimento de fármacos em estado sólido para mascarar sabores e odores desagradáveis e proteger o fármaco da humidade (Liu et al., 2012; Quinteros et al., 2012), uma vez que não é tóxico e é facilmente absorvido oralmente. Para além destas aplicações, tem sido utilizado com grande frequência na melhoria da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (Tang et al., 2011).

2.1.2 Nanotransportadores como Sistemas de Liberação Controlada

Nas últimas décadas têm sido exercidos vários esforços no sentido de desenvolver e sintetizar sistemas de liberação controlada à escala micro e nanométrica (Santos et al., 2013). São sistemas preparados para aumentar a biodisponibilidade ou estabilidade do composto ativo e para libertar o fármaco em locais específicos. Adicionalmente, são ainda atribuídas, a estes sistemas de partículas, todas as vantagens associadas a um sistema de liberação controlada (Kalimuthu & Yadav, 2009), sendo que essas vantagens advêm essencialmente do tamanho associado às partículas e da utilização de materiais biodegradáveis na sua síntese (Singh & Lillard, 2009).

Os nanotransportadores (tamanho $<1 \mu\text{m}$) possuem vantagens sobre os microtransportadores (tamanho $> 1 \mu\text{m}$) como sistema de liberação controlada, uma vez que os capilares mais pequenos do corpo humano possuem um diâmetro entre 5 - 6 μm , e por isso para facilitar a penetração das partículas é preferível utilizar nanopartículas. Para além disso, os materiais utilizados na síntese deste tipo de partículas permitem que a liberação seja mais controlada e prolongada em alvos intracelulares (Singh & Lillard, 2009).

Os nanotransportadores são materiais e dispositivos de escala nanométrica sintetizados a partir de materiais biodegradáveis, como polímeros naturais ou sintéticos (Rawat et al., 2006). As propriedades físico-químicas, como o tamanho, o elevado rácio entre área superficial e a massa ou o volume e a elevada reatividade, associadas aos nanotransportadores, torna-os ideais como veículo de liberação controlada de fármacos (Tkacheva et al., 2014). Na Tabela 3 apresentam-se as vantagens, assim como limitações associadas a este tipo de sistemas de liberação.

Tabela 3 – Vantagens e limitações dos nanotransportadores como sistema de liberação controlada. Retirado de Danhier et al., 2010; National Cancer Institute, 2015; Peer et al., 2007; Rawat et al., 2006; Sagnella & Drummond, 2012

Vantagens	Limitações
Proteger o fármaco da degradação precoce	Suscetíveis à agregação contribuindo para dificuldades no manuseamento, armazenamento e administração
Prevenir a interação prematura do fármaco com o meio	Inadequado para fármacos pouco potentes
Melhorar a penetração intracelular	-
Controlo da cinética e do perfil de distribuição do fármaco nos tecidos	-

Tabela 3 – Vantagens e limitações dos nanotransportadores como sistema de libertação controlada. Retirado de Danhier et al., 2010; National Cancer Institute, 2015; Peer et al., 2007; Rawat et al., 2006; Sagnella & Drummond, 2012 (continuação)

Vantagens	Limitações
Aumentar a absorção de fármacos em tecidos específicos (por exemplo em tecidos tumorais), prevenindo assim a interação com células saudáveis e reduzindo os efeitos secundários	Tendo em conta o seu tamanho, o nanotransportador pode penetrar meios indesejados e provocar consequências nocivas (por exemplo, causar danos genéticos e mutações se penetrar o invólucro nuclear das células)
Com a modificação das propriedades superficiais dos nanotransportadores é possível aumentar a especificidade de libertação do fármaco	-
Melhorar a solubilidade do fármaco permitindo a administração intravenosa	-

Os nanotransportadores permitem direcionar o fármaco para um alvo específico (Wilczewska et al., 2012). O princípio subjacente ao mecanismo de direcionamento do fármaco dos nanotransportadores assenta no facto dos tecidos que apresentam áreas patológicas, como tumores, enfartes e inflamações, possuírem uma vascularização mais permeável, ou seja, um maior espaçamento entre as células endoteliais que constituem a parede dos vasos sanguíneos (Bamrungsap et al., 2012; Torchilin, 2010). Assim, os nanotransportadores são incapazes de atravessar o endotélio normal, mas conseguem atravessar tecidos doentes.

Dentro dos nanotransportadores incluem-se vários sistemas de libertação, desde nanopartículas, que incluem as nanocápsulas e as nanoesferas, de diferentes origens (poliméricas, sólido-lipídicas, metálicas, de sílica ou magnéticas), complexos lipídicos (lipossomas e micelas), micelas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbono, polímeros conjugados, entre outros (Danhier et al., 2010; Peer et al., 2007; Rawat et al., 2006; Sagnella & Drummond, 2012).

As nanopartículas possuem dimensões entre 10 e 1000 nm (Quintanar-Guerrero et al., 1998; Santos et al., 2013) e incluem as nanoesferas e as nanocápsulas, sendo que a distinção entre ambas assenta na morfologia e arquitetura da partícula (Quintanar-Guerrero et al., 1998; Saha et al., 2013).

As esferas consistem em matrizes poliméricas, enquanto as cápsulas caracterizam-se por possuírem um núcleo líquido lipofílico ou hidrofílico, rodeado por uma parede polimérica estabilizado por surfactantes na interface partícula/água (Santos et al., 2013; Schaffazick et al., 2006). As nanocápsulas destacam-se na aplicação como veículo na libertação de fármacos uma vez que o seu núcleo permite uma maior eficiência na incorporação dos fármacos hidrofóbicos e permitem uma libertação prolongada e adequada (Fiel et al., 2014). Na Figura 7 encontram-se representadas duas formas diferentes de incorporar o fármaco em nanoesferas e nanocápsulas.

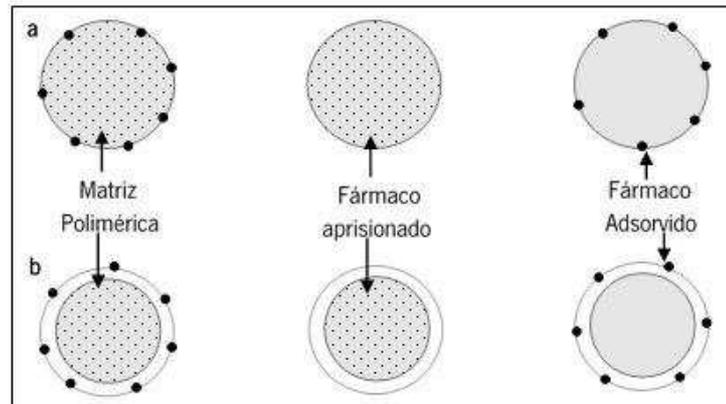


Figura 7 – Diferentes formas de incorporar o fármaco nas (a) nanoesferas e (b) nanocápsulas. Retirado de Nagarwal et al., 2009.

As nanopartículas poliméricas podem ser obtidas a partir de polímeros sintéticos, como poli-ε-caprolactona, poli-acrilamida e poli-acrilato ou então, a partir de polímeros naturais como a albumina, quitosano e gelatina (Wilczewska et al., 2012).

Os métodos de síntese de nanopartículas com fármaco incorporado são variados e incluem evaporação do solvente, emulsificação espontânea ou difusão do solvente, *salting-out* ou emulsificação-difusão, gelificação iónica e dessolvatação, entre outros (Muhaimin, 2013; Nagarwal et al., 2009).

A técnica mais aplicada é a evaporação do solvente que pode distinguir-se em dois métodos, a emulsão simples (óleo em água – o/w) e a emulsão dupla (água em óleo em água – ((o/w)/w) (Rao & Geckeler, 2011). O processo de evaporação do solvente consiste, essencialmente, na adição de uma fase orgânica, contendo o polímero e o fármaco dissolvido, a uma fase aquosa com ou sem surfactantes (sobre agitação bastante intensa), após a qual se recorre à extração do solvente por evaporação sob agitação contínua ou sob pressão reduzida, sendo por fim recuperadas as nanopartículas por liofilização (Muhaimin, 2013; Rao & Geckeler, 2011).

A eficiência desta técnica passa por um conjunto de variáveis como a solubilidade do fármaco, a morfologia interna das nanopartículas, o tipo de solvente, a taxa de difusão, a temperatura, a

composição e viscosidade do polímero e a incorporação do fármaco, sendo que o sucesso da síntese depende diretamente da incorporação bem-sucedida do fármaco, que é melhor caso este seja insolúvel ou fracamente solúvel no meio aquoso (Muhaimin, 2013). Alguns fármacos que cumprem esta especificação incluem anticancerígenos, agentes narcóticos, anestésicos locais e agentes de controlo de fertilidade (Muhaimin, 2013).

As terapias com utilização de nanopartículas podem ser melhoradas com o emprego de nanopartículas responsivas capazes de produzir modificações físico-químicas, quando expostos a estímulos externos, que resultam na libertação do fármaco. Como foi referido, os estímulos podem ser vários, sendo um dos principais o pH (Gao et al., 2010).

2.2 Caracterização Física e Química de Polímeros Responsivos

As técnicas analíticas, como microscopia, espectroscopia, métodos químicos e métodos físicos, são essenciais para obter diferentes tipos de informações sobre a amostra em análise, desde a composição química e nível de impurezas, à estrutura física. Tal informação é importante tanto para investigadores como para industriais, pois possibilita compreender de forma mais intrínseca a natureza dos materiais, permitindo verificar teorias e produzir melhores produtos (Ebnesajjad, 2014).

2.2.1 Análise Termogravimétrica – TGA

A análise termogravimétrica é uma técnica analítica que permite monitorizar a alteração da massa de uma amostra, que é aquecida, arrefecida ou mantida a temperatura constante, a uma velocidade constante, sob uma atmosfera reativa (ar, oxigénio, hidrogénio ou dióxido de carbono) ou inerte (azoto, hélio ou árgon), em função do tempo ou temperatura (Kim, 2006; Vyazovkin, 2002).

Com esta técnica é possível determinar a estabilidade térmica de materiais e analisar a humidade e componentes voláteis da amostra (Ebnesajjad, 2014). Representa uma ferramenta muito útil na avaliação do comportamento de combustão ou pirólise da amostra, sendo que através do gráfico de perda de massa ou perda de massa relativa em função do tempo ou temperatura é possível identificar o número e sequência de reações que ocorrem durante o processo de pirólise, e ainda determinar parâmetros cinéticos como a ordem e energia de ativação dessas mesmas reações (Broido, 1969; Kim, 2006).

O TGA é uma técnica quantitativa bastante precisa, mas em termos qualitativos fornece informações muito limitadas, contudo, conhecendo o mecanismo de decomposição do material em análise ou a composição desse material, é possível associar as perdas de massa observadas com os produtos específicos da decomposição, por exemplo, a perdas de massa em torno do ponto de ebulição é possível associar a presença de solvente residual ou humidade (Vyazovkin, 2002).

As perdas de massa estão associadas à degradação e/ou decomposição, vaporização de líquidos, sublimação, redução de óxidos metálicos a metais e dessorção de gases, enquanto o ganho de massa pode ocorrer devido à adsorção, absorção, reações sólido-gás e oxidação (Földvári, 2011; Vyazovkin, 2002).

O resultado de um ensaio de TGA é uma curva termogravimétrica da massa relativa ao longo do ensaio em função da temperatura, similar à representada na Figura 8 (PerkinElmer, 2010). Para analisar com maior detalhe as perdas de massa observadas, constrói-se a forma diferencial da curva de TGA (DTGA), obtendo-se uma curva que representa a velocidade de perda de massa e cujos picos correspondem aos degraus de perda ou ganho de massa da primeira curva (pontos de inflexão) e indicam a temperatura específica de cada uma dessas perdas ou ganhos (Földvári, 2011; Vyazovkin, 2002).

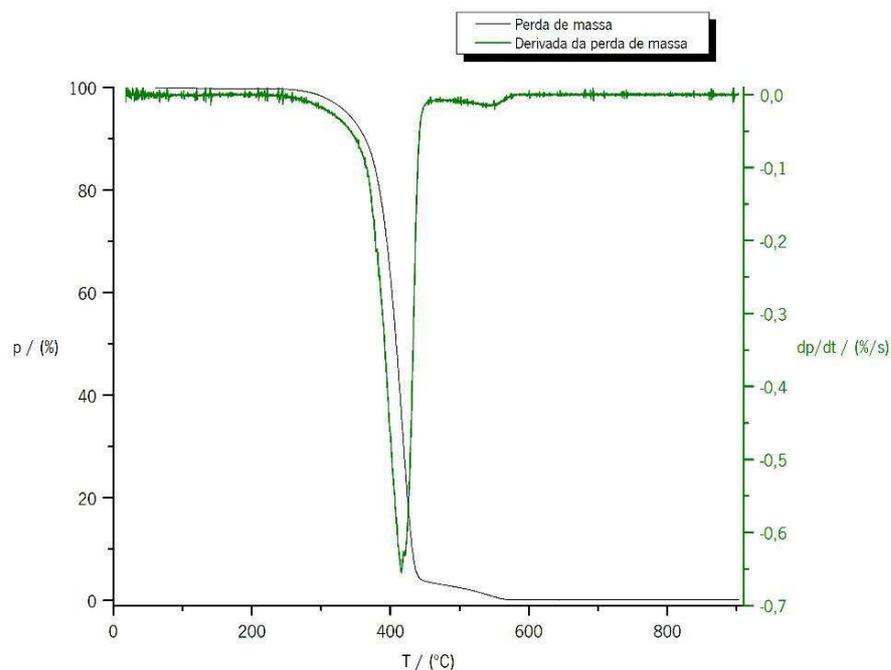


Figura 8 – Exemplo de uma curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a verde), com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T). Adaptado de PerkinElmer, 2010.

Na maioria dos ensaios de TGA é utilizada uma atmosfera inerte para que a amostra apenas reaja com a temperatura durante a decomposição, ou seja, ocorre pirólise, uma vez que a decomposição química durante o aquecimento é realizada na ausência de oxigênio ou outro composto reativo (PerkinElmer, 2010). Na decomposição, a massa de reagentes desaparece originando produtos na forma gasosa e possivelmente resíduos de cinzas (Kim, 2006).

A forma da curva obtida experimentalmente depende de dois fatores, as propriedades da amostra e as condições experimentais, que podem afetar a cinética (Kim, 2006).

2.2.2 Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier é a técnica de espectroscopia de infravermelho mais utilizada (Rakesh & Rajesh, 2014; Thermo Nicolet Corporation, 2001).

O princípio da espectroscopia assenta na absorção de radiação infravermelha (IR) quando a frequência desta é igual à frequência específica das vibrações entre as ligações dos átomos que constituem a molécula (Rakesh & Rajesh, 2014). O espectro de infravermelho resulta da passagem de radiação infravermelha através da amostra e determinando a fração da radiação incidente que é absorvida a determinada energia (Evora et al., 2002). Assim, a energia à qual surge um pico no espectro de absorção corresponde à frequência de vibração de uma parte ou grupo da molécula em análise e a quantidade de radiação absorvida vem em unidades de absorvância como função da frequência (Siebert & Hildebrandt, 2007; Stuart, 2004).

No caso particular do FTIR, é possível medir todas as frequências infravermelhas simultaneamente através da utilização de um interferómetro que produz um sinal único que contém todas as frequências, sendo possível assim ler uma amostra em apenas alguns segundos (Thermo Nicolet Corporation, 2001).

O espectro de FTIR representa, em forma de analogia, uma impressão digital molecular da amostra, uma vez que cada molécula é resultado de uma combinação única de átomos, logo não existem estruturas moleculares que produzam o mesmo espectro de infravermelho (Thermo Nicolet Corporation, 2001).

O FTIR é uma ferramenta muito útil na identificação de materiais de origem desconhecida, na determinação da qualidade ou consistência de uma amostra e na determinação da quantidade de componentes numa mistura, sendo estas informações obtidas dependendo do comprimento de onda percorrido na análise (Rakesh & Rajesh, 2014; Thermo Nicolet Corporation, 2001). Na

Tabela 4 encontram-se as aplicações do FTIR de acordo com as diferentes regiões do espectro de infravermelhos.

Tabela 4 – Aplicações do FTIR de acordo com a região do espectro de infravermelhos. Retirado de Rakesh & Rajesh, 2014

Região	Comprimento de onda / μm	Número de onda / cm^{-1}	Frequência / Hz	Aplicações
Próxima	0,78-2,5	12800-4000	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$	Análise quantitativa
Média	2,5-50	4000-200	$1,2 \times 10^{14}$ - 6×10^{12}	Identificação de grupos funcionais, análise quantitativa e detecção de impurezas
Afastada	50-100	200-10	6×10^{12} - 3×10^{11}	Análise estrutural da molécula
Mais usada	2,5-15	4000-67	$1,2 \times 10^{14}$ - 2×10^{13}	Maioritariamente análise quantitativa

De acordo com a literatura, existe uma convenção sobre a localização das bandas de absorção para cada tipo de ligação. Na Figura 9 encontram-se as diferentes localizações de um grupo alargado de ligações.

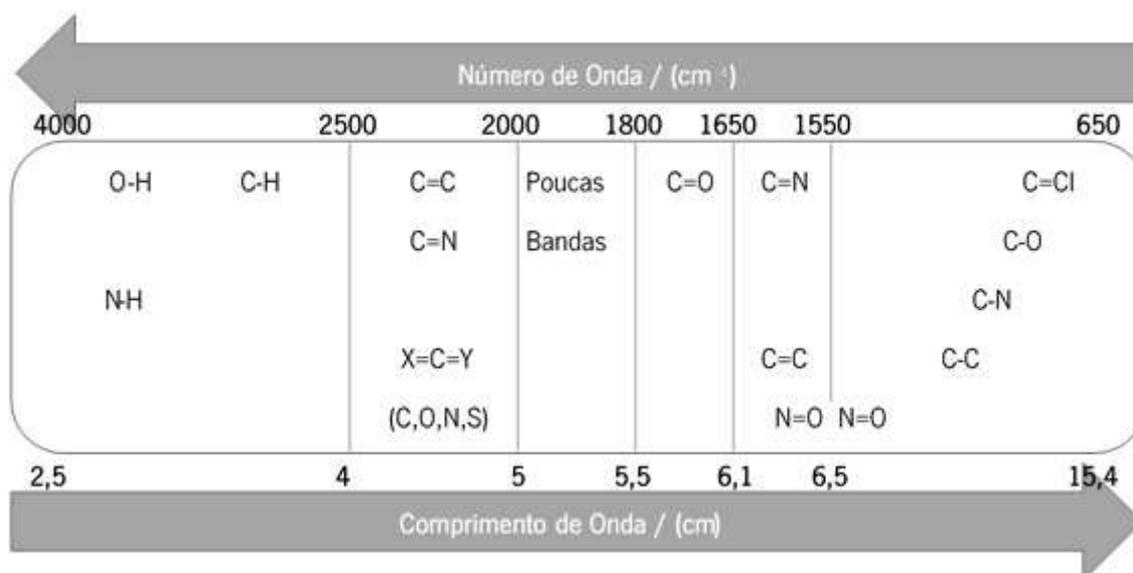


Figura 9 – Localização aproximada de algumas bandas correspondentes a absorção por parte de diferentes tipos de ligações. Adaptado de Pavia et al., 2013.

2.2.3 Dispersão Dinâmica de Luz – DLS

O tamanho das partículas e correspondente distribuição de tamanhos são algumas das características mais importantes na caracterização de nanopartículas, uma vez que estes parâmetros permitem definir a distribuição *in vivo*, a toxicidade e a especificidade de libertação (Mohanraj & Chen, 2006).

A dispersão dinâmica de luz trata-se de um termo genérico para todos os métodos que permitam obter informação sobre a dinâmica molecular (Schmitz, 1990). A técnica de DLS permite determinar o tamanho de partículas com dimensões compreendidas entre 5 nm e vários micrómetros, relacionando o movimento aleatório e constante das partículas (movimentos Brownianos) com o seu tamanho (Arzenšek, 2010; Particle Sizing Systems, n.d.).

Para além disso, permite ainda determinar a distribuição de tamanhos de partículas (Malvern Instruments, 2015a). Os movimentos Brownianos devem-se exclusivamente à difusão das partículas suspensas no líquido, e por isso, quanto maiores as partículas, menor o movimento Browniano, e quanto menores as partículas, maiores e mais rápidas são as deslocações por colisão com as moléculas de solvente (Arzenšek, 2010; Delgado, 2013; Malvern Instruments, 2015a), como se pode constatar na representação esquemática da Figura 10.

Num determinado volume de solução o movimento molecular das partículas provoca flutuações na concentração ao longo do tempo. O princípio desta técnica consiste em relacionar essas flutuações com flutuações na intensidade de dispersão da luz (Lucas et al., 2001; Malvern Instruments, 2015a).

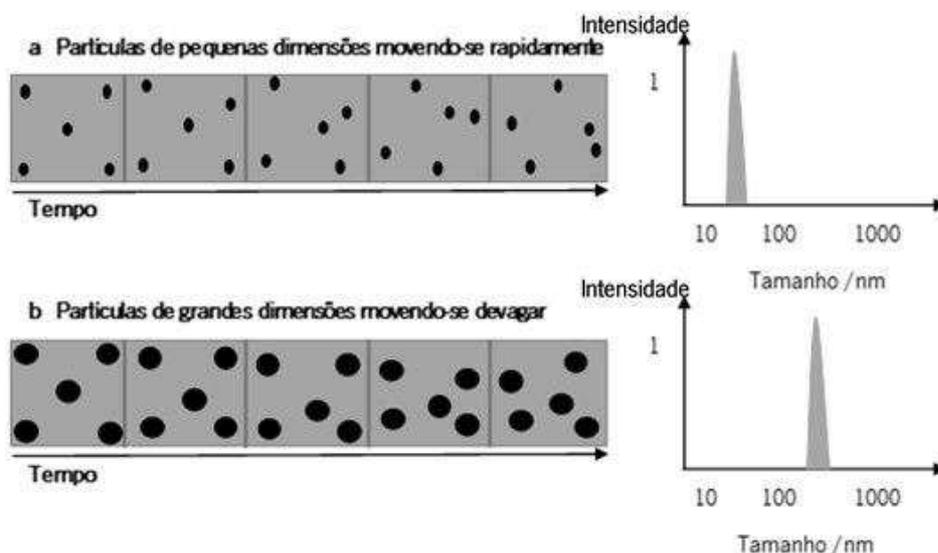


Figura 10 – Relação entre o movimento das partículas e o tamanho das mesmas. Partículas mais pequenas deslocam-se mais rapidamente (a) e partículas maiores movem-se mais lentamente (b). Adaptado de Arzenšek, 2010.

É de realçar que a temperatura é um fator muito importante nesta análise e, por isso, deve ser determinada com exatidão assim como mantida estável, uma vez que ela está intrinsecamente relacionada com a viscosidade do solvente. A instabilidade na temperatura pode provocar movimentos não-aleatórios que levam a uma interpretação errada do tamanho das partículas (Arzenšek, 2010).

2.2.4 Dispersão Eletroforética de Luz – ELS

A dispersão eletroforética de luz é utilizada para caracterizar a carga superficial das partículas em solução (McNeil-Watson, 2013; Xu, 2000), nomeadamente, determinar a mobilidade eletroforética e o potencial zeta das partículas em dispersão (Malvern Instruments, 2015b).

No caso individual de partículas com tamanhos a rondar os nanómetros e micrómetros existe uma área superficial elevada e, por isso, a interface partícula-líquido influencia as propriedades físicas, como a dispersão e estabilidade das soluções contendo as tais partículas. É por isso importante, em termos de caracterização deste tipo de soluções, determinar parâmetros intrínsecos da partícula, como a carga e morfologia da superfície (Xu, 2000).

O potencial zeta é uma função da carga superficial da partícula quando esta é exposta a um meio líquido, servindo de indicador da magnitude das interações repulsivas entre partículas e, por isso, da estabilidade da dispersão (Weiner, Tscharnuter, & Fairhurst, 1993). Quanto maior for o potencial, mais estável é a dispersão e quanto menor o potencial, mais instável é a dispersão (Pan et al., 2012; Weiner et al., 1993).

O método mais comum para determinar este parâmetro é através da aplicação de um campo elétrico à suspensão de partículas, forçando as partículas com carga a movimentarem-se em direção ao eletrodo de carga oposta (eletroforese) (Xu, 2000).

A mobilidade das partículas suspensas depende diretamente da carga que possuem e do líquido no qual se encontram dispersas (McNeil-Watson, 2013). Com o equipamento de ELS mede-se a velocidade eletroforética das partículas, de forma análoga à medição que ocorre na técnica de DLS, esta velocidade relaciona-se com a mobilidade eletroforética (μ_p) e o potencial zeta através de uma série de equações teóricas, permitindo, através do *software* do equipamento, determinar esses parâmetros (Hanus & Ploehn, 1999; Malvern Instruments, 2015b).

2.2.5 Microscopia Eletrónica de Varrimento – SEM

O SEM é uma técnica de microscopia que permite utilizar uma gama de ampliação bastante superior (até 1 000 000 vezes) à microscopia ótica, assim como uma profundidade de campo com uma magnitude mais elevada (Vernon-Parry, 2000).

O princípio da microscopia eletrónica de varrimento é realizar o varrimento e recolher os sinais eletrónicos emitidos pela amostra em análise, recorrendo à utilização de um feixe de eletrões focado com precisão num determinado ponto da amostra (Ebnesajjad, 2014; Wells, 2001).

A imagem da superfície da amostra, obtida por microscopia eletrónica de varrimento, é formada pela análise de todos os pontos da mesma, através da recolha e amplificação da corrente de eletrões que resulta da interação do feixe de eletrões com a amostra, apresentando as variações na eficiência da geração e recolha do sinal em diferentes pontos da amostra (Ebnesajjad, 2014; Smith & Oatley, 1955; Wells, 2001).

A energia do feixe de luz aplicado varia entre 0,1 e 50 keV, dependendo da análise (Reimer, 1998).

A resolução deste tipo de equipamentos pode ir desde 1 nm a 1 μ m, dependendo do microscópio e do sinal usado para formar a imagem (Vernon-Parry, 2000).

Com este tipo de microscopia é possível reunir uma série de informações sobre a amostra em análise, como a topografia da superfície, a estrutura cristalina, a composição química e o comportamento elétrico na superfície da amostra (Vernon-Parry, 2000).

2.3 Ibuprofeno

O ibuprofeno é denominado de ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico pela nomenclatura IUPAC, sendo o primeiro anti-inflamatório não esteroide (NSAID), antipirético e analgésico comercializado com sucesso (Higton, 1999).

Este fármaco existe na forma de dois enantiómeros, o R(-)-ibuprofeno e o S(+)-ibuprofeno, uma vez que a molécula possui um centro quiral no carbono 2 do grupo do ácido propiónico (Rainsford, 2012), sendo no entanto comercializado como mistura racémica (Ramukutty & Ramachandran, 2012). Na Figura 11 pode-se observar as estruturas químicas dos enantiómeros e da mistura racémica.

O mecanismo de ação deste fármaco consiste no bloqueio das enzimas ciclo-oxigenases responsáveis pela síntese das prostaglandinas, reduzindo assim a dor e a inflamação (Weller, 2013), sendo que a forma (S)-ibuprofeno possui maior capacidade de inibição desse químico (Higton, 1999).

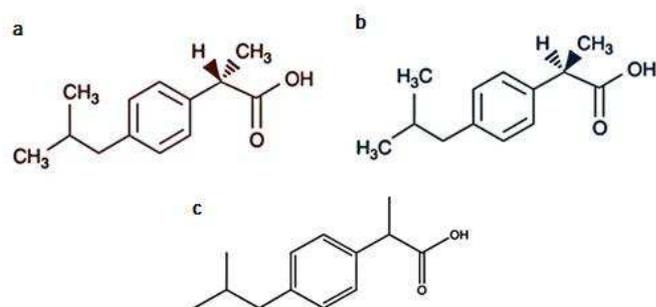


Figura 11 – Estrutura química do (a) S-(+)-enantiômero de ibuprofeno, (b) R-(-)-enantiômero de ibuprofeno e (c) do ibuprofeno (C₁₃H₁₈O₂). Adaptado de (Patel et al., 2013; Rainsford, 2012).

Trata-se de um composto branco cristalino com um odor e sabor característico (Higton, 1999), relativamente lipofílico e insolúvel, ionizando a valores de pH fisiológicos (Patel et al., 2013). As principais características do ibuprofeno são uma massa molecular de 206,30 g/mol, um pKa em torno do 4,4 e 5,2 (Patel et al., 2013; Weller, 2013), um ponto de ebulição de entre 212 °C e 251 °C e um ponto de fusão em torno do 75 °C e 77 °C (Lerdkanchanaporn & Dollimore, 1997).

A permeabilidade do ibuprofeno através da pele humana encontra-se muito bem documentada, assim como a sua solubilidade de acordo com o pH do meio (Hadgraft & Valenta, 2000). Na Tabela 5, encontram-se os valores destas duas propriedades em função do pH, e constata-se que a solubilidade do ibuprofeno aumenta com o pH, devido à ionização da molécula (molécula altamente carregada a valores de pH mais elevados e descarregada a valores de pH mais baixos), ao contrário do que acontece com a permeabilidade (Hadgraft & Valenta, 2000; Jiang et al., 2005).

Tabela 5 – Solubilidade e permeabilidade do ibuprofeno em função do pH em água. Adaptado de (Hadgraft & Valenta, 2000)

pH	2,2	2,3	4,0	5,0	6,0	7,0	9,0	9,2
Solubilidade / (mg/L)	24	27	29	96	520	3700	7830	14800
Coefficiente de permeabilidade / (mm/min)	0,01	0,0088	0,0075	0,006	0,0032	0,0011	0,0004	0,0002

Em relação a solventes orgânicos, o ibuprofeno apresenta-se ligeiramente solúvel em hexano e bastante solúvel em etanol, octanol, dimetilsulfóxido, clorofórmio e acetona, entre outros (Higton, 1999).

A eficácia terapêutica da administração tópica de ibuprofeno é dependente da penetração do fármaco através da pele, assim como da sua potência (Patel et al., 2013). Segundo vários estudos

reportados na literatura, o fluxo máximo de ibuprofeno através da pele é conseguido a valores de pH elevados, uma vez que a baixa permeabilidade identificada é compensada pelo aumento significativo da solubilidade (Hadgraft & Valenta, 2000). A importância do pH nas propriedades do ibuprofeno deve-se exclusivamente ao facto deste fármaco ser um ácido carboxílico e por esse motivo o pKa influenciar diretamente a ionização e, por conseguinte a permeabilidade (Patel et al., 2013).

As propriedades farmacológicas do fármaco, nomeadamente o tempo de meia-vida de 2 horas, tornam-no ideal para fármaco modelo no desenvolvimento de diferentes tecnologias de libertação. As técnicas de libertação que se encontram descritas na literatura envolvem processos de difusão ou de erosão e os métodos de incorporação são o revestimento do fármaco ou a incorporação do fármaco numa matriz, como se pode observar na Figura 12 (Higton, 1999).

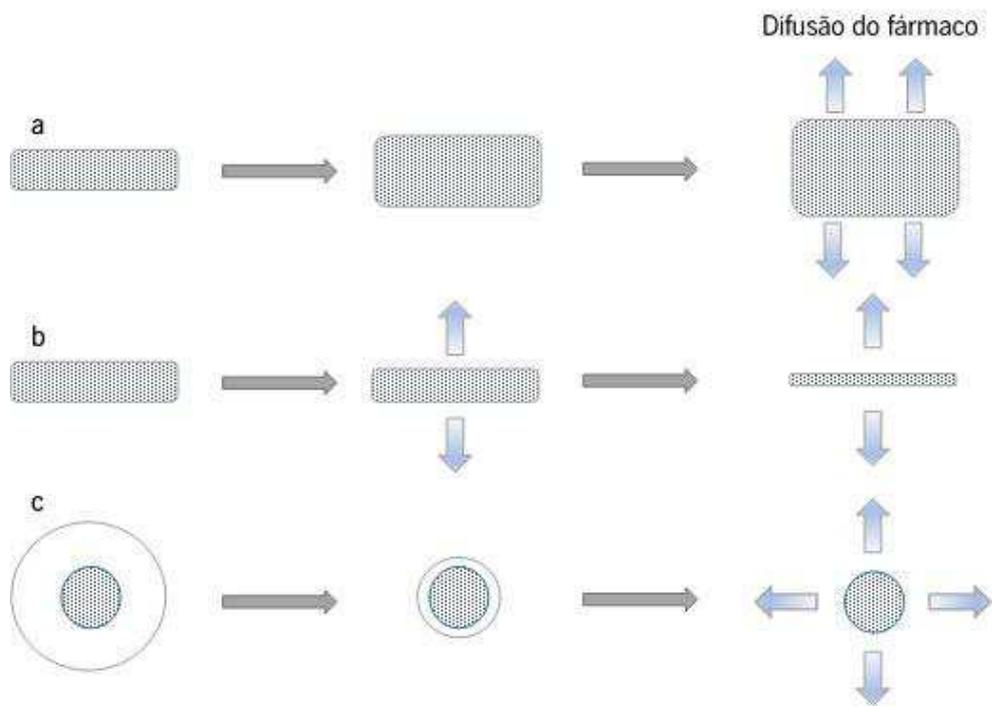


Figura 12 – Mecanismos de libertação de acordo com as diferentes formas de incorporação do fármaco, (a) difusão devido ao intumescimento da matriz, (b) difusão devido à erosão da matriz e (c) difusão por erosão ou dissolução do revestimento. Retirado de Higton, 1999.

A dose diária máxima de ibuprofeno para um adulto ronda as 1200 mg, sendo que se recomenda a toma de doses unitárias de 400 mg. No entanto, o período de toma não deve ultrapassar os 10 dias (Rainsford et al., 1999).

As principais aplicações médicas do ibuprofeno são no alívio da dor associada à osteoartrite, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, dores lombares e articulares, enxaquecas, dores menstruais, dores musculares e dores de pós-operatório, entre outras. Recomenda-se que este

fármaco seja tomado como analgésico de primeira instância para gestão da dor a curto prazo (Oberoi, 2004; Sánchez-Borges et al., 2005).

No caso particular das formulações tópicas de ibuprofeno, é descrita a existência de uma difusão inicial, seguida de uma redistribuição através dos vasos sanguíneos, tendo em conta, como já foi referido, que os tecidos danificados ou inflamados possuem vasos sanguíneos com maior permeabilidade, existindo, por isso, uma maior concentração de fármaco nestas regiões após a redistribuição (Patel et al., 2013). Este tipo de libertação de ibuprofeno tem ganho importância nos últimos anos devido à capacidade de libertar e aliviar a dor localmente, sem os riscos secundários associados a outras formas de administração (Dhar & Rajagopalan, 2011).

A principal dificuldade da aplicação tópica de ibuprofeno é a manutenção da concentração do fármaco devido à sua reduzida permeabilidade através da pele, como já foi mencionado anteriormente. Assim, o objetivo no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada tópicos e transdérmicos com ibuprofeno incorporado passa pelo estudo e utilização de solução supersaturadas, adesivos muco-aderentes e veículos contendo surfactantes não-iónicos ou ácidos gordos (Makhmalzadeh et al., 2012).

2.4 Aplicações de Nanopartículas como Sistemas de Libertação Controlada

O facto de serem partículas que podem incorporar ou conter qualquer tipo de substância torna as nanopartículas um veículo bastante versátil, e por isso podem ser utilizadas em diversos tipos de tecnologias e áreas de estudo, desde a eletrónica à medicina. As nanopartículas têm diversas aplicações em diversas áreas, tais como aplicações térmicas, óticas, magnéticas, mecânicas, energéticas, biomédicas e eletrónicas (Introduction to Nanotechnology, 2009).

As aplicações na área da medicina incluem a libertação controlada e dirigida de fármacos, diagnósticos *in vivo* e *in vitro* e produção de materiais biocompatíveis melhorados (De Jong & Borm, 2008).

2.4.1 Aplicação tópica e transdérmica de nanopartículas com Ibuprofeno

A pele surge como uma via promissora de libertação controlada de ingredientes ativos, uma vez que permite evitar a absorção irregular associada a tratamentos convencionais. Para além disso, como o fármaco é aplicado diretamente na região afetada, não é necessária a administração de concentrações tão elevadas (Samah, 2011).

Existem três formas de atuação do composto quando aplicado na pele, pela via tópica, pela via transdérmica ou pela via transcutânea. O primeiro caso refere-se a terapias nas camadas mais externas e menos permeáveis da pele, a via transdérmica assenta na passagem dos fármacos através das multicamadas da pele até à circulação sistémica e por fim a via transcutânea que corresponde à situação em que os fármacos atingem os tecidos mais profundos, como músculos e articulações (Samah, 2011).

No caso dos anti-inflamatórios, como o ibuprofeno, a via principal de atuação é pela via tópica e transcutânea, sendo que o alvo do fármaco é o local de aplicação (camadas mais externas da pele) e os tecidos profundos, respetivamente (Samah, 2011).

Assim como para outros sistemas de libertação controlada, no caso da administração tópica e transdérmica, os nanotransportadores podem ser idealizados especificamente para responder a um parâmetro ou estímulo, de modo a se adequarem à via de libertação pretendida. Isto é possível através da modificação das propriedades físico-químicas das formulações de nanotransportadores, como o ajuste da viscosidade da formulação, a incorporação de agentes específicos, entre outros (Lee et al., 2010).

A importância do desenvolvimento de formulações tópicas (cremes e géis) e transdérmicas (adesivos dérmicos) de ibuprofeno prende-se essencialmente com a minimização dos efeitos secundários causados no trato gastrointestinal pelos métodos de administração oral e com a manutenção de níveis constantes de fármaco no local de aplicação (Lakshmi et al., 2011; Lee et al., 2010).

Os medicamentos anti-inflamatórios não esteroides são reconhecidos por terem uma capacidade de penetrarem nas camadas mais profundas dos tecidos. No entanto, é evidente que a capacidade de permeabilidade através da pele e, por consequência, o potencial terapêutico depende diretamente do veículo no qual o composto se encontra incorporado e através do qual se pretende fazer a libertação (Hadgraft et al., 2003). A utilização de nanotransportadores, nomeadamente nanopartículas com ibuprofeno incorporado, permite colmatar a baixa permeabilidade destes compostos através da pele, sendo assim possível desenvolver formulações tópicas e transdérmicas eficazes de ibuprofeno (Lakshmi et al., 2011)

Atualmente, já existem algumas formulações de ibuprofeno no mercado, nomeadamente no que diz respeito a géis (Boots Ibuprofen Gel; Ibugel® e Deep Relief®), mousses (Ibumousse®), adesivos de espuma (Biatain Ibu®) e *sprays* (Ibuspray®) (Patel et al., 2013).

a. O pH da pele como estímulo

O tratamento de feridas é bastante complexo, sendo influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos, sendo um deles o pH, que afeta a liberação de oxigênio, a atividade proteolítica e a toxicidade bacteriana, ou seja, todo o processo bioquímico envolvido no tratamento de feridas. No entanto, o pH das feridas não está relacionado com o grau da ferida, mas com o tipo de tecido afetado (Gethin, 2007). O pH das feridas crônicas ronda os 7,2 - 8,9, sendo que, aquelas cujo pH se afasta mais do valor do pH neutro apresentam maior dificuldade no tratamento.

De acordo com estudos publicados, aquando do processo de cura, o pH da ferida tende para valores mais neutros, diminuindo em seguida para valores ácidos (Gethin, 2007). As diferentes etapas de cicatrização/tratamento das feridas (homeostasia, inflamação, proliferação e remodelação) são caracterizadas por diferentes gamas de pH, por isso este é um fator essencial e importante a ter em conta no desenvolvimento de novas técnicas de tratamentos tópicos e transdérmicos (Percival et al., 2014).

Atualmente, já existem produtos no mercado que respondem diretamente a desvios ao pH normal, nomeadamente têxteis que monitorizam o tratamento da ferida. Por alterações das suas características físicas é possível determinar o progresso de cura/cicatrização (Hu et al., 2012).

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais

Neste trabalho foram utilizados dois polímeros pH-responsivos diferentes, um copolímero aniônico de ácido metacrílico-etil acrilato e um copolímero catiónico composto por dimetilaminoetil metacrilato e ésteres metacrílicos, respetivamente, denominados comercialmente por Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO, adquiridos à Evonik Industries.

O ibuprofeno foi o fármaco escolhido para incorporar nas nanopartículas sintetizadas a partir dos polímeros referidos. Foram ainda utilizados dois estabilizantes durante a síntese das nanopartículas por forma a garantir a estabilidade do sistema, o PVA (álcool polivinílico) com 87-90 % de grau de hidrólise e massa molecular relativa de 30 000 – 70 000 g/ mol e o Span® 85, sendo que ambos foram adquiridos à Sigma Aldrich.

O solvente orgânico para dissolução dos polímeros e ibuprofeno foi o metanol com massa molecular relativa de 32,04 g/mol e grau de pureza superior a 99,8 %.

Foi necessário em diversas situações ajustar o pH das soluções, pelo que, para tal, foram preparadas duas soluções a partir de uma base forte e um ácido forte, designadamente, o hidróxido de sódio (NaOH) com massa molecular relativa de 40 g/mol da VWR Chemicals Prolabo e o ácido clorídrico (HCl) com composição mássica de 0,37 e massa molecular relativa de 36,46 g/mol da Riedel-de Haën.

Foram preparados 3 tampões distintos para utilizar como meio para os ensaios de libertação, nomeadamente o tampão HCl/KCl (pH=1,2), tampão citrato (pH=5,5) e o tampão fosfato (pH=6,8).

No tampão HCl/KCl foi utilizada a solução de HCl, mencionada anteriormente, e cloreto de potássio (KCl) com massa molecular de 74,56 g/mol da Panreac.

Para o tampão citrato, utilizaram-se o citrato trissódico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) com massa molecular relativa de 294,10 g/mol e o ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) com massa molecular de 210,14 g/mol, ambos adquiridos à Panreac.

Para a preparação do tampão fosfato recorreu-se ao fosfato dipotássico (K_2HPO_4) com massa molecular relativa de 174,18 g/mol e ao dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) com massa molecular relativa de 136,09 g/mol, ambos adquiridos à Panreac.

Toda a água utilizada nas mais diversas análises e técnicas foi água pura (Millipore®) com exceção da preparação das soluções tampão, nas quais foi utilizada água desionizada.

3.2 Síntese de nanopartículas de Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO

Para o primeiro conjunto de sínteses (do ensaio 1 ao ensaio 4) foi preparada uma solução tampão citrato (pH≈6) com PVA (concentração de 0,01 g/mL) e uma solução de Eudragit® em metanol (concentração de 0,025 g/mL).

Uma vez preparadas, a solução de Eudragit® foi adicionada à solução de PVA recorrendo a uma bureta automática (Bioblock Scientific da Razel Scientific Instruments Inc), a uma velocidade de aproximadamente 0,65 mL/min.

Durante a adição, a solução de PVA encontrava-se num banho de óleo a 25 °C, de modo a manter a temperatura constante, sob agitação magnética de 600 min⁻¹.

Após a adição completa, reduziu-se imediatamente a agitação magnética para 100 min⁻¹ e a solução permaneceu durante 24 h no banho a 25 °C de modo a evaporar o solvente orgânico.

Seguiu-se uma série de 3 centrifugações recorrendo à centrífuga Universal 320 R da Hettich Zentrifugen, a primeira a 1500 min⁻¹ durante 10 minutos para remover agregados poliméricos, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente a 9000 min⁻¹ durante 30 minutos e, por fim, realizou-se uma última centrifugação a 15 000 min⁻¹ durante 20 minutos. No ensaio 3 e 4 esta etapa não foi realizada uma vez que a centrifugação se demonstrou insignificante nos ensaios com Eudragit® E PO.

Uma parte da solução final obtida foi congelada e liofilizada (Freezone 6 da Labconco) de modo a obter-se nanopartículas na forma de um pó. Outra parte foi analisada (análise do tamanho e o potencial zeta das nanopartículas) conforme obtida, com as nanopartículas dispersas. Colocaram-se as amostras no liofilizador após a temperatura ter estabilizado em torno dos -43 °C e esperou-se que a pressão de vácuo descesse abaixo dos 20 kPa para então retirar as amostras liofilizadas. O mesmo procedimento foi adotado nos ensaios em que se recorreu à incorporação de ibuprofeno, sendo que o mesmo foi adicionado à fase orgânica antes da adição desta à fase aquosa.

Na Tabela 6 encontram-se as condições das sínteses realizadas de acordo com este primeiro protocolo.

Tabela 6 - Condições e polímeros utilizados em cada ensaio realizado de acordo com o primeiro procedimento experimental, assim como a massa pesada de cada polímero em cada síntese

Ensaio	Polímero	Massa de polímero / (g)	Condições
1	Eudragit® L100-55	0,2507±0,00005	Sem ibuprofeno incorporado.
2	Eudragit® E PO	0,2516±0,00005	Realizaram-se as 3 centrifugações.
3	Eudragit® E PO	0,2506±0,00005	Sem ibuprofeno incorporado. Não se realizaram centrifugações. Realizou-se liofilização.
4	Eudragit® E PO	0,2509±0,00005	Massa de Ibuprofeno: 2,40±0,05 mg. Não se realizaram centrifugações. Realizou-se liofilização.

Após uma primeira análise das soluções e nanopartículas sintetizadas, decidiu-se proceder a algumas alterações no protocolo inicialmente definido, nomeadamente no estabilizante/surfactante a utilizar e na agitação durante a adição da fase orgânica à fase aquosa. Os ensaios preparados de acordo com o protocolo otimizado incluem desde o ensaio 5 até ao ensaio 18.

Neste sentido, foi preparada uma solução aquosa de Span® 85 (composição volúmica de 0,4 %) e uma solução de Eudragit® em metanol (concentração de 0,025 g/mL).

Uma vez preparadas, a solução de Eudragit® foi adicionada à solução de Span utilizando uma bureta automática, a uma velocidade de 0,65 mL/min. Durante a adição, a solução de Span® 85 permaneceu num banho de óleo a 25 °C sob agitação magnética a 900 min⁻¹. Após a adição completa, manteve-se a agitação vigorosa por 30 minutos, após os quais, a solução foi deixada durante 24 h no banho a 25 °C sob agitação magnética a 100 min⁻¹ de modo a evaporar o solvente orgânico.

Uma parte da solução final obtida foi congelada e liofilizada de modo a obterem-se as nanopartículas na forma de pó. Colocaram-se as amostras no liofilizador após a temperatura ter estabilizado em torno dos -43 °C e esperou-se que a pressão de vácuo descesse abaixo dos 20 kPa, e só então se retiraram as amostras.

O mesmo procedimento foi usado para as sínteses nas quais se recorreu à incorporação de ibuprofeno, sendo que o composto ativo foi adicionado à fase orgânica antes da adição desta à

fase aquosa. Na Figura 13 encontra-se representado o esquema elucidativo da etapa de adição da fase orgânica à fase aquosa.

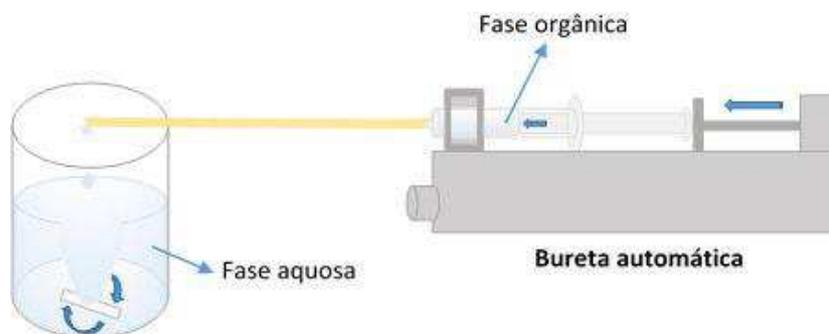


Figura 13 – Representação esquemática do sistema de injeção da fase orgânica (polímero ou polímero + fármaco em metanol) na fase aquosa (PVA ou Span 85 em água).

Na Tabela 7 encontram-se as condições dos ensaios realizados de acordo com o protocolo otimizado.

Tabela 7 – Condições e polímeros utilizados em cada ensaio realizado de acordo com o procedimento experimental final e ainda as massas pesadas de polímero e ibuprofeno

Ensaio	Polímero	Massa de polímero / (g)	Massa de Ibuprofeno / (g)	Condições
5	Eudragit® E PO	0,25160±0,00005	0,25360±0,00005	Estabilizante: Span® 85. Realizou-se liofilização.
6	Eudragit® E PO	0,25180±0,00005	-	Estabilizante: PVA. Realizou-se liofilização.
7	Eudragit® L100-55	0,25050±0,00005	-	Estabilizante: Span® 85. Realizou-se liofilização.
8	Eudragit® E PO	0,25270±0,00005	-	
9	Eudragit® E PO	0,24950±0,00005	0,25210±0,00005	
10	Eudragit® E PO	0,25000±0,00005	-	
11	Eudragit® L100-55	0,25140±0,00005	0,24990±0,00005	
12	Eudragit® L100-55	0,24980±0,00005	-	

Tabela 7 – Condições e polímeros utilizados em cada ensaio realizado de acordo com o procedimento experimental final e ainda as massas pesadas de polímero e ibuprofeno (continuação)

Ensaio	Polímero	Massa de polímero / (g)	Massa de Ibuprofeno / (g)	Condições
13	Eudragit® E PO	0,25120±0,00005	-	Estabilizante: Span® 85. Realizou-se liofilização.
14	Eudragit® E PO	0,25130±0,00005	0,12560±0,00005	
15	Eudragit® E PO	0,24990±0,00005	0,25030±0,00005	
16	Eudragit® E PO	0,25050±0,00005	0,50130±0,00005	
17	Eudragit® L100-55	0,25080±0,00005	-	
18	Eudragit® L100-55	0,25160±0,00005	1,00060±0,00005	

3.3 Caracterização das nanopartículas de Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO

As nanopartículas de Eudragit® L100-55 e Eudragit® E PO obtidas, bem como as formulações de nanopartículas, os polímeros Eudragit® e o fármaco, foram analisados por uma série de técnicas de caracterização descritas de seguida.

3.3.1 Análise Termogravimétrica

Aproximadamente 2 – 10 mg de polímero, fármaco e formulações de nanopartículas foram analisadas num analisador termogravimétrico (TGA Perkin Pyris 1 da Perkin Elmer).

As amostras foram colocadas no cadinho e expostas a um intervalo de temperatura entre a temperatura ambiente e 900 ° C, com uma velocidade de aquecimento de 20 °C/min sob atmosfera reativa (ar).

3.3.2 Análise de Espetroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

As análises de espectroscopia de infravermelhos foram realizadas no espectrómetro de infravermelhos com transformada de Fourier Spectrum 100, com um acessório de amostragem

com reflexão total atenuada, da Perkin Elmer. Todos os espectros foram recolhidos após 16 varrimentos ao longo da gama de 4000 cm^{-1} – 650 cm^{-1} . Um varrimento do *background* foi adquirido antes da análise das amostras.

3.3.3 Medição do tamanho das nanopartículas e potencial zeta

O tamanho e o potencial zeta das nanopartículas sintetizadas foram determinados por dispersão dinâmica de luz e dispersão eletroforética de luz, respetivamente, utilizando o Zetasizer (Nano ZS90, Malvern).

Esta medição ocorreu em dois momentos distintos, para efeitos de comparação, tendo sido feita uma medição imediatamente após o término do período de 24 h de evaporação do solvente orgânico e uma medição após a liofilização.

Na primeira medição referida retiraram-se amostras da solução de nanopartículas para analisar o tamanho e potencial zeta das partículas sintetizadas.

Na segunda medição, cerca de 1 mg de nanopartículas liofilizadas foi suspensa em 20 mL de água. Procedeu-se à agitação no vortex (Vortex 200 – Mixer 230 V da Labnet International, Inc) e no banho de ultrassons (Ultrasons H-D da P-Selecta) (30 minutos a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) por forma dispersar as nanopartículas.

Os dados foram obtidos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo a água o dispersante utilizado. A viscosidade para a água nestas condições é de $8,872 \times 10^{-4}\text{ Pa}\cdot\text{s}$ (0,8872 cP) e a constante dielétrica é de 78,5. Recorreu-se à utilização do atenuador automático, sendo que, para as medições de ELS, a voltagem aplicada variou entre os 147 V e 150 V, dependendo das medições.

Todas as amostras foram analisadas três vezes com medições sucessivas efetuadas pelo equipamento e por isso todos os resultados de DLS e ELS surgem sob a forma de média das 3 medições realizadas.

3.3.4 Análise de microscopia eletrónica de varrimento

A análise estrutural das nanopartículas foi efetuada por microscopia eletrónica de varrimento no microscópio eletrónico de varrimento do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). As amostras analisadas foram previamente revestidas com ouro, para aumentar a sua condutividade e assim permitir uma melhoria na qualidade das imagens obtidas. As imagens foram adquiridas com várias ampliações: 2000x, 10000x, 20000x e 50000x.

3.4 Liberação de Ibuprofeno

3.4.1 Retas de Calibração

Por forma a poder quantificar-se a liberação de ibuprofeno a partir das nanopartículas sintetizadas construíram-se três retas de calibração para o ibuprofeno a pH distintos utilizando o UV/vis.

Os pHs estudados foram pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8. A escolha do pH 1,2 e 6,8 deveu-se ao fato de estes valores de pH serem os mais utilizados, de acordo com a literatura, para estudos de liberação com polímero análogos e o pH 5,5 foi selecionado porque é o pH mais usual da pele, sendo que as principais aplicações previstas das nanopartículas sintetizadas são a administração tópica.

Foram preparadas três soluções de ibuprofeno, de acordo com as condições presentes na Tabela 8, cujas absorvâncias foram lidas no espectrofotômetro Lambda 35 UV/VIS da Perkin Elmer.

Tabela 8 – Massa de ibuprofeno pesada e respetiva concentração da solução-mãe resultante, utilizada para preparar as sucessivas diluições necessárias para construir a curva de calibração a diferentes valores de pH

pH	Massa de Ibuprofeno/ (mg)	[Ibu] / (mg/L)
1,20	6,40±0,05	22,5
5,55	6,60±0,05	26,4
6,74	8,50±0,05	17,0

Em seguida, foram preparadas soluções com diferentes concentrações a partir da solução-mãe correspondente. Subsequentemente procedeu-se à leitura de absorvância dessas soluções colocando uma amostra de cada uma delas nas cuvetes de quartzo.

É de salientar que o pH de todas as soluções, incluindo as resultantes da diluição da solução-mãe, foi verificado e ajustado recorrendo a um medidor de pH (Orion 3 Star pH Benchtop da Qlabo). As retas de calibração encontram-se no Anexo I – Curvas de Calibração do Ibuprofeno por Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/visível.

3.4.2 Preparação da solução tampão HCl/KCl (pH 1,2)

A solução tampão HCl/KCl foi preparada misturando uma solução de 0,1 mol/L de KCl e uma solução de 0,1 mol/L de HCl.

Recorrendo ao medidor de pH, verificou-se o pH da solução e ajustou-se com solução de HCl ou NaOH, quando necessário.

3.4.3 Preparação da solução tampão citrato (pH 5,5)

A solução tampão citrato foi preparada misturando uma solução de 0,1 mol/L de $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ e uma solução de 0,1 mol/L de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$.

Recorrendo ao medidor de pH verificou-se o pH da solução e ajustou-se com solução de HCl ou NaOH, quando necessário.

3.4.4 Preparação da solução tampão fosfato (pH 6,8)

A solução tampão fosfato foi preparada misturando uma solução de 0,2 mol/L de K_2HPO_4 e uma solução de 0,2 mol/L de KH_2PO_4 .

Recorrendo ao medidor de pH verificou-se o pH da solução e ajustou-se com solução de HCl ou NaOH, quando necessário.

3.4.5 Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir da solução de nanopartículas em solução

Para a monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas em solução (não liofilizadas) recorreu-se à adição de um determinado volume de solução de nanopartículas com ibuprofeno (de acordo com a diluição necessária para uma leitura de absorvâncias com significado) num balão de 50 mL.

Procedeu-se então a um ajuste do pH por adição de solução de HCl ou NaOH por forma a obter-se soluções com os 3 valores de pH em estudo (pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8) e iniciou-se, imediatamente, a monitorização retirando uma amostra e colocando a solução sob agitação magnética a 150 min^{-1} . Em seguida foram retiradas amostras ao longo do tempo, até um período de tempo total variável de acordo com os diferentes estudos.

O mesmo procedimento foi realizado para a solução de nanopartículas sem ibuprofeno, de modo a determinar se a solução de nanopartículas sem ibuprofeno incorporado poderia servir de controlo.

Cada amostra retirada foi colocada na cuvete de quartzo e lida a sua absorvância no espectrómetro de Uv/vis (Lambda 35 UV/VIS spectrometer da Perkin Elmer).

O branco de cada ensaio de monitorização foi água ultrapura cujo pH foi ajustado para o pH correspondente ao ensaio em análise (pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8).

3.4.6 Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas liofilizadas

Enquanto a monitorização da libertação a partir da solução com nanopartículas foi realizada recorrendo a água, nos ensaios com as nanopartículas liofilizadas utilizaram-se as diferentes soluções tampões correspondentes aos 3 valores de pH distintos em estudo.

Pesou-se uma determinada massa de nanopartículas liofilizadas com ibuprofeno incorporado, suspendeu-se em 50 mL do tampão correspondente ao ensaio em causa, e iniciou-se imediatamente a monitorização retirando uma amostra e colocando sob agitação magnética a solução a 150 min⁻¹. Em seguida foram retiradas amostras ao longo do tempo, até um período de tempo total variável de acordo com os diferentes estudos.

Cada amostra retirada foi colocada na cuvete de quartzo e lida a sua absorvância no espectrómetro de Uv/vis (Lambda 35 UV/VIS spectrometer da Perkin Elmer).

O branco de cada ensaio de monitorização foi o tampão correspondente ao ensaio em causa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do Processo de Síntese de Nanopartículas

Como já foi referido, os primeiros ensaios realizados no âmbito deste trabalho de dissertação foram elaborados de acordo com um protocolo experimental que se revelou inadequado e por isso, posteriormente, foi ajustado de acordo com as necessidades em termos de tamanho, uniformidade e estabilidade das nanopartículas.

4.1.1 Ensaios de acordo com o procedimento experimental inicial

Nestes primeiros ensaios, recorreu-se a um procedimento reportado na literatura (Yoo et al., 2011) para síntese das nanopartículas a partir de um polímero análogo aos polímeros utilizados no presente trabalho. Apenas ligeiras modificações foram efetuadas no protocolo original (estabilizante utilizado, velocidade de agitação e omissão das centrifugações), tendo em conta a disponibilidade de material e equipamentos.

Nesta secção da dissertação encontram-se os resultados dos ensaios mais pertinentes sobre as dificuldades encontradas no processo de síntese estabelecido e na consequente obtenção de nanopartículas.

Os resultados da análise de DLS das soluções de nanopartículas resultantes dos ensaios 1 (com Eudragit® L100-55) e 2 (com Eudragit® E PO) são representativos das dificuldades nas etapas de centrifugação do procedimento implementado (Figura 14).

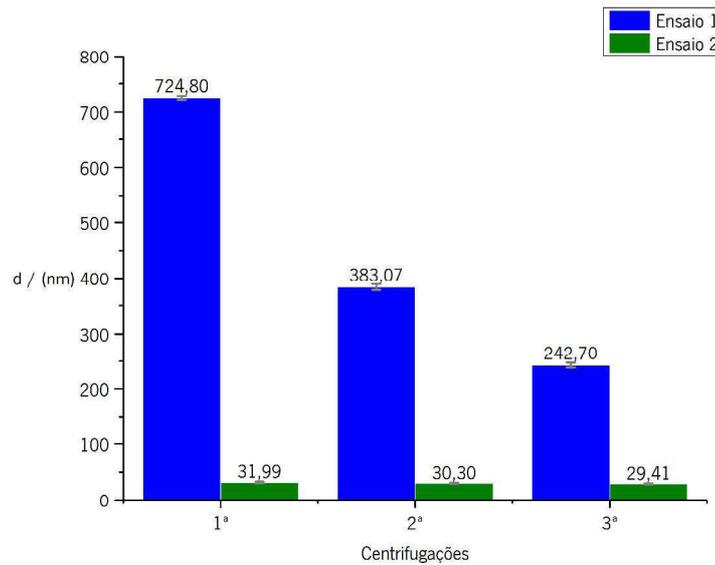


Figura 14 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em função das sucessivas centrifugações efetuadas à solução de nanopartículas dos ensaios 1 e 2. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Na Tabela 9 encontram-se os respectivos índices de polidispersão (PDI), determinados pela análise de DLS, indicativos da amplitude da distribuição de tamanho das partículas e da real aproximação dos dados obtidos pelo modelo Gaussiano e cálculos subjacentes à análise (Arzenšek, 2010). Os valores de PDI variam de 0 a 1, considerando-se que as partículas são monodispersas para valores entre 0,01 e 0,5 e possuem alguma dispersão para valores entre 0,5 e 0,7 (Kharia et al., 2012). Valores superiores a 0,7 indicam que amostra não é passível de ser analisada por DLS uma vez que possui uma distribuição de tamanhos bastante heterogênea (Instruments, 2011; Kharia et al., 2012).

Tabela 9 – Média dos valores de PDI associados a cada análise de DLS das nanopartículas resultantes das sucessivas centrifugações dos ensaios 1 e 2 e desvio padrão associado ao cálculo da média do PDI

Ensaio	Centrifugação	Média do PDI
1	1ª	0,424 \pm 0,065
	2ª	0,133 \pm 0,022
	3ª	0,190 \pm 0,009
2	1ª	0,771 \pm 0,011
	2ª	0,735 \pm 0,031
	3ª	0,505 \pm 0,015

Avaliando os tamanhos das partículas obtidos com as sucessivas centrifugações das soluções resultantes dos ensaios 1 e 2 (Figura 14) foi possível constatar que, no ensaio 1, no qual o polímero utilizado foi o Eudragit® L100-55, a centrifugação se demonstrou eficiente, ocorrendo a

diminuição do tamanho das partículas de $724,80 \pm 3,16$ nm para $242,7 \pm 4,45$ nm após as três centrifugações. No entanto, no caso do ensaio 2, com Eudragit® E PO, as sucessivas centrifugações não se traduziram uma diminuição significativa do tamanho das partículas, passando apenas de $31,99 \pm 1,39$ nm para $29,41 \pm 0,72$ nm após a terceira centrifugação.

Para além disso, verificou-se que com as sucessivas centrifugações no ensaio 1, o valor de PDI diminuiu (de $0,424 \pm 0,065$ para $0,190 \pm 0,009$) após as três centrifugações, obtendo-se uma solução com uma distribuição de tamanhos de partículas mais homogênea, ou seja obteve-se uma solução de partículas ainda mais monodispersa (Tang et al., 2009) compreendendo apenas uma população de nanopartículas na solução.

Da mesma forma, para o ensaio 2 verificou-se também essa redução de valor, contudo, neste caso os valores mantiveram-se demasiado elevados, passando de $0,771 \pm 0,011$ para $0,505 \pm 0,015$ após as três centrifugações, revelando que apesar de ter ocorrido uma diminuição na polidispersão das partículas ela ainda é elevada, ou seja existem populações de partículas com tamanhos distintos sem que haja uma população que se sobreponha às restantes. Por este motivo, nos ensaios seguintes, nos quais se utilizou Eudragit® E PO, optou-se por não recorrer às etapas de centrifugação.

A par dos ensaios 1 e 2 foram ainda efetuados os ensaios 3 e 4 segundo este procedimento, nas mesmas condições de síntese com a exceção de que nanopartículas produzidas no ensaio 4 possuíam ibuprofeno incorporado.

Os primeiros resultados obtidos apontaram para uma elevada heterogeneidade das nanopartículas sintetizadas usando este procedimento, assim, importa apresentar os valores das análises de DLS e ELS das nanopartículas produzidas pelos ensaios 3 (Eudragit® E PO) e 4 (Eudragit® E PO) para determinar a estabilidade das nanopartículas e avaliar preliminarmente o efeito da incorporação de ibuprofeno nas nanopartículas.

Na Figura 15 ilustram-se os resultados das análises de DLS das nanopartículas resultantes dos ensaios 3 e 4.

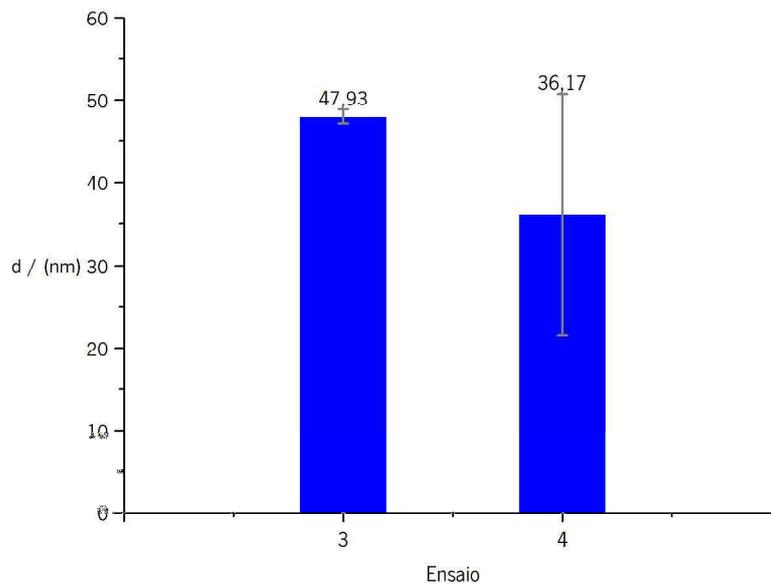


Figura 15 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 3 e 4. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Em concordância, a média dos valores de PDI da análise de DLS foi de $0,915 \pm 0,017$ e $0,543 \pm 0,243$ para os ensaios 3 e 4, respetivamente.

Analisando a Figura 15 constata-se que as nanopartículas obtidas nos ensaios 3 e 4 possuíam um tamanho bastante diminuto, $47,93 \pm 0,88$ nm e $36,17 \pm 14,58$ nm, respetivamente, e um elevado valor de PDI, que serve como indicação para a existência de mais de duas populações de nanopartículas, tornando a solução polidispersa. Para além disso, os tamanhos das partículas são demasiado pequenos tendo em conta que o objetivo seria obter nanopartículas com tamanhos compreendidos entre 50 nm e 500 nm, tamanho descrito como ideal para nanopartículas para a libertação controlada de fármacos (Uchechi et al., 2014).

Não foi possível retirar quaisquer conclusões da comparação dos resultados da análise de DLS ao ensaio 3 e 4, uma vez que os valores são bastante semelhantes, apesar das nanopartículas do ensaio 4 possuírem ibuprofeno incorporado.

Seria expectável que as partículas do ensaio 4 fossem maiores que as obtidas no ensaio 3, uma vez que possuem um composto incorporado, mas tal não aconteceu. Este resultado pode sugerir que a quantidade de ibuprofeno incorporada foi insuficiente para se evidenciar no tamanho das partículas, ou então que a estrutura catiónica do polímero e a estrutura aniónica do fármaco interagem de alguma forma, originando partículas de um tamanho inferior ao esperado devido às forças de atração entre compostos de carga contrária. No entanto, como não foram efetuadas análises complementares para averiguar possíveis justificações para esta situação,

nomeadamente, análise de FTIR e TGA para verificar a incorporação do ibuprofeno, optou-se por aprofundar o estudo deste parâmetro em ensaios posteriores.

Na Figura 16 encontram-se os resultados da análise de ELS das nanopartículas em solução resultantes dos ensaios 3 e 4. É de salientar que o potencial zeta não é uma propriedade da partícula, este parâmetro existe para uma partícula num determinado dispersante a uma determinada temperatura e viscosidade, sendo calculado pelo equipamento de acordo com a mobilidade eletroforética da partícula presente num dado sistema.

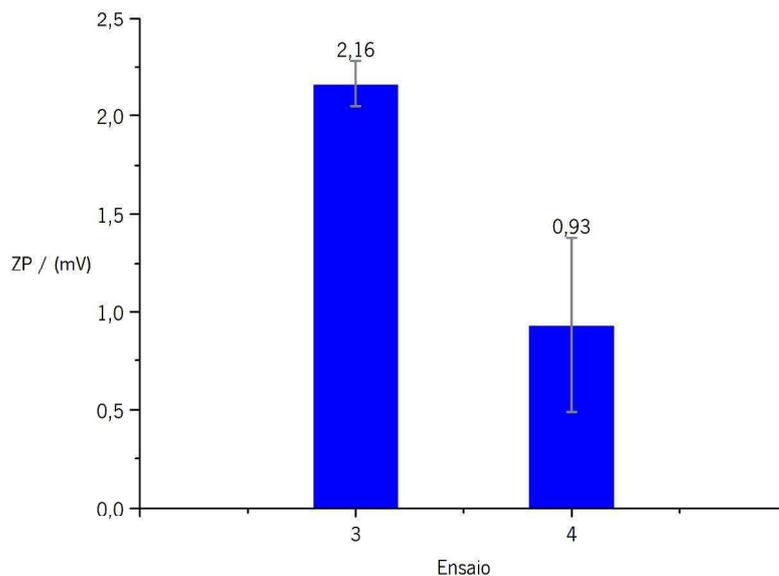


Figura 16 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 3 e 4. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Avaliando a Figura 16 constata-se que as nanopartículas sintetizadas através deste procedimento são bastante instáveis, tanto para o ensaio 3 como para o ensaio 4 (valor de potencial zeta $2,16 \pm 0,12$ mV e $0,93 \pm 0,45$ mV, respetivamente), uma vez que de acordo com a fundamentação teórica, quando os valores de potencial zeta são muito baixos, significa que a suspensão é instável pois as partículas carregadas não são capazes de se repelir e por isso têm maior tendência a agregar (Mohanraj & Chen, 2006; Mu & Feng, 2014).

No caso de nanopartículas com valores de potencial zeta compreendidos entre -10 mV e 10 mV, pode assumir-se que se trata de partículas com carga neutra e por isso a probabilidade de flocularem ou agregarem é muito maior (Clogston & Patri, 2011).

É de referir, que em termos de comparação entre os valores da análise de ELS para os ensaios 3 e 4 se verificou um valor inferior para as partículas com ibuprofeno incorporado (ensaio 4), facto

que pode ser justificado com a carga oposta que o polímero e fármaco possuem, formando por isso nanopartículas com carga mais próxima do valor nulo.

De acordo com os resultados das análises de DLS e ELS das soluções resultantes dos ensaios 3 e 4 ficou estabelecido que seria necessário alterar o procedimento de modo a se sintetizar nanopartículas com tamanhos superiores e maior estabilidade.

Adicionalmente, é importante considerar o aspeto visual das nanopartículas liofilizadas obtidas no ensaio 3 (Figura 17).

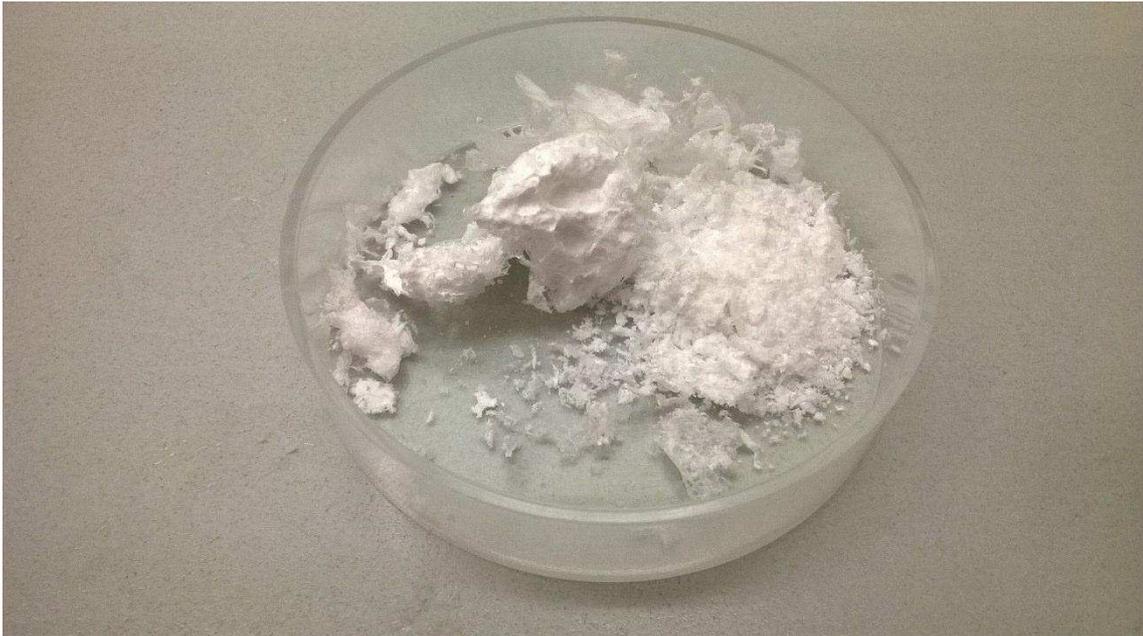


Figura 17 – Nanopartículas sintetizadas no ensaio 3 após liofilização.

A estrutura do produto obtido foi muito distinta da que se pretendia, uma vez que o objetivo era obter um pó fino, à semelhança do que se encontra reportado na literatura para polímeros análogos (Yoo et al., 2011). A principal justificação para tal ter acontecido estará relacionada com a utilização do PVA como estabilizante, que terá estabelecido ligações que se sobrepuseram ao polímero principal e constituinte das nanopartículas, o Eudragit®. Encontra-se descrito na literatura que o PVA pode-se manter associado à estrutura superficial das nanopartículas, justificando-se o aspeto obtido para o produto (Abdelwahed et al., 2006).

Esta hipótese foi testada posteriormente, trocando de estabilizante, de modo a perceber se o produto obtido era resultado da utilização do PVA no procedimento, ou se era o produto que se iria obter, tendo em conta os polímeros utilizados.

Para além dessa alteração, conclui-se que seria necessário aumentar a concentração de ibuprofeno a incorporar, já que a quantidade utilizada no ensaio 4 (rácio entre polímero e fármaco,

100:1) é muito distinta da que se encontra reportada na literatura (Bucolo et al., 2002; Kislalioglu et al., 1991; Pignatello, Bucolo, Spedalieri et al., 2002; Pignatello, Bucolo, Ferrara, et al., 2002). A esta situação acresce o facto da dose diária máxima de ibuprofeno ser de 1200 mg em tomas unitárias de 400 mg (Rainsford et al., 1999), por isso o objetivo, tendo em conta as potenciais aplicações das nanopartículas, será sempre incorporar o máximo possível, sem nunca exceder essa quantidade, para que a libertação seja gradual ao longo do dia, e dentro dos limites estabelecidos. Estes resultados evidenciaram a necessidade de alterar o procedimento de síntese.

4.1.2 Ensaios realizados usando o procedimento de síntese modificado

Os ensaios numerados de 5 a 18 foram realizados introduzindo ligeiras modificações nos parâmetros operacionais do processo de síntese abaixo descritas (Bucolo et al., 2002; Pignatello, Bucolo, Spedalieri, et al., 2002; Pignatello, Bucolo, Ferrara, et al., 2002; Yoo et al., 2011).

Na preparação de emulsões, existem fatores que influenciam diretamente o tamanho das partículas formadas e a estabilidade da emulsão, sendo eles as propriedades dos líquidos, a presença de um estabilizante e as condições de preparação da emulsão (Liyana, Nour, Rizauddin, Gimbin, & Nurdin, 2014).

A primeira alteração processual aplicada foi o aumento da agitação aquando da adição da fase orgânica à fase aquosa, uma vez que de acordo com a literatura essa agitação é responsável pela maior ou menor eficácia na síntese de nanopartículas estáveis e de tamanhos adequados (Kawashima et al., 1989; Pandya, Patel, & Patel, 2011).

Na maioria dos casos de síntese de nanopartículas de polímeros análogos aos utilizados no presente trabalho, e em condições semelhantes, são utilizadas velocidades de agitação superiores a 600 min⁻¹ (velocidade fixada no primeiro procedimento) (Bucolo et al., 2002; Nepolean et al., 2012; Quintanar-Guerrero et al., 1998). Assim, tendo em conta o equipamento disponível, procedeu-se ao aumento da agitação para as 900 min⁻¹.

A segunda modificação introduzida foi estabelecer um período de 30 minutos, após a total adição da fase orgânica, durante o qual a solução ficaria sob a agitação magnética estabelecida anteriormente, em oposição à imediata redução da agitação estabelecida no procedimento inicial. Com esta etapa, pretendia-se essencialmente garantir a máxima dispersão no meio das nanopartículas sintetizadas, uma vez que a agitação permite “quebrar” o líquido disperso em muitas e pequenas “gotículas”, i.e. as nanopartículas (Liyana et al., 2014).

A terceira alteração consistiu na substituição do PVA por Span® 85 como estabilizante. Os estabilizantes podem ser surfactantes, polímeros ou uma mistura de ambos, sendo adicionados com o principal propósito de reduzir a energia livre do sistema, reduzindo a tensão interfacial e, por consequência, prevenindo a agregação de nanopartículas (Verma et al., 2011). Assim, optou-se por testar um novo estabilizante, tendo-se escolhido o Span® 85, dado que o mesmo é apresentado na literatura como uma boa alternativa, e se encontrava disponível no laboratório.

A última alteração consistiu na eliminação das etapas de centrifugação, uma vez que tal como já havia sido referido, essas etapas revelaram-se ineficazes nos primeiros ensaios com Eudragit® E PO. Posteriormente, revelou-se que, também para os ensaios com Eudragit® L100-55, as centrifugações seriam desnecessárias pois o tamanho das partículas era o adequado.

Na Figura 18 encontram-se os valores dos tamanhos das partículas obtidos por DLS das soluções de nanopartículas dos ensaios 6, 7 e 8, sendo que os resultados do ensaio 6 foram utilizados posteriormente para avaliar a eficiência do novo estabilizante. O ensaio 5 foi considerado na análise do aspeto visual das nanopartículas.

No ensaio 6 manteve-se o PVA como estabilizante e alteraram-se os restantes parâmetros (utilizou-se o Eudragit® E PO) e no ensaio 7 e 8 foi utilizado o procedimento modificado, sendo o polímero utilizado o Eudragit® L100-55 e o Eudragit® E PO, respetivamente.

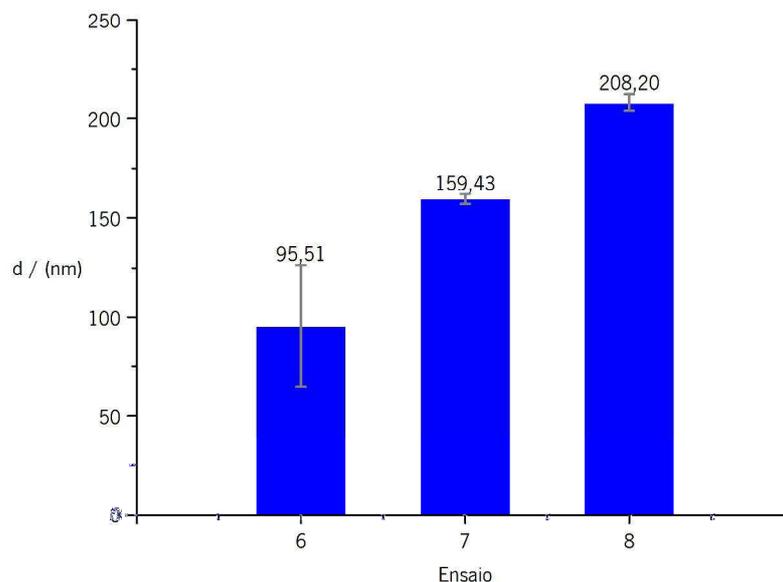


Figura 18 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 6, 7 e 8. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Os valores de PDI das partículas dos ensaios 6, 7 e 8, foram de $0,457 \pm 0,158$, $0,291 \pm 0,009$ e $0,212 \pm 0,005$, respetivamente.

Comparando os ensaios 3 e 6, foi possível constatar a eficácia da maioria das alterações ao procedimento, com exceção da alteração do estabilizante, uma vez que em ambos os ensaios o estabilizante utilizado foi o PVA.

Assim, verificou-se que modificando apenas a agitação, foi possível obter nanopartículas de um tamanho mais adequado, ou seja passou-se de partículas com tamanho de $47,93 \pm 0,88$ nm para partículas com tamanho de $95,51 \pm 30,85$ nm.

Adicionalmente, obteve-se um PDI aceitável, tendo-se para o ensaio 3 um valor de $0,915 \pm 0,017$, enquanto para o ensaio 6 foi de $0,457 \pm 0,158$. Apesar desta melhoria nos resultados, as alterações na agitação não foram suficientes, uma vez que as partículas obtidas no ensaio 6 apresentavam um PDI próximo do limite superior estabelecido e um elevado desvio padrão associado aos valores obtidos para o tamanho e o PDI.

Comparando os ensaios 6 e 8 pretendeu-se analisar a eficácia do novo estabilizante, Span® 85 face ao PVA. Assim, no ensaio 6 foi utilizado PVA e no ensaio 8 foi utilizado Span® 85.

Analisando o tamanho das partículas de ambos ensaios é evidente que as partículas do ensaio 8 se encontram mais próximas dos objetivos estabelecidos.

Apesar das partículas do ensaio 6 terem aumentado de tamanho com a modificação processual, $95,51 \pm 30,85$ nm, o desvio padrão foi muito elevado e o valor de PDI foi muito elevado indiciando que a solução de nanopartículas não era monodispersa, existindo populações de nanopartículas de tamanhos distintos.

As partículas do ensaio 8 apresentaram um tamanho de $208,20 \pm 4,42$ nm para um PDI de $0,212 \pm 0,005$. Por isso, face aos resultados do ensaio 6, a utilização de Span® 85 como estabilizante apresentou-se como uma melhor solução.

Comparando os ensaios 1 e 7, foi possível avaliar, de uma forma global, o efeito das modificações nos ensaios cujo polímero usado foi o Eudragit® L100-55.

Os resultados das análises de DLS obtidos no ensaio 1, após a 3ª centrifugação, encontravam-se dentro dos valores pretendidos, $242,7 \pm 4,45$ nm para um PDI de $0,190 \pm 0,009$. Contudo, com os resultados do ensaio 7, foi possível comprovar que, para além do novo procedimento ter sido bastante eficaz, é desnecessário recorrer a qualquer centrifugação para obter um resultado aceitável, sendo o tamanho das partículas obtidas no ensaio 7 de $159,43 \pm 2,52$ nm com um PDI de $0,291 \pm 0,009$.

Globalmente, procedeu-se à comparação dos ensaios 3 e 8, para avaliar a influência da alteração de todos os parâmetros simultaneamente, nos ensaios envolvendo o polímero Eudragit® E PO.

Analisando os valores obtidos para o ensaio 3, $47,93 \pm 0,88$ nm com PDI de $0,915 \pm 0,017$, e para o ensaio 8, $208,20 \pm 4,42$ nm com PDI de $0,212 \pm 0,005$, facilmente se constatou que o novo procedimento permitiu obter nanopartículas com um tamanho e uniformidade superiores.

A estabilidade das nanopartículas foi avaliada por ELS, apresentando-se os valores para os ensaios 6, 7 e 8 na Figura 19.

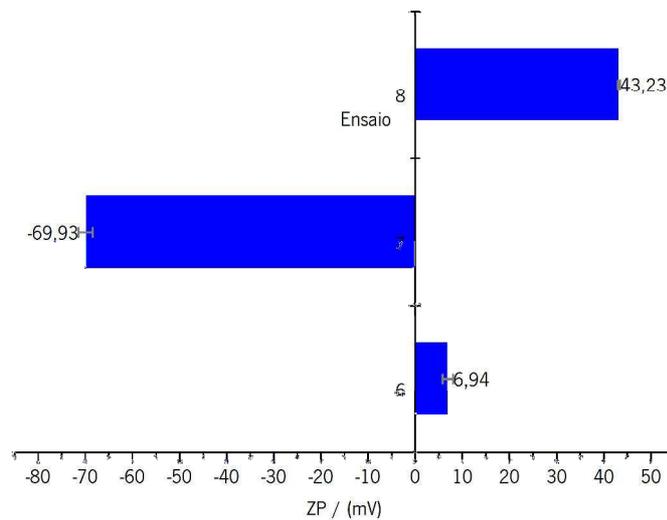


Figura 19 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 6, 7 e 8. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

A comparação dos resultados de ELS dos ensaios 3 ($2,16 \pm 0,12$ mV) e 6 permitiram aferir do efeito do novo procedimento (com a exceção do uso de um estabilizante alternativo).

Este novo procedimento permitiu obter nanopartículas com um potencial zeta superior ao do ensaio 3 (potencial zeta das nanopartículas do ensaio 6 é de $6,94 \pm 1,11$ mV), no entanto foi ainda demasiado baixo. Neste sentido, apenas as alterações na agitação não foram suficientes para melhorar a estabilidade da solução.

Comparando os valores do potencial zeta obtidos para os ensaios 6 e 8, foi possível concluir qual o efeito do estabilizante na estabilidade da solução.

O valor de potencial zeta para a solução obtida no ensaio 8 foi $43,23 \pm 0,21$ mV, ou seja muito superior ao valor do ensaio 6, indicando que as nanopartículas são estáveis e fortemente catiónicas, correspondente à carga do polímero (Eudragit® E PO) (Sauer & McGinity, 2009), e por isso não tendem a agregar (Clogston & Patri, 2011). Verificou-se ainda que, por si só, a introdução de um novo estabilizante originou resultados muito melhores em termos de estabilidade das partículas sintetizadas.

Analisando o valor de potencial zeta para o ensaio 7, verificou-se que o valor obtido ($-69,93 \pm 1,50$ mV) se traduziu na obtenção de nanopartículas bastante estáveis e sem tendência a agregar. No entanto, neste caso como estamos perante um polímero aniônico (Eudragit® L100-55), (Evonik Industries, 2012), obtiveram-se nanopartículas fortemente aniônicas (Clogston & Patri, 2011). Comparando os resultados dos ensaios 6 (novo procedimento mas com PVA) e 8 (novo procedimento com Span® 85), foi possível verificar que a modificação de estabilizante contribuiu, em grande parte, para a obtenção de nanopartículas com tamanhos mais aceitáveis e mais estáveis.

Comparando ainda os ensaios 3 e 8 foi possível avaliar todos os parâmetros simultaneamente. Verificou-se que o novo procedimento foi bastante mais eficiente, dado que para o ensaio 3 se obteve um potencial zeta bastante mais baixo do que o valor registado para o ensaio 8, constatando-se que o novo procedimento permitiu sintetizar nanopartículas muito mais estáveis. Como já foi referido, as nanopartículas sintetizadas e depois liofilizadas no ensaio recorrendo a PVA (ensaio 3) demonstraram que estruturalmente o PVA se sobrepunha ao polímero em estudo e por isso a liofilização das nanopartículas não resultava no produto pretendido.

Nesse sentido, este foi outro aspeto a considerar aquando da substituição do PVA. Na Figura 20, encontra-se uma ilustração do produto de liofilização do ensaio 6, constatando-se que o aspeto do produto não advinha do processo de síntese em termos globais, mas especificamente da utilização do PVA como estabilizante.

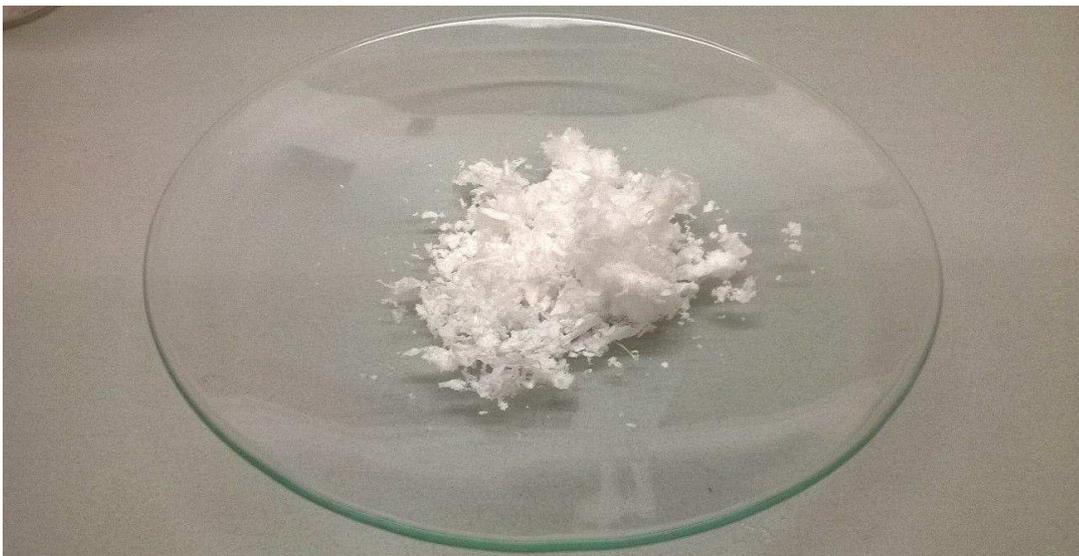


Figura 20 – Nanopartículas sintetizadas no ensaio 6 após liofilização.

As nanopartículas do ensaio 6 apresentaram o mesmo aspeto das nanopartículas do ensaio 3, indicando que apesar das modificações na agitação, o facto do estabilizante ser o PVA resultou num produto final ainda distante do pretendido.

Apesar de não existirem imagens do ensaio 7 (Eudragit® L100-55) e 8 (Eudragit® E PO), foi possível registar que o aspeto das nanopartículas era distinto (pó fino) do apresentado na Figura 20, corroborando as conclusões anteriormente avançadas relativamente ao sucesso da obtenção e nanopartículas com o novo procedimento, e em particular com a modificação do estabilizante. Em ensaios posteriores, nomeadamente os ensaios 9, 10, 11 e 12 (Figura 21), nos quais se usou o Span® 85, foi possível observar imagens do produto final totalmente distintas das ilustradas nas Figura 17 e Figura 20.

Observando a Figura 21, verificou-se que, ao contrário dos ensaios 10, 11 e 12, nos quais foi possível obter um produto liofilizado de acordo com o pretendido (pó fino), no ensaio 9, a liofilização das nanopartículas de Eudragit® E PO com ibuprofeno incorporado resultou num produto na forma de gel. Este resultado poderá ser indicativo de uma reestruturação do polímero aquando da liofilização devido à presença do ibuprofeno, mais especificamente durante a etapa de congelamento, uma vez que para as nanopartículas de Eudragit® E PO sem ibuprofeno incorporado (ensaio 10) e para as nanopartículas de Eudragit® L100-55 com e sem ibuprofeno incorporado (ensaio 11 e 12, respetivamente) a liofilização ocorreu como o esperado.

É de salientar que este fenómeno, i.e. formação de gel aquando da liofilização, já havia sido observado no ensaio 5 (realizado nas condições do procedimento modificado com incorporação de ibuprofeno), do qual não existiu registo fotográfico. No entanto, como este ensaio foi o primeiro em que se introduziu o processo de liofilização e o mesmo não ocorreu de acordo com o desejado por falhas de corrente, esse resultado foi desvalorizado.



Figura 21 – Nanopartículas sintetizadas nos ensaios 9, 10, 11 e 12 após liofilização (ensaios numerados da esquerda para a direita).

No caso de nanopartículas contendo um fármaco incorporado, o processo de liofilização pode ser ligeiramente comprometido, uma vez que este processo pode induzir a deslocação do fármaco do interior das nanopartículas (Abdelwahed et al., 2006).

Durante o congelamento das nanopartículas, a água cristaliza ao mesmo tempo que a concentração do fármaco dissolvido na água aumenta até ao ponto em que apresenta as propriedades de um sólido (eutético). Com o aumento da concentração do fármaco na água ocorre a redução do potencial zeta da solução e por consequência ocorre um aumento na tendência de agregação das partículas (Abdelwahed et al., 2006). Esta agregação de partículas pode ser o fator que levou aos rearranjos da estrutura das nanopartículas aquando do congelamento, originando um gel em vez de um pó.

Na figura apresentam-se as fotografias correspondentes aos ensaios 13, 14, 15, 16, 17 e 18. Uma vez que foram realizados uma série de novos ensaios (Figura 22), apresentam-se as suas fotografias por forma a sustentar os resultados obtidos no ensaio 9.



Figura 22 – Nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13, 14, 15, 16, 17 e 18 após liofilização.

Os ensaios com Eudragit® E PO sem ibuprofeno incorporado (ensaio 13) e com Eudragit® L100-55 sem e com ibuprofeno incorporado (ensaio 17 e ensaio 18) resultaram em nanopartículas corretamente liofilizadas. Enquanto os ensaios 14, 15 e 16, com Eudragit® E PO e ibuprofeno incorporado, formaram gel na liofilização.

Uma solução para ultrapassar este problema na liofilização seria recorrer a um congelamento mais rápido do que aquele efetuado, uma vez que um congelamento rápido sem adição de um crioprotetor em nanopartículas catiónicas, como é caso do Eudragit® E PO, resultaria na menor agregação das partículas e por isso poderia resultar na formação de pó (Abdelwahed et al., 2006).

4.2 Caracterização Física e Química das Nanopartículas

Após a otimização do processo de síntese, foram efetuados 10 ensaios que foram utilizados para caracterização das nanopartículas sintetizadas neste trabalho.

Nesta seção encontram-se compilados os resultados das análises de caracterização das nanopartículas, nomeadamente, análise termogravimétrica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, tamanho e potencial zeta, análise estrutural e morfológica.

4.2.1 Análise Termogravimétrica

Numa primeira etapa, realizou-se a análise TGA dos polímeros puros e fármaco, para avaliar a estabilidade dos materiais de acordo com as perdas de massa que ocorrem quando esses materiais são expostos a temperaturas elevadas.

Os gráficos com a curva de perda de massa e a primeira derivada associada permitiram identificar as perdas de massa e avaliar com clareza os intervalos de temperaturas correspondentes a essas perdas, sendo ainda possível inferir, para determinadas perdas ou ganhos, qual o evento térmico associado, de acordo com as temperaturas de ocorrência do mesmo.

Posteriormente, compararam-se as curvas termogravimétricas dos compostos no estado puro com as curvas obtidas para as nanopartículas sem e com ibuprofeno, permitindo inferir quaisquer alterações resultantes da presença do ibuprofeno.

a. Caracterização dos polímeros e fármaco puro

Na Figura 23 apresenta-se a curva do TGA para o polímero Eudragit® L100-55, assim como a primeira derivada da curva de perda de massa de modo a identificar a perda máxima.

A curva da análise termogravimétrica do Eudragit® L100-55 apresentou uma massa residual para os 900 °C, temperatura final do ensaio, de 0,35 %.

A primeira perda foi de 3,48 % entre os 19 °C e os 85 °C e resultou da perda de humidade presente no polímero (Parikh et al., 2014).

A partir dos 185 °C verificou-se que o polímero deixa de ser estável (Aguilar et al., 2015), evidenciando-se uma perda inicial de massa de 8,21 % em torno dos 200 °C, associada à decomposição da cadeia lateral do polímero (Hughey et al., 2010; Petereit & Weisbrod, 1999) e à conversão dos ácidos metacrilatos em anidros por rearranjos estruturais e perda de água (Lin, Liao, & Hsiue, 1995).

Seguiu-se uma perda mais significativa e acentuada no intervalo dos 328 °C e 434 °C de 79,11 %, associada a reações de despolimerização ou ligações cruzadas da cadeia principal (Petereit & Weisbrod, 1999; Sauer, 2008). Por fim, surgiu uma perda de massa de aproximadamente 8 % na gama dos 500 °C a 589 °C.

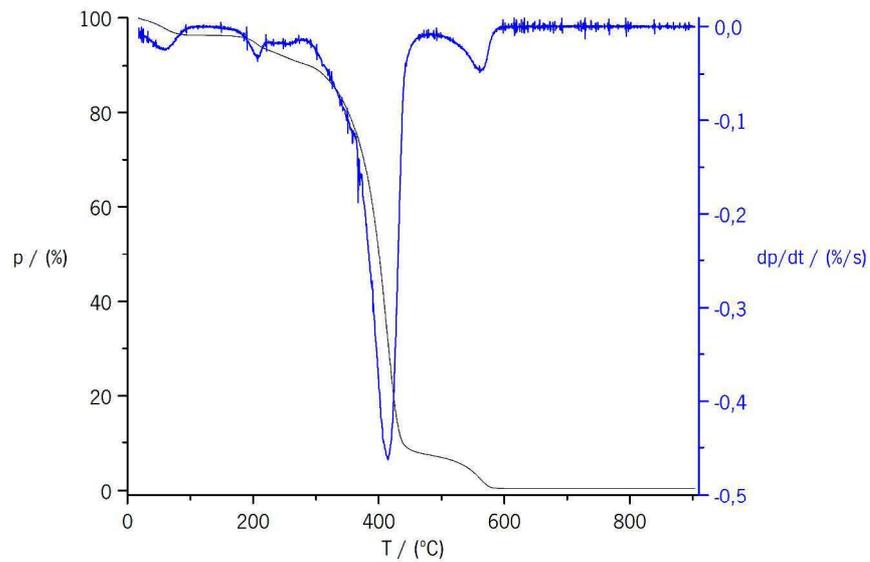


Figura 23 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do Eudragit® L100-55, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura 24 apresenta-se a curva do TGA para o polímero Eudragit® E PO, assim como a primeira derivada da curva de perda de massa.

A curva da análise termogravimétrica do Eudragit® E PO apresentou uma massa residual de 0,65 % para os 900 °C, temperatura final do ensaio.

O polímero em análise sofreu uma perda de massa em forma de múltiplos eventos de decomposição (Dantu, Devi, Hari, & Mill, 2012), sendo que num primeiro instante apresentou uma perda de 26,5 % a partir dos 277 °C e até aos 336 °C, uma segunda perda de 50,35 % a partir dos 388 °C e até aos 454 °C, e por fim um último evento de perda de massa relacionada com a decomposição do polímero de 9,46 % entre os 454 °C e os 613 °C.

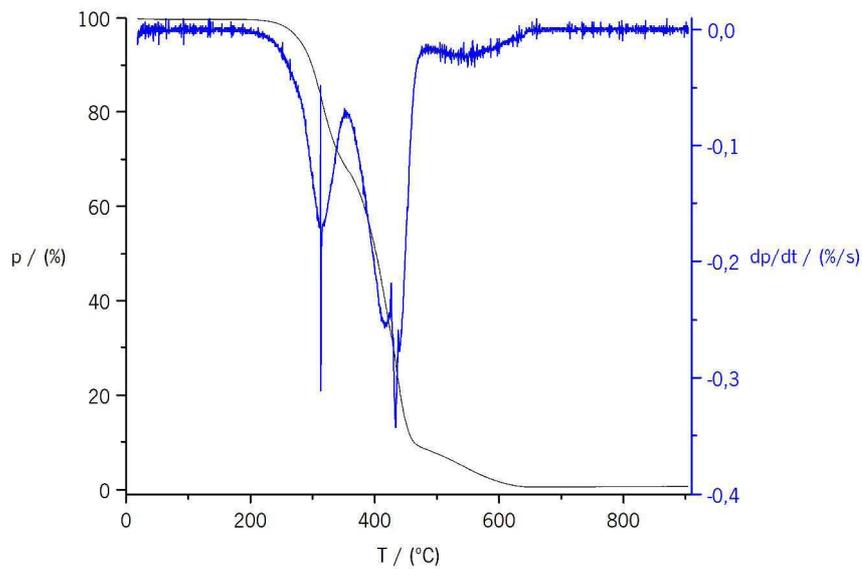


Figura 24 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do Eudragit® E PO, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura 25 apresenta-se a curva do TGA para o ibuprofeno, bem como a primeira derivada da curva de perda de massa.

A curva da análise termogravimétrica do ibuprofeno apresentou apenas uma perda de peso, sendo a massa residual de 0,11 % para a temperatura final de ensaio de 900 °C.

O fármaco apresentou uma estabilidade térmica até aos 194 °C, sendo que a única perda de massa foi de 99,79 % a partir dos 194 °C e até 312 °C, resultante da decomposição do fármaco por combustão (Ramukutty & Ramachandran, 2012). Nesse intervalo encontra-se o ponto de ebulição do ibuprofeno (Ramukutty & Ramachandran, 2012), que é 228 °C.

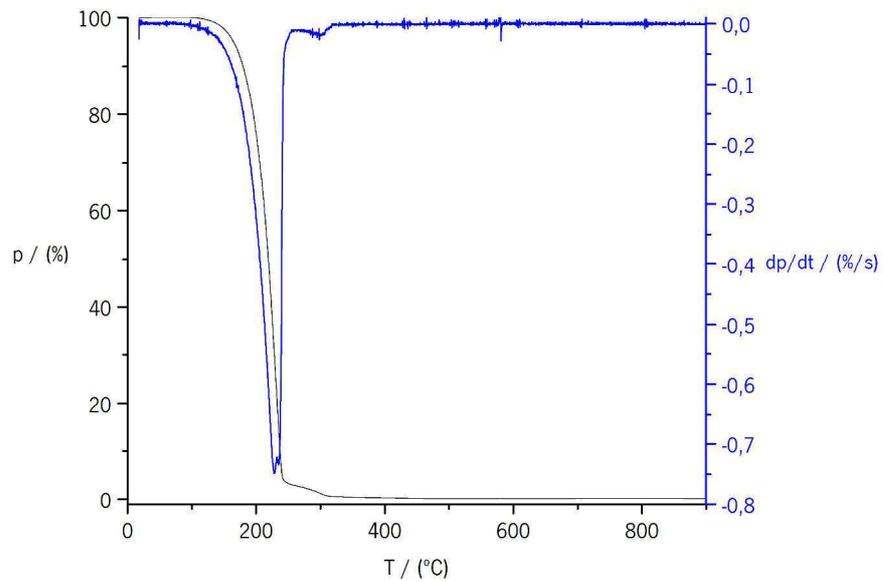


Figura 25 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) do ibuprofeno, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

b. Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO

Nesta secção foram analisados todos os ensaios nos quais o polímero utilizado foi o Eudragit® E PO.

Na Figura 26 encontra-se a curva termogravimétrica do polímero Eudragit® E PO, do ibuprofeno e das nanopartículas resultantes dos ensaios 9 e 10, tratando-se de nanopartículas com ibuprofeno incorporado e nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, respetivamente.

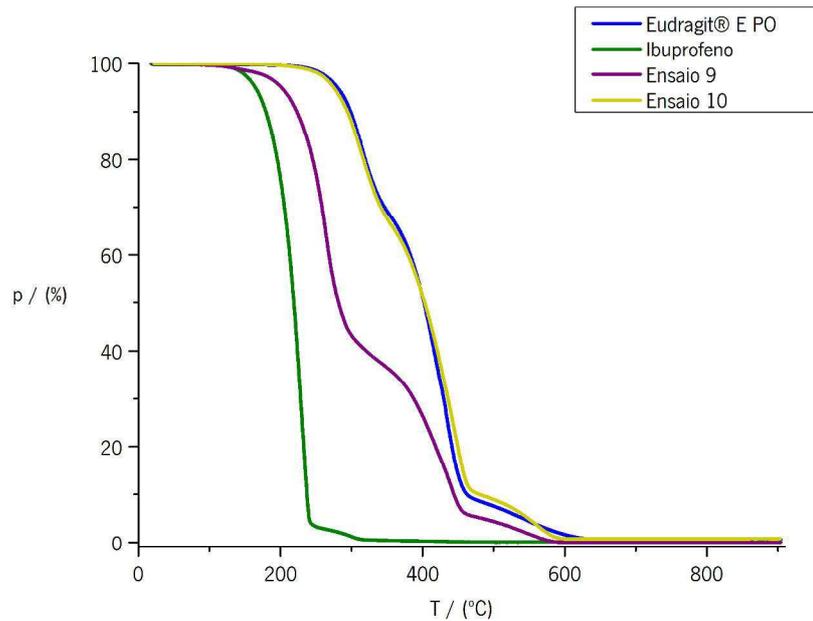


Figura 26 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® E PO e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 9 e 10, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).

No primeiro instante, analisando a curva do polímero puro em comparação com as nanopartículas sem ibuprofeno (ensaio 10), foi possível constatar que não existiram quaisquer alterações estruturais e químicas no polímero durante o processo de síntese, sendo a estabilidade térmica (276 °C) e decomposição térmica das nanopartículas idêntica à estabilidade (277 °C) e decomposição do polímero puro, ocorrendo uma perda de massa na forma de múltiplos eventos de decomposição tal como o polímero puro, verificando-se uma massa residual aos 900 °C de 0,78 %.

No que diz respeito ao ensaio 9, no qual foi utilizado ibuprofeno, foi evidente que o perfil da curva não era semelhante à curva do polímero puro, possuindo um formato revelador da presença do ibuprofeno, i.e. como as nanopartículas contêm ibuprofeno, e este composto possui uma estabilidade térmica inferior (194 °C) à estabilidade térmica do polímero (277 °C), a curva das nanopartículas apresentou um patamar inicial correspondente à degradação do ibuprofeno. No entanto, como o fármaco se encontrava no interior das nanopartículas, o polímero atuou como protetor térmico e, assim, a degradação do ibuprofeno surgiu apenas à temperatura de 230 °C em vez de 194 °C, temperatura de degradação característica do composto puro.

O segundo patamar evidenciado na Figura 26 para o ensaio 9, correspondeu à degradação do polímero. O aumento da estabilidade do ibuprofeno já foi referido na literatura para outros materiais contendo o ibuprofeno incorporado (Zhang et al., 2014).

Através da análise da curva termogravimétrica do ensaio 9 foi possível ainda determinar a quantidade de ibuprofeno presente nas nanopartículas, tendo em conta a percentagem de massa degradada e a quantidade que foi utilizada na síntese.

Sabe-se que as quantidades de polímero e ibuprofeno utilizadas seguiram uma estequiometria 1:1, logo, teoricamente, no gráfico ter-se-ia uma perda de massa inicial, associada ao ibuprofeno, de aproximadamente 50 %, sendo a restante relativa ao polímero.

Pela análise do gráfico, verificou-se que a quantidade incorporada nas nanopartículas teria sido de aproximadamente 54 %. No entanto, este valor foi superior àquele que incorporamos e por isso foi possível inferir que esta percentagem determinada não correspondeu exclusivamente à degradação do ibuprofeno, existindo também degradação do polímero.

O Eudragit® E PO puro possuiu uma decomposição em múltiplos eventos (Figura 24), sendo que a primeira etapa de perda de massa se iniciou em torno dos 277 °C, valor muito próximo do início da perda de massa das nanopartículas do ensaio 9 (230 °C). Este facto foi comprovado através da comparação da derivada da curva perda de massa dos ensaios 9 e 10 providenciada no Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaios Realizados, Figura All.1 e Figura All.2, respetivamente; e da curva da derivada da perda de massa do polímero puro (Figura 24).

Dessa comparação constatou-se a ausência na curva do ensaio 9 do primeiro pico de derivada da degradação do polímero puro, presente no ensaio 10 (nanopartículas sem ibuprofeno incorporado), o que permite denotar que essa degradação inicial ocorreu simultaneamente com a degradação do ibuprofeno. Assim, não foi possível afirmar perentoriamente qual a quantidade de ibuprofeno incorporada, inferindo-se apenas, em termos relativos, que o fármaco foi incorporado nas nanopartículas.

Com base nestes resultados, procurou estudar-se a incorporação de diferentes quantidades de ibuprofeno nas nanopartículas de Eudragit® E PO. Para tal, realizaram-se os ensaios 13, 14, 15 e 16.

O ensaio 13 corresponde a nanopartículas sem ibuprofeno incorporado enquanto os restantes ensaios correspondem a nanopartículas com ibuprofeno com razões de polímero:fármaco diferentes, sendo elas 1:0,5, 1:1 e 1:2, respetivamente, para os ensaios 14, 15 e 16.

Na Figura 27 encontra-se a curva termogravimétrica do polímero Eudragit® E PO, do ibuprofeno e das nanopartículas resultantes dos ensaios 13, 14, 15 e 16.

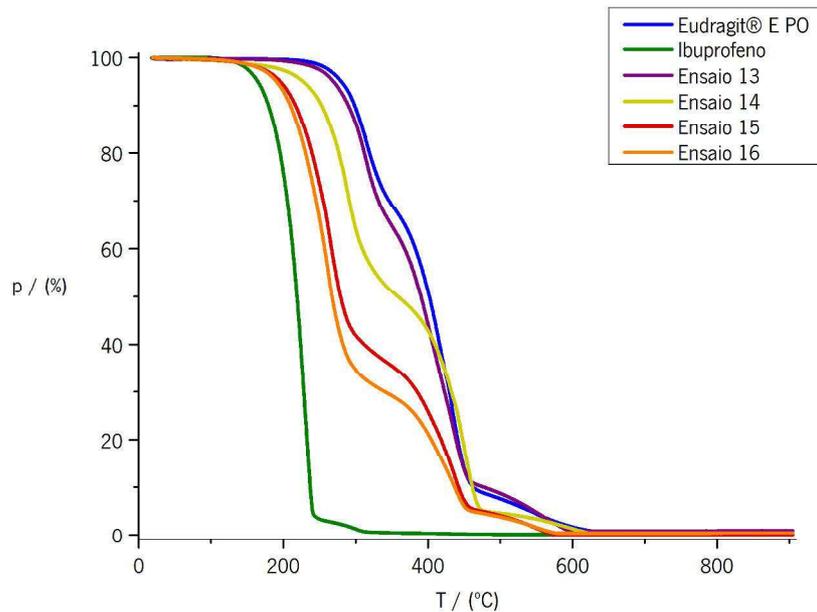


Figura 27 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® E PO e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 13, 14, 15 e 16, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).

Mais uma vez foi possível constatar, pela análise da curva do polímero puro em comparação com as nanopartículas sem ibuprofeno (ensaio 13), que a decomposição térmica das nanopartículas ocorreu exatamente da mesma forma que a decomposição do polímero puro.

Foi possível observar uma perda de massa na forma de múltiplos eventos de decomposição tal como para o polímero puro, verificando-se uma massa residual aos 900 °C de 0,89 %. Para além disso, a estabilidade térmica das nanopartículas do ensaio 13 e polímero puro foi idêntica uma vez que as nanopartículas se mantiveram estáveis até aos 277 °C.

O segundo aspeto que foi possível ser observado na Figura 27 foi que, com o aumento da concentração de ibuprofeno, o primeiro patamar de perda de massa, associado à degradação do ibuprofeno, aproximou-se da curva termogravimétrica do fármaco.

A temperatura de estabilidade térmica diminuiu com o aumento da concentração de ibuprofeno incorporado, sendo a temperatura para o ensaio 14, 15 e 16 de 246 °C, 222 °C e 215 °C, respetivamente, facto explicado pela maior quantidade de ibuprofeno face à quantidade de polímero. Neste sentido, foi possível concluir que as concentrações mais elevadas de ibuprofeno tiveram impacto na estabilidade das nanopartículas sintetizadas.

Assim, teoricamente, para o ensaio 14, a massa de fármaco incorporado foi de cerca de 33 % face a 67 % de polímero. No entanto, graficamente verificou-se uma perda inicial de massa associada à degradação do ibuprofeno de 36 %, mais uma vez este valor excedeu a quantidade de ibuprofeno

que teoricamente havia sido incorporada, indiciando a interferência de uma degradação inicial do polímero no resultado observado.

Assim como para o ensaio 9, foi também possível verificar esse facto pela análise da curva da derivada da perda de massa para o ensaio 14 presente no Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaio Realizados, Figura All.6, comparativamente, com o ensaio 13, as nanopartículas sem ibuprofeno (Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaio Realizados, Figura All.5), e com o polímero puro (Figura 24).

No caso do ensaio 15, o rácio de polímero e fármaco foi de 1:1, logo graficamente seria de esperar observar-se uma perda inicial de cerca de 50 %, correspondente à degradação do ibuprofeno. No entanto, verificou-se que a perda inicial foi de 54 %, valor que excedeu a quantidade teórica de ibuprofeno incorporada. Este facto pode estar associado a uma degradação inicial do polímero, como foi anteriormente explicado.

Também neste caso, a comparação da derivada da perda de massa do ensaio 15 (Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaio Realizados, Figura All.7) com a derivada das nanopartículas sem ibuprofeno e do polímero puro permitiu constatar que o pico associado à primeira etapa de degradação do polímero puro ocorreu simultaneamente com a degradação do ibuprofeno presente nas nanopartículas.

No último ensaio realizado com Eudragit® E PO (ensaio 16) utilizou-se duas vezes mais quantidade de ibuprofeno (67 %) do que quantidade de polímero (33 %).

A perda de massa inicial, associada à degradação de ibuprofeno, foi de 64 %, contrariamente aos ensaios 14 e 15, este valor encontrava-se dentro do limite máximo de ibuprofeno incorporado (67 %). Esta situação pode ser justificada pelo facto de, com o aumento da quantidade de ibuprofeno, face à quantidade de polímero, o efeito da degradação do polímero apresentar menor influência em termos quantitativos. Em concomitância com esta suposição obteve-se uma temperatura de estabilidade para o ensaio 16 (215 °C) mais afastada da temperatura de estabilidade do polímero puro (277 °C).

A par disto, a sucessiva diminuição da temperatura de estabilidade das nanopartículas com o aumento da quantidade de ibuprofeno incorporada também indicou uma menor influência do polímero sob o comportamento de decomposição das nanopartículas.

c. Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55

Neste ponto foram caracterizados os ensaios realizados com o Eudragit® L100-55. Inicialmente realizou-se a análise dos ensaios 11 e 12 e posteriormente, face aos resultados obtidos nesses dois ensaios, procedeu-se à realização de um novo ensaio, com a incorporação de uma maior quantidade de ibuprofeno.

A título de curiosidade poderão ser consultadas as curvas termogravimétricas constituídas pela curva da perda de massa e derivada da curva de perda de massa de todos ensaios com Eudragit® L100-55 no Anexo II – Curvas Termogravimétricas e Derivadas Associadas para os Ensaios Realizados.

Na Figura 28 encontra-se a curva termogravimétrica do polímero Eudragit® L100-55, do ibuprofeno e das nanopartículas resultantes dos ensaios 11 e 12, tratando-se de nanopartículas com ibuprofeno incorporado e nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, respetivamente.

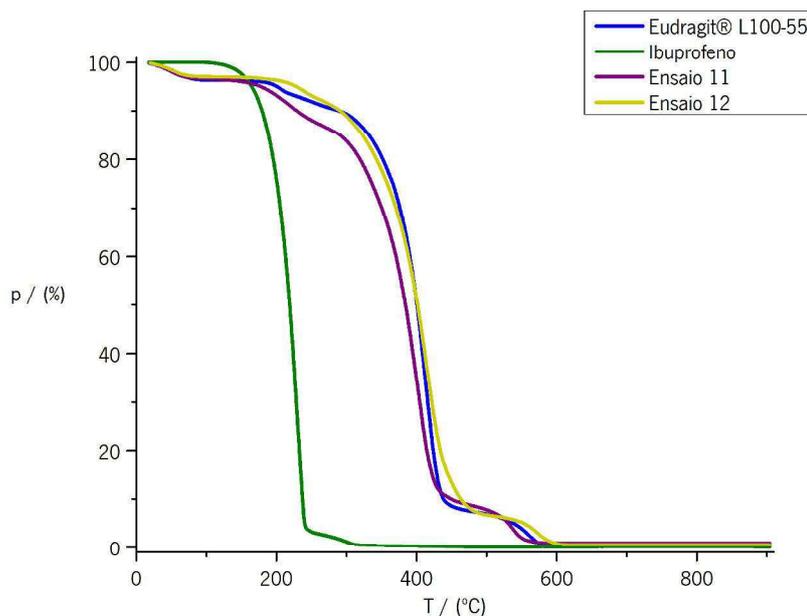


Figura 28 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® L100-55 e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 11 e 12, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

A primeira avaliação a fazer diz respeito à comparação das nanopartículas sem ibuprofeno (ensaio 12) com a curva termogravimétrica do polímero puro. Como foi possível constatar, a curva de perda de massa do ensaio 12 foi praticamente idêntica à curva de perda de massa do polímero puro, sendo a estabilidade térmica das nanopartículas de 206 °C enquanto a do polímero puro foi de 185 °C.

Apesar do valor de estabilidade ter sido ligeiramente díspar, o comportamento de degradação das nanopartículas foi bastante semelhante ao comportamento de degradação do polímero puro. No caso das nanopartículas existiu uma perda inicial devido à humidade presente, a maior perda de massa registada ocorreu entre as temperaturas de 364 °C e 444 °C, seguida de uma perda final em torno dos 550 °C e 592 °C e a massa residual aos 900 °C foi de 0,61 %. Todos estes eventos podem ser observados na curva termogravimétrica do polímero puro com pequenas variações nas temperaturas de ocorrência das mesmas.

Em relação ao ensaio 11, no qual foi incorporado ibuprofeno, o objetivo seria verificar a formação de dois eventos de degradação distintos, associados à degradação de ibuprofeno e polímero. Contudo, não foi possível distinguir e determinar a quantidade de ibuprofeno, pois as estabilidades térmicas do ibuprofeno e polímero puro revelaram-se bastante próximas, 194 °C e 185 °C, respetivamente (Forrest, 2008). Existindo apenas, um proeminente patamar entre os 179 °C e os 356 °C (com perda de massa associada de 18 %) que não é possível ser atribuído à degradação de nenhum dos compostos concisamente.

Apesar de se verificar um ligeiro patamar na curva do ensaio 11, não foi possível fazer a quantificação do ibuprofeno incorporado uma vez que não foi possível afirmar que esse patamar corresponde efetivamente à degradação do fármaco. Este resultado poderá ser explicado pela incapacidade de quantificação devido à proximidade das estabilidades térmicas.

Outra hipótese a considerar poderá ser a incapacidade de incorporar o ibuprofeno em nanopartículas de Eudragit® L100-55, uma vez que se tratam de partículas com mesma carga elétrica (Evonik Industries, 2012; Patel et al., 2013; Weller, 2013). As forças de repulsão entre fármaco e polímero podem ter sido superiores àquelas intrínsecas à síntese, existindo assim a possibilidade de não ter sido exequível sintetizar nanopartículas com ibuprofeno através deste procedimento.

Com base nesta discussão, realizou-se um ensaio em que a quantidade de ibuprofeno foi bastante superior à incorporada no ensaio 11, por forma a esclarecer a incapacidade de quantificação do ibuprofeno ou a incapacidade em sintetizar nanopartículas de Eudragit® L100-55 contendo ibuprofeno.

Na Figura 29 encontram-se as curvas termogravimétrica dos ensaios realizados assim como do polímero puro e ibuprofeno puro, sendo que o ensaio 17 corresponde às nanopartículas sem ibuprofeno e o ensaio 18 corresponde às nanopartículas com ibuprofeno.

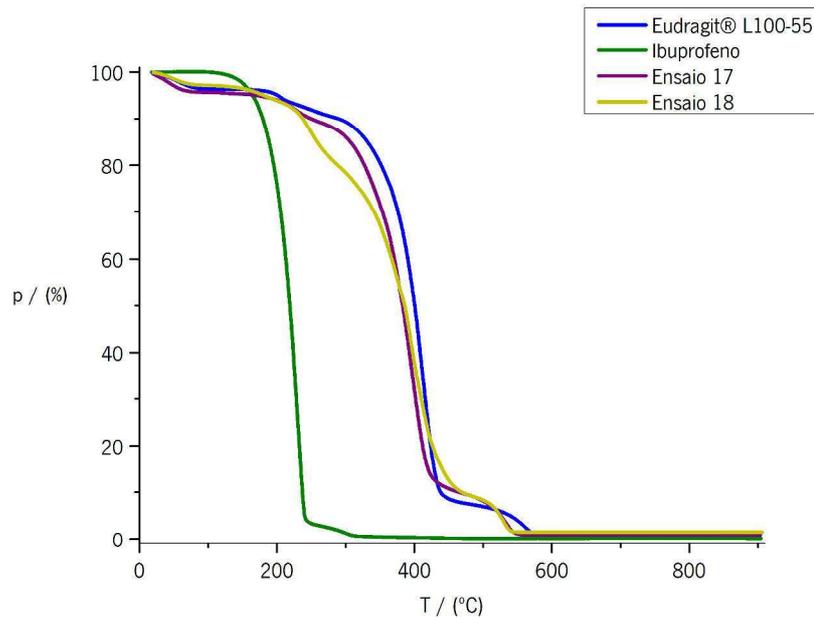


Figura 29 – Curva termogravimétrica dos compostos puros, Eudragit® L100-55 e ibuprofeno, e das nanopartículas liofilizadas do ensaio 17 e 18, com a perda de massa (p) em função da temperatura (T).

Pela análise da curva termogravimétrica do ensaio 17, tal como foi verificado para o ensaio 12, o comportamento de degradação das nanopartículas sem ibuprofeno foi idêntico ao do composto puro.

A estabilidade térmica das nanopartículas do ensaio 17 foi de 199 °C, bastante próximo do valor da temperatura da estabilidade térmica do composto puro (185 °C). Quanto à restante curva, existiu inicialmente uma perda da massa associada à perda de água, seguindo-se o momento em que as nanopartículas deixaram de ser estáveis. A maior perda de massa foi registada entre os 307 °C e os 419 °C e por fim teve-se uma perda de massa inferior em torno dos 513 °C até aos 546 °C. A massa residual deste ensaio foi de 0,89 % para os 900 °C. O comportamento de degradação do polímero puro apresentou os mesmos eventos referidos mas com ligeiras variações na temperatura.

Para o ensaio 18, no qual foi incorporado ibuprofeno numa quantidade quatro vezes superior à quantidade de polímero, não foi possível observar a presença do mesmo, eliminando-se portanto a hipótese de que a quantidade de ibuprofeno tinha sido insuficiente para se verificar resultados na curva termogravimétrica.

A impossibilidade de determinar quantitativamente o ibuprofeno persistiu devido à proximidade da estabilidade térmica do ibuprofeno e polímero. Contudo, não foi possível excluir a existência de uma incompatibilidade entre ibuprofeno e polímero que limitou a síntese das nanopartículas, uma

vez que, apesar de não ser possível quantificar o ibuprofeno, observou-se um patamar de degradação inicial entre os 231 °C e os 342 °C para o ensaio 18 no valor de 20 %.

Esta hipótese foi posteriormente aprofundada com uma análise de FTIR para estes ensaios e ainda recorrendo aos ensaios de libertação efetuados a partir das nanopartículas deste polímero.

4.2.2 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de FTIR aos polímeros e fármaco utilizados no presente trabalho permitiu caracterizar e analisar possíveis interações, por comparação, após a síntese das nanopartículas e incorporação do ibuprofeno. Assim, as nanopartículas sintetizadas em 10 ensaios distintos (com Eudragit® E PO ou Eudragit® L100-55; com ou sem ibuprofeno) foram analisadas por FTIR.

O espectro obtido na análise de FTIR para cada composto puro permitiu identificar as suas bandas características. Neste sentido, foi possível por comparação com os espectros obtidos para as nanopartículas contendo ibuprofeno inferir o sucesso da incorporação, i.e. pela presença de bandas características do fármaco.

Adicionalmente, no caso de nanopartículas sem ibuprofeno, a comparação dos espectros das nanopartículas obtidas em condições distintas permitiu perceber que alterações podem ter ocorrido nas partículas.

a. Caracterização dos polímeros e fármaco puro

Na Figura 30 apresenta-se o espectro do FTIR para o polímero Eudragit® L100-55. Observaram-se a 1697 cm^{-1} as bandas correspondentes às vibrações da ligação C=O dos grupos ácido carboxílico. Verificaram-se ainda bandas correspondentes a vibrações características das ligações CH a 2983 cm^{-1} (Aguilar et al., 2015).

A 1383 cm^{-1} observaram-se bandas correspondentes a vibrações características da ligação simétrica N-O do grupo nitroso e a 1447 cm^{-1} observaram-se bandas correspondentes a vibrações características da ligação C-C do grupo alcano (Aguilar et al., 2015).

Verificaram-se ainda bandas correspondentes a vibrações características das ligações éster a 1256 cm^{-1} e 1156 cm^{-1} e bandas associadas a vibrações das ligações OH na gama de 2500 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} (Evonik Industries, 2012).

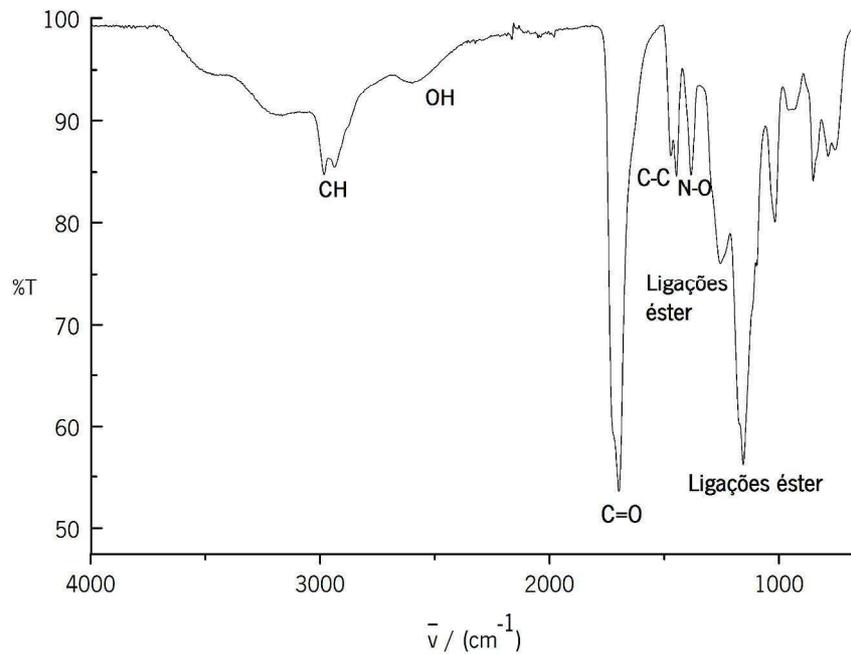


Figura 30 – Espectro de FTIR do Eudragit® L100-55 após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

Na Figura 31 apresenta-se o espectro do FTIR para o polímero Eudragit® E PO. A 2769 cm^{-1} e 2821 cm^{-1} observaram-se bandas características correspondentes aos grupos dimetilamino.

Verificaram-se ainda bandas correspondentes a grupos ésteres a 1144 cm^{-1} , 1239 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} e uma banda a 1723 cm^{-1} correspondente à vibração da ligação C=O do grupo éster. Para além das bandas enunciadas, verificaram-se ainda bandas relacionadas com as vibrações do grupo CHx a 1388 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} e 2949 cm^{-1} (Evonik Industries, 2014).

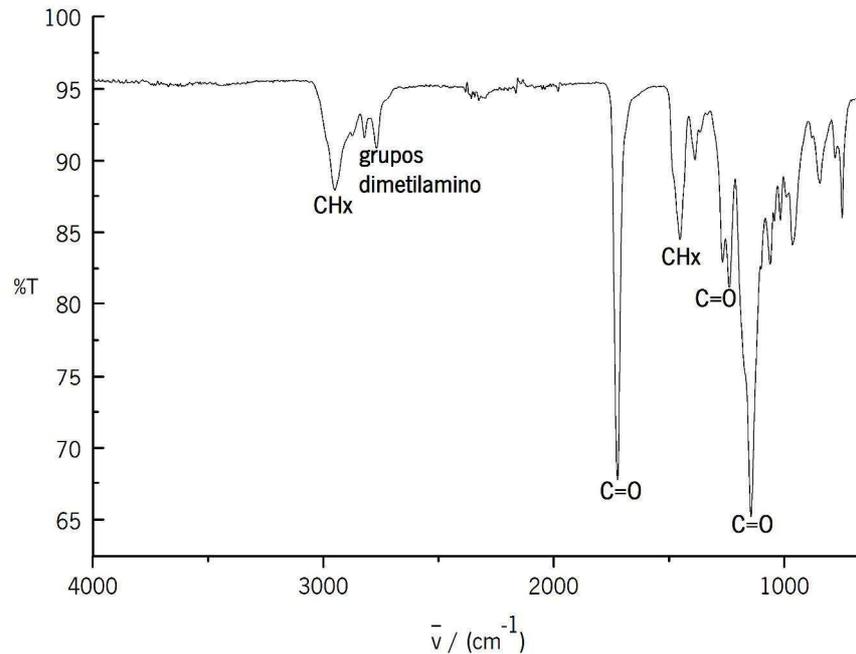


Figura 31 – Espectro de FTIR do Eudragit® E PO após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

As bandas características do espectro de transmitância do ibuprofeno encontram-se representadas no espectro de FTIR da Figura 32.

A 2954 cm^{-1} surgiu uma banda intensa correspondente ao alongamento assimétrico do grupo CH_3 e a 2870 cm^{-1} surgiu uma banda correspondente ao alongamento assimétrico do grupo CH_2 . A 1705 cm^{-1} , a 1507 cm^{-1} , a 1419 cm^{-1} , a 1321 cm^{-1} e a 1231 cm^{-1} surgiram bandas correspondentes a vibrações de alongamento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo carbonilo, a vibrações de alongamento da ligação $\text{C}=\text{C}$ dos grupos aromáticos, à deformação da ligação $\text{CH}-\text{CO}$, à deformação no plano do grupo OH e a vibrações de alongamento da ligação $\text{C}-\text{C}$, respetivamente (Gaikwad et al., 2013; Oberoi, 2004; Ramukutty & Ramachandran, 2012).

Para além destas bandas existiu ainda uma banda a 1073 cm^{-1} , correspondente à deformação no plano da ligação $=\text{C}-\text{H}$, uma banda a 866 cm^{-1} , correspondente à deformação fora do plano da ligação $\text{C}-\text{H}$ e uma banda a 779 cm^{-1} , correspondente à vibração do grupo CH_2 (Gaikwad et al., 2013; Oberoi, 2004; Ramukutty & Ramachandran, 2012).

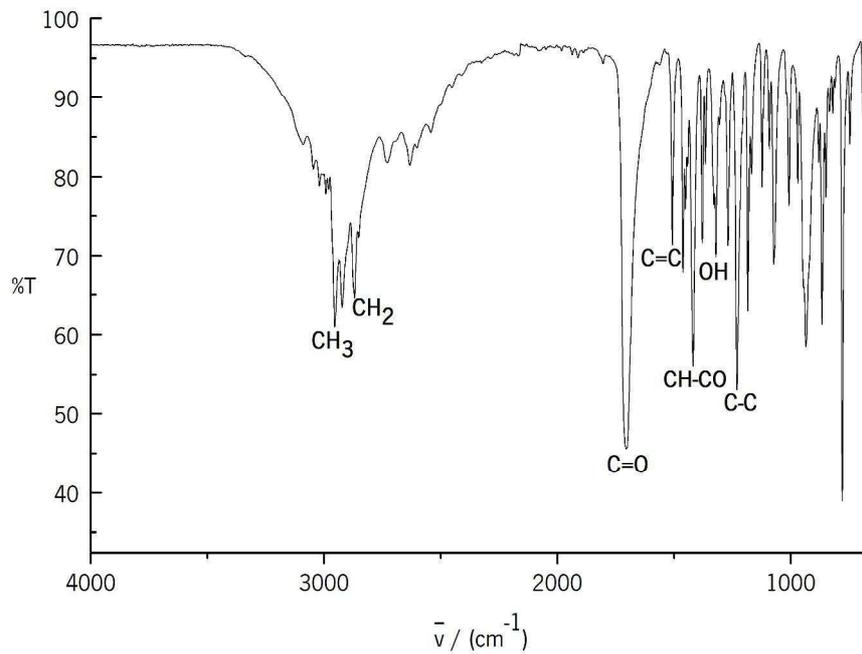


Figura 32 – Espectro de FTIR do Ibuprofeno após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

b. Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO

Como foi referido, através dos espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas foi possível avaliar a presença de ibuprofeno nas nanopartículas e determinar se as bandas características do polímero puro se modificaram, sugerindo um rearranjo das ligações aquando da síntese.

Na Figura 33 encontra-se o espectro de FTIR do polímero Eudragit® E PO e das nanopartículas resultantes dos ensaios 9 e 10, tratando-se de nanopartículas com ibuprofeno incorporado e nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, respetivamente.

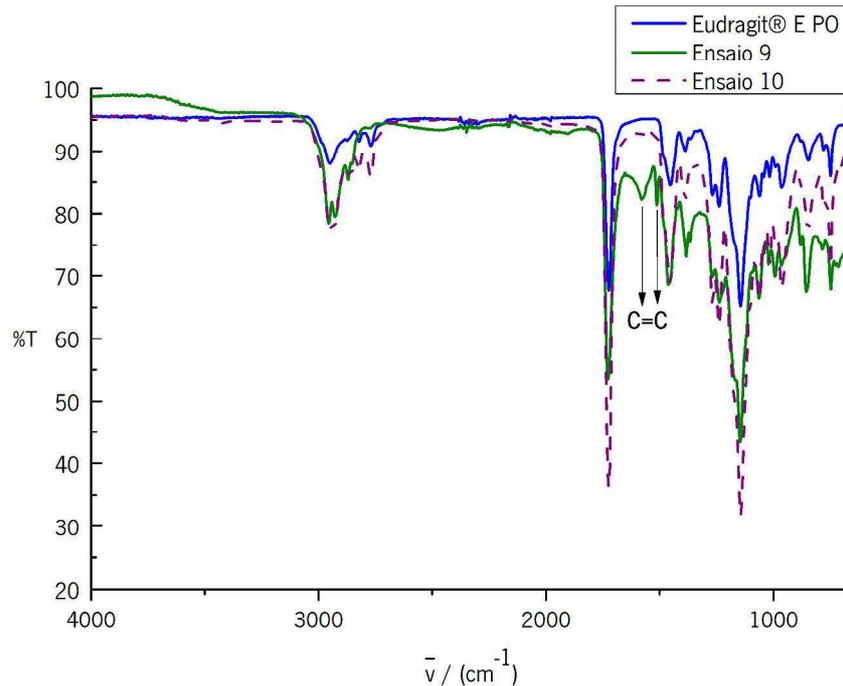


Figura 33 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 9 e 10, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

Avaliando primeiro o ensaio sem ibuprofeno (ensaio 10), constatou-se que as bandas características verificadas para o polímero puro coincidiram com as bandas das nanopartículas, não sendo formada nenhuma nova banda. Tendo sido possível inferir que durante o processo de síntese não existiram interações entre os reagentes, nem ocorreram, ou foram mínimas, as modificações nas ligações do polímero.

No que diz respeito ao ensaio 9, no qual foi incorporado ibuprofeno nas nanopartículas, verificou-se que a maioria das bandas características do ibuprofeno se encontrava sobreposta pelas bandas do polímero, e por isso não foi possível afirmar, a partir da análise dessas bandas, que o ibuprofeno havia sido incorporado. No entanto, existiram duas bandas que se destacaram, que não existiam no espectro do polímero puro e no espectro das nanopartículas sem ibuprofeno, sendo elas a 1579 cm⁻¹ e a 1512 cm⁻¹.

Avaliando estas bandas em comparação com as bandas características do ibuprofeno puro (Figura 32), foi possível avançar que, com ligeiras variações no número de onda, as bandas descobertas eram efetivamente devidas à presença de ibuprofeno. Adicionalmente, foi possível ainda supor que não existiu qualquer interação entre fármaco e polímero, tendo o fármaco sido incorporado como esperado.

Com base nestes resultados, foram realizadas análises posteriores de FTIR a nanopartículas de outros ensaios, tendo sido possível verificar a permanência ou não dessas bandas no espectro. Com essas novas análises, foi ainda possível avaliar se essas bandas teriam maior intensidade com o aumento da quantidade de ibuprofeno incorporado.

Nesse sentido, as Figura 34, Figura 35 e Figura 36 permitem comparar o espectro do polímero puro, nanopartículas sem ibuprofeno incorporado (ensaio 13) e nanopartículas com ibuprofeno incorporado do ensaio 14, 15 e 16. Na Figura 34 ilustra-se o espectro de FTIR do polímero Eudragit® E PO e das nanopartículas resultantes do ensaio 13 e 14.

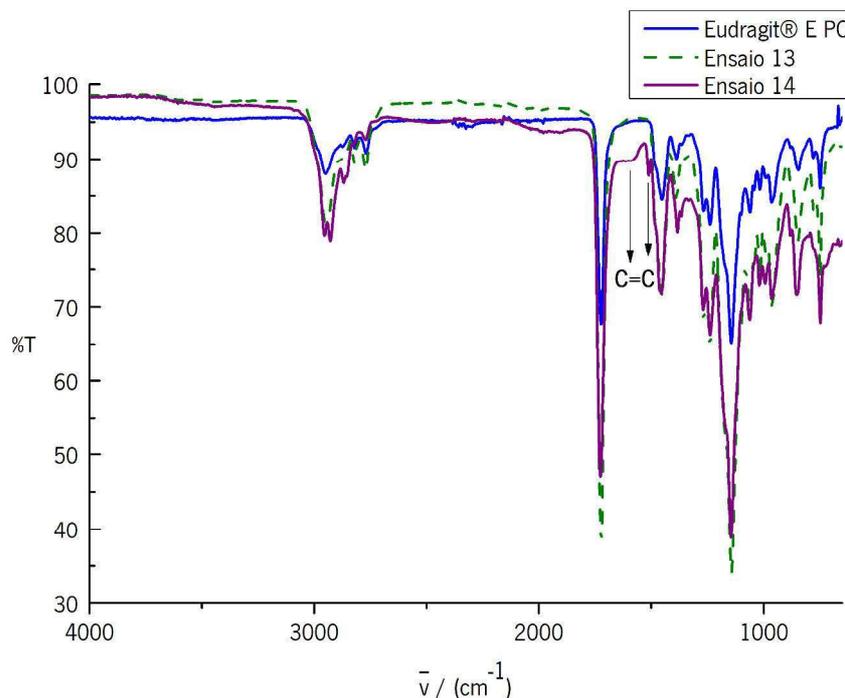


Figura 34 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 14, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

Mais uma vez, pela avaliação do ensaio correspondente às nanopartículas sem ibuprofeno incorporado (ensaio 13), constatou-se que as nanopartículas sintetizadas possuíam um espectro de FTIR praticamente idêntico ao espectro do polímero puro, tal como tinha sido verificado na análise do ensaio 10.

Avaliando o espectro do ensaio 14 na Figura 34, verificou-se, como foi referido para o ensaio 9, que, com exceção de duas novas bandas a 1592 cm^{-1} e a 1512 cm^{-1} , no restante espectro as bandas do polímero e fármaco se sobrepuseram.

De acordo com a literatura, as bandas características na zona dos 1600 cm^{-1} -1500 cm^{-1} são as mais importantes para identificação das vibrações associadas aos anéis aromáticos. Para além

disso, usualmente, as bandas nesta zona surgem aos pares, por vezes com alguma distância entre elas (Coates, 2000). Tendo isto em conta, e avaliando as bandas características do ibuprofeno e a estrutura química do ibuprofeno (Patel et al., 2013; Rainsford, 2012), foi possível afirmar que as bandas a 1592 cm^{-1} e 1512 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento da ligação C=C do anel aromático do fármaco, uma vez que o polímero não possui na sua constituição qualquer grupo aromático (Evonik Industries, 2014).

As próximas duas figuras serviram exclusivamente para analisar o espectro dos ensaios com ibuprofeno incorporado (ensaio 15 e 16), sendo que o espectro do ensaio 13 (nanopartículas sem ibuprofeno) foi incluído para efeitos de comparação. Assim, na Figura 35, encontra-se o espectro de FTIR do polímero puro, do ensaio 13 e do ensaio 15, cujas nanopartículas possuem ibuprofeno.

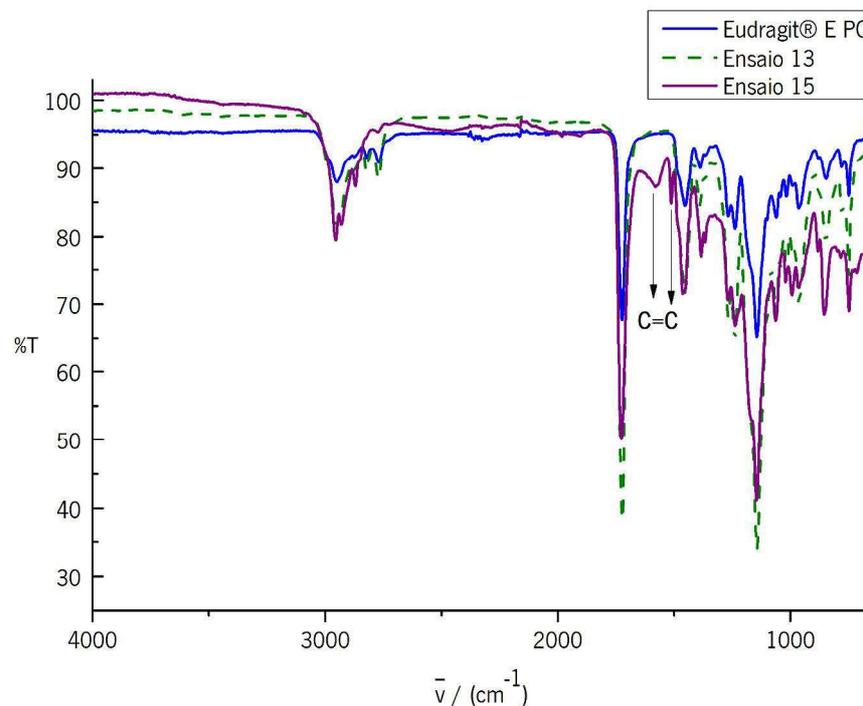


Figura 35 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 15, após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

Analisando o espectro do ensaio 15 na Figura 35, comprovou-se a hipótese avançada nos ensaios 9 e 14. As bandas reveladoras da presença de ibuprofeno nas nanopartículas sintetizadas surgiram a 1579 cm^{-1} e 1512 cm^{-1} . Este resultado foi igual ao obtido para o ensaio 9, o que poderá ser explicado pelo facto da quantidade de ibuprofeno incorporada em ambos os ensaios ter sido exatamente a mesma, enquanto para o ensaio 14, a quantidade de ibuprofeno incorporada foi metade da quantidade dos ensaios 9 e 15.

Supõe-se que a quantidade de ibuprofeno nas nanopartículas poderá ter influência na localização das bandas assim como na intensidade das mesmas, esta hipótese foi explorada posteriormente à apresentação dos resultados do ensaio 16.

Na Figura 36 encontra-se o espectro de FTIR do polímero puro, do ensaio 13 e do ensaio 16, cujas nanopartículas possuem ibuprofeno.

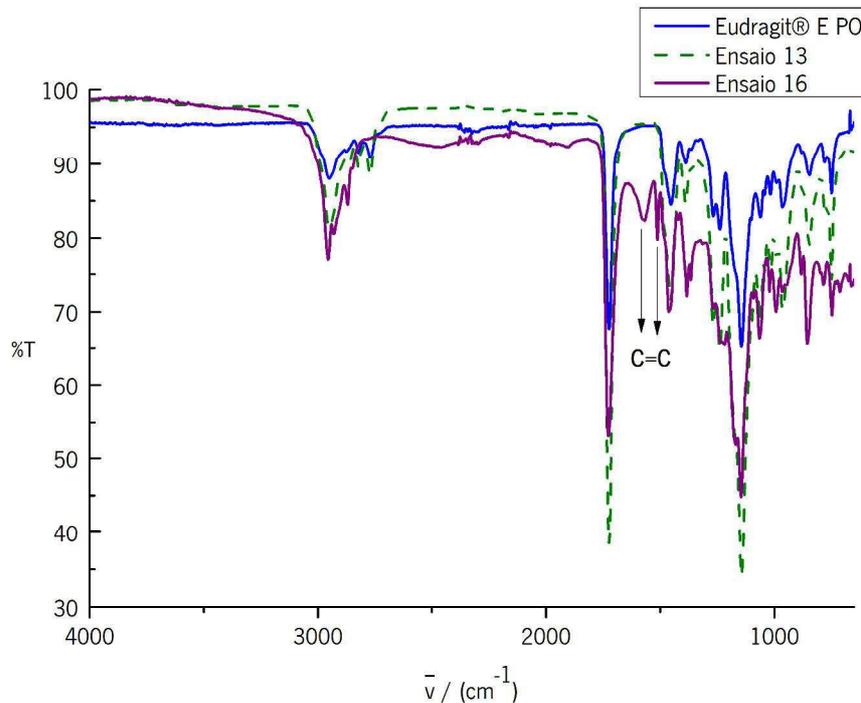


Figura 36 – Espectros de FTIR do Eudragit® E PO e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 13 e 16, após 16 varrimentos. Encontra-se assinaladas algumas bandas características.

Pela observação do gráfico da Figura 36, foi possível denotar-se as bandas relativas à presença do ibuprofeno, a 1568 cm^{-1} e 1512 cm^{-1} .

Observando globalmente os 3 ensaios com ibuprofeno (ensaios 14, 15 e 16) foi possível avaliar que as diferentes quantidades de ibuprofeno incorporadas reproduziram efeitos visíveis nas bandas de ibuprofeno identificadas.

Num primeiro instante, avaliando a posição das bandas identificadas, foi possível constatar que a quantidade não terá tido influência na posição da banda a 1512 cm^{-1} , uma vez que esta se manteve inalterada para o ensaio 14, 15 e 16 e ainda para o ensaio 9, mas poderá ter tido influência na posição da segunda banda, tendo em conta que esta se aproximou da banda a 1512 cm^{-1} . Para os ensaios 14, 15 e 16 a banda posicionou-se a 1592 cm^{-1} , 1579 cm^{-1} e 1568 cm^{-1} , respetivamente. Em relação à intensidade das bandas, salientou-se o facto do aumento da quantidade de ibuprofeno incorporada se ter traduzido no aumento da intensidade das bandas, tornando-se mais

definidas. Este resultado verificou-se para ambas as bandas identificadas como se pode constatar pela Figura AIII.1 do Anexo III – Espectros de FTIR. É de notar que os resultados obtidos para análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foram de encontro aos resultados da análise termogravimétrica.

c. Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55

Neste segmento foram caracterizados os ensaios em que se usou o polímero Eudragit® L100-55, procedendo-se à análise dos ensaios 11 e 12.

Na Figura 37 encontra-se o espectro de FTIR do polímero Eudragit® L100-55 e das nanopartículas resultantes dos ensaios 11 e 12, tratando-se de nanopartículas com ibuprofeno incorporado e nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, respetivamente.

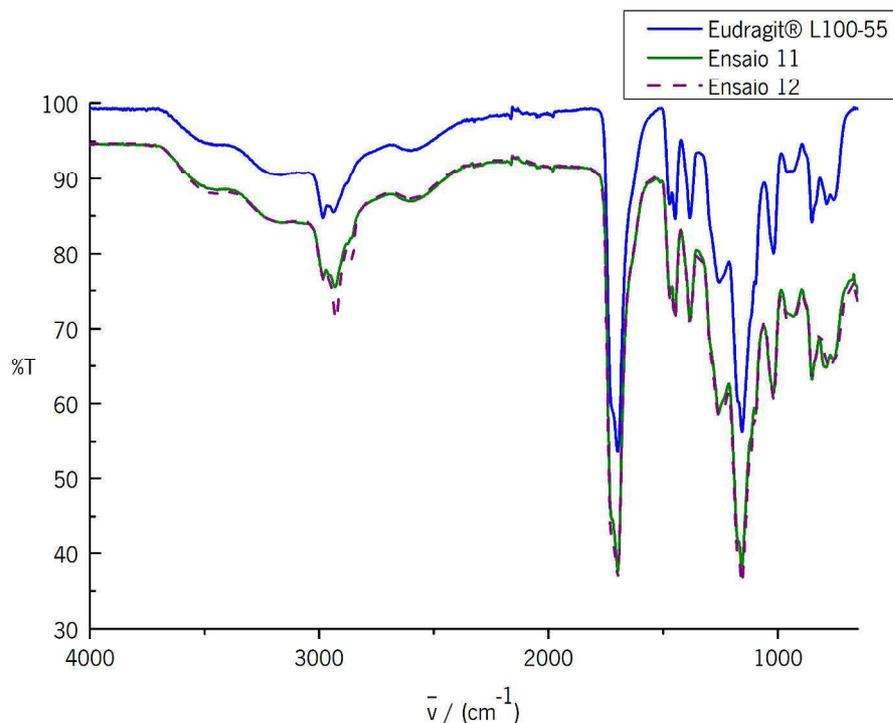


Figura 37 – Espectros de FTIR do Eudragit® L100-55 e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 11 e 12, após 16 varrimentos.

Observando-se atentamente o espectro do ensaio 11 e 12 da Figura 37, comparativamente com o espectro do polímero puro, verificou-se que, excetuando a maior definição das bandas no caso dos ensaios 11 e 12, as bandas presentes em todos os espectros foram iguais, por isso, contrariamente aos ensaios com Eudragit® E PO, não foi possível confirmar a presença de ibuprofeno nas nanopartículas obtidas no ensaio 11.

Contudo, o espectro das nanopartículas do ensaio 12 permitiu inferir que não ocorreram interações entre os reagentes, e verificou-se que as bandas características do polímero permaneceram intactas nas nanopartículas do ensaio 12.

Tendo em vista os resultados da análise termogravimétrica do ensaio 11 (Figura 28), foi possível comprovar-se a hipótese de que foi impossível incorporar o ibuprofeno nestas nanopartículas (tal como foi avançado no seguimento da análise de TGA do ensaio 11). A quantidade de fármaco poderia ser a causa desses resultados e como tal realizaram-se novos ensaios com quantidades superiores de ibuprofeno (ensaios 17 e 18).

Na Figura 38 encontra-se o espectro de FTIR do polímero Eudragit® L100-55 e das nanopartículas resultantes dos ensaios 17 e 18, tratando-se de nanopartículas sem ibuprofeno incorporado e nanopartículas com ibuprofeno incorporado, respetivamente.

No caso do ensaio 18, como já foi referido, a quantidade de ibuprofeno incorporada foi quatro vezes superior à quantidade do ensaio 11, por isso, se a quantidade fosse a razão pela qual não teria sido possível observar-se bandas do ibuprofeno no ensaio 11, seria de esperar observar-se essas bandas no ensaio 18.

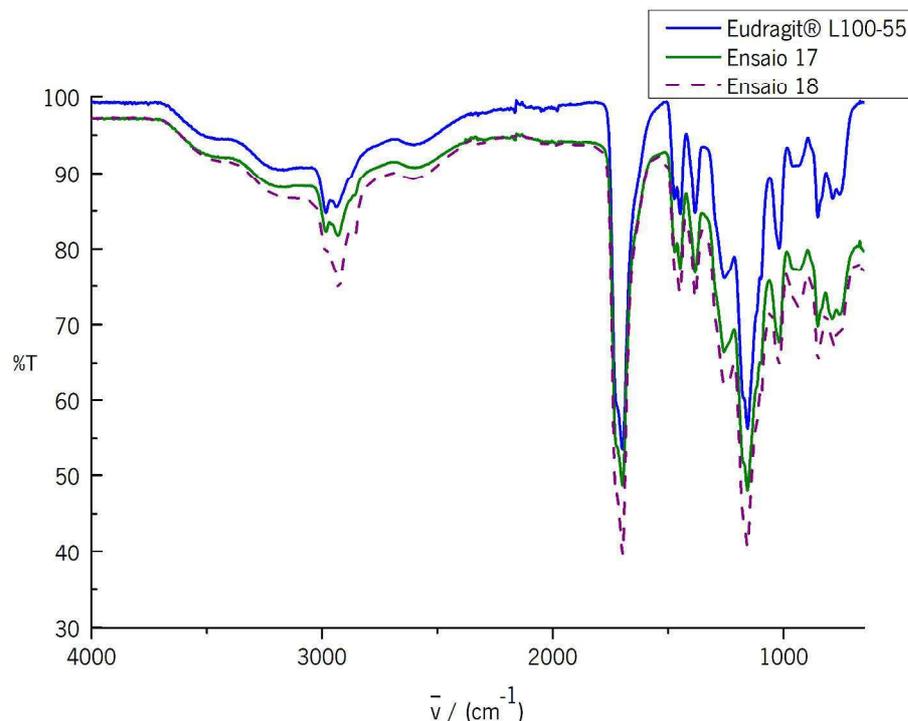


Figura 38 – Espectros de FTIR do Eudragit® L100-55 e das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 17 e 18, após 16 varrimentos.

Constatou-se que, mais uma vez não existiram bandas indicativas da presença de ibuprofeno (ensaio 18), obtendo-se espectros para ambos os ensaios idênticos ao espectro do polímero puro.

Assim, foi possível afirmar que, para as nanopartículas sem ibuprofeno, não existiram alterações nas ligações e bandas características após a síntese.

Em relação às nanopartículas com ibuprofeno foi possível confirmar a ausência deste nas mesmas, tal como havia sido avançado através da análise termogravimétrica do ensaio 18 (Figura 29), uma vez que mesmo após o aumento da quantidade de ibuprofeno, não se observaram quaisquer bandas associadas ao fármaco.

4.2.3 Análise do tamanho das nanopartículas

Um dos aspetos mais importantes na caracterização das nanopartículas é a análise do seu tamanho, bem como a determinação da uniformidade no tamanho das nanopartículas obtidas (Mohanraj & Chen, 2006).

Assim, analisaram-se os tamanhos e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas obtidas em 7 ensaios por dispersão dinâmica de luz. As nanopartículas obtidas nos ensaios 9, 10 e 12 não foram analisadas já que estes ensaios não acrescentavam informação em termos do tamanho das partículas face aos restantes.

Com os ensaios realizados foi possível avaliar a influência do aumento da quantidade de ibuprofeno incorporado e a da etapa de liofilização no tamanho das nanopartículas obtidas.

Esta secção encontra-se organizada da seguinte forma, primeiro são analisados os resultados da análise de DLS para as nanopartículas de Eudragit® E PO antes e depois delas serem liofilizadas, em seguida surgem os resultados da análise de DLS para as nanopartículas de Eudragit® L100-55 antes e depois delas serem liofilizadas.

a. Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO

A caracterização recorrendo à técnica de DLS permite obter resultados concisos sobre o tamanho das nanopartículas sintetizadas, desde que o valor de polidispersão não seja demasiado elevado ($>0,5$) e por isso foi esta a técnica escolhida. No entanto, para confirmar os resultados de DLS, especialmente nas nanopartículas obtidas após a liofilização recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento.

Na Figura 39 encontram-se os valores dos tamanhos das partículas obtidos para as nanopartículas dos ensaios 13, 14, 15 e 16, que correspondem a ensaios de nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, de nanopartículas com ibuprofeno incorporado (rácio 1:0,5), de nanopartículas com ibuprofeno incorporado (rácio 1:1) e de nanopartículas com ibuprofeno incorporado (rácio 1:2), respetivamente.

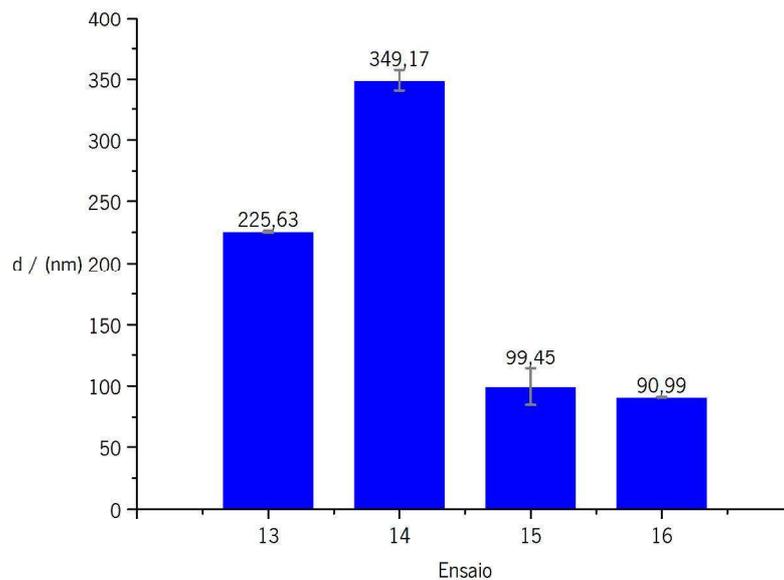


Figura 39 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 13, 14, 15 e 16. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Relativamente aos valores de PDI associados à análise de DLS das partículas dos ensaios 13, 14, 15 e 16, verificou-se que para o ensaio 13 foi de $0,225 \pm 0,010$, para o ensaio 14 foi de $0,367 \pm 0,045$, para o ensaio 15 foi de $0,544 \pm 0,085$ e para o ensaio 16 foi de $0,302 \pm 0,007$.

Analisando a Figura 39 verificou-se que as nanopartículas sintetizadas possuíam um tamanho que permitia a sua utilização como sistema de libertação controlada. Adicionalmente, verificou-se que estas partículas possuíam índices de polidispersão que sugeriam a uniformidade de tamanho.

Avaliando os ensaios sucessivos, seria de esperar que com a incorporação de ibuprofeno, as nanopartículas aumentassem o seu tamanho como foi observado em estudos anteriores (Chidambaram & Krishnasamy, 2013; Kalimuthu & Yadav, 2009; Mainardes & Evangelista, 2005; Yoo et al., 2011). No entanto, este resultado só se verificou para as nanopartículas com menor quantidade de ibuprofeno incorporado do ensaio 14, no qual o tamanho obtido foi de $349,17 \pm 8,26$ nm, face aos $225,63 \pm 0,71$ nm das nanopartículas sem ibuprofeno (ensaio 13).

A explicação para as nanopartículas terem diminuído de tamanho quando a concentração de ibuprofeno foi maior poderá estar associada ao facto de moléculas de fármaco e moléculas de polímero terem interagido mais fortemente devido à carga contrária de ambas, originando nanopartículas mais compactas, observação que se encontra em conformidade com alguns estudos reportados na literatura para polímeros análogos (Mandal et al., 2010).

No caso do ensaio 14, a quantidade de ibuprofeno pode não ter sido suficiente para que esta interação tivesse ocorrido, e assim as nanopartículas aumentaram de tamanho por incorporação do ibuprofeno.

A possível interação entre o Eudragit® E 100, a partir do qual é obtido o Eudragit® E PO, e fármacos aniônicos já foi reportada. No entanto não existiu nenhuma indicação da influência dessa interação no tamanho das partículas obtidas utilizando Eudragit® E PO (Quinteros et al., 2008). A hipótese do ibuprofeno não ter sido incorporado poderá ser descartada uma vez que pela análise termogravimétrica e pela análise de FTIR comprovou-se a sua presença nas nanopartículas.

Só são apresentados os resultados do ensaio 13, no caso das nanopartículas após liofilização para os ensaios com Eudragit® E PO, uma vez que foi o único ensaio onde as nanopartículas foram corretamente liofilizadas. Nos restantes ensaios (14, 15 e 16) não foi possível obter-se um pó capaz de se dispersar em água.

Assim, no caso do ensaio 13, o tamanho das partículas após liofilização foi de $177,33 \pm 83,51$ nm com um índice de polidispersão associado de $0,567 \pm 0,078$. Como foi possível verificar-se, após a liofilização, as nanopartículas possuíam praticamente o mesmo tamanho tendo em conta o elevado valor de desvio padrão.

Adicionalmente, o índice de polidispersão aumentou, por isso não foi possível comparar o tamanho das nanopartículas antes e após a liofilização, sendo necessário, para posteriores conclusões recorrer à análise das imagens de microscopia eletrónica de varrimento.

À parte disso, o PDI elevado pode ter sido resultado da difícil dispersão destas nanopartículas em água, por modificações estruturais das mesmas após liofilização (Dillen et al., 2006). A redução do tamanho das partículas após a liofilização já foi referida na literatura (Dillen et al., 2006).

b. Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55

Como já foi referido, neste ponto foram analisados todos os ensaios cujo polímero utilizado foi o Eudragit® L100-55.

Na Figura 40 encontram-se os valores dos tamanhos das nanopartículas obtidos por DLS para soluções dos ensaios 11, 17 e 18 antes destas serem liofilizadas, correspondendo ao ensaio de nanopartículas com ibuprofeno incorporado (1:1), ao ensaio de nanopartículas sem ibuprofeno incorporado e ao ensaio de nanopartículas com ibuprofeno incorporado (rácio 1:4), respetivamente.

Recorreu-se apresentação dos resultados do ensaio 11, uma vez que este ensaio difere dos restantes realizados às nanopartículas com Eudragit® L100-55 em termos de quantidade de ibuprofeno incorporada.

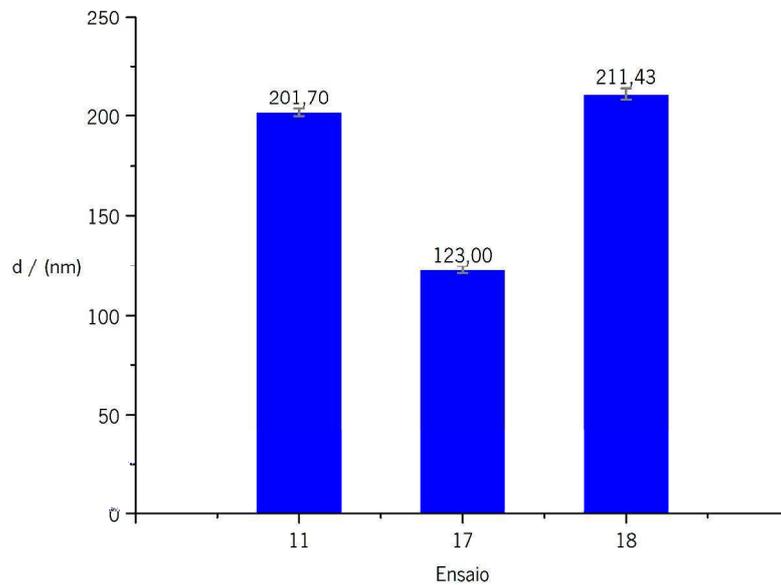


Figura 40 – Tamanho médio das nanopartículas (nm) em solução dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

No que diz respeito aos valores de PDI associados à análise de DLS das partículas dos ensaios 11, 17 e 18, verificou-se para o ensaio 11 que o PDI foi de $0,272 \pm 0,015$, para o ensaio 17 foi de $0,220 \pm 0,014$ e para o ensaio 18 foi de $0,230 \pm 0,030$.

Verificou-se mais uma vez que as nanopartículas sintetizadas eram viáveis para serem utilizadas como sistema de libertação controlada.

Observando os tamanhos de partículas dos ensaios 11 ($201,70 \pm 1,97$ nm), 17 ($123,00 \pm 1,83$ nm) e 18 ($211,43 \pm 2,81$ nm) verificou-se que as nanopartículas onde havia sido incorporado ibuprofeno possuíam um maior tamanho. No entanto, como havia já sido concluído através de análises anteriores, não foi possível incorporar ibuprofeno nas nanopartículas de Eudragit® L100-55. Assim, a principal justificação para estes resultados relaciona-se com a formação de aglomerados durante a etapa de síntese.

No caso das sínteses com incorporação de ibuprofeno, verificou-se que, no momento do gotejamento da solução polimérica na solução aquosa, ocorreu imediatamente a formação de aglomerados, sendo que estes poderão ter interferido diretamente no tamanho das nanopartículas sintetizadas. Nomeadamente, ocorreu uma maior formação de aglomerados na síntese das nanopartículas do ensaio 18.

No caso do ensaio 17, não se verificou a formação de quaisquer aglomerados. Assim, a formação destes aglomerados poderá estar diretamente relacionada com o facto do polímero e fármaco possuírem carga contrária e por isso no momento de formação das nanopartículas, o fármaco precipitou, resultando em nanopartículas sem ibuprofeno no seu interior.

Na Figura 41 encontram-se representados os valores dos tamanhos das partículas obtidos por DLS para as nanopartículas liofilizadas dos ensaios 11, 17 e 18.

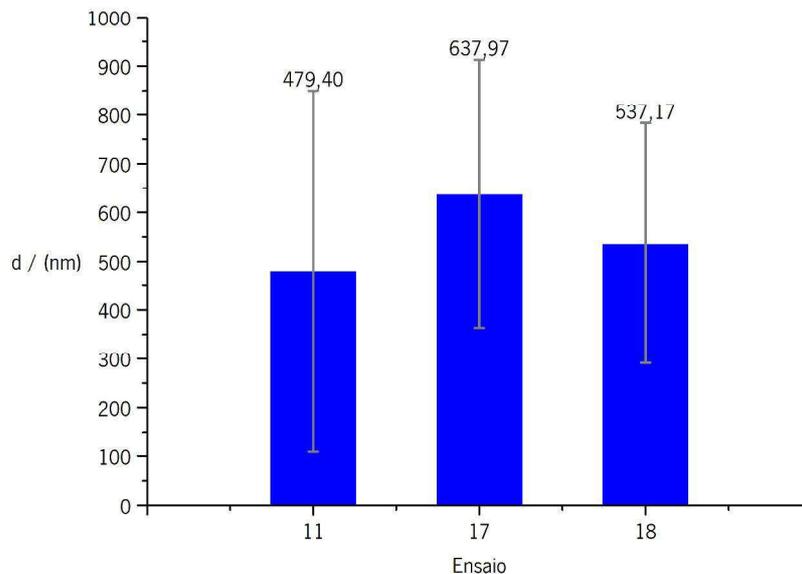


Figura 41 – Tamanho médio das nanopartículas liofilizadas (nm) dispersas em água a 25 °C dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Relativamente aos valores de PDI associados à análise de DLS para as nanopartículas liofilizadas dos ensaios 11, 17 e 18, tem-se que para o ensaio 11 foi de $0,848 \pm 0,144$, para o ensaio 17 foi de $0,832 \pm 0,163$ e para o ensaio 18 foi de $0,720 \pm 0,209$.

Avaliando os tamanhos das partículas depois da liofilização constatou-se que ocorre um aumento relativo do tamanho das mesmas, uma vez que o desvio padrão associado foi bastante elevado. Para além disso, a comparação das nanopartículas antes e depois da liofilização não foi possível pois, associado a esse elevado valor de desvio padrão, obteve-se um índice de polidispersão também demasiado elevado, revelando que as nanopartículas sintetizadas possuíam uma distribuição de tamanhos muito heterogénea.

Uma hipótese para este aumento significativo do tamanho das partículas após liofilização prender-se-á com o facto de este processo levar a alterações na estrutura interna das nanopartículas, pela formação de cristais de gelo na fase aquosa interna e pela agregação das partículas durante o

processo de liofilização, resultando numa maior dificuldade em dispersar estas nanopartículas em água (Dillen et al., 2006).

4.2.4 Análise do potencial zeta das nanopartículas

Para além da análise do tamanho das nanopartículas, outro parâmetro bastante importante é a análise da estabilidade das nanopartículas sintetizadas. Esta análise foi efetuada por determinação da dispersão eletroforética de luz, a partir da qual foi possível obter o potencial zeta que permitiu determinar a estabilidade das nanopartículas.

Outro aspeto que pode ser avaliado através da análise do valor de potencial zeta é a localização do fármaco nas nanopartículas, i.e. se o fármaco se encontra encapsulado no centro da nanopartícula ou se foi absorvido na sua superfície (Mohanraj & Chen, 2006).

A partir dos valores de potencial zeta obtidos pela análise de ELS foi possível avaliar a influência do aumento da concentração do fármaco, no caso das nanopartículas sintetizadas com Eudragit® E PO e ainda avaliar a influência da etapa de liofilização na estabilidade das nanopartículas.

Tal como já referido anteriormente, apenas se analisaram por ELS as nanopartículas obtidas em 7 ensaios, uma vez que os ensaios 9, 10 e 12, não apresentavam nenhuma novidade para o estudo em causa.

É de salientar que esta secção se encontra organizada de forma similar à anterior, surgindo em primeiro lugar os resultados de ELS para as nanopartículas de Eudragit® E PO, antes e depois de liofilizadas, e em seguida apresentam-se os resultados de ELS para as nanopartículas de Eudragit® L100-55, antes e depois de liofilizadas.

a. Caracterização das nanopartículas Eudragit® E PO

Na Figura 42 encontram-se os valores de potencial zeta obtidos por ELS das nanopartículas dos ensaios 13, 14, 15 e 16.

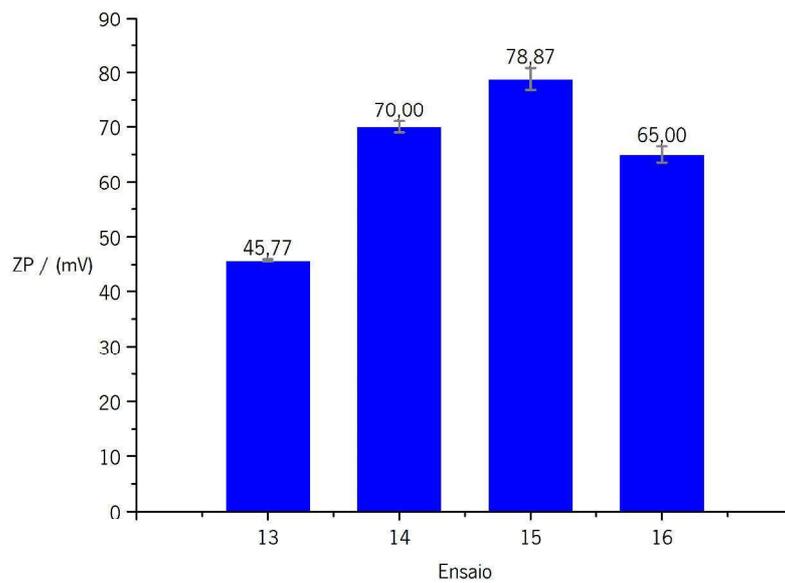


Figura 42 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 13, 14, 15 e 16. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Analisando a Figura 42 constata-se que as nanopartículas sintetizadas eram bastante estáveis, sendo os valores de potencial zeta de $45,77 \pm 0,21$ mV, $70,00 \pm 1,04$ mV, $78,87 \pm 1,99$ mV e $65,00 \pm 1,47$ mV para os ensaios 13, 14, 15 e 16, respetivamente.

Uma vez que os valores de potencial zeta foram todos superiores a 30 mV foi possível assumir que a suspensão era estável, uma vez que a carga superficial das nanopartículas impediu a agregação das partículas (Mohanraj & Chen, 2006).

Para além disso, através dos valores obtidos foi possível inferir que as nanopartículas possuíam o ibuprofeno encapsulado no centro da nanopartícula pois os valores de potencial zeta foram positivos, carga correspondente ao polímero uma vez que o fármaco é aniónico (Mohanraj & Chen, 2006).

Em relação à comparação entre os resultados dos diferentes ensaios, teve-se que com a incorporação de ibuprofeno nas nanopartículas a estabilidade destas aumentou, como já foi relatado em estudos com polímeros análogos (Pignatello, Bucolo, Spedalieri, et al., 2002). No entanto, não se constatou uma relação direta entre o aumento da quantidade de ibuprofeno e a variação do potencial zeta.

Tal como para a análise de DLS, não foi possível realizar a análise de ELS às nanopartículas liofilizadas dos ensaios 14, 15 e 16 por não ter sido possível dispersá-las em água. Neste sentido, o valor de potencial zeta obtido para o ensaio 13 foi de $26,93 \pm 2,40$ mV.

A primeira observação efetuada foi o facto do valor do potencial zeta das nanopartículas após liofilização ter sido inferior ao valor obtido para as nanopartículas antes da liofilização ($45,77 \pm 0,21$ mV). No entanto, o valor indicou que as nanopartículas permaneceram estáveis.

De acordo com os resultados da análise de ELS das nanopartículas de Eudragit® E PO constatou-se que foi possível obter-se partículas estáveis em todos os ensaios realizados.

b. Caracterização das nanopartículas Eudragit® L100-55

Como já foi referido, optou-se pela apresentação dos resultados do ensaio 11 uma vez que este ensaio diferiu dos restantes realizados às nanopartículas com Eudragit® L100-55, em termos de quantidade de ibuprofeno incorporada.

Na Figura 43 encontram-se representados os valores de potencial zeta das partículas obtidas nos ensaios 11, 17 e 18.

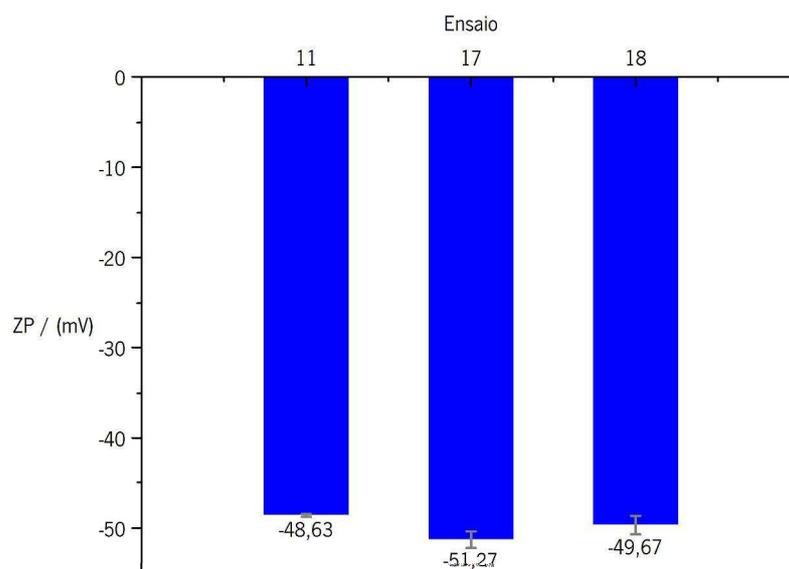


Figura 43 – Potencial zeta das nanopartículas (mV) em solução, com a concentração de 0,025 g/mL, dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Analisando a Figura 43 verificou-se que as nanopartículas sintetizadas eram todas estáveis uma vez que todos os valores de potencial zeta foram superiores a 30 mV, em valor absoluto, sendo eles $-48,63 \pm 0,15$ mV, $-51,27 \pm 0,90$ mV e $-49,67 \pm 1,02$ mV para os ensaios 11, 17 e 18, respetivamente.

Mais uma vez, o valor negativo do potencial zeta encontrava-se associado à carga aniónica do polímero Eudragit® L100-55, uma vez que, como já foi discutido, não foi possível incorporar o

ibuprofeno nas nanopartículas deste polímero. Por essa razão, não foi possível tirar quaisquer conclusões em termos de comparação dos resultados dos diferentes ensaios.

Na Figura 44 encontram-se os valores de potencial zeta das nanopartículas liofilizadas dos ensaios 11, 17 e 18 obtidos por análise de ELS.

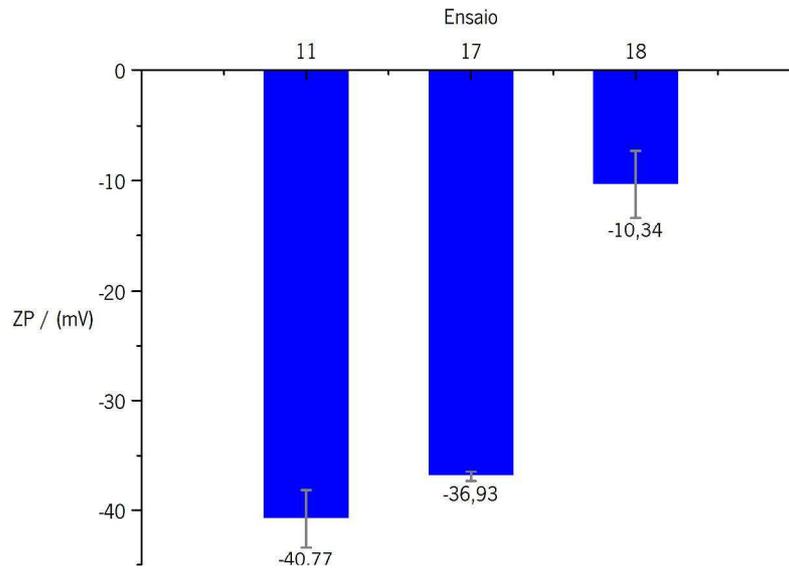


Figura 44 – Potencial zeta das nanopartículas liofilizadas (mV) dispersas em água a 25 °C (concentração inferior a 0,05 g/mL) dos ensaios 11, 17 e 18. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

Avaliando o potencial zeta das partículas depois da liofilização constatou-se que para os ensaios 11 e 17 ocorreu uma ligeira diminuição dos valores (em valor absoluto). No entanto, permaneceram dentro dos limites característicos de partículas estáveis, no caso do ensaio 18 ocorreu uma diminuição mais drástica dos valores, o que poderá estar associado a um rearranjo estrutural das nanopartículas durante o processo de liofilização tendo em conta a formação de aglomerados no processo de síntese por precipitação do ibuprofeno.

4.2.5 Análise estrutural e morfológica por microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Foram realizadas análises de SEM a amostras representativas dos três tipos de nanopartículas sintetizadas, ou seja, nanopartículas de Eudragit® E PO sem e com ibuprofeno (ensaio 13 e 15, respetivamente) e nanopartículas de Eudragit® L100-55 sem e com ibuprofeno (ensaio 17 e 18, respetivamente).

Os resultados de DLS são geralmente confirmados por SEM, no entanto para as nanopartículas sintetizadas não foi possível correlacionar os resultados de DLS das nanopartículas liofilizadas com

os resultados de SEM das mesmas nanopartículas uma vez que, no caso do ensaio 15 que se encontrava na forma de gel, este reagiu durante a análise, ocorrendo alterações no tamanho. Nos restantes ensaios não foi possível efetuar grandes ampliações uma vez que as amostras se degradaram facilmente com o aumento de temperatura durante o varrimento do feixe de eletrões. Na Figura 45 ilustram-se duas imagens de SEM correspondentes a nanopartículas do ensaio 13.

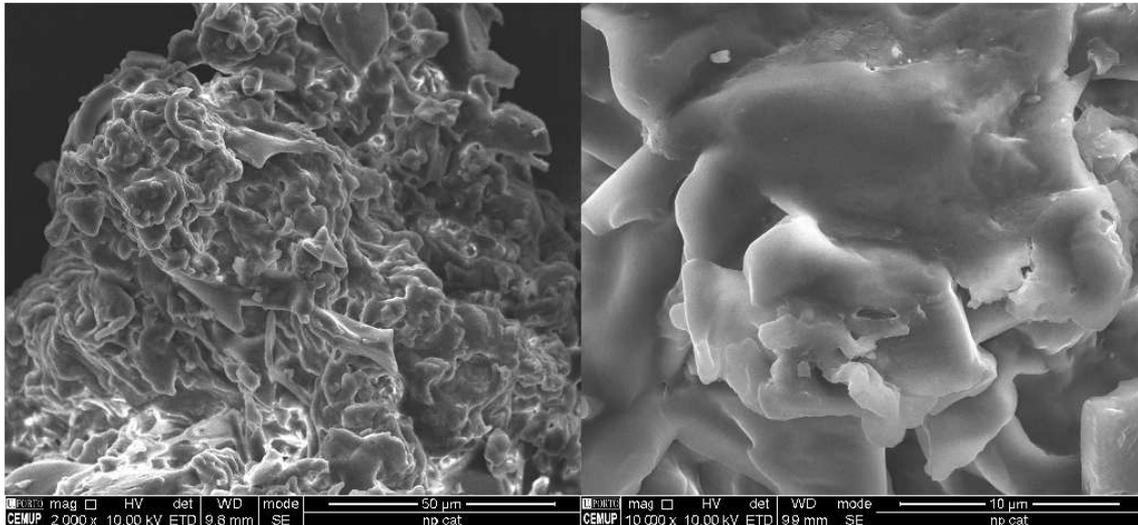


Figura 45 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 13.

Como se pode observar na Figura 45, não foi possível distinguir quaisquer nanopartículas, observando-se grandes aglomerados sem nenhuma estrutura individualizada.

Na Figura 46 apresentam-se duas imagens de SEM relativas a nanopartículas do ensaio 15, ensaio em forma de gel por complicações na liofilização tal como mencionado anteriormente.

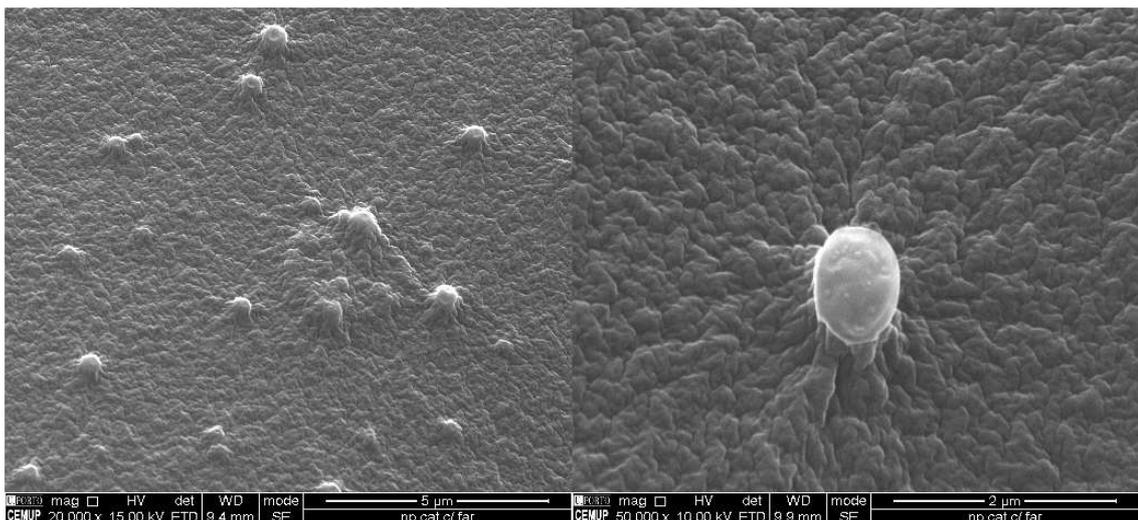


Figura 46 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 15.

Apesar do gel ter reagido, neste caso já foi possível observar estruturas esféricas individualizadas.

Na Figura 47 apresentam-se duas imagens de SEM das nanopartículas obtidas no ensaio 17, ensaio de Eudragit® L100-55.

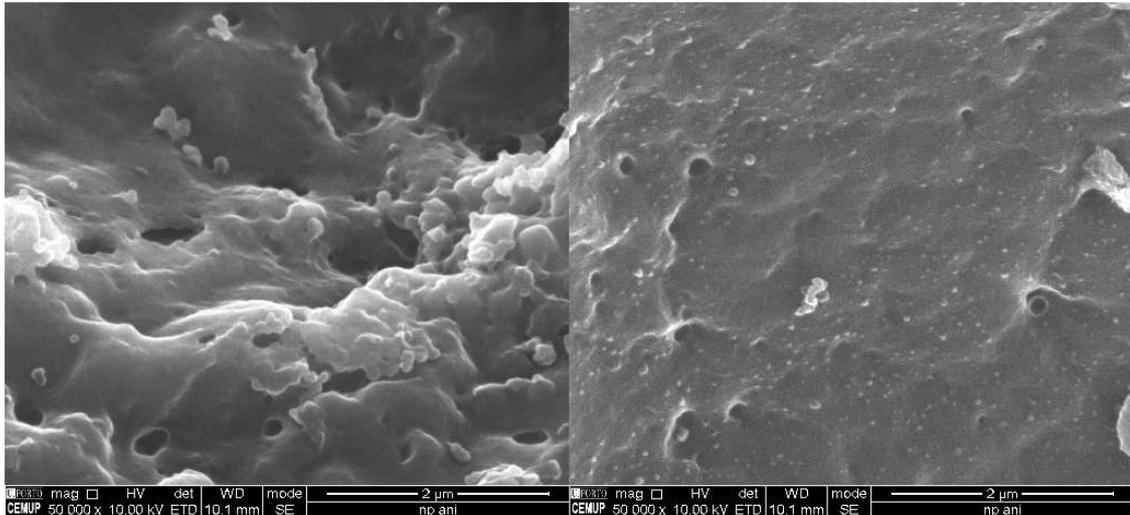


Figura 47 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 17.

No caso das nanopartículas do ensaio 17 foi possível observar-se partículas não esféricas na forma de aglomerados.

Na Figura 48 apresentam-se duas imagens de SEM correspondentes a partículas obtidas no ensaio 18, ensaio em forma de gel por complicações na liofilização tal como mencionado anteriormente.

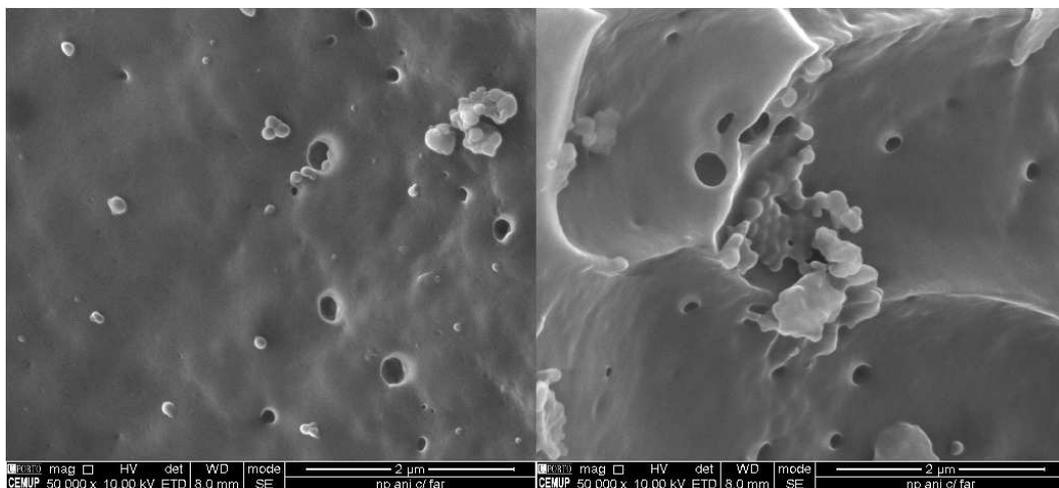


Figura 48 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das nanopartículas liofilizadas do ensaio 18.

Assim como no caso das nanopartículas do ensaio 17 foi possível observar partículas, no entanto neste ensaio foi possível constatar que essas partículas eram ligeiramente esféricas.

Para além da morfologia foi possível concluir quanto à composição molecular das estruturas avaliadas que todas as nanopartículas eram constituídas essencialmente por oxigénio e carbono, no Anexo IV – Análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X seguem as análises

detalhadas de espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS) das amostras, que permitiram determinar a composição estrutural das mesmas.

Não foi possível tirar mais conclusões das análises de SEM para além das enunciadas tendo em conta as limitações das amostras em estudo.

4.3 Estudos de Libertação

Nesta secção são apresentados alguns dos resultados mais importantes de todo o trabalho desenvolvido, uma vez que um dos objetivos principais deste trabalho era o estudo da libertação do fármaco adsorvido nas nanopartículas.

Tendo em conta a abrangência de possíveis aplicações desta tecnologia, optou-se por estudar soluções com vista duas formas de aplicação distintas, isto é, para além dos estudos de libertação a partir das nanopartículas liofilizadas, realizaram-se também estudos com a solução de nanopartículas antes destas serem liofilizadas, uma vez que poderá apresentar-se como promissor incorporar ou impregnar essa solução num tecido a partir do qual o composto ativo se irá libertar. A monitorização da libertação do ibuprofeno em ambos casos de estudo foi efetuada recorrendo à espectroscopia de UV/vis, uma vez que o fármaco utilizado é bastante conhecido e por isso o seu espectro de UV/vis encontra-se bem definido.

O espectro UV/vis característico do ibuprofeno possui 3 picos característicos passíveis de serem utilizados para quantificação do mesmo, sendo eles a 221 nm, 265 nm e 272 nm (Kislalioglu et al., 1991), como se se pode observar no Anexo V – Espectro de UV/vis do Ibuprofeno, Figura AV.1. No caso deste trabalho, logo nos testes preliminares de libertação que não foram apresentados, verificou-se que seria impossível utilizar o pico a 221 nm (mais comum para quantificação), uma vez que, tendo em conta as elevadas concentrações de fármaco utilizadas, a partir dos 240 nm observaram-se perturbações no espectro e absorvâncias demasiado elevadas (saturação do espectro). No Anexo V – Espectro de UV/vis do Ibuprofeno, Figura AV.2 encontra-se um desses espectros a título de exemplo.

Foi ainda nesses estudos preliminares que se decidiu optar pela quantificação a 265 nm, como já havia sido feito em outros estudos, de acordo com a literatura, para concentrações mais elevadas de fármaco (Kislalioglu et al., 1991).

A apresentação dos perfis de libertação sob a forma de concentração, recorrendo às curvas de calibração, não foi efetuada, pois as concentrações obtidas excediam os limites de quantificação

e, no caso dos ensaios com a solução de nanopartículas antes da liofilização, o controlo/branco não pode ser feito corretamente.

Como já foi mencionado, de ensaio para ensaio as nanopartículas sintetizadas foram diferentes, essas diferenças intensificam-se entre os ensaios com e sem ibuprofeno incorporado, pois a presença de ibuprofeno levou à formação de nanopartículas distintas, nomeadamente em termos de tamanho.

Assim sendo, o controlo/branco a utilizar na análise de UV/vis nos ensaios com as nanopartículas antes da liofilização deveria ser uma solução de nanopartículas idêntica à solução de nanopartículas com ibuprofeno. No entanto, não foi possível fazer esse controlo e por isso todas as medições de absorvância correspondente ao ibuprofeno libertado das nanopartículas com ibuprofeno apresentaram uma parcial interferência que se deveu às nanopartículas presentes no meio, não existindo forma de retirar esta interferência das leituras.

O estudo de libertação do fármaco foi efetuado para três valores de pH distintos. Optou-se por estudar o pH 1,2 e 6,8, uma vez que, de acordo com a literatura, são os pHs mais utilizados no estudo da libertação de compostos ativos a partir de nanopartículas de polímeros análogos (Barreto, 2009; Hao et al., 2013; Kislalioglu et al., 1991). Para além disso, estes dois pHs permitiram observar os comportamentos distintos dos dois polímeros, uma vez que o Eudragit® L100-55 é solúvel em meio aquoso a partir do pH 5,5 e o Eudragit® E PO é solúvel em meio aquoso abaixo de pH 5,0 (Sauer & McGinity, 2009).

A escolha do pH 5,5 assenta no facto desse ser o pH usual da pele (Gethin, 2007), e as principais aplicações previstas para a tecnologia desenvolvida incluem a administração tópica.

Tipicamente, em estudos de libertação como os efetuados neste trabalho, realiza-se um estudo comparativo entre diferentes modelos cinéticos característicos dos estudos de libertação controlada de compostos ativos, para determinar qual o modelo que melhor se ajusta ao conjunto de dados obtidos.

Assim, os modelos estudados foram o modelo de ordem zero e o modelo de primeira ordem. O modelo de ordem zero (Equação 1) é característico de sistemas de libertação lenta e continuada e é geralmente utilizado para descrever sistemas transdérmicos (Barreto, 2009; Salgueiro, 2011).

$$f(t)=k_0t+b$$

Equação 1

onde $f(t)$ é a quantidade de fármaco libertada até ao momento t , b é a quantidade de fármaco no instante $t=0$ e k_0 é a constante cinética de ordem zero (Barreto, 2009; Das, Suresh, & Desmukh, 2010; Salgueiro, 2011).

No caso do mecanismo de primeira ordem (Equação 2), a velocidade de libertação depende diretamente da concentração do fármaco, por isso é muitas vezes aplicado a matrizes contendo fármacos solúveis em água e matrizes porosas (Salgueiro, 2011).

$$\ln(f(t))=kt+\ln(b)$$

Equação 2

onde k é a constante cinética de primeira ordem (Barreto, 2009; Das et al., 2010; Salgueiro, 2011).

Esta secção encontra-se organizada em dois subcapítulos, sendo o primeiro sobre o estudo da libertação a partir da solução de nanopartículas antes da liofilização e o segundo sobre o estudo da libertação de ibuprofeno a partir da solução de nanopartículas liofilizadas.

Dentro de cada subcapítulo, apresentam-se os resultados organizados por ensaios (ensaios 14, 15, 16 e 18), com o estudo pormenorizado da libertação em meios com diferentes pHs, seguindo-se o estudo dos mecanismos cinéticos dos ensaios.

4.3.1 Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas pré-liofilização

Os estudos de libertação foram apresentados sob a forma de percentagem cumulativa da quantidade de ibuprofeno libertado ao longo do tempo, com exceção do ensaio 18, uma vez que neste ensaio, como não foi possível incorporar de ibuprofeno e por consequência não ocorreu a sua libertação, apresenta-se a absorvância em função do tempo.

No Anexo VI – Exemplo de Cálculo da Quantidade de Ibuprofeno Libertada para o Estudo Pré-liofilização encontra-se a explicação da determinação da quantidade cumulativa, sendo que a quantidade cumulativa não representa que foi libertada a totalidade do ibuprofeno incorporado, mas sim que foi libertado o máximo que foi possível determinar no instrumento de análise usado neste estudo.

Esse cálculo foi possível uma vez que, de acordo com os resultados da análise termogravimétrica, para todos os ensaios com Eudragit® E PO, o ibuprofeno foi incorporado nas nanopartículas, por isso foi possível concluir que, na solução antes da liofilização, a concentração máxima lida após decorrido todo o ensaio corresponde à libertação completa do ibuprofeno.

No caso do Eudragit® L100-55, não foi possível assumir isso, uma vez que nas análises de caracterização não foi possível provar a presença de ibuprofeno.

Após estudos preliminares para melhor compreensão e planejamento dos estudos de liberação de ibuprofeno, os quatro ensaios utilizados para o estudo pormenorizado da liberação de ibuprofeno foram os ensaios 14, 15, 16 e 18.

O estudo da liberação a partir da solução de nanopartículas pré-liofilização foi efetuado a partir de uma solução, logo o ajuste de pH teve de ser realizado diretamente pela adição de HCl ou NaOH e não foi possível recorrer à utilização de solução tampão.

Na Figura 49 apresenta-se o perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo para o ensaio 14, 15, 16 e 18, em três meios com valores de pH distintos. No caso do ensaio 14, 15 e 16, a quantidade de ibuprofeno incorporado foi distinta, sendo o rácio polímero:fármaco de 1:0,5, 1:1 e 1:2, respetivamente.

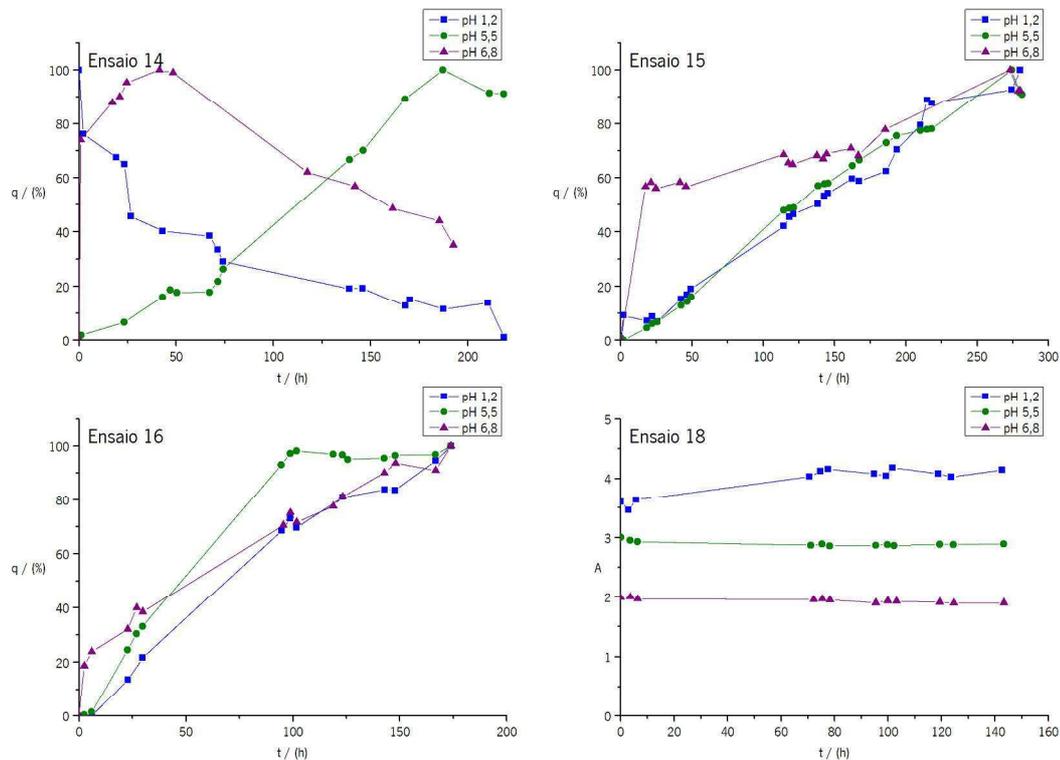


Figura 49 – Perfis de liberação do ibuprofeno a pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8 para as nanopartículas obtidas nos ensaios 14, 15, 16 e 18.

Para o estudo a pH 1,2 (ensaio 14) verificou-se o decréscimo da quantidade ibuprofeno libertada ao longo do tempo. Essa diminuição poderá dever-se à instabilidade termodinâmica do sistema por precipitação do ibuprofeno (Van Driessche, 2013), já que este é pouco solúvel a pH ácido. A par disto, ocorreu a dissolução de Eudragit® E PO, que de alguma forma contribuiu para instabilidade do sistema contribuindo por consequência para esse decréscimo.

Nos ensaios posteriores, com maior concentração de ibuprofeno, não se verificou esse decréscimo a pH 1,2. Foi possível inferir que a menor quantidade de ibuprofeno incorporada resultou numa maior instabilidade, aquando da libertação do fármaco para o meio.

Essa maior instabilidade poderá estar relacionada com interações entre o ibuprofeno e o polímero e/ou os sais dos ácidos ou bases adicionados para acerto do pH, durante a libertação do fármaco. Nomeadamente, poderão ter ocorrido interações por formação de ligações de hidrogénio e interações iónicas, de acordo com o reportado na literatura (Moustafine et al., 2006).

No caso do estudo a pH 6,8 (ensaio 14), verificou-se o mesmo decréscimo, mas apenas após um aumento inicial, indicando que o aumento de ibuprofeno poderá ter sido rápido, até um ponto, seguindo depois um comportamento similar ao observado para pH 1,2.

No caso do pH 5,5 (ensaio 14), ocorreu o aumento esperado da quantidade de ibuprofeno libertada, tendo em conta que em torno do pH 5,0 o polímero Eudragit® E PO intumescce. Este resultado permitiu afirmar com maior certeza que para o pH 6,8 o aumento inicial se deveu ao ibuprofeno e assim, concluiu-se que ocorreu um aumento mais rápido para esse pH do que para o pH 5,5.

Este resultado está em concordância com as características do polímero em causa, uma vez que para valores de pH mais baixos a libertação se deve à dissolução das nanopartículas, que poderá interferir com a libertação do fármaco. Para valores de pH mais elevados, tal como já referido, o polímero intumescce, permitindo que o fármaco seja libertado por difusão, não existindo interferência na velocidade de libertação do mesmo.

Ao contrário do que acontecia para o ensaio 14, no ensaio 15 ocorreu a libertação de ibuprofeno para todos os valores de pH estudados.

Pela análise da Figura 49, constatou-se que para o pH 6,8 (ensaio 15) existiu um aumento considerável logo nas primeiras horas, diminuindo em seguida a velocidade de libertação. No caso do ensaio 15 a pH 1,2 e 5,5, a cinética foi bastante similar em todo o estudo de libertação, não tendo sido possível constatar qualquer comportamento quanto à dependência do pH.

Para o pH 6,8 (ensaio 15) apesar do aumento significativo nas primeiras horas, a quantidade cumulativa máxima só foi atingida mais tarde não ocorrendo nenhum decréscimo.

Os primeiros pontos do estudo de libertação poderão ser incoerentes, tendo-se maior fiabilidade nos restantes pontos lidos, uma vez que, segundo a literatura, os primeiros pontos dos estudos de libertação poderão possuir muitas vezes interferências relacionadas com a separação efetiva

do nanotransportador e fármaco (Dai et al., 2004). Assim, não é desejável assumir o comportamento de libertação apenas baseado na análise dos primeiros pontos.

No ensaio 16 verificou-se maiores diferenças entre os três perfis traçados. Ocorreu a libertação de ibuprofeno para todos os pHs estudados, sendo que o aumento foi mais rápido para o pH 5,5, seguindo-se o pH 1,2. No caso do pH 6,8, mais uma vez se verificou um aumento significativo nas primeiras horas, seguindo-se um aumento mais lento no restante estudo.

Neste ensaio, a libertação foi mais rápida para o pH 5,5, sugerindo que este pH, o valor mais próximo do pH considerado de viragem para o polímero, permitiu uma libertação continuada mais constante.

Observando de forma global os três ensaios com Eudragit® E PO foi possível concluir que com o aumento da quantidade de ibuprofeno incorporada, mais rápida foi a libertação de fármaco para o meio.

Constatou-se este facto facilmente observando a quantidade cumulativa libertada passadas 100 h de estudo, tendo-se tido para o ensaio 14 a pH 5,5 uma percentagem em torno dos 40 %, para o ensaio 15 a percentagem variou entre os 40 % e os 60 % para todos os valores de pH, e por fim para o ensaio 16 a percentagem variou entre 65 % e 100 % para todos os valores de pH.

Como já foi referido, o polímero Eudragit® L100-55 caracteriza-se por não intumescer e por se dissolver a valores de pH superiores a 5,5. Assim, e de acordo com a literatura, quanto maior o pH, mais depressa ocorre a libertação de ibuprofeno (Hao et al., 2013).

Os dados do ensaio 18 foram apresentados na forma da absorvância em função do tempo pois, como foi possível observar-se pela Figura 49, não existiram variações na absorvância que indicassem a presença de ibuprofeno.

Esse resultado foi de encontro às conclusões tiradas na caracterização das nanopartículas de ibuprofeno, uma vez que nessa secção todos os resultados indicaram que não foi possível incorporar o ibuprofeno, tendo o mesmo precipitado no momento da síntese das nanopartículas.

a. Modelação cinética da libertação de ibuprofeno

De forma a avaliar qual modelo cinético que melhor se ajustava aos dados recolhidos nos estudos de libertação, recorreu-se à análise do modelo cinético de ordem zero e do modelo cinético de primeira ordem.

Em relação ao modelo de ordem zero, construiu-se o gráfico da quantidade cumulativa em percentagem em função do tempo e aplicou-se o ajuste linear a esses dados. No entanto, para alguns casos, o ajuste linear não foi o mais adequado.

Para o modelo de primeira ordem construiu-se o gráfico do logaritmo natural da quantidade cumulativa em percentagem em função do tempo e aplicou-se o ajuste linear a esse conjunto de dados. Também para o modelo de primeira ordem, se aplicou o ajuste que melhor se adequava ao conjunto de dados obtidos.

Não foi efetuada modelação cinética ao ensaio 18, uma vez que não ocorreu libertação de ibuprofeno.

Nos Anexo VII – Gráficos da Modelação Cinética de Ordem Zero dos Estudo de Libertação das Nanopartículas Pré-líofilização e Anexo VIII – Gráficos da Modelação Cinética de Primeira Ordem dos Estudos de Libertação das Nanopartículas Pré-líofilização encontram-se os gráficos pormenorizados da modelação cinética de ordem zero e de primeira ordem, respetivamente, de todos os ensaios para todos os pHs.

Na Tabela 10 resumem-se os valores da constante cinética de ordem zero e de primeira ordem e o respetivo R quadrado para ambos os modelos, para todos os ensaios realizados em todos os valores de pH. A partir desses valores foi possível avaliar qual o melhor modelo para ajustar os dados experimentais.

Tabela 10 – Valores das variáveis do modelo cinético de ordem zero e de primeira ordem para os ensaios 14, 15, 16, para os três valores de pH estudados

Ensaio	pH	Modelo cinético de ordem zero			Modelo cinético de primeira ordem		
		Tipo de ajuste	k_0	R^2	Tipo de ajuste	k	R^2
14	1,2	Linear	-0,322±0,090	0,796	Linear	-0,009±0,0014	0,942
	5,5	Linear	0,556±0,070	0,954	Logarítmico	-	0,890
	6,8	Polinomial	-	0,810	Polinomial	-	0,941
15	1,2	Linear	0,365±0,021	0,986	Logarítmico	-	0,990
	5,5	Linear	0,359±0,024	0,978	Logarítmico	-	0,988
	6,8	Linear	0,192±0,069	0,686	Linear	0,002±0,0003	0,948
16	1,2	Linear	0,575±0,089	0,960	Logarítmico	-	0,977
	5,5	Logarítmico	-	0,913	Logarítmico	-	0,933
	6,8	Linear	0,491±0,065	0,953	Logarítmico	-	0,970

No caso do ensaio 14, no qual a libertação ocorreu apenas para pH 5,5 e 6,8, observou-se que para o primeiro pH o modelo que melhor se ajustou foi o de ordem zero recorrendo a um ajuste linear enquanto para pH 6,8, o melhor modelo foi o da primeira ordem, sendo necessário um ajuste polinomial. Esta diferença baseou-se essencialmente no facto do estudo a pH 6,8 apresentar um aumento inicial seguido de um decréscimo contínuo.

Para o ensaio 15, ocorreu libertação em todos os estudos de pH e o modelo que melhor se ajustou foi a cinética de primeira ordem, para todos os valores de pH estudados. No entanto para o pH 1,2 e 5,5 foi necessário recorrer a um ajuste logarítmico enquanto para o pH 6,8 foi aplicado um ajuste linear.

Em relação ao ensaio 16, para todos os pHs estudados o modelo que melhor se ajustou foi o de primeira ordem.

É de salientar que o ajuste linear não foi aquele que melhor se adequou ao conjunto de dados obtidos e, por isso não foi possível determinar se estas nanopartículas funcionariam como um bom sistema de libertação lenta e continuada.

4.3.2 Monitorização da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas pós-liofilização

Também para os estudos da libertação de ibuprofeno a partir das nanopartículas liofilizadas não foi possível apresentar a quantidade de ibuprofeno libertada na forma de concentração, uma vez que as concentrações foram superiores aos limites de quantificação.

Assim, em todos os gráficos de monitorização da libertação de ibuprofeno, com exceção do gráfico do ensaio 18, encontra-se a quantidade cumulativa em função do tempo. No Anexo IX – Exemplo de Cálculo da Quantidade de Ibuprofeno Libertada para o Estudo Pós liofilização encontra-se a explicação da determinação da quantidade cumulativa, sendo que a quantidade cumulativa de 100 % corresponde à libertação da quantidade total de ibuprofeno incorporado.

O cálculo da quantidade cumulativa foi possível uma vez que, de acordo com os resultados da análise termogravimétrica, para todos os ensaios com Eudragit® E PO, o ibuprofeno foi incorporado nas nanopartículas. No entanto, não foi possível determinar a quantidade exata de ibuprofeno incorporada, por isso assumiu-se a incorporação completa do fármaco.

No caso do Eudragit® L100-55 as análises de caracterização não permitiram confirmar a presença de ibuprofeno e os estudos de libertação das nanopartículas pré-liofilização sustentaram esses resultados. Assim, optou-se por apresentar os resultados da absorvância em função do tempo.

Os ensaios de liberação com as nanopartículas liofilizadas foram efetuados em três soluções tampões distintas, tampão HCl/KCl para o meio de pH 1,2, tampão citrato para o meio de pH 5,5 e tampão fosfato para o meio de pH 6,8.

Na Figura 50 ilustra-se o perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo para o ensaio 14, 15, 16 e 18, em três meios com valores de pH distinto. No caso dos ensaios 14, 15 e 16, a quantidade de ibuprofeno incorporado foi distinta, sendo o rácio polímero:fármaco de 1:0,5, 1:1 e 1:2, respetivamente.

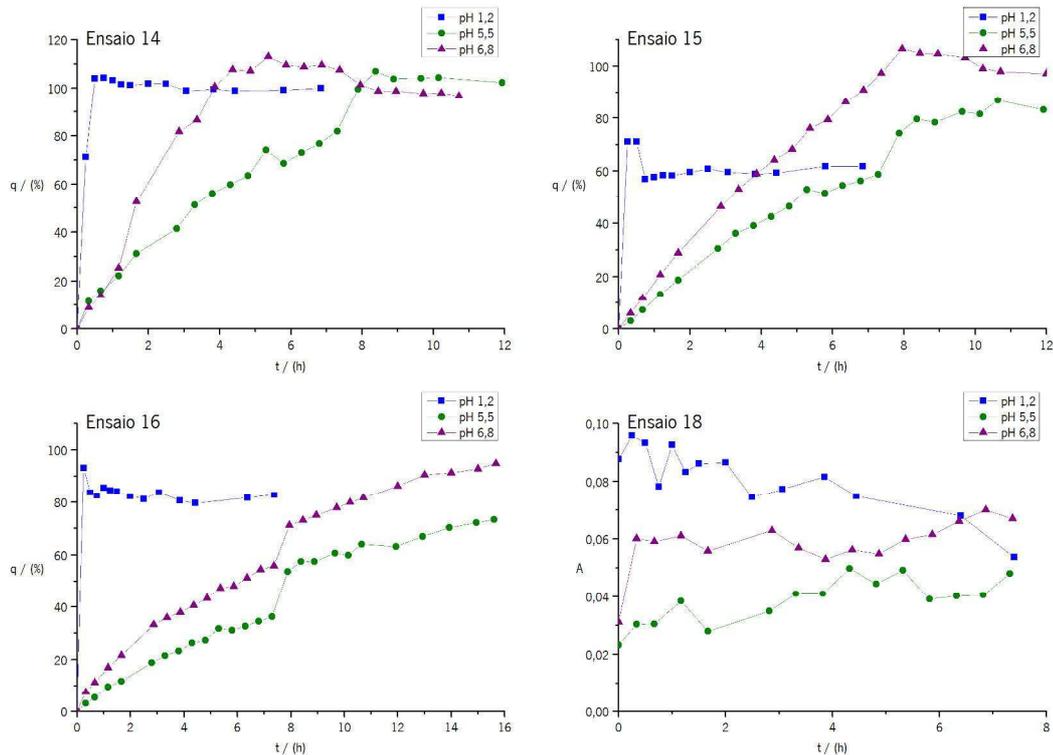


Figura 50 – Perfis de liberação do ibuprofeno a pH 1,2, pH 5,5 e pH 6,8 para as nanopartículas liofilizadas obtidas nos ensaios 14, 15, 16 e 18.

Para o ensaio 14 a pH 1,2 ocorreu um aumento muito elevado antes da 1 h de monitorização, estabilizando em seguida a quantidade de ibuprofeno libertada. Para além disso, foi possível constatar que alguns dos pontos nas primeiras horas de estudo (1 h e 2,5 h) se encontraram acima dos 100 %, revelando que essas medições estavam afetadas de erros experimentais.

Esta situação poderá estar relacionada com a hipótese anteriormente enunciada. Uma menor quantidade de ibuprofeno incorporada nas nanopartículas resultou em maiores interações (por formação de ligações de hidrogénio e interações iónicas) entre o polímero e os restantes reagentes no meio.

O aumento inicial para pH 1,2 poderá indicar que, como as nanopartículas se dissolvem a pH ácido, a libertação foi praticamente imediata. Relativamente aos restantes pHs, a libertação foi mais prolongada e lenta devido ao intumescimento das nanopartículas.

No caso do pH 5,5 e do pH 6,8 (ensaio 14), a libertação foi mais rápida para o pH 6,8, consistente com as características do polímero em causa, uma vez que quanto maior o pH, mais o polímero intumesce, logo maior a difusão do ibuprofeno (Kultima, 2010).

Observando-se o perfil de libertação a pH 1,2 do ensaio 15 verificou-se mais uma vez um aumento significativo na primeira hora de estudo, seguindo-se um patamar constante, tal como havia sido observado no ensaio 14.

Para o estudo a pH 1,2 (ensaio 14), a libertação ficou apenas nos 60 %, uma vez que os dois pontos acima dos 60 % foram os primeiros pontos lidos e por isso poderão estar mais sujeitos a interferências, como já foi referido.

A razão pela qual a libertação não terá sido superior a 60 % pode estar relacionada com o facto da massa de nanopartículas suspensas na solução tampão ($40,4 \pm 0,05$ mg) ter sido bastante superior comparativamente com os restantes estudos, como se pode constatar pelo Anexo IX – Exemplo de Cálculo da Quantidade de Ibuprofeno Libertada para o Estudo Pós liofilização. Assim, terá sido possível que a solução tenha ficado saturada e por isso não foi possível libertar uma maior quantidade de ibuprofeno.

Quanto aos perfis a pH 5,5 e 6,8 (ensaio 15) observou-se que a libertação foi mais rápida para o ensaio a pH 6,8, como seria de esperar. É de salientar que o estudo a pH 5,5 não libertou na totalidade o ibuprofeno no tempo de estudo estabelecido.

No ensaio 16 a pH 1,2, mais uma vez verificou-se um aumento significativo na primeira hora de estudo, estabilizando em seguida, sendo que estabilizou em torno do 80 %, revelando uma maior libertação do que no ensaio 15, podendo afirmar-se que a massa de nanopartículas colocada no ensaio 15 poderá ter influenciado a libertação.

A quantidade de 100 % para pH 1,2 só foi atingida para o ensaio 14 uma vez que a quantidade de ibuprofeno incorporado foi muito inferior.

No caso do pH 6,8 e 5,5 (ensaio 16) a libertação ocorreu a maior velocidade para o primeiro pH. É de salientar que este ensaio não libertou na totalidade o ibuprofeno incorporado uma vez que o estudo foi terminado ao fim das 16 h.

Observando de forma global os três ensaios com Eudragit® E PO foi possível concluir que com o aumento da quantidade de ibuprofeno incorporada, a velocidade de liberação se tornou mais lenta, uma vez que mais depressa terá ocorrido a saturação da solução.

Foi possível observar esta liberação mais lenta analisando a quantidade cumulativa libertada passadas 4 h de monitorização, tendo-se para o ensaio 14 a pH 5,5 uma percentagem em torno dos 59 %, e a pH 6,8 uma percentagem em torno dos 100%. Para o ensaio 15 a pH 5,5 teve-se uma percentagem em torno dos 41 % e a pH 6,8 teve-se uma percentagem em torno dos 61 %. Por fim, para o ensaio 16 a pH 5,5 teve-se uma percentagem em torno dos 24 % e a pH 6,8 teve-se uma percentagem em torno dos 38 %.

Como foi referido, os dados do ensaio 18 foram representados na forma da absorvância em função do tempo uma vez que, como foi possível constatar pela Figura 50, não existiram variações na absorvância que pudessem surgir a presença de ibuprofeno.

Ao longo do estudo, para os diferentes valores de pH estudados, as variações de absorvância foram insignificantes, o que foi de encontro a todas as análises previamente efetuadas, tanto na caracterização das nanopartículas de ibuprofeno, como no estudo da liberação de ibuprofeno a partir das nanopartículas antes da liofilização.

a. Modelação cinética da liberação de ibuprofeno

Mais uma vez, o estudo cinético foi apenas efetuado aos ensaios com Eudragit® E PO já que no ensaio 18 não existiu liberação de ibuprofeno. A modelação cinética efetuada para o estudo das nanopartículas liofilizadas foi igual à efetuada para as nanopartículas antes da liofilização.

Nos Anexo X – Gráficos da Modelação Cinética de Ordem Zero dos Estudos de Liberação das Nanopartículas Liofilizadas e Anexo XI – Gráficos da Modelação Cinética de Primeira Ordem dos Estudos de Liberação das Nanopartículas Liofilizadas encontram-se os gráficos pormenorizados da modelação cinética de ordem zero e de primeira ordem, respetivamente, para os ensaios realizados a todos os valores de pH.

Na Tabela 11 apresentam-se apenas os valores da constante cinética de ordem zero e de primeira ordem e o respetivo R quadrado para ambos os modelos. A partir desses valores é possível avaliar qual o melhor modelo para ajustar os dados experimentais.

Tabela 11 – Valores das variáveis do modelo cinético de ordem zero e de primeira ordem para os ensaios 14, 15, 16 para os três valores de pH estudados

Ensaio	pH	Modelo cinético de ordem zero		Modelo cinético de primeira ordem	
		Tipo de ajuste	R ²	Tipo de ajuste	R ²
14	1,2	Potencial	0,205	Potencial	0,211
	5,5	Polinomial	0,977	Logarítmico	0,988
	6,8	Polinomial	0,987	Polinomial	0,981
15	1,2	Potencial	0,241	Potencial	0,235
	5,5	Polinomial	0,984	Logarítmico	0,988
	6,8	Polinomial	0,990	Logarítmico	0,974
	1,2	Potencial	0,551	Potencial	0,552
	5,5	Polinomial	0,970	Logarítmico	0,987
	6,8	Polinomial	0,988	Logarítmico	0,993

Em relação a todos os ensaios para pH 1,2, não foi possível escolher um modelo que se ajustasse corretamente aos dados, devido ao aumento repentino que se verificou no início do ensaio. Todos os valores de R quadrado se encontravam bastante afastados do valor unitário.

No caso do ensaio 15 a pH 5,5 e 6,8 foi possível afirmar que o modelo cinético que melhor se ajustou foi a cinética de primeira ordem e a cinética de ordem zero, respetivamente. Sendo que, para o estudo a pH 5,5 foi necessário recorrer a uma ajuste logarítmico enquanto para o estudo a pH 6,8 recorreu-se a um ajuste polinomial.

Para o ensaio 16 a pH 5,5 e 6,8, o modelo de primeira ordem com ajuste logarítmico foi o que melhor se ajustou para ambos os estudos.

Avaliando os estudos com as nanopartículas pré-liofilização e liofilizadas constatou-se que possuíam comportamentos ligeiramente distintos, nomeadamente em relação à resposta/libertação perante diferentes valores de pH. No caso dos estudos com a solução de nanopartículas antes da liofilização, o comportamento perante as diferentes quantidades de ibuprofeno incorporadas foi distinto, possivelmente pelo facto de não ter sido possível controlar e monitorar tão bem o pH.

5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Com a elaboração desta dissertação pretendeu-se delinear um processo de síntese de nanotransportadores, nomeadamente nanopartículas, capazes de assumir a função de sistema de libertação controlada. A par desse objetivo apresentou-se essencial a caracterização das nanopartículas sintetizadas, assim como o estudo da libertação do fármaco incorporado nas mesmas.

Foi possível concluir que o procedimento estabelecido para a síntese, após a alteração de estabilizante e modificação da velocidade de agitação, permitiu a obtenção de nanopartículas de acordo com os parâmetros pretendidos, concluindo-se que a escolha acertada desses parâmetros influenciou diretamente as nanopartículas obtidas.

Assim, a utilização de Span® 85 em vez de PVA, o aumento das rotações durante a adição da fase orgânica à fase aquosa, a inclusão de um período de 30 minutos de agitação elevada e a eliminação das etapas de centrifugação reproduziram melhorias substanciais nas nanopartículas sintetizadas, designadamente ao nível do tamanho pretendido (entre 50 nm e 500 nm), da uniformidade e estabilidade. Concluiu-se ainda que o processo de liofilização para as nanopartículas contendo ibuprofeno não foi eficiente, resultando em nanopartículas na forma de gel, em vez de se formar um pó fino.

Em relação às nanopartículas sem ibuprofeno incorporado, concluiu-se que foram sintetizadas nanopartículas cujas propriedades térmicas e químicas eram idênticas às do polímero base. As nanopartículas pré-liofilização apresentaram-se estáveis e com tamanhos compreendidos entre $225,63 \pm 0,71$ nm e $123,00 \pm 1,83$ nm, para as nanopartículas de Eudragit® E PO e Eudragit® L100-55, respetivamente.

Após a liofilização, as nanopartículas mantiveram-se estáveis mas os tamanhos aumentaram, tendo em conta a difícil dispersão das mesmas em água, com exceção das nanopartículas de Eudragit® E PO.

No que diz respeito às nanopartículas com incorporação de ibuprofeno, a primeira conclusão que se tirou foi a impossibilidade de sintetizar nanopartículas de Eudragit® L100-55 com ibuprofeno, uma vez que em todos os ensaios de caracterização dessas nanopartículas, se obtiveram resultados que corroboraram a inexistência de ibuprofeno nas mesmas.

Quanto às nanopartículas de Eudragit® E PO, de acordo com os ensaios de caracterização, foi possível observar-se a presença de ibuprofeno. Observou-se que a curva termogravimétrica

possuía um perfil correspondente à degradação de dois compostos distintos (fármaco e polímero) e na análise de FTIR observou-se o aparecimento de bandas características dos grupos aromáticos do ibuprofeno (entre os 1568 cm^{-1} e 1592 cm^{-1} , dependendo das nanopartículas analisadas, e a 1512 cm^{-1}).

O tamanho das nanopartículas com ibuprofeno foi menor do que aquelas sem ibuprofeno devido às forças de atração entre o fármaco e o polímero, apresentando no entanto uma elevada estabilidade.

A análise por microscopia eletrônica de varrimento das nanopartículas com e sem ibuprofeno não permitiu tirar grandes conclusões sobre os tamanhos das partículas nem sobre a sua morfologia. Relativamente aos ensaios de libertação, as primeiras conclusões foram que, tal como tinha sido corroborado pelas análises de caracterização, não foi possível incorporar ibuprofeno nas nanopartículas de Eudragit® L100-55.

Em relação aos estudos com Eudragit® E PO com a solução de nanopartículas antes da liofilização, concluiu-se que no caso do ensaio com uma menor quantidade de ibuprofeno (ensaio 14) a libertação para pH 1,2 não ocorreu devido à instabilidade da solução, enquanto para pH 6,8 a libertação foi muito rápida nas primeiras horas.

Para os ensaios 15 e 16 concluiu-se que a libertação a pH 6,8 foi muito elevada nas primeiras horas, tendo-se reduzido a velocidade de libertação no restante período de monitorização. Para o ensaio 15 a pH 1,2 e pH 5,5 a libertação foi praticamente igual, enquanto no ensaio 16, a libertação foi mais rápida para pH 5,5.

Globalmente, o aumento de ibuprofeno incorporado resultou numa libertação mais rápida.

O modelo cinético que melhor se ajustou à maioria dos estudos de libertação foi o modelo de primeira ordem, com exceção dos estudos a pH 5,5 para o ensaio 14. Do mesmo modo, o tipo de ajuste que melhor se adequou aos perfis de libertação obtidos foi o ajuste logarítmico, com exceção dos estudos a pH 1,2 e 5,5 para o ensaio 14, e do estudo a pH 6,8 para o ensaio 15.

Para os estudos com as nanopartículas de Eudragit® E PO liofilizadas concluiu-se, que para todos os estudos (ensaio 14, 15 e 16) a pH 1,2 a libertação foi muito rápida na primeira hora de ensaio, sendo que em seguida a libertação se manteve contante.

Para os valores de pH de 5,5 e 6,8 chegou-se praticamente à libertação de todo o ibuprofeno em todos os ensaios, com exceção do ensaio 15 (pH 5,5) e para o ensaio 16 (pH 5,5 e 6,8), sendo que a libertação foi sempre mais rápida a pH 6,8.

Globalmente, o aumento de ibuprofeno incorporado resultou na libertação mais lenta do fármaco ao longo do tempo.

O modelo cinético que melhor se ajustou à maioria dos estudos de libertação foi o modelo de primeira ordem, com exceção dos estudos a pH 6,8 para os ensaios 14 e 15. Para os estudos cujo melhor ajuste foi o modelo de primeira ordem o melhor tipo de ajuste foi o logarítmico, enquanto para os restantes o melhor tipo de ajuste foi o polinomial.

Para os estudos a pH 1,2 não foi efetuada análise da modelação cinética porque o valor do R quadrado se encontrava bastante afastado do valor unitário.

Concluiu-se portanto que os resultados para as nanopartículas não liofilizadas são ligeiramente distintos dos resultados para as nanopartículas sujeitas a liofilização, em termos do perfil de libertação perante diferentes pH, e por isso, a aplicação de cada conjunto de nanopartículas terá de ter isso em conta.

Em termos de recomendações ou melhorias para futuros trabalhos no âmbito deste tema, salienta-se a necessidade de uma caracterização mais detalhada dos polímeros estudados já que a informação disponível é escassa, sendo este um fator essencial para se obterem melhores resultados na síntese de nanopartículas. Outro aspeto a considerar na síntese de nanopartículas seria testar a possível influência da velocidade de congelação na obtenção de nanopartículas na forma de pó.

Uma vez que não foi possível incorporar o ibuprofeno nas nanopartículas de Eudragit® L100-55 através do procedimento estabelecido, seria conveniente estudar um procedimento alternativo para que esta incorporação fosse possível.

Nos estudos de libertação seria interessante estudar pormenorizadamente uma forma de se poder fazer o controlo/branco corretamente nos estudos com nanopartículas pré-liofilização, uma vez que este fator se apresentou como uma grande limitação em termos da interpretação dos resultados. Seria ainda interessante estudar a libertação de ibuprofeno a outros valores de pH.

Por fim, apresenta-se como bastante interessante utilizar estes polímeros e explorar as suas aplicações nas mais diversas formas de sistemas de libertação controlada e ainda recorrer a outras técnicas de caracterização para estudar o efeito das variações de pH no comportamento de intumescimento do polímero Eudragit® E PO.

Com tudo isto, concluiu-se que o trabalho desenvolvido no âmbito da dissertação permitiu abrir horizontes para uma imensidão de possibilidades, uma vez que estes polímeros são bastantes

versáteis e desconhecidos ao mesmo tempo, apresentando-se como promissora a aplicação dos mesmos como sistemas de libertação controlada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Aguilar, L., Unnithan, A., Amarjargal, A., Tiwari, S., Hong, S., Park, C., & Kim, C. (2015). Electrospun polyurethane/Eudragit® L100-55 composite mats for the pH dependent release of paclitaxel on duodenal stent cover application. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.057>
- Almeida, H., Amaral, M., & Lobão, P. (2012). Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 01–10. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2609>
- Al-Taani, B., & Tashtoush, B. (2003). Effect of microenvironment pH of swellable and erodable buffered matrices on the release characteristics of diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech*, 4(3), 1–6. <http://doi.org/10.1208/pt040343>
- Arzenšek, D. (2010). *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. Ljubljana.
- Bajpai, A., Shukla, S., Bhanu, S., & Kankane, S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(11), 1088–1118. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., & Tan, W. (2012). Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Nanomedicine*, 7(8), 1253–1271. <http://doi.org/10.2217/nnm.12.87>
- Barreto, L. (2009). *Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por extrusión-esferonización*. Universidade de Santiago de Compostela. Tese de Doutoramento.
- Bawa, P., Pillay, V., Choonara, Y., & Du Toit, L. (2009). Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biomedical Materials*, 4, 1–15. <http://doi.org/10.1007/s13758-011-0009-3>
- Broido, A. (1969). A simple, sensitive graphical method of treating thermogravimetric analysis data. *Journal of Polymer Science Part A-2*, 7, 1761–1773. <http://doi.org/10.1002/pol.1969.160071012>
- Bucolo, C., Maltese, A., Puglisi, G., & Pignatello, R. (2002). Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an eudragit RS100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic Research*, 34(5), 319–323. <http://doi.org/10.1159/000065608>

- Cabane, E., Zhang, X., Langowska, K., Palivan, C., & Meier, W. (2012). Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases*, 7(9), 1–27. <http://doi.org/10.1007/s13758-011-0009-3>
- CeNTI. (n.d.). CeNTI - Centre for Nanotechnology and Smart Materials. Retirado 31 de Janeiro , 2015, from <http://www.centi.pt>
- Chidambaram, M., & Krishnasamy, K. (2013). A Step-by-Step Optimization Process to Fabricate Narrow Sized Dual Drug Loaded Polymeric Nanoparticles Using Modified Nanoprecipitation Technique. *Nano Biomed. Eng.*, 5(3), 107–115. <http://doi.org/10.5101/nbe.v5i3.p107-115.1>.
- Clogston, J., & Patri, A. (2011). Zeta Potential Measurement. Em S. McNeil (Ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (pp. 63–70). <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-197-1>
- Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Em *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 10815–10837). John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/9780470027318>
- Coelho, J., Ferreira, P., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A., Góis, J., & Gol, M. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA Journal*, 1, 164–209. <http://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>
- Dai, J., Nagai, T., Wang, X., Zhang, T., Meng, M., & Zhang, Q. (2004). PH-sensitive nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), 229–240. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.006>
- Danhier, F., Feron, O., & Pr eat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135–146. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>
- Dantu, A., Devi, D., Hari, B., & Mill, B. (2012). Enhancement of Solubility of Nimesulide in the Presence of Polymer with Milling Technique, 4(9), 1907–1914.
- Das, S., Suresh, P., & Desmukh, R. (2010). Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(2), 318–323. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2009.09.002>
- De Jong, W., & Borm, P. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149.
- Delgado, J. (2013). *Prepara o e caracteriza o de nanotransportadores (nanoc psulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lip dicos nanoestruturados) sem subst ncia ativa*. Instituto Polit cnico de Bragan a. Retirado de <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/9219>. Tese de Mestrado.
- Dhar, N., & Rajagopalan, S. (2011). A smart patch for transdermal drug delivery. Montreal.

- Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., & Ludwig, A. (2006). Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), 72–82. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.041>
- Duarte, A., Roy, C., Vega-González, A., Duarte, C., & Subra-Paternault, P. (2007). Preparation of acetazolamide composite microparticles by supercritical anti-solvent techniques. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1-2), 132–139. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.041>
- Ebnesajjad, S. (2014). Surface and Material Characterization Techniques. Em *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding* (2nd ed., pp. 39–75). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-323-26435-8.00004-6>
- Evonik Industries. (2012). *EUDRAGIT® L100-55 - Specification and Test Methods*. Retirado de <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/Documents/evonik-specification-eudragit-l-100-55.pdf>
- Evonik Industries. (2014). *EUDRAGIT® E 100, EUDRAGIT® E PO and EUDRAGIT® E 12,5 - Specification and Test Methods*. Retirado de <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/Documents/evonik-specification-eudragit-e-100,eudragit-e-po-and-eudragit-e-12,5.pdf>
- Evora, M., Gonçalves, O., Dutra, R., Diniz, M., Wiebeck, H., & Andrade e Silva, L. (2002). Comparação de Técnicas FTIR de Transmissão, Reflexão e Fotoacústica na Análise de Poliamida-6, Reciclada e Irradiada. *Polímeros:Ciência E Tecnologia*, 12(1), 60–68. <http://doi.org/10.1590/S0104-14282002000100013>
- Fiel, L., Contri, R., Bica, J., Figueiró, F., Battastini, A., Guterres, S., & Pohlmann, A. (2014). Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. *Nanoscale Research Letters*, 9(233), 1–11. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-9-233>
- Fitzpatrick, S., Fitzpatrick, L., Thakur, A., Mazumder, M., & Sheardown, H. (2012). Temperature-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Review of Medical Devices*, 9(4), 339–351. <http://doi.org/10.1586/erd.12.24>
- Földvári, M. (2011). *Handbook of the thermogravimetric system of minerals and its use in geological practice*. (G. Maros, Ed.) *Central European Geology*. Budapest: Geological Institute of Hungary. <http://doi.org/10.1556/CEuGeol.56.2013.4.6>
- Forrest, M. (2008). Application to Thermoplastics and Rubbers. Em Paul Gabbott (Ed.), *Principles and Applications of Thermal Analysis* (pp. 190–250). Blackwell Publishing.
- Gaikwad, V., Bhatia, M., & Singhvi, I. (2013). Effect of polymeric properties on physical characteristics of fast disintegrating ibuprofen tablets : A statistical approach. *Der Pharmacia Lettre*, 5(3), 140–147.

- Gao, W., Chan, J., & Farokhzad, O. (2010). pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 7(6), 1913–1920. <http://doi.org/10.1021/mp100253e.pH-responsive>
- Gethin, G. (2007). The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*, 3(3), 52–56.
- Hadgraft, J., & Valenta, C. (2000). pH, pK(a) and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 200(2), 243–247. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00402-6](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00402-6)
- Hadgraft, J., Whitefield, M., & Rosher, P. (2003). Skin penetration of topical formulations of ibuprofen 5%: An in vitro comparative study. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 16(3), 137–142. <http://doi.org/10.1159/000069759>
- Hanus, L., & Ploehn, H. (1999). Characterization Colloidal Materials Using Dynamic Light Scattering. Em A. Miling (Ed.), *Surface Characterization Methods - principles, Techniques, and Applications* (pp. 199–248). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hao, S., Wang, B., Wang, Y., Zhu, L., Wang, B., & Guo, T. (2013). Preparation of Eudragit L100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 127–133. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.036>
- Higton, F. (1999). The Pharmaceutics of Ibuprofen. Em K. Rainsford (Ed.), *Ibuprofen - A critical bibliographic review* (pp. 48–78). Taylor & Francis.
- Hoffman, A. (2013). Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 10–16. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.004>
- Hoogenboom, R. (2014). Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications. Em *Smart Polymers and their Applications* (pp. 15–44). Woodhead Publishing Limited. <http://doi.org/10.1533/9780857097026.1.15>
- Hu, J., Meng, H., Li, G., & Ibekwe, S. (2012). A review of stimuli-responsive polymers for smart textile applications. *Smart Materials and Structures*, 21, 23. <http://doi.org/10.1088/0964-1726/21/5/053001>
- Hughey, J., DiNunzio, J., Bennett, R., Brough, C., Miller, D., Ma, H., ... McGinity, J. (2010). Dissolution enhancement of a drug exhibiting thermal and acidic decomposition characteristics by fusion processing: a comparative study of hot melt extrusion and KinetiSol dispersing. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 760–774. <http://doi.org/10.1208/s12249-010-9431-y>
- Instruments, M. (2011). *Inform White Paper Dynamic Light Scattering. Malvern Guides.*
- Introduction to Nanotechnology. (2009). Nanoparticles and Their Applications. Retirado em 20 de Junho, 2015, de <http://nanogloss.com/nanoparticles/nanoparticles-and-their-applications/#axzz3dd30MCMX>

- Jiang, B., Hu, L., Gao, C., & Shen, J. (2005). Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties. *International Journal of Pharmaceutics*, *304*(1-2), 220–230. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.008>
- Kalimuthu, S., & Yadav, A. (2009). Formulation and evaluation of Carvedilol loaded Eudragit e 100 nanoparticles. *International Journal of PharmTech Research*, *1*(2), 179–183.
- Kawashima, Y., Niwa, T., Handa, T., Takeuchi, H., Iwamoto, T., & Itoh, K. (1989). Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *78*(1), 68–72.
- Kharia, A., Singhai, A., & Verma, R. (2012). Formulation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles of an Antiviral Drug for Gastroretention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, *4*(4), 1557–1558. Retirado de http://www.academia.edu/2611995/Formulation_and_Evaluation_of_Polymeric_Nanoparticles_of_an_Antiviral_Drug_for_Gastroretention
- Kiliçarslan, M., & Baykara, T. (2004). Effects of the permeability characteristics of different polymethacrylates on the pharmaceutical characteristics of verapamil hydrochloride-loaded microspheres. *Journal of Microencapsulation*, *21*(2), 175–189. <http://doi.org/10.1080/02652040310001637820>
- Kim, M. (2006). *Predicting thermally thin burning of polymer using TGA/DSC*. Universidade de Maryland. Retirado de <http://drum.lib.umd.edu/handle/1903/4215>. Tese de Mestrado.
- Kislalioglu, M., Khan, M., Blount, C., Goettsch, R., & Bolton, S. (1991). Physical characterization and dissolution properties of ibuprofen: Eudragit coprecipitates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *80*(8), 799–804. <http://doi.org/10.1002/jps.2600800820>
- Kuckling, D., Doering, A., Krahl, F., & Arndt, K. (2012). Stimuli-Responsive Polymer Systems. Em *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set* (Vol. 10, pp. 377–413). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00214-4>
- Kultima, J. (2010). *A novel design of gene therapy carriers - pH sensitive cationic nanoparticles with encapsulated iron oxide particles*. Universidade de Uppsala Escola de Engenharia. Tese de Mestrado.
- Lakshmi, P., Kumar, M., Sridharan, A., & Bhaskaran, S. (2011). Formulation and evaluation of ibuprofen topical gel: A novel approach for penetration enhancement. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *3*(3), 25–30.
- Lee, R., Shenoy, D., & Sheel, R. (2010). Micellar Nanoparticles: Applications for Topical and Passive Transdermal Drug Delivery. Em *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (pp. 37–58). Elsevier Inc. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10002-2>
- Lerdkanchanaporn, S., & Dollimore, D. (1997). A thermal analysis study of Ibuprofen. *Journal of Thermal Analysis*, *49*(2), 879–886. <http://doi.org/10.1007/BF01996773>

- Lin, S., Liao, C., & Hsiue, G. (1995). A reflectance FTIR/DSC microspectroscopic study of the nonisothermal kinetics of anhydride formation in Eudragit L-100 films. *Polymer Degradation and Stability*, 47(2), 299–303. [http://doi.org/10.1016/0141-3910\(94\)00129-V](http://doi.org/10.1016/0141-3910(94)00129-V)
- Liu, H., Zhan, X., Suwardie, H., Wang, P., & Gogos, C. (2012). Miscibility studies of indomethacin and Eudragit E PO by thermal, rheological, and spectroscopic analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(6), 2204–2212. <http://doi.org/10.1002/jps>
- Liyana, M., Nour, A., Rizauddin, D., Gimbut, J., & Nurdin, S. (2014). Stabilization and Characterization of Heavy Crude Oil-in-Water (O/W) Emulsions. *IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology*, 3(2), 489–496.
- Lucas, E., Soares, B., & Monteiro, E. (2001). Técnicas para determinação de peso molecular ponderal médio. Em *Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica* (1st ed., pp. 89–124). Rio de Janeiro: Serviços Editoriais, Ltda.
- Mainardes, R., & Evangelista, R. (2005). PLGA nanoparticles containing praziquantel: Effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2), 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.027>
- Makhmalzadeh, B., Torabi, S., & Azarpanah, A. (2012). Optimization of Ibuprofen delivery through rat skin from traditional and novel nanoemulsion formulations. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), 47–58.
- Malvern Instruments. (2015a). Dynamic Light Scattering (DLS). Retirado em 13 de Junho, 2015, de <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/>
- Malvern Instruments. (2015b). Electrophoretic Light Scattering (ELS). Retirado em 13 de Junho, 2015, de <http://www.malvern.com/en/products/technology/electrophoretic-light-scattering/>
- Mandal, B., Alexander, K., & Riga, A. (2010). Sulfacetamide loaded eudragit RL100 nanosuspension with potential for ocular delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 510–523.
- McNeil-Watson, F. (2013). Electrophoretic Light Scattering. Em *Encyclopedia of Biophysics* (1st ed., pp. 648–654). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6>
- Mohan, C. (2006). *Buffers - A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. California. Retirado de http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Buffers/CALBIOCHEM_Buffers.pdf
- Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573.
- Moustafine, R., Zaharov, I., & Kemenova, V. (2006). Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit E PO/Eudragit L100-55 interpolyelectrolyte complexes.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 63(1), 26–36.
<http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.10.005>

- Mu, L., & Feng, S. S. (2014). Fabrication, Characterization and in vitro Release of paclitaxel (Taxol®) Loaded Poly(Lactic-co-Glycol Acid) Microspheres Prepared by Spray Drying Technique with Lipid /Cholesterol Emulsifiers. Em S. S. Feng, J. Rompas, & S. Chong (Eds.), *Chemotherapeutic Engineering: Collected Papers of Si-Shen Feng—A Tribute to Shu Chien on His 82nd Birthday* (pp. 285–306). CRC Press. Retirado de https://books.google.com/books?id=sa_SBQAAQBAJ&pgis=1
- Muhaimin. (2013). *Study of Microparticle Preparation by the Solvent Evaporation Method Using Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)*. Universidade de Berlim. Retirado de http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000095490. Tese de Doutoramento.
- Nagarwal, R., Kant, S., Singh, P., Maiti, P., & Pandit, J. (2009). Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 136(1), 2–13.
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.12.018>
- National Cancer Institute. (2015). Benefits for Treatment and Clinical Outcomes. Retirado em 25 de Maio, 2015, de <http://nano.cancer.gov/learn/impact/treatment.asp>
- Nepolean, R., Narayanan, N., Subramaniam, N., Venkateswaran, K., & Vinoth, J. (2012). Preparation and characterization of nisoldipine nanoparticles by nanoprecipitation method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(11), 1989–1994.
- Oberoi, L. (2004). *Formulation of a fast-acting ibuprofen suspension by using nicotinamide as hydrotropic agent- application of DSC , spectroscopy and microscopy in assessment of the type of interaction*. Universidade de Toledo. Tese de Mestrado.
- Pan, H., Marsh, J., Christenson, E., Soman, N., Ivashyna, O., Lanza, G., ... Wickline, S. (2012). Postformulation Peptide Drug Loading of Nanostructures. Em N. Düzgünes (Ed.), *Methods in Enzymology Volume 508 - Nanomedicine: Cancer, Diabetes, and Cardiovascular, Central Nervous System, Pulmonary and Inflammatory Diseases* (pp. 17–40). Academic Press. Retirado de <https://books.google.com/books?id=eyLzDIt5AU4C&pgis=1>
- Panambur, G., Koltover, I., & Batcheller, S. (n.d.). Designing temperature and pH sensitive NIPAM based polymers. Retirado em 25 de Maio, 2015, de <http://www.sigmaldrich.com/materials-science/polymer-science/nipam-polymers.html>
- Pandya, V., Patel, J., & Patel, D. (2011). Formulation, optimization and characterization of simvastatin nanosuspension prepared by nanoprecipitation technique. *Der Pharmacia Lettre*, 3(2), 129–140.
- Parikh, T., Gupta, S., Meena, A., & Serajuddin, A. (2014). Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion - III: Polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *Journal of Excipients and Food Chem*, 5(1), 56–64.

- Particle Sizing Systems. (n.d.). Particle Sizing Systems. Retirado em 11 de Junho, 2015, de <http://pssnicomp.com/definitions/dynamic-light-scattering/>
- Patel, A., Bell, M., O'Connor, C., Inchley, A., Wibawa, J., & Lane, M. (2013). Delivery of ibuprofen to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, *457*(1), 9–13. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.019>
- Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., & Vyvyan, J. (2013). Infrared Spectroscopy. Em *Introduction to Spectroscopy* (5th ed., pp. 13–101). Stamford: Cengage Learning. Retirado de <http://www.gpatpharmaplus.com/wp-content/uploads/2013/07/Pavia-IR-spectroscopy.pdf>
- Pecosky, D., & Robinson, J. (1991). Bioadhesive Polymers and Drug Delivery. Em P. Tarcha (Ed.), *Polymers for Controlled Drug Delivery* (pp. 99–127). Florida: CRC Press. Retirado de https://books.google.pt/books?id=A73NI1TmS7wC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true
- Peer, D., Karp, J., Hong, S., Farokhzad, O., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, *2*(12), 751–760. <http://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Percival, S., Mccarty, S., Hunt, J., & Woods, E. (2014). The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair and Regeneration*, *22*, 174–186. <http://doi.org/10.1111/wrr.12125>
- PerkinElmer. (2010). *Thermogravimetric Analysis (TGA) - A Beginner's Guide*. Waltham. Retirado de http://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44-74556gde_tgabeginnersguide.pdf
- Petereit, H., & Weisbrod, W. (1999). Formulation and process considerations affecting the stability of solid dosage forms formulated with methacrylate copolymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *47*(1), 15–25. [http://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00083-6](http://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00083-6)
- Pignatello, R., Bucolo, C., Ferrara, P., Maltese, A., Puleo, A., & Puglisi, G. (2002). Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *16*(1-2), 53–61. [http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00057-X](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00057-X)
- Pignatello, R., Bucolo, C., Spedalieri, G., Maltese, a., & Puglisi, G. (2002). Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials*, *23*(15), 3247–3255. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00080-7](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00080-7)
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new processo based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, *15*(7), 1056–1062. <http://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2014.06.008>

- Quinteros, D., Allemandi, D., & Manzo, R. (2012). Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit E 100. *Scientia Pharmaceutica*, *80*(2), 487–496. <http://doi.org/10.3797/scipharm.1107-17>
- Quinteros, D., Rigo, V., Kairuz, A., Olivera, M., Manzo, R., & Allemandi, D. (2008). Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *33*(1), 72–79. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.10.002>
- Rainsford, K. (2012). Introduction. Em *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects* (pp. 1–4). Sheffield: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rainsford, K., Kean, W., & Buchanan, W. (1999). Safety and Efficacy of Non-prescription (OTC) Ibuprofen. Em K. Rainsford (Ed.), *Ibuprofen - A critical bibliographic review* (pp. 324–376). Taylor & Francis.
- Rakesh, P., & Rajesh, P. (2014). Quantitative Analytical applications of FTIR Spectroscopy in Pharmaceutical and Allied Areas. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, *4*(2), 145–157.
- Ramukutty, S., & Ramachandran, E. (2012). Growth, spectral and thermal studies of ibuprofen crystals. *Crystal Research and Technology*, *47*(1), 31–38. <http://doi.org/10.1002/crat.201100394>
- Rao, J., & Geckeler, K. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, *36*(7), 887–913. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., & Saraf, S. (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(9), 1790–1798. <http://doi.org/10.1248/bpb.29.1790>
- Reimer, L. (1998). Introduction. Em A. Schawlow, A. Siegman, T. Tamir, & I. Lotsch (Eds.), *Scanning Electron Microscopy - Physics of Image Formation and Microanalysis* (2nd ed., pp. 1–12). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Reyes-Ortega, F. (2008). pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications. Em *Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine* (pp. 45–92). CRC Press. Retirado de <https://books.google.com/books?id=IJ5MfrfohuYC&pgis=1>
- Sagnella, S., & Drummond, C. (2012). Drug Delivery : a Nanomedicine Approach. *Australian Biochemist*, *43*(3), 5–9.
- Saha, N., Hasan, I., Nazmi, M., & Reza, S. (2013). Design and Development of Sustained Release Microspheres of Ibuprofen by Emulsification Solvent Evaporation Method Using Polymeric Blend, *16*(1), 39–44.

- Salgueiro, A. (2011). *Hidrogéis nanocompósitos de ouro para a libertação de fármacos*. Universidade de Aveiro. Tese de Mestrado.
- Samah, N. (2011). *Nanogel-based Carriers for topical delivery*. Universidade de Cardiff. Retirado de <http://orca.cf.ac.uk/54437/1/U584538.pdf>. Tese de Doutoramento.
- Sánchez-Borges, M., Capriles-Hulett, A., & Caballero-Fonseca, F. (2005). Risk of skin reactions when using ibuprofen-based medicines. *Expert Opinion on Drug Safety*, 4(5), 837–848. <http://doi.org/10.1517/14740338.4.5.837>
- Santos, S., Lorenzoni, A., Ferreira, L., Mattiazzi, J., Adams, A., Denardi, L. ., ... Cruz, L. (2013). Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. *Materials Science and Engineering C*, 33(3), 1389–1394. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.040>
- Sauer, D. (2008). *An Investigation of Formulation Factors and Processing Parameters for the Powder-Coating of Tablets*. Universidade do Texas em Austin. Retirado de <http://repositories.lib.utexas.edu/bitstream/handle/2152/3942/sauerd60033.pdf?sequence=2>. Tese de Doutoramento.
- Sauer, D., & McGinity, J. (2009). Properties of theophylline tablets dry powder coated with Eudragit E PO and Eudragit L100-55. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(6), 632–641. <http://doi.org/10.3109/10837450902882369>
- Schaffazick, S., Pohlmann, A., Mezzaliraa, G., & Guterres, S. (2006). Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(3), 562–569. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532006000300020>
- Schmaljohann, D. (2006). Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1655–1670. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.020>
- Schmitz, K. (1990). External perturbations. Em *Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules* (pp. 319–376). San Diego: Academic Press, Inc.
- Shen, X., Yu, D., Zhu, L., Branford-White, C., White, K., & Chatterton, N. (2011). Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1-2), 200–207. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.058>
- Siebert, F., & Hildebrandt, P. (2007). Theory of Infrared Absorption and Raman Spectroscopy. Em *Vibrational Spectroscopy in Life Science* (pp. 11–61). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. <http://doi.org/10.1002/9783527621347.ch2>
- Singh, R., & Lillard, J. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pahtol*, 86(3), 215–223. <http://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>. Nanoparticle-based

- Smith, K., & Oatley, C. (1955). The scanning electron microscope and its fields of application. *British Journal of Applied Physics*, *6*, 391–399. <http://doi.org/10.1088/0508-3443/6/11/304>
- Stuart, B. (2004). Introduction. Em *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications* (pp. 1–14). John Wiley & Sons, Inc.
- Tang, B., Dawson, M., Lai, S., Wang, Y., Suk, J., Yang, M., ... Hanes, J. (2009). Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(46), 19268–19273. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905998106>
- Tang, J., Xu, N., Ji, H., Liu, H., Wang, Z., & Wu, L. (2011). Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *International Journal of Nanomedicine*, *6*, 2429–2435. <http://doi.org/10.2147/IJN.S24185>
- Thakral, S., Thakral, N., & Majumdar, D. (2013). Eudragit®: a technology evaluation. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *10*(1), 131–149. <http://doi.org/10.1517/17425247.2013.736962>
- Thermo Nicolet Corporation. (2001). *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Madison. Retirado de <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>
- Tkacheva, T. N., Yefimova, S. L., Klochkov, V. K., Sorokin, A. V., & Malyukin, Y. V. (2014). Dynamics of dye release from nanocarriers of different types in model cell membranes and living cells. *Biopolymers an Cell*, *30*(4), 314–320.
- Torchilin, V. (2010). Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example. In M. Schafer-Korting (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 197, pp. 3–53). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3>
- Uchechi, O., Ogbonn, J., & Attama, A. (2014). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. Em A. D. Sezer (Ed.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (pp. 193–236). InTech. <http://doi.org/10.5772/57028>
- Van Driessche, A. (2013). *The Manufacturing and Characterisation of Amorphous Solid Dispersions of Felodipine and Eudragit® E Po and the Influence of Pe01*. Universidade de Queen's em Belfast. Tese de Mestrado.
- Verma, S., Kumar, S., Gokhale, R., & Burgess, D. (2011). Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *International Journal of Pharmaceutics*, *406*(1-2), 145–152. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.027>
- Vernon-Parry, K. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, *13*(4), 40–44. [http://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](http://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X)

- Vyazovkin, S. (2002). Thermogravimetric Analysis. Em E. Kaufmann (Ed.), *Characterization of Materials* (1st ed., pp. 344–362). Ohio: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471266965.com029>
- Weiner, B., Tscharnuter, W., & Fairhurst, D. (1993). Zeta Potential: A New Approach. *A Paper Presented at the Canadian Mineral Analysts Meeting*. Winnipeg. Retirado de <http://www.laborchemie.com/data/Weiner Zeta Potential.pdf>
- Weller, M. (2013). *Advanced oxidation treatment for ibuprofen, ketoprofen and naproxen in water and method for determining ibuprofen, ketoprofen and naproxen concentration using liquid-liquid extraction-gas chromatography-flame ionization detection*. Worcester Polytechnic Institute. Retirado de http://www.wpi.edu/Pubs/ETD/Available/etd-011413-164639/unrestricted/Weller_Thesis.pdf. Tese de Mestrado
- Wells, O. (2001). Scanning electron microscopy. Em *Encyclopedia of Materials Science: Science and Technology* (pp. 8265–8269). Elsevier Science Publishers. <http://doi.org/10.1002/sca.4950170309>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, *64*(5), 1020–1037. [http://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](http://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- Xu, R. (2000). Electrophoretic Light Scattering - Zeta Potencial Measurement. Em *Particle Characterization: Light Scattering Methods* (pp. 289–343). New York: Kluwer Academic Publishers.
- Yoo, J., Giri, N., & Lee, C. (2011). pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *403*(1-2), 262–267. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.032>
- Zhang, P., Forsgren, J., & Strømme, M. (2014). Stabilisation of amorphous ibuprofen in Upsalite, a mesoporous magnesium carbonate, as an approach to increasing the aqueous solubility of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, *472*(1-2), 185–191. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.025>

ANEXO I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO IBUPROFENO POR ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL

Na Figura Al.1 encontra-se a curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 1,2, determinada por espectroscopia de absorção Uv/vis.

O limite de quantificação para esta curva de calibração foi de 32,17 mg/L e o limite de detecção foi de 9,65 mg/L.

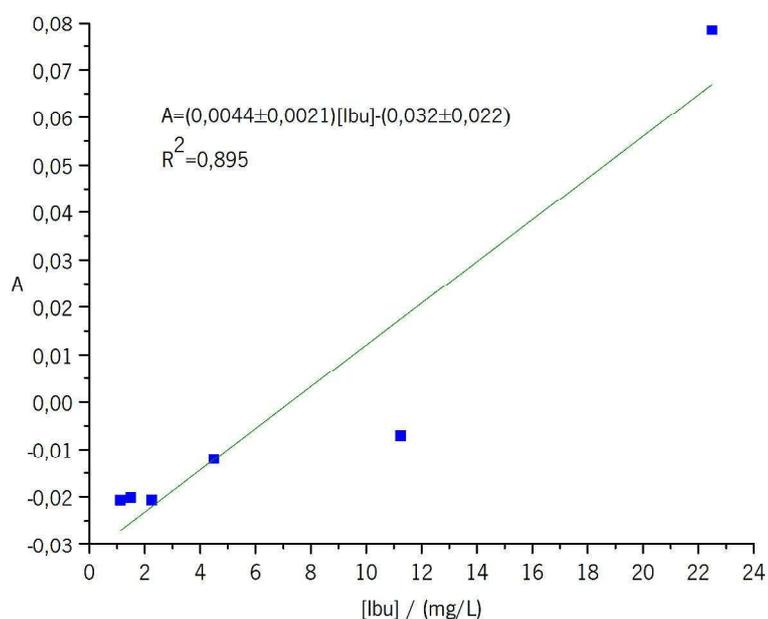


Figura Al.1 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 1,2 por espectroscopia de UV/vis.

Na Figura Al.2 encontra-se a curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 5,5 determinada por espectroscopia de absorção Uv/vis.

O limite de quantificação para esta curva de calibração foi de 7,05 mg/L e o limite de detecção foi de 2,11 mg/L.

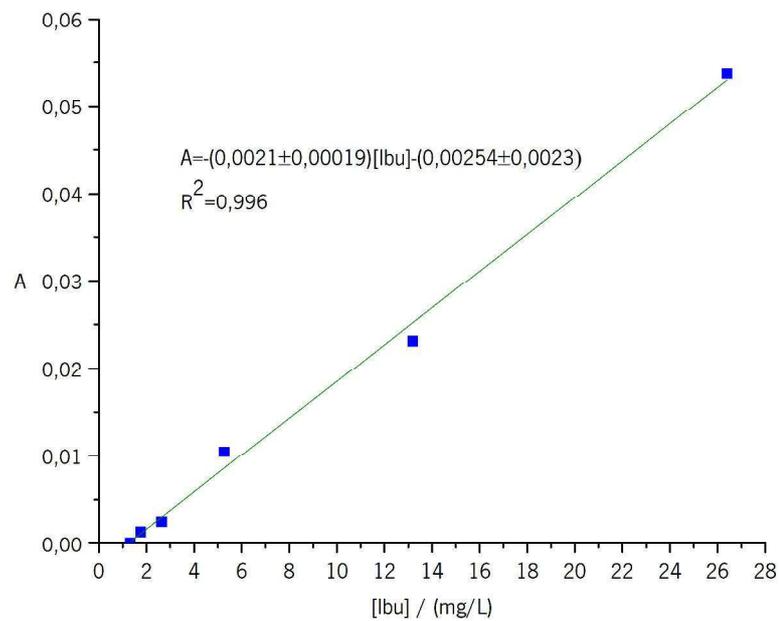


Figura AI.2 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 5,5 por espectroscopia de UV/vis.

Na Figura AI.3 encontra-se a curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 6,8 determinada por espectroscopia de absorção Uv/vis.

O limite de quantificação para esta curva de calibração foi de 12,84 mg/L e o limite de detecção foi de 3,85 mg/L.

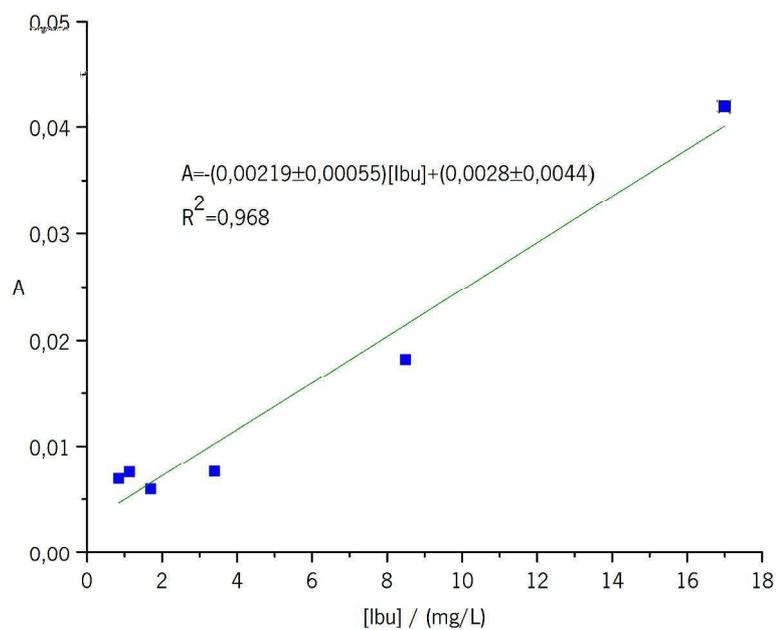


Figura AI.3 – Curva de calibração do ibuprofeno em água a pH 6,8 por espectroscopia de UV/vis.

ANEXO II – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS E DERIVADAS ASSOCIADAS PARA OS ENSAIOS REALIZADOS

Na Figura All.1 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 9.

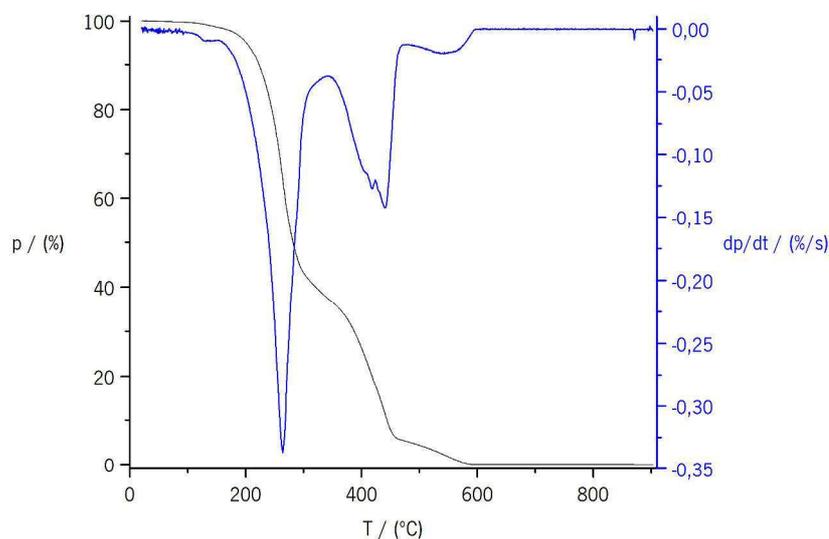


Figura All.1 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 9, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura All.2 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 10.

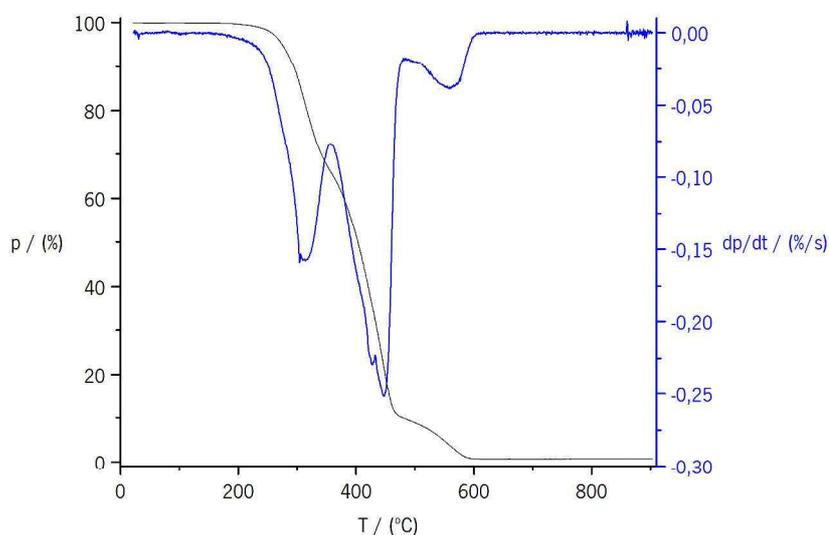


Figura All.2 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 10, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura All.3 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 11.

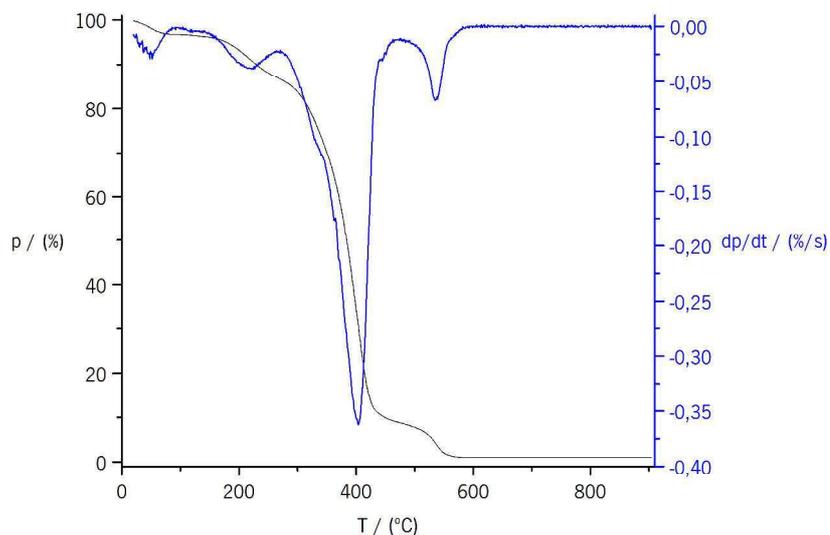


Figura All.3 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 11, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura All.4 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 12.

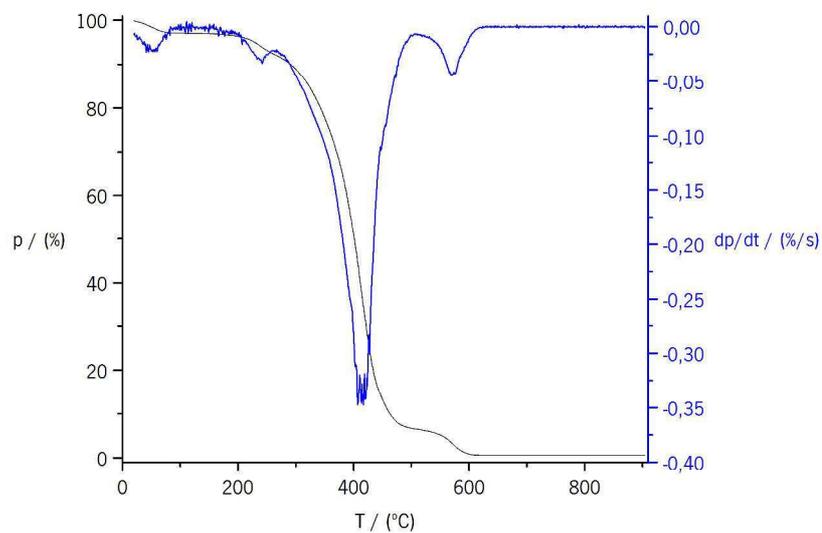


Figura All.4 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 12, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura All.5 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 13.

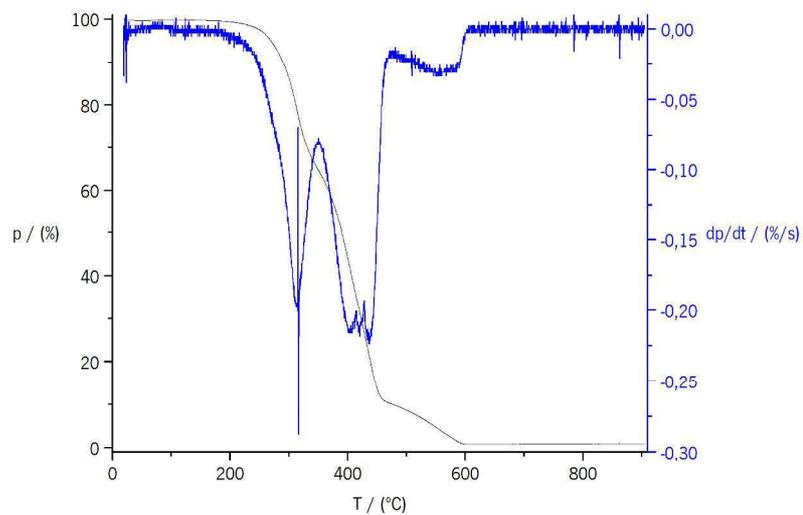


Figura AII.5 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 13, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura AII.6 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 14.

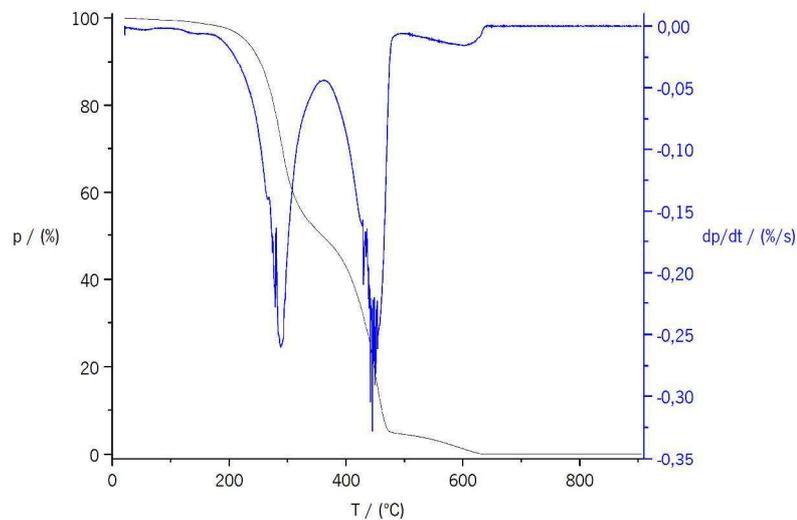


Figura AII.6 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 14, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura AII.7 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 15.

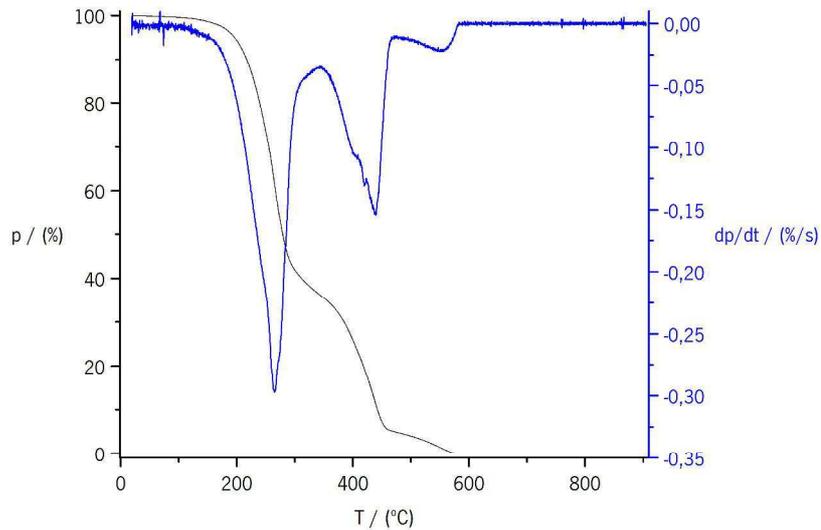


Figura AII.7 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 15, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura AII.8 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 16.

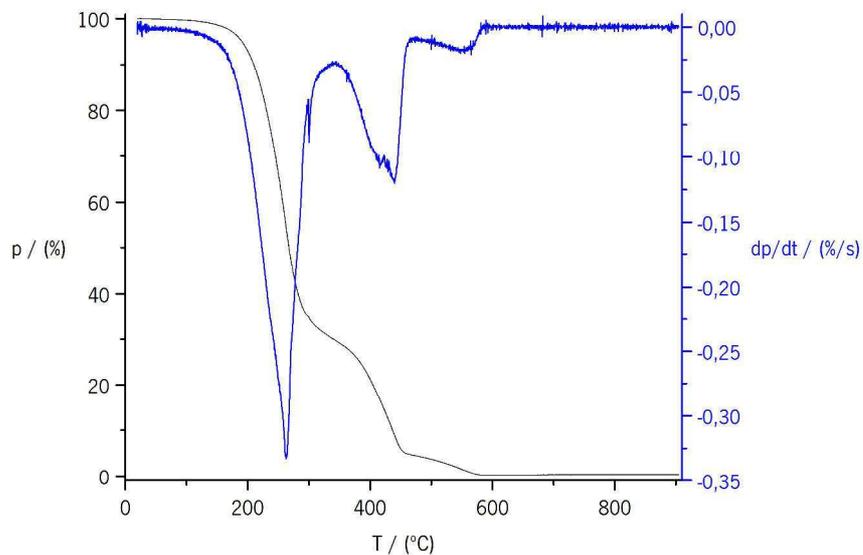


Figura AII.8 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 16, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura AII.9 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 17.

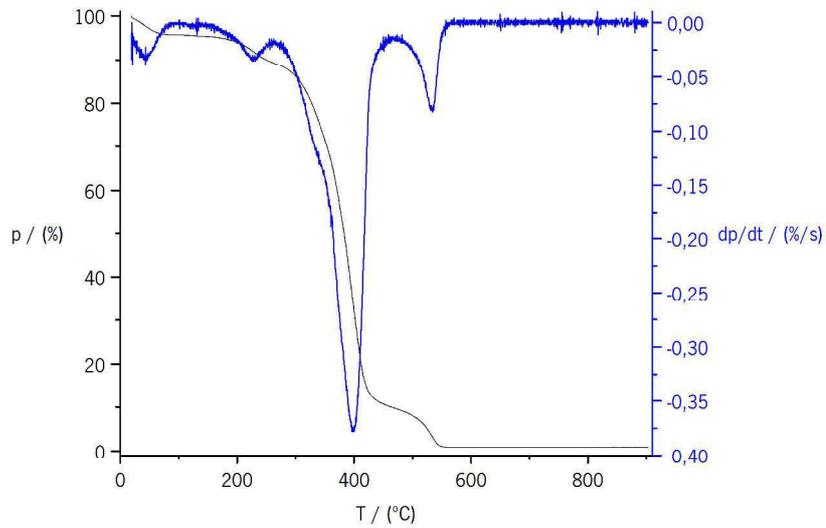


Figura All.9 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 17, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

Na Figura All.10 apresenta-se a curva termogravimétrica para o ensaio 18.

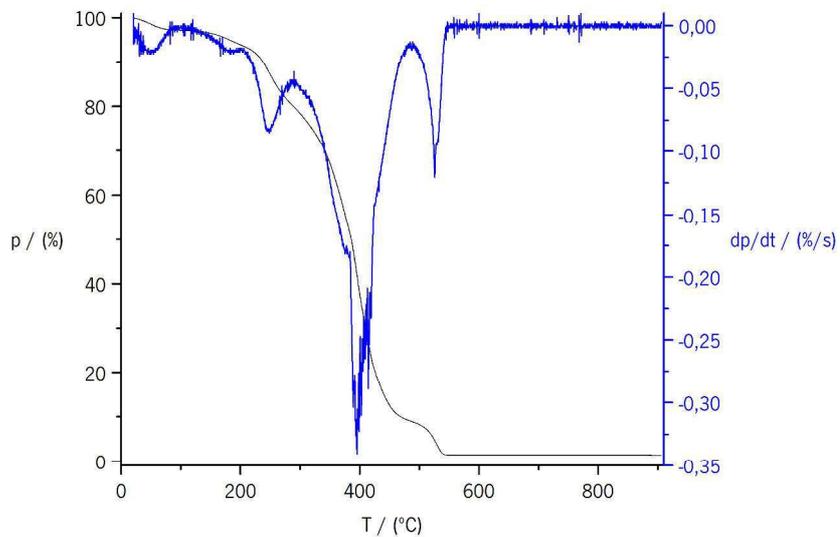


Figura All.10 – Curva termogravimétrica (a preto) e respetiva curva da derivada da perda de massa (a azul) das nanopartículas do ensaio 18, com a perda de massa (p) e a derivada da perda de massa (dp/dt) em função da temperatura (T).

ANEXO III – ESPETROS DE FTIR

Na Figura AIII.1 apresentam-se os espectros de FTIR para os ensaios 14, 15 e 16. Foi possível constatar que as bandas espectrais referentes ao ibuprofeno aumentam de intensidade com o aumento da quantidade de ibuprofeno incorporada (sendo o ensaio 14 aquele em que se usou uma menor quantidade de ibuprofeno, o ensaio 15 aquele em que se usou uma quantidade intermédia, e o ensaio 16 aquele em que se usou a maior quantidade de ibuprofeno).

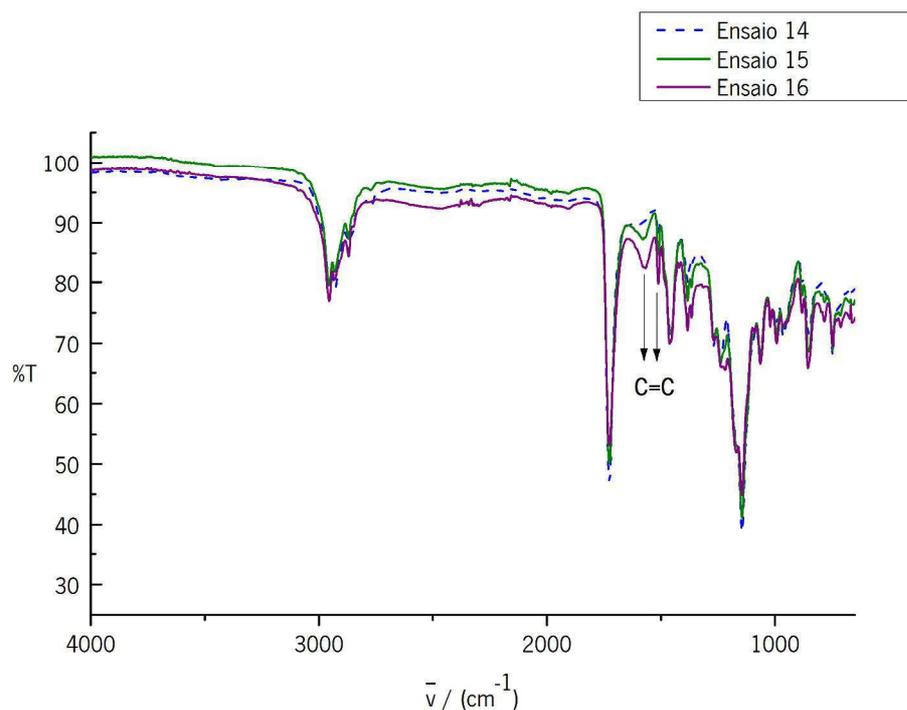


Figura AIII.1 – Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas nos ensaios 14, 15 e 16 após 16 varrimentos. Encontram-se assinaladas algumas bandas características.

ANEXO IV – ANÁLISE DE ESPETROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X

Através da espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X realizada no CEMUP, foi possível determinar a análise elementar ou caracterização química das amostras.

Na Figura AIV 1 encontra-se o espectro EDS de uma amostra do ensaio 13.

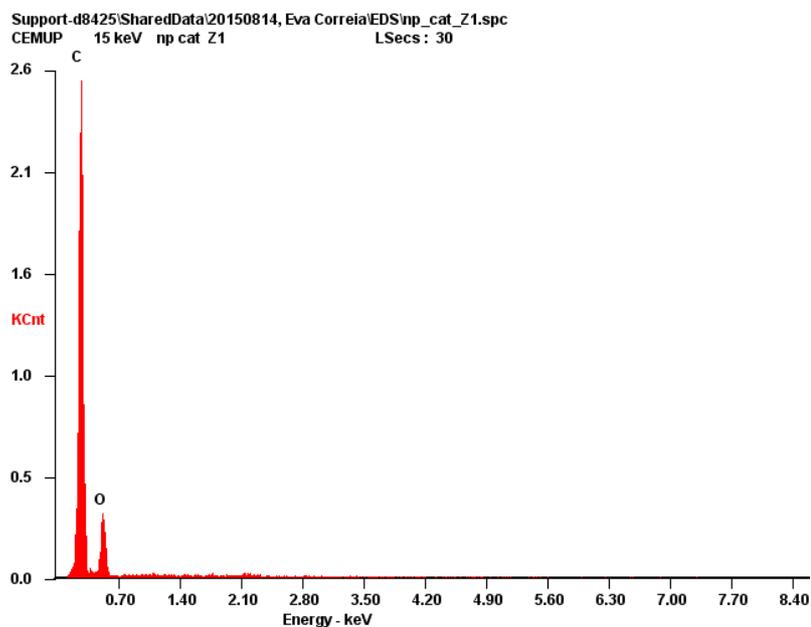


Figura AIV 1 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 13.

Na Figura AIV.2 encontra-se o espectro EDS de uma amostra do ensaio 15.

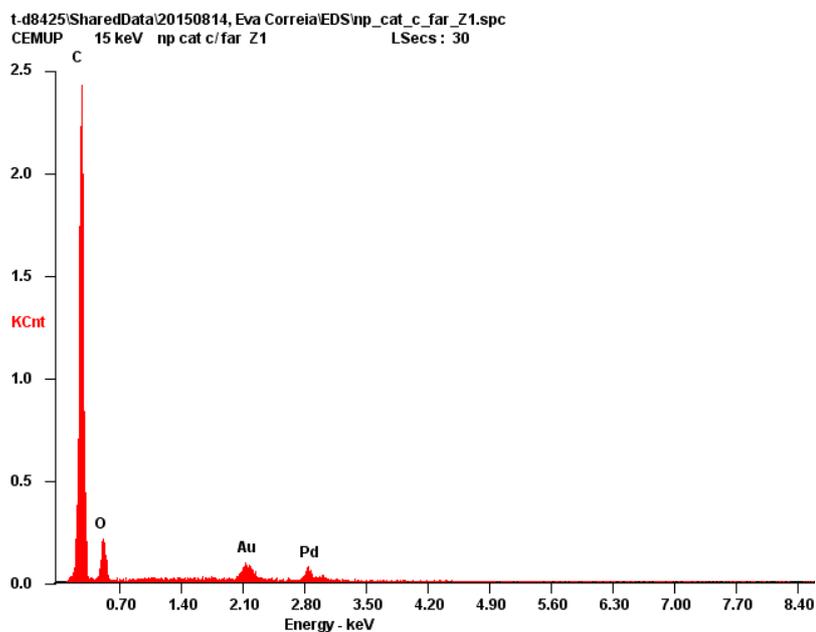


Figura AIV.2 – Espectro EDS de uma amostra do ensaio 15.

Na Figura AIV.3 encontra-se o espectro EDS de uma amostra do ensaio 17.

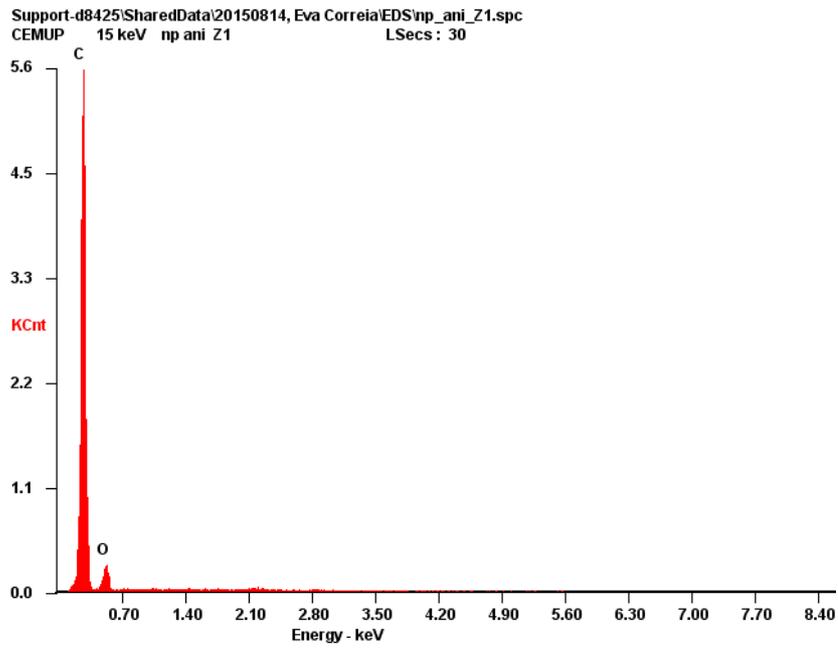


Figura AIV.3 – Espetro EDS de uma amostra do ensaio 17.

Na Figura AIV.4 encontra-se o espectro EDS de uma amostra do ensaio 18.

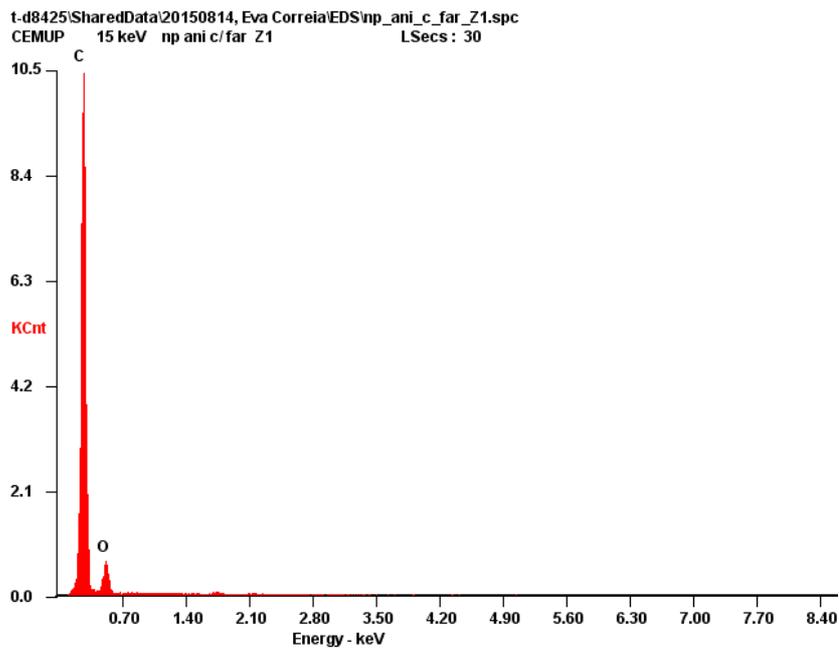


Figura AIV.4 – Espetro EDS de uma amostra do ensaio 18.

ANEXO V – ESPETRO DE UV/VIS DO IBUPROFENO

Na Figura AV.1 encontra-se o espectro de UV/vis característico do ibuprofeno.

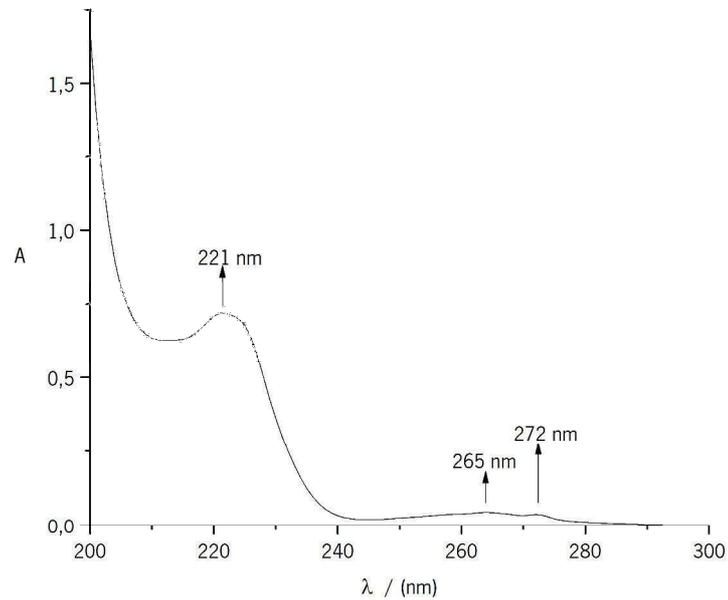


Figura AV.1 – Espectro característico de UV/vis para o ibuprofeno.

Na Figura AV.2 encontra-se o espectro de UV/vis para o ibuprofeno que se liberta nos estudos com as nanopartículas antes da liofilização.

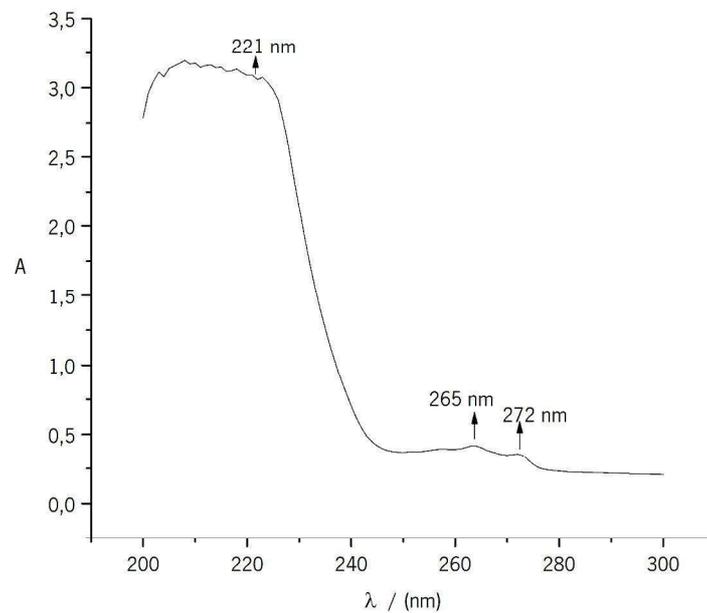


Figura AV.2 – Espectro de UV/vis para o ibuprofeno libertado das nanopartículas.

ANEXO VI – EXEMPLO DE CÁLCULO DA QUANTIDADE DE IBUPROFENO LIBERTADA PARA O ESTUDO PRÉ-LIOFILIZAÇÃO

Uma vez que os valores de absorvância para os ensaios com ibuprofeno não se devem apenas ao fármaco, mas também às interferências do meio (nanopartículas e reagentes) e como não foi possível usar esse meio como controlo/branco, foi necessário definir outra forma para representar os dados obtidos.

Analisando todos os valores de absorvância obtidos no estudo ao longo do tempo, selecionou-se o valor mais baixo como sendo o valor zero, subtraindo aos restantes valores de absorvância a esse valor (Equação 3).

$$A = A_{\text{real}} - A_0 \quad \text{Equação 3}$$

onde A é a absorvância no instante t, A_{real} é a absorvância lida pelo equipamento e A_0 é a absorvância mínima lida.

Em seguida calculou-se a quantidade cumulativa na forma de percentagem, ou seja, de todos os valores de absorvância obtidos após a subtração, admitiu-se que o valor máximo lido seria a absorvância máxima e, por consequência, a quantidade cumulativa máxima, e a partir desse pressuposto calculou-se a quantidade cumulativa dos restantes dados pela Equação 4.

$$\frac{q}{\%} = \frac{A}{A_{\text{máx}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde q é a quantidade cumulativa na forma de percentagem, A é a absorvância no instante t e $A_{\text{máx}}$ é a absorvância máxima.

ANEXO VII – GRÁFICOS DA MODELAÇÃO CINÉTICA DE ORDEM ZERO DOS ESTUDO DE LIBERTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PRÉ-LIOFILIZAÇÃO

Na Figura AVII.1 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 1,2.

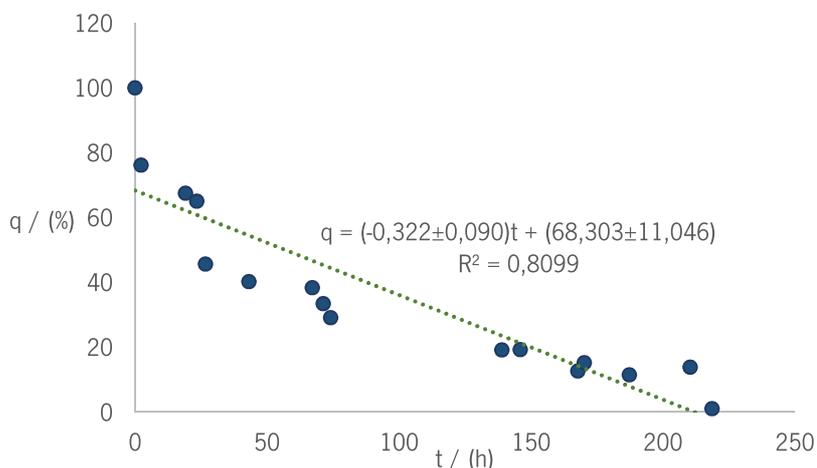


Figura AVII.1 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 1,2.

Na Figura AVII.2 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 5,5.

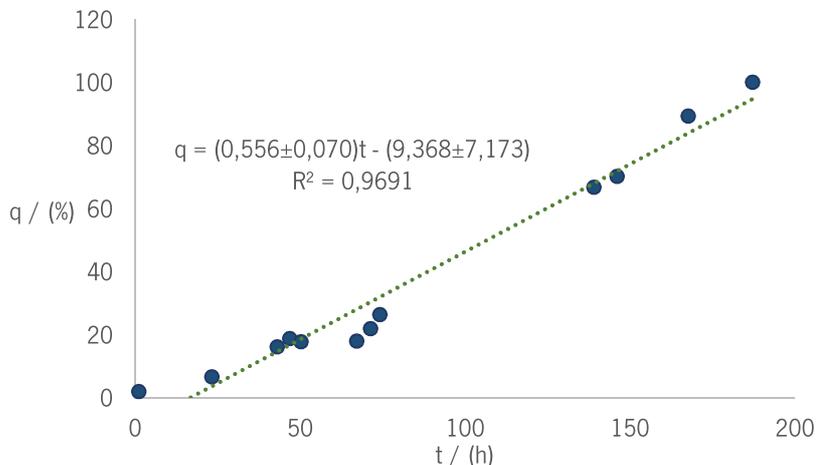


Figura AVII.2 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 5,5.

Na Figura AVII.3 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 6,8.

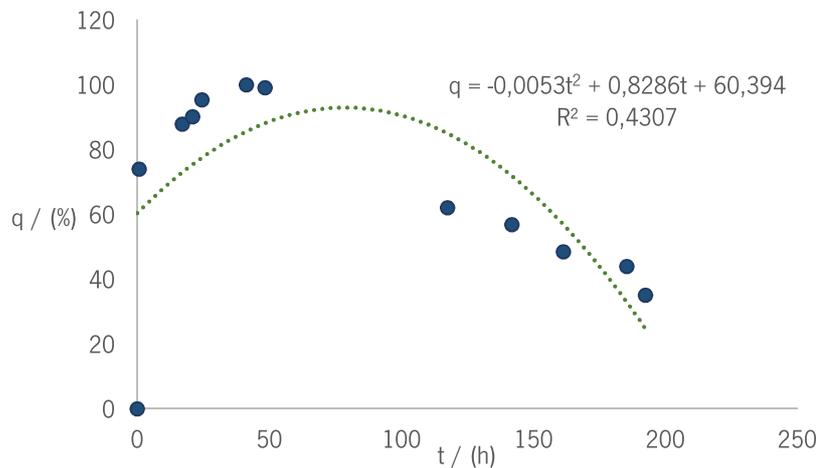


Figura AVII.3 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.

Na Figura AVII.4 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 1,2.

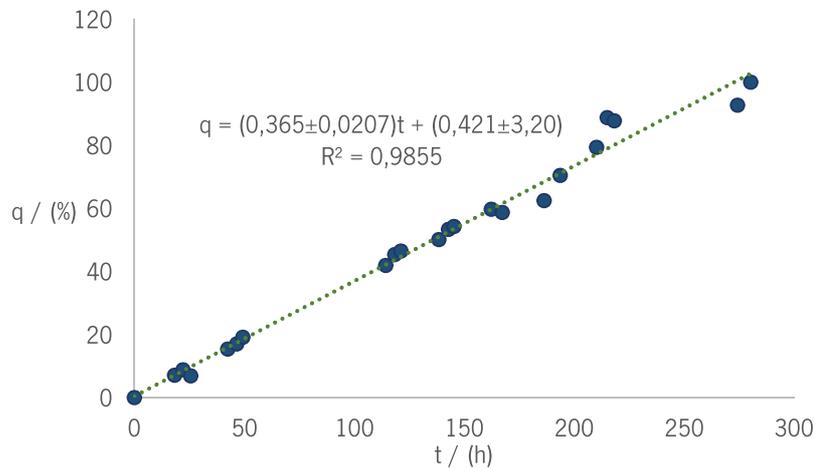


Figura AVII.4 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 1,2.

Na Figura AVII.5 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 5,5.

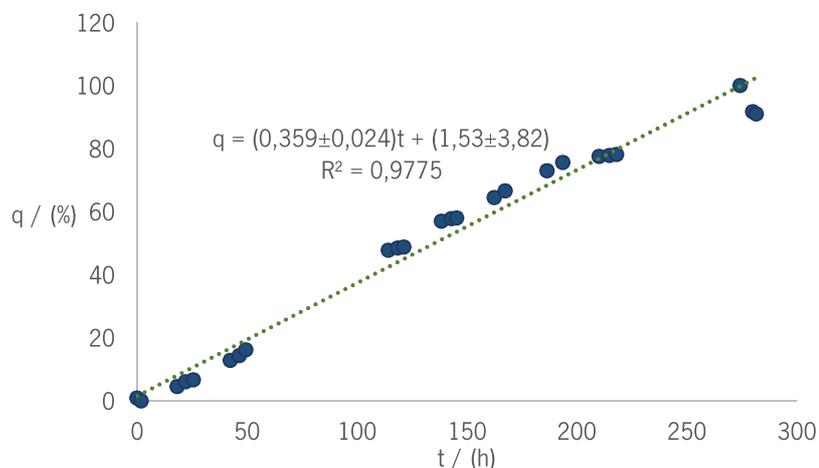


Figura AVII.5 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 5,5.

Na Figura AVII.6 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 6,8.

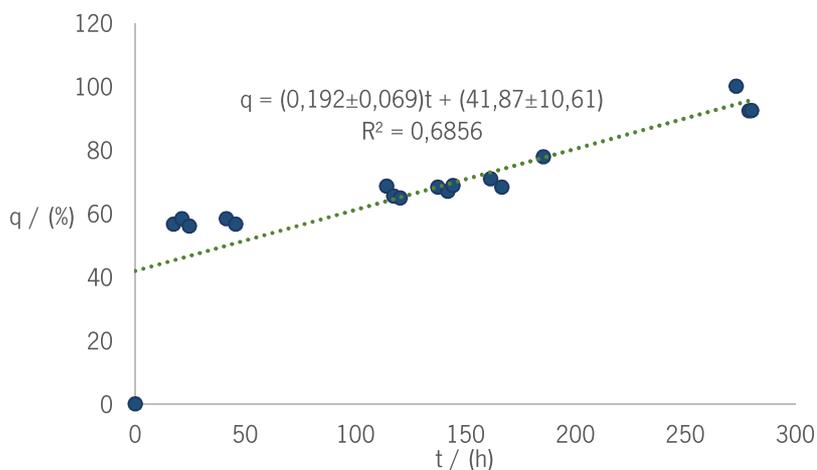


Figura AVII.6 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 6,8.

Na Figura AVII.7 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 1,2.

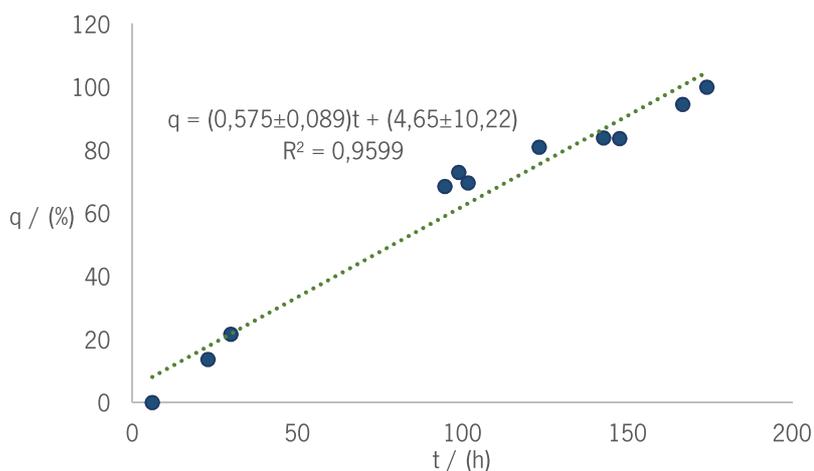


Figura AVII.7 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 16 a pH 1,2.

Na Figura AVII.8 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 5,5.

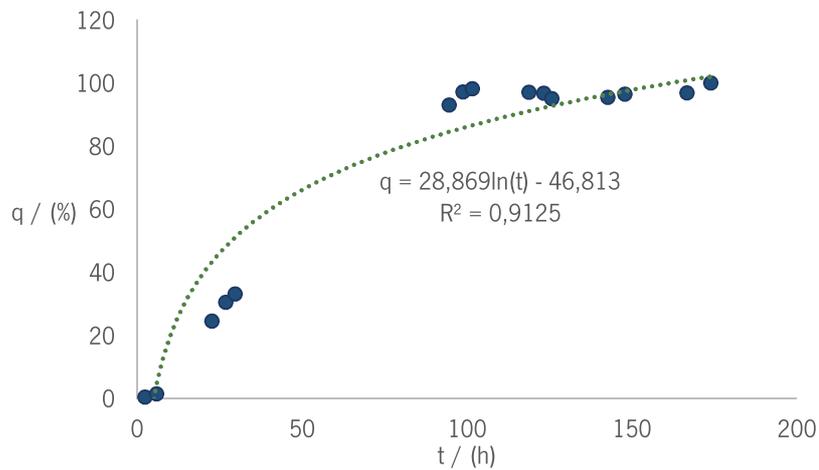


Figura AVII.8 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.

Na Figura AVII.9 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 6,8.

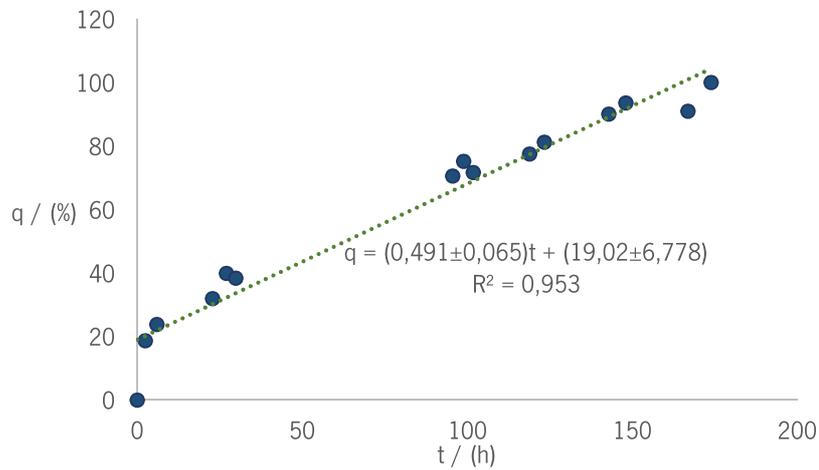


Figura AVII.9 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 16 a pH 6,8.

ANEXO VIII – GRÁFICOS DA MODELAÇÃO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM DOS ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PRÉ-LIOFILIZAÇÃO

Na Figura AVIII.1 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 1,2.

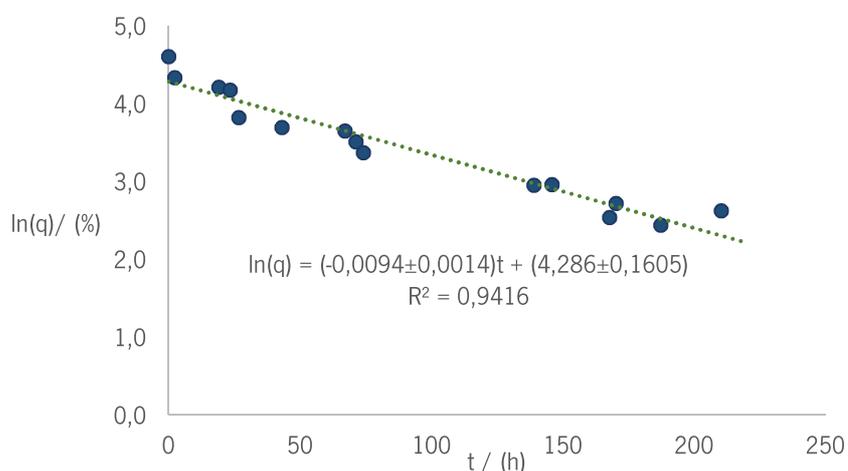


Figura AVIII.1 – Gráfico do logaritmo natural da liberação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 14 a pH 1,2.

Na Figura AVIII.2 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 5,5.

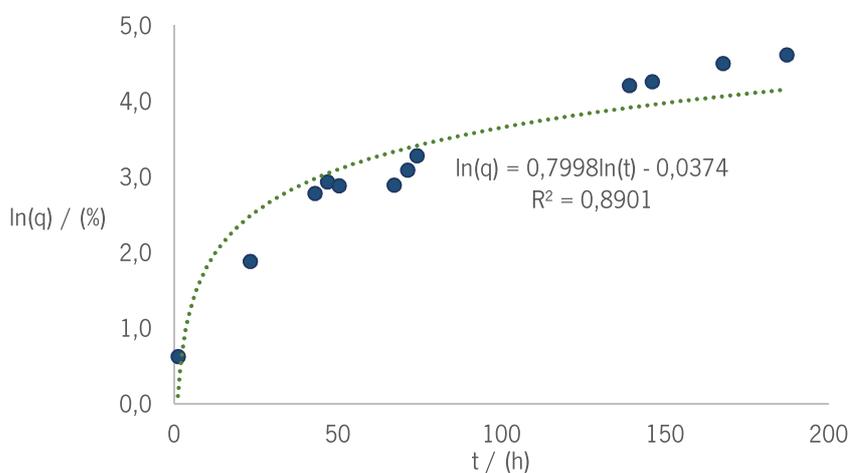


Figura AVIII.2 – Gráfico do logaritmo natural da liberação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 14 a pH 5,5.

Na Figura AVIII.3 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 6,8.

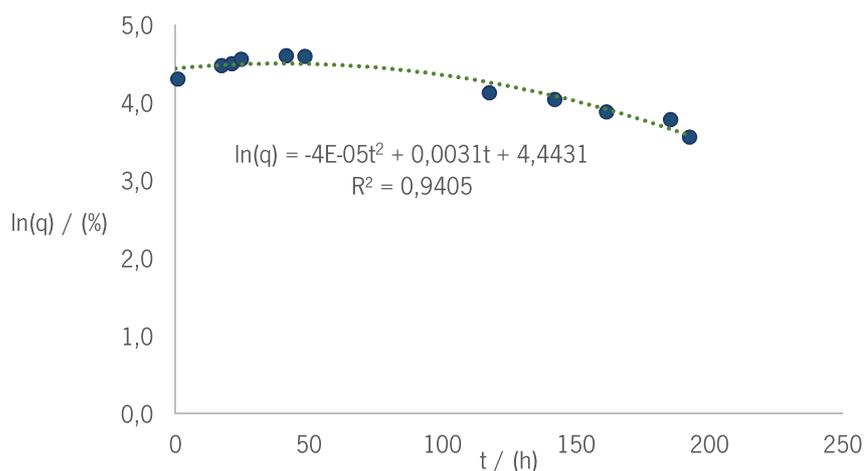


Figura AVIII.3 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.

Na Figura AVIII.4 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 1,2.

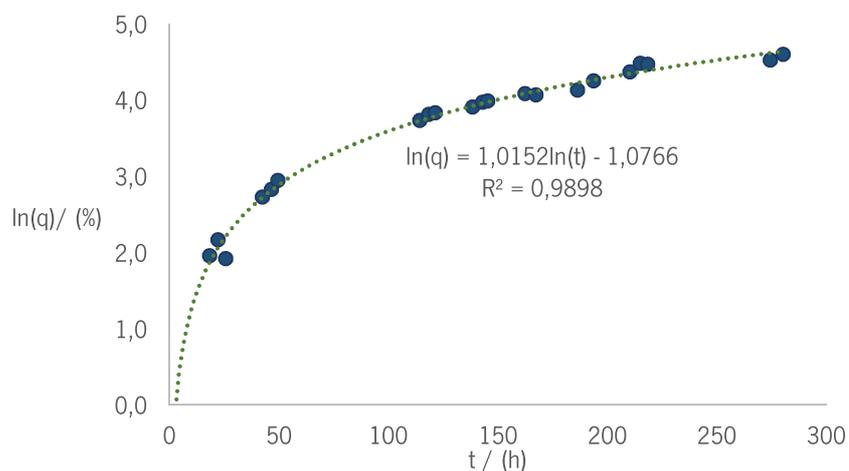


Figura AVIII.4 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 1,2.

Na Figura AVIII.5 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 5,5.

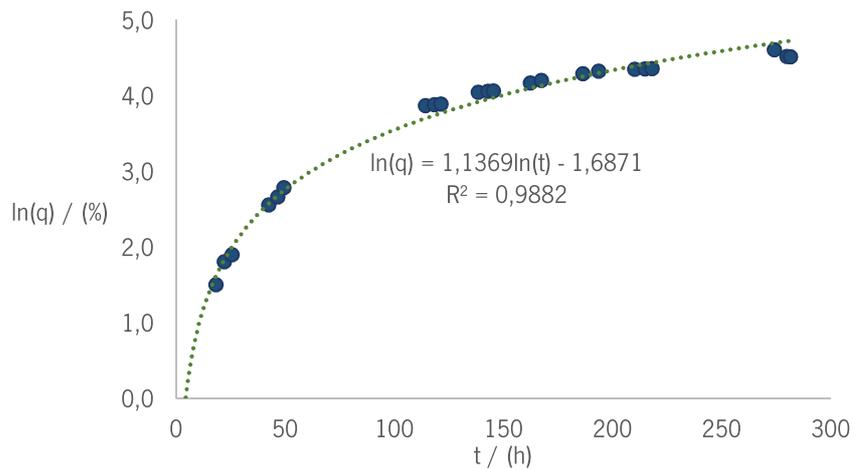


Figura AVIII.5 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 5,5.

Na Figura AVIII.6 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 6,8.

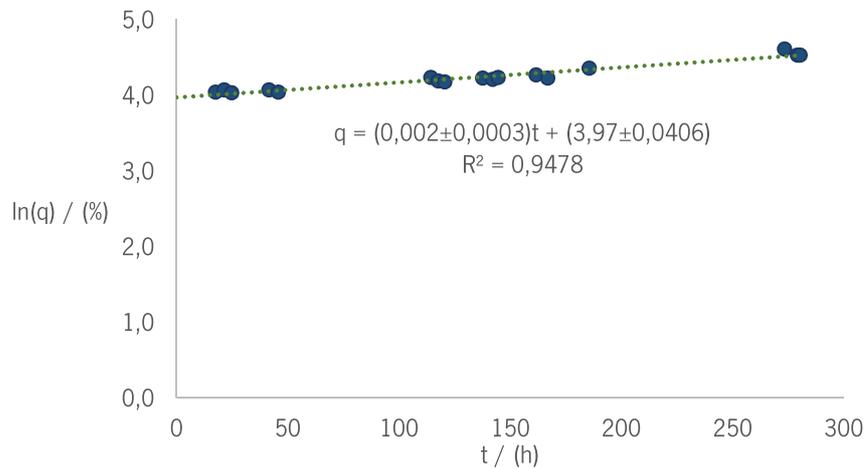


Figura AVIII.6 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste linear para o ensaio 15 a pH 6,8.

Na Figura AVIII.7 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 1,2.

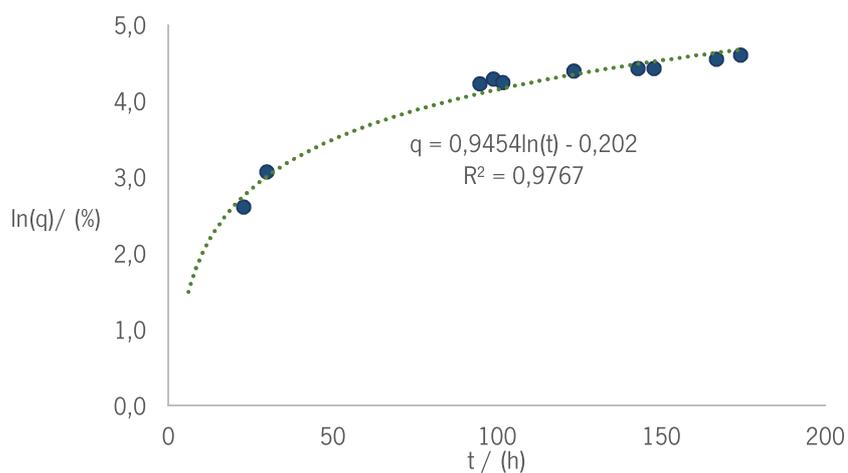


Figura AVIII.7 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 1,2.

Na Figura AVIII.8 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 5,5.

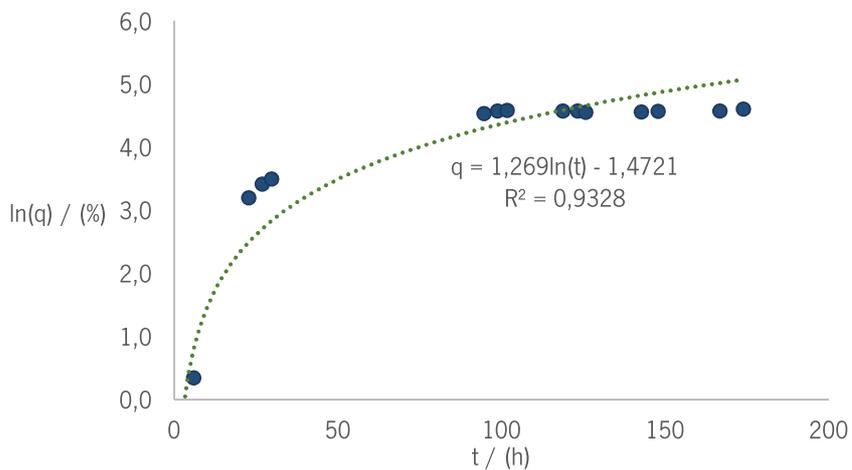


Figura AVIII.8 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.

Na Figura AVIII.9 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 6,8.

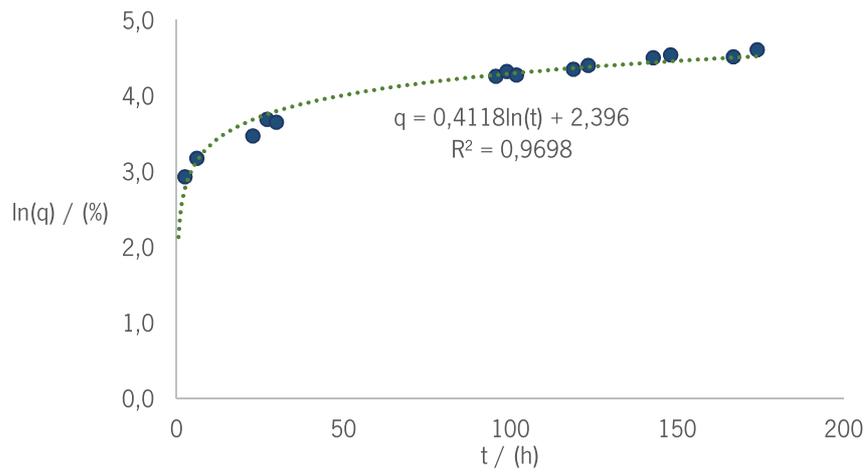


Figura AVIII.9 – Gráfico do logaritmo natural da liberação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.

ANEXO IX – EXEMPLO DE CÁLCULO DA QUANTIDADE DE IBUPROFENO LIBERTADA PARA O ESTUDO PÓS LIOFILIZAÇÃO

Uma vez que as concentrações de ibuprofeno foram superiores aos limites de quantificação das retas de calibração, não foi possível representar os estudos de libertação das nanopartículas liofilizadas em termos de concentração de ibuprofeno libertado em função do tempo, sendo usada outra forma para representar os dados obtidos.

Analisando todos os valores de concentração obtidos no estudo ao longo do tempo, selecionou-se o valor inicial como sendo o valor zero, subtraindo aos restantes valores de concentração esse valor (Equação 5).

$$[Ibu] = [Ibu]_{\text{real}} - [Ibu]_0 \quad \text{Equação 5}$$

onde $[Ibu]$ é a concentração de ibuprofeno no instante t , $[Ibu]_{\text{real}}$ é a concentração calculada pela reta de calibração utilizando a absorvância lida pelo equipamento e $[Ibu]_0$ é a concentração no instante 0.

Em seguida, calculou-se a quantidade cumulativa na forma de percentagem, ou seja, a fração entre a concentração de ibuprofeno obtida após a subtração da concentração inicial e a concentração incorporada, uma vez que segundo as curvas termogravimétricas aos ensaios com Eudragit® E PO, foi possível supor que o ibuprofeno foi incorporado totalmente.

Na Equação 6 apresenta-se a expressão matemática utilizada para calcular a quantidade cumulativa.

$$\frac{q}{\%} = \frac{[Ibu]}{[Ibu]_{\text{max}}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde q é a quantidade cumulativa, $[Ibu]$ concentração de ibuprofeno no instante t e $[Ibu]_{\text{max}}$ é a concentração máxima, a incorporada nas nanopartículas.

A concentração incorporada foi calculada sabendo-se a massa de nanopartículas utilizadas nos estudos de libertação, o volume de tampão, que foi igual em todos os estudos (50 mL), e a percentagem de ibuprofeno incorporada. Os dados utilizados para calcular a concentração de ibuprofeno incorporada nas nanopartículas encontram-se na Tabela AIX.1.

Tabela AIX.1 – Dados utilizados para o cálculo da concentração de ibuprofeno incorporada nas nanopartículas

Ensaio	Ibuprofeno incorporado / %	pH	m /mg
14	0,333	1,2	20,2±0,05
		5,5	14,9±0,05
		6,8	19,8±0,05
15	0,50	1,2	40,4±0,05
		5,5	19,8±0,05
		6,8	26,3±0,05
16	0,64	1,2	18,4±0,05
		5,5	19,0±0,05
		6,8	21,3±0,05

ANEXO X – GRÁFICOS DA MODELAÇÃO CINÉTICA DE ORDEM ZERO DOS ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIOFILIZADAS

Na Figura AX.1 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 1,2.

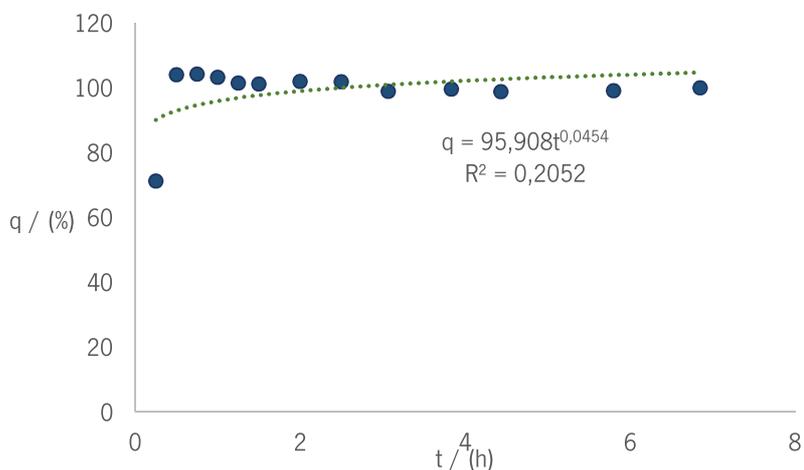


Figura AX.1 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 14 a pH 1,2.

Na Figura AX.2 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 5,5.

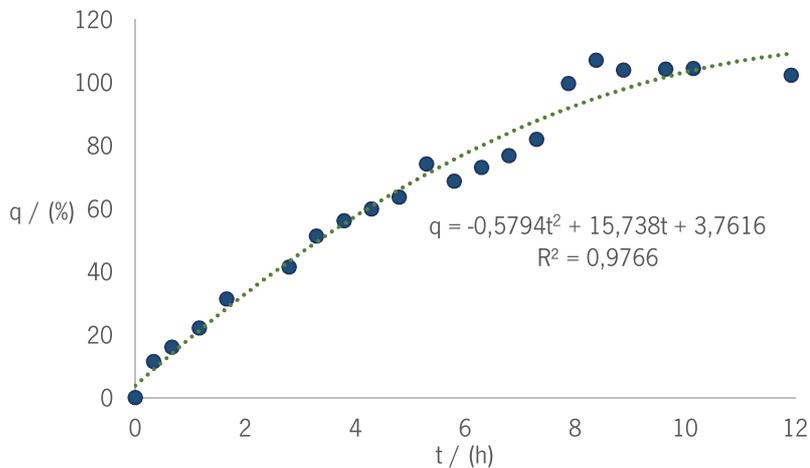


Figura AX.2 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 5,5.

Na Figura AX.3 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 6,8.

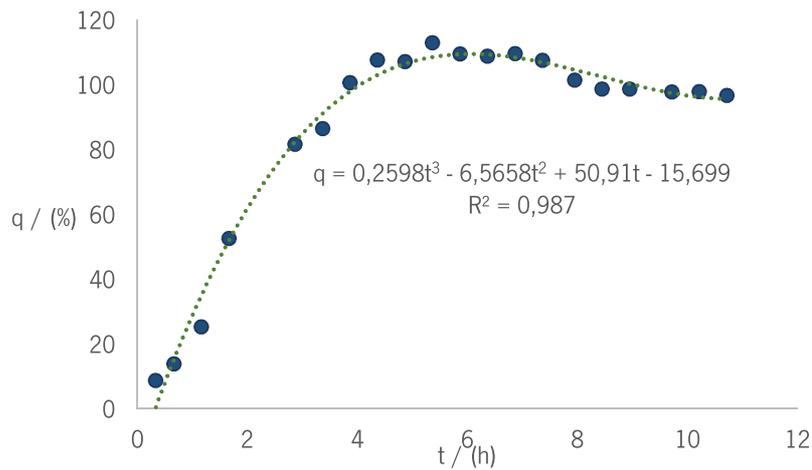


Figura AX.3 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.

Na Figura AX.4 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 1,2.

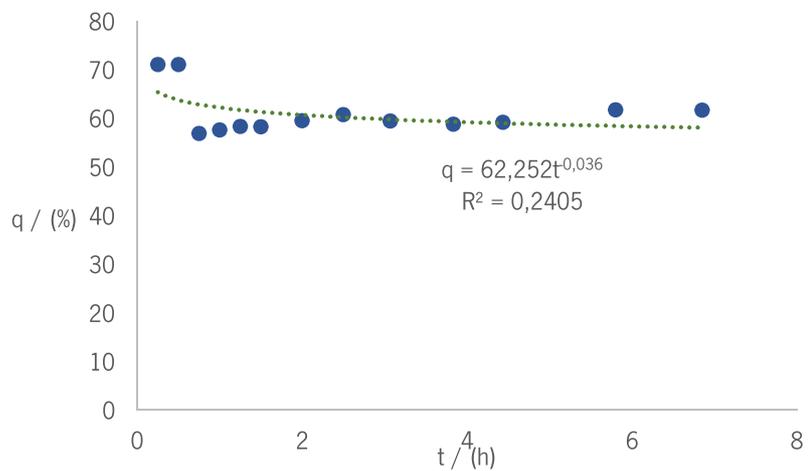


Figura AX.4 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 15 a pH 1,2.

Na Figura AX.5 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 5,5.

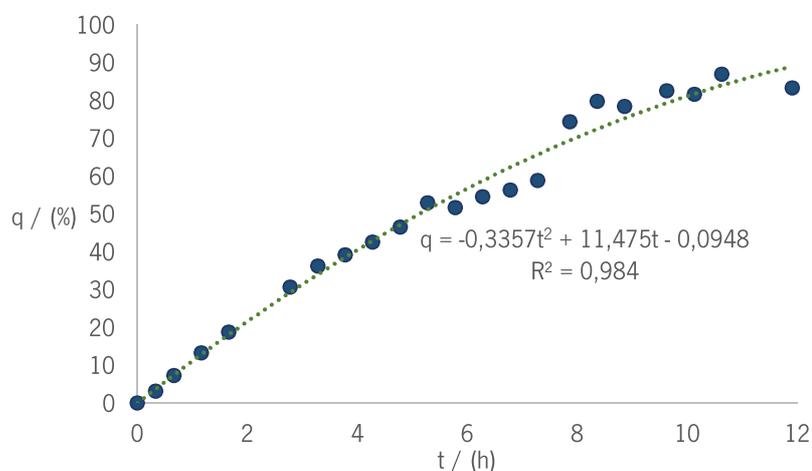


Figura AX.5 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 15 a pH 5,5.

Na Figura AX.6 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 6,8.

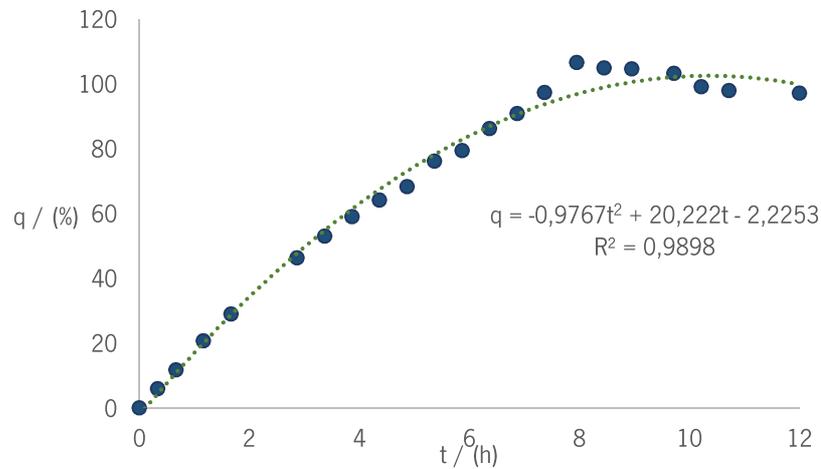


Figura AX.6 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 15 a pH 6,8.

Na Figura AX.7 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 1,2.

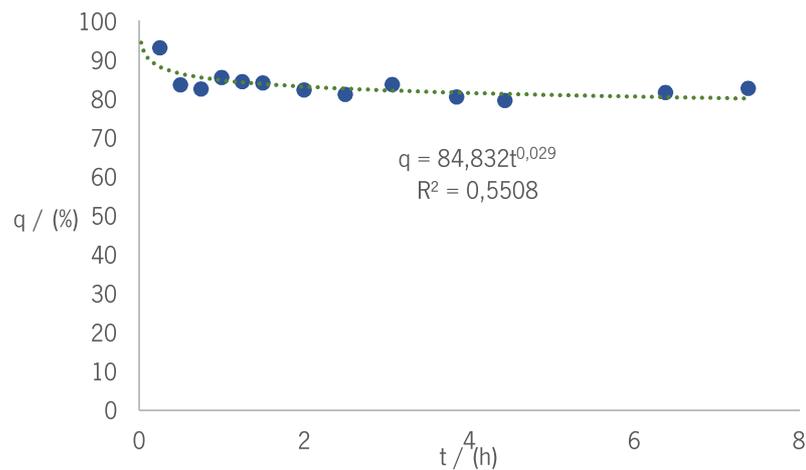


Figura AX.7 – Gráfico da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 16 a pH 1,2.

Na Figura AX.8 encontra-se o gráfico da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 5,5.

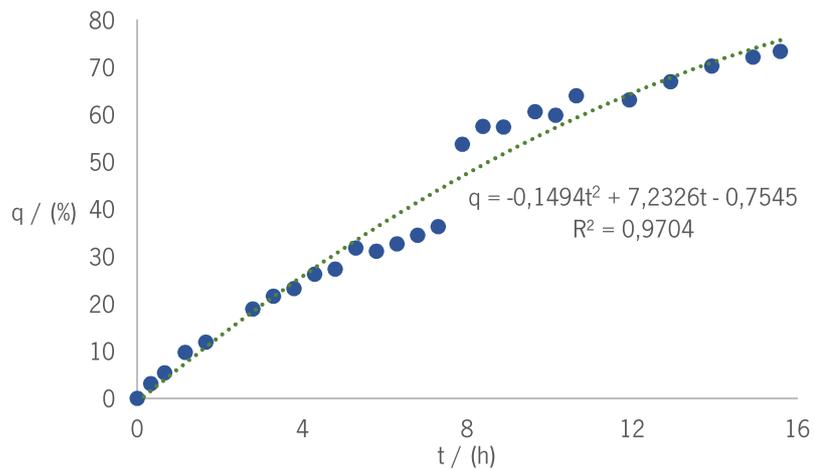


Figura AX.8 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 16 a pH 5,5.

Na Figura AX.9 encontra-se o gráfico da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 6,8.

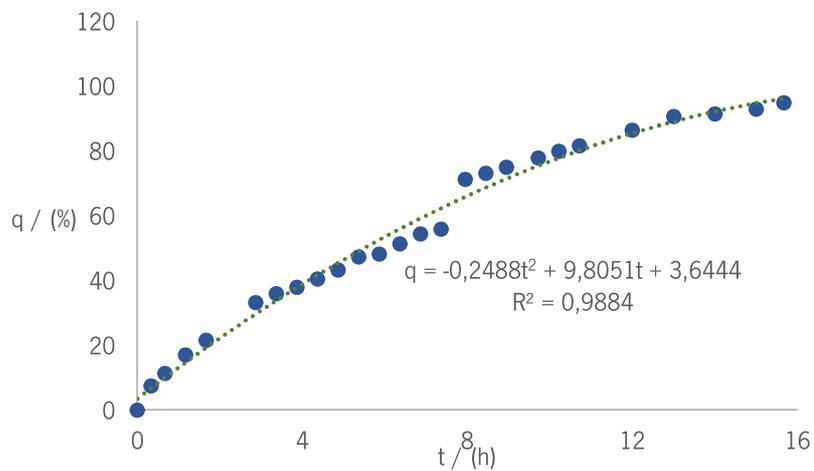


Figura AX.9 – Gráfico da liberação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 16 a pH 6,8.

ANEXO XI – GRÁFICOS DA MODELAÇÃO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM DOS ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIOFILIZADAS

Na Figura AXI.1 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 1,2.

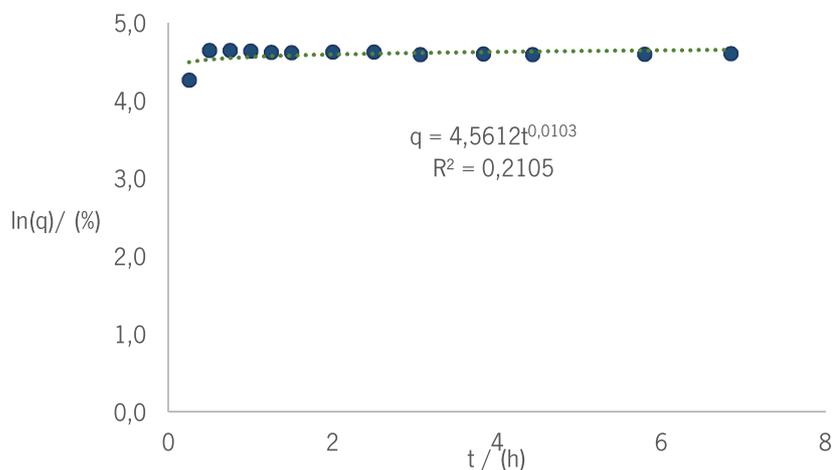


Figura AXI.1 – Gráfico do logaritmo natural da liberação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 14 a pH 1,2.

Na Figura AXI.2 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 5,5.

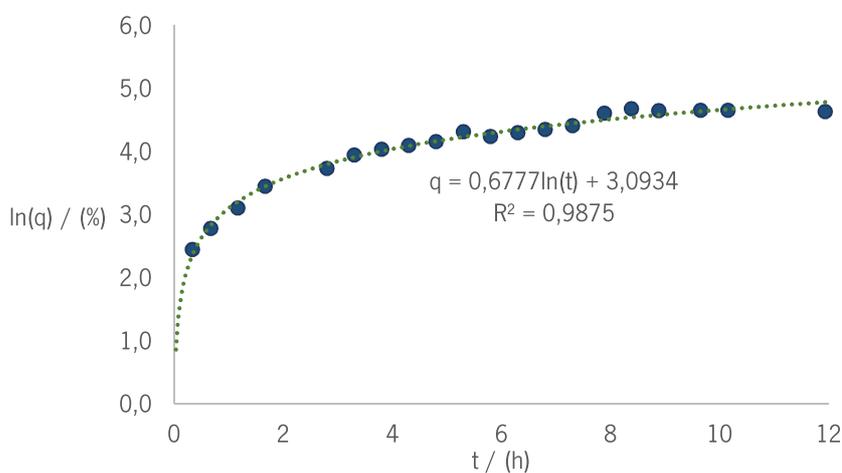


Figura AXI.2 – Gráfico do logaritmo natural da liberação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 14 a pH 5,5.

Na Figura AXI.3 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da liberação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 14 a pH 6,8.

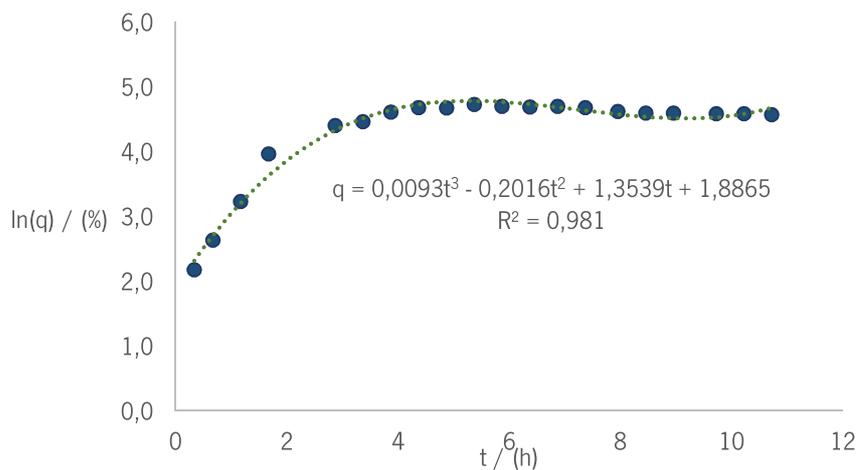


Figura AXI.3 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste polinomial para o ensaio 14 a pH 6,8.

Na Figura AXI.4 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 1,2.

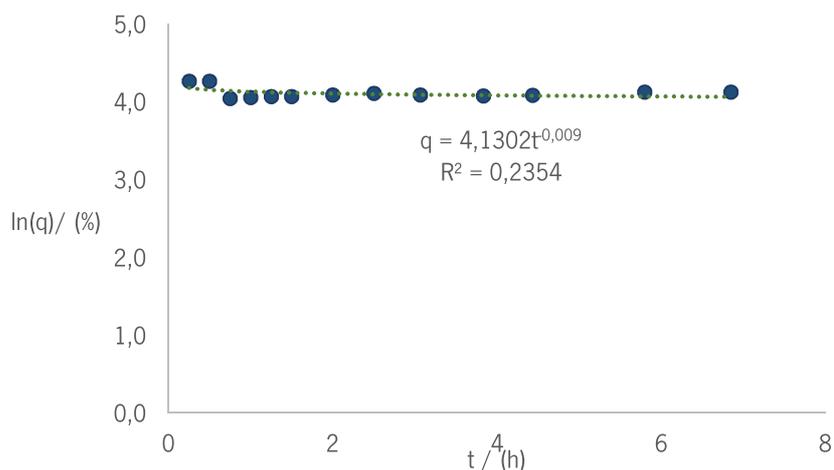


Figura AXI.4 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 15 a pH 1,2.

Na Figura AXI.5 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 5,5.

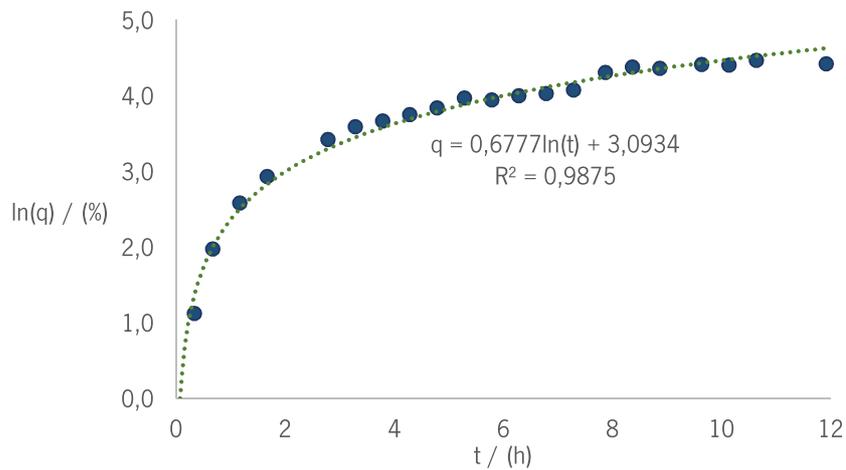


Figura AXI.5 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 5,5.

Na Figura AXI.6 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 15 a pH 6,8.

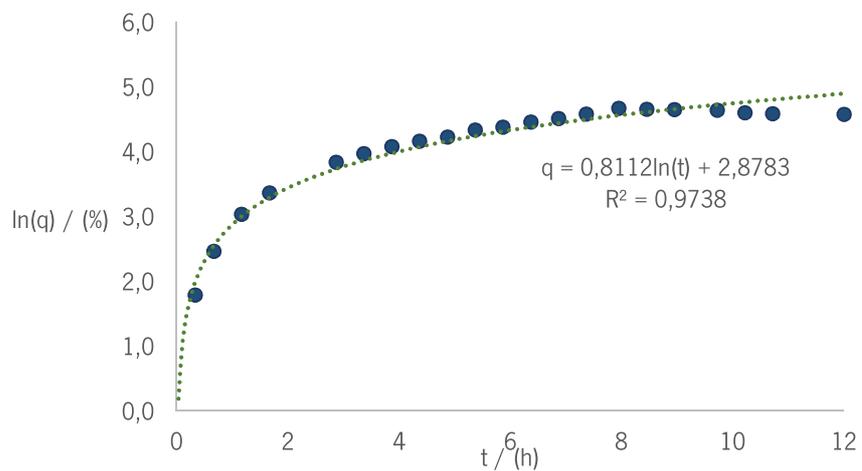


Figura AXI.6 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 15 a pH 6,8.

Na Figura AXI.7 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 1,2.

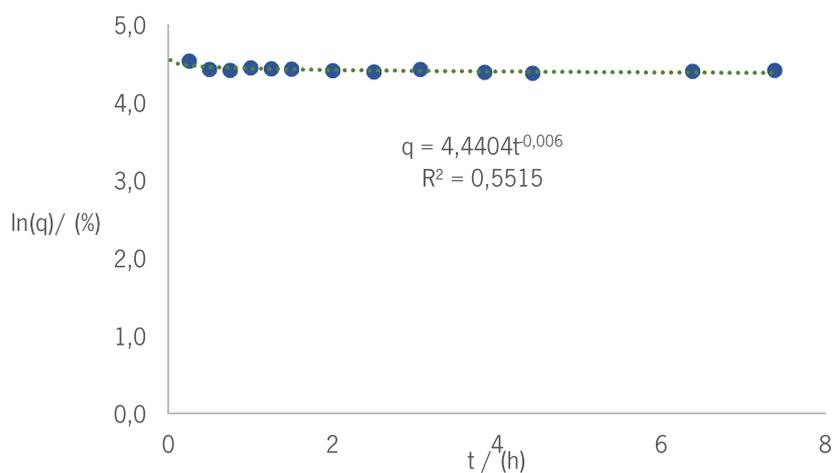


Figura AXI.7 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste potencial para o ensaio 16 a pH 1,2.

Na Figura AXI.8 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 5,5.

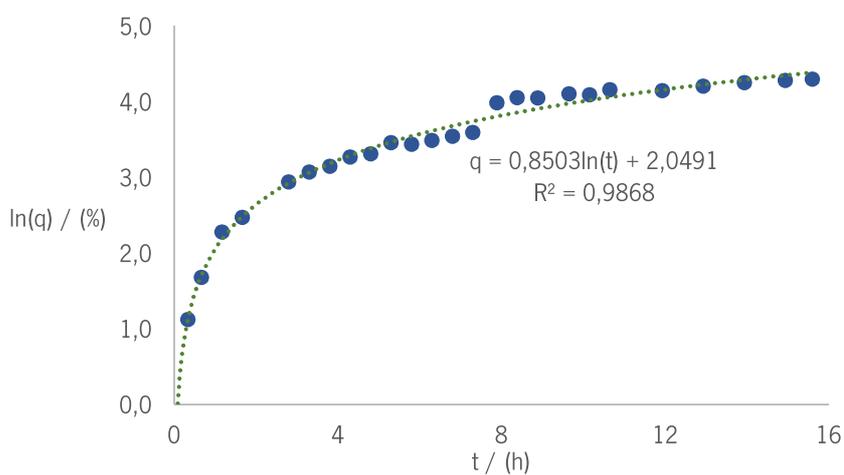


Figura AXI.8 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 5,5.

Na Figura AXI.9 encontra-se o gráfico do logaritmo natural da libertação de ibuprofeno em função do tempo com a reta do ajuste linear aos dados obtidos para o ensaio 16 a pH 6,8.

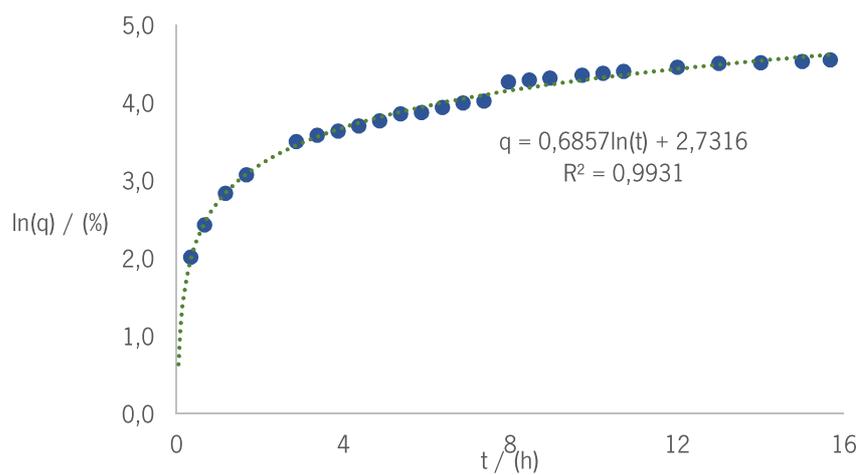


Figura AXI.9 – Gráfico do logaritmo natural da libertação em função do tempo com a reta do ajuste logarítmico para o ensaio 16 a pH 6,8.