



Beatriz Isabel Estevens Romba

Licenciatura em Engenharia Biomédica

Biodispositivos electrónicos multifuncionais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Isabel Ferreira, Professora Associada, DCM – FCT/UNL

Co-orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL

Co-orientadora: Ana Baptista, Doutoranda do DCM – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho Silva
Vogais: Prof. Doutora Isabel Maria das Mercês Ferreira
Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges
Doutoranda Ana Catarina Bernardino Baptista

Biodispositivos electrónicos multifuncionais

©2012 - Todos os direitos reservados. Beatriz Isabel Estevens Romba. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este projecto não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas que me acompanharam ao longo de todo o percurso. A elas, deixo o meu agradecimento.

Aos meus orientadores, Professora Isabel Ferreira e Professor João Paulo Borges, por me terem dado a oportunidade de participar neste projecto e por todo o apoio e disponibilidade ao longo deste. Obrigada pelos conhecimentos que me transmitiram que sem dúvida, enriqueceram a minha formação académica.

À Mestre Ana Baptista, pelo incansável apoio em todo este percurso. Por todo o tempo disponível, pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação, pela amizade e pela motivação, um *Muito Obrigada*.

Aos professores Célia Henriques e Jorge Carvalho Silva, por toda a disponibilidade concedida e partilha de conhecimentos.

Aos responsáveis dos grupos de materiais poliméricos e mesomorfos e materiais da electrónica optoelectrónica e nanotecnologias, pela disponibilidade de todos os equipamentos necessários, pela simpatia e amabilidade com que fui tratada ao longo deste projecto.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e amizade. Por toda a partilha não só de conhecimentos mas também de risos e desabafos.

A todos os meus amigos que indirectamente foram essenciais para a elaboração da minha tese. Obrigada pelo apoio, pela vossa amizade, por ouvirem os meus desabafos, frustrações e pelo incentivo que me deram para continuar em frente.

Ao Ricardo, que acompanhou de perto toda esta minha etapa, um especial obrigado. Obrigada por toda a força e confiança indispensáveis durante todo este percurso. Por todo o carinho, apoio e compreensão, mesmo nas alturas mais complicadas.

Por último, um grande *Obrigado* a toda a minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, por todo o apoio e amor incondicional. Nada teria sido possível sem eles.

Resumo

A administração tradicional de fármacos através de comprimidos ou injeções apresenta bastantes desvantagens quando comparado com um sistema de libertação controlada. Com este sistema, evita-se a sobredosagem de medicação pois o fármaco é aplicado directamente no local onde deve actuar.

Neste trabalho pretende-se desenvolver um biodispositivo que seja capaz de libertar uma substância presente no seu interior através de pequenos estímulos eléctricos. Para tal, é necessário que este dispositivo, para além de biocompatível, seja electricamente condutor.

Numa primeira fase, foram produzidas membranas de acetato de celulose e de polivinilpirrolidona por electrofiação, as quais foram posteriormente revestidas com polipirrol, um polímero condutor biocompatível. De forma a encontrar a membrana mais adequada às funcionalidades do dispositivo proposto, foram experimentadas e analisadas diferentes metodologias.

Nas membranas mais condutoras foi introduzido um fármaco e analisada a influência da aplicação de um pequeno sinal eléctrico na quantidade de fármaco libertado. Os resultados obtidos são promissores no que respeita à possível aplicação destas membranas na libertação controlada de fármaco a nível da epiderme.

Palavras-chave: sistema de libertação controlada de fármacos; biodispositivo; polímeros condutores; biocompatível.

Abstract

The traditional administration of drugs through pills or injections presents a fair amount of disadvantages when compared to a controlled release system. With this system over dosage is avoided, since the medicine is applied directly on the spot where it must act.

With this paper we aim to develop a biodevice that is capable of releasing a substance present in its interior through mild electric impulses. For that to happen, it is necessary that this device, besides being biocompatible, is electroconductive.

In a first stage, cellulose acetate and polyvinylpyrrolidone membranes were produced by electrospinning and subsequently covered with polypyrrole, a biocompatible conductor polymer. In order to find the membrane that suites better the functionalities of the proposed device, several methodologies were experimented and analyzed.

Drugs were introduced on the most conductive membranes and the influence of inducing small electric impulses on the quantity of released drug was analyzed. In what concerns the possible application of these membranes on epidermal controlled drugs releasing systems, the results obtained are promising.

Key words: controlled drugs releasing system; biodevice; conductor polymers; biocompatible.

Lista de acrónimos e símbolos

AC – Acetato de celulose

FeCl₃ – Cloreto de Ferro (III)

I – Corrente eléctrica

PBS – do inglês, Phosphate buffered saline

PPy – Polipirrol

PVP – Polivinilpirrolidona

Py – Pirrol

Mw – do inglês, Molecular weight

V – Potencial eléctrico

R – Resistência eléctrica

SEM – Scanning Electron Microscope (Microscopia Electrónica de Varrimento)

wt/v – Massa por volume

σ – Condutividade

%wt – Percentagem mássica

[AAS] – Concentração de ácido acetilsalicílico

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de acrónimos e símbolos	iv
Índice	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Objectivos	xi
Capítulo 1- Revisão da Literatura	1
1.1-Sistema de libertação controlada de fármacos	1
1.2-Estado de arte.....	2
Capítulo 2- Constituintes do biodispositivo	7
2.1 - Constituintes da matriz polimérica.....	7
2.1.1-Polímeros	7
2.1.2- Acetato de Celulose	8
2.1.3- Polivinilpirrolidona.....	9
2.2 - Electrofiação	10
2.2.1-Descrição do processo	10
2.2.2- Influência dos parâmetros de electrofiação na morfologia nas fibras	11
2.3 - Revestimento das matrizes poliméricas.....	13
2.3.1 – Polímeros Condutores.....	13
2.3.1 – Polipirrol.....	14
2.4 – Ácido acetilsalicílico	16
Capítulo 3- Métodos experimentais	17
3.1 – Produção das membranas	17
3.1.1 – Solução polimérica	17
3.1.2- Electrofiação	18
3.2 - Revestimento das matrizes poliméricas	19
3.2.1 - PVP	20
3.2.2 - Acetato de celulose.....	20
3.2.2.1 - Oxidação in situ em solução aquosa Acetato de celulose	21
3.2.2.2 - Oxidação por exposição a vapores de pirrol	22

3.3 – Caracterização das membranas.....	23
3.3.1 – Morfologia – SEM	23
3.3.1.1 – Procedimento experimental.....	23
3.3.2 – Condutividade Eléctrica – Curvas IV.....	24
3.3.2.1 – Procedimento experimental.....	24
3.4 – Estudo da libertação do fármaco	25
3.4.1 – PBS.....	26
3.4.2 – Espectroscopia UV-Visível	27
3.4.3 – Espectros de referência do AAS	28
3.4.4 – Testes de libertação de fármaco	28
3.5 – Citotoxicidade das membranas	30
3.5.1 – Procedimento experimental	31
Capítulo 4- Análise de resultados	35
4.1 – Membranas de PVP revestidas com polipirrol	35
4.1.1 – Caracterização morfológica.....	35
4.1.2- Condutividade eléctrica	38
4.2 - Membranas de AC revestidas em vapores de pirrol	40
4.2.1 – Caracterização morfológica.....	40
4.2.2 – Condutividade eléctrica	41
4.3 - Membrana de AC revestidas por oxidação in situ do pirrol	42
4.3.1 – Caracterização morfológica.....	42
4.3.2- Condutividade eléctrica	45
4.4 – Libertação de fármaco por estímulos eléctricos.....	48
4.4.1 – Curva de referência de AAS em H ₂ O	48
4.4.2 – Curva de referência de AAS em PBS.....	49
4.4.3- Libertação em água destilada.....	50
4.4.3.1- Estudo da influência do pulso eléctrico aplicado.....	50
4.4.4 - Ensaios realizados em PBS.....	53
4.4.4.1 - Estudo da influência da duração do pulso eléctrico.	53
4.4.4.2- Estudo da influência do sinal do pulso eléctrico aplicado numa membrana com 30%wt AAS	54
4.4.4.3- Estudo da influência da amplitude do pulso eléctrico	55

4.4.4.4- Estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 40%wt AAS	56
4.4.5- Conclusões dos ensaios realizados.....	57
4.5- Citotoxicidade.....	57
Capítulo 5 - Conclusões do estudo	61
Bibliografia	63
Capítulo 6 - Anexos.....	67
Anexo 1- Histogramas e valores medidos para estimar o diâmetro médio das fibras.....	67

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Picos de oxidação (a) e redução (b) dos eléctrodos revestidos por polipirrol e dexametasona. [8].....	5
Figura 1.2 – Esquema da elaboração de um sistema de libertação de fármacos a partir de nanotubos de carbono [9].....	6
Figura 2.1 – Cadeia de Acetato de Celulose	8
Figura 2.2 – Estrutura do PVP.	9
Figura 2.3 – Esquema de montagem e funcionamento do processo de Electrofiação (figura adaptada de [26]).....	11
Figura 2.4 – Polimerização química do pirrol como o cloreto de ferro (III) como agente oxidativo.....	15
Figura 2.5 – Polimerização electroquímica do polipirrol com o ião A- como dopante. (figura adaptada de [17]).....	15
Figura 2.6 – Formação da ácido acetilsalicílico na presença de catalisadores como o ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) ou o ácido fosfórico (H ₃ PO ₄).....	16
Figura 3.1 – Montagem experimental utilizada para a produção de fibras por electrofiação.....	18
Figura 3.2 – Metodologia utilizada para revestir as membranas de PVP por polipirrol.....	20
Figura 3.3 – Amostras preparadas para a medição da sua condutividade.....	24
Figura 3.4 – Montagem experimental utilizada em todos os ensaio realizados.....	29
Figura 3.5 – Inserção das 2 membranas em meio limpo. No tubo da esquerda encontra-se a membrana de AC e à esquerda a mesma membrana mas revestida por PPY.....	31
Figura 4.1 – Fibras de PVP/FeCl ₃ antes do revestimento de polipirrol	37
Figura 4.2 – Gráfico I-V de uma das membranas produzidas.....	38
Figura 4.3 – a) Imagem SEM da membrana de AC produzida por electrofiação b) Imagen SEM da membrana de AC revestida com 1 hora de polimerização em vapores de pirrol.....	40
Figura 4.4 - Imagens SEM de membrana de AC após 30 minutos de polimerização em vapores de pirrol, com diferentes ampliações, a)10.00K e b) 50.00 K.....	41

Figura 4.5 – Fotografia (a) e imagens SEM (b e c) das fibras de AC com PPy através da oxidação in situ após 24 horas de polimerização, utilizando uma concentração de pirrol de 0,05mol/L.....	42
Figura 4.6 - Gráfico das absorvâncias obtidas a partir de soluções de H2O com diferentes concentrações de AAS.....	48
Figura 4.7 - Curva de referência de AAS em água destilada.....	49
Figura 4.8 - Gráfico das absorvâncias obtidas a partir de soluções de PBS com concentrações conhecidas de AAS.....	49
Figura 4.9 – Curva de referência de AAS em solução PBS.....	50
Figura 4.10 - a) Gráfico das absorvâncias obtidas relativas aos pulso aplicados. b)Gráfico das absorvâncias correspondentes aos primeiros 6 estímulos do ensaio.....	51
Figura 4.11 – Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência da duração do pulso eléctrico aplicado.....	53
Figura 4.12 – Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 30%wt AAS.....	54
Figura 4.13 – Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência da amplitude do pulso eléctrico aplicado na membrana.....	55
Figura 4.14 – Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 40%wt AAS.....	56
Figura 4.15 – Imagem obtida por microscópio óptico do poço correspondente à membrana de AC revestida por polipirrol.....	58
Figura 6.1 – a) Histograma dos diâmetros para a membrana de acetato de celulose. b) Histograma dos diâmetros da membrana de acetato de celulose revestida com polipirrol.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Parâmetros de electrofiação utilizados para a formação das fibras de AC e PVP.....	19
Tabela 3.2 – Proporções entre FeCl ₃ e PPy testadas.....	21
Tabela 3.3 – Parâmetros experimentados para a o revestimento das fibras de AC por PPy.....	22
Tabela 3.4 – Parâmetros utilizados para a obtenção dos gráficos I-V.....	25
Tabela 3.5 – Sais utilizados para a produção da solução PBS.....	26
Tabela 3.6 –Soluções preparadas para a curva de referência da concentração AAS com o espectro de absorvância.....	28
Tabela 3.7 – Testes de libertação de fármaco realizados.....	30
Tabela 3.8 – Esquematização dos poços utilizados no teste de citotoxicidade.....	33
Tabela 4.1 – Imagens de PVP revestidas com PPy para diferentes tempos de polimerização, obtidas por SEM.....	36
Tabela 4.2 – Condutividade estimada consoante o tempo de polimerização utilizado no revestimento.....	39
Tabela 4.3 – Imagens SEM de membranas de AC com revestimento realizado em diferentes concentrações de pirrol.....	44
Tabela 4.4 – Condutividades de membranas de AC com diferentes proporções de FeCl ₃ /Py.....	45
Tabela 4.5 – Condutividades obtidas para membranas de AC revestidas in situ com diferentes tempos de polimerização e concentração de pirrol.....	46
Tabela 4.6 – Condutividade calculada para membranas com diferentes concentrações de AAS, revestidas com PPy.....	47
Tabela 4.7 – Legenda da figura 4.10 que relaciona a amostra com o estímulo eléctrico correspondente.....	52
Tabela 4.8 – Valores normalizados obtidos do teste de citotoxicidade.....	58
Tabela 6.1 – Diâmetros medidos para várias fibras das membranas de AC e AC revestido com PPy.....	67
Tabela 6.2 –Desvio padrão e média dos diâmetros obtidos.....	68

Objectivos

Neste trabalho, é pretendido desenvolver um sistema de libertação controlada de fármaco para uma aplicação ao nível da epiderme. Tal sistema deve ser constituído por um biodispositivo electrónico que, perante pequenos estímulos eléctricos, seja capaz de libertar uma substância presente no interior.

A característica mais importante de tal dispositivo é a sua condutividade, para que este seja capaz de libertar o fármaco em resposta a um potencial eléctrico baixo. A sua aplicação na área da biomédica requer que este seja biocompatível, ou seja, não provoca resposta por parte do sistema imunitário, quando em contacto com o corpo. Quanto à sua morfologia, deve ser flexível e possuir elevada área superficial e porosidade para alojar o fármaco no seu interior.

Para alcançar estes objectivos, foi realizado um estudo que pode ser dividido em duas partes. A primeira consiste no desenvolvimento de uma membrana polimérica que possua as características mencionadas. Na segunda etapa são testadas estas membranas como sistema de libertação electrónica de fármaco e é avaliada a sua aplicabilidade.

Capítulo 1 – Revisão da Literatura

Neste capítulo será feita uma breve introdução aos sistemas de libertação controlada de fármaco, onde serão apresentadas as suas características e vantagens relativamente à administração tradicional de fármacos. De seguida será feita uma revisão da literatura necessária para o desenvolvimento do biodispositivo electrónico proposto neste trabalho.

1.1- Sistema de libertação controlada de fármacos

A administração tradicional de fármacos, quer por via oral através de comprimidos quer por via intravenosa com recurso a injeções, embora ainda constitua o principal método de medicação, apresenta desvantagens bastante consideráveis. Nestes tratamentos, a quantidade de fármaco que alcança o local de acção é muito inferior à quantidade administrada, pois a maioria é desperdiçada em outros tecidos ou é metabolizada e excretada sem que tenha tido efeito. É por isso necessária uma sobredosagem ou uma aplicação mais prolongada para que sejam verificados os efeitos pretendidos. Neste tipo de administração, a concentração de fármaco na corrente sanguínea é bastante inconstante ao longo do tempo, sendo caracterizada por um pico elevado momentos após a inserção do medicamento no corpo, seguido de um decrescimento exponencial até que exista nova administração.

O recurso a sistemas de libertação controlada de fármacos pretende solucionar estes efeitos adversos. Estes sistemas são compostos por um material que serve de suporte e de transportador do fármaco até que este seja libertado no local pretendido. São geralmente de origem polimérica mas podem também ser constituídos por nanopartículas como lipossomas ou micelas ligadas ao fármaco, mantendo-o inactivo até ao local de acção [1].

As características do dispositivo determinam a eficácia e a forma como o fármaco é libertado, mas em todos estes sistemas, a libertação é feita de forma controlada, permitindo uma concentração da substância activa constante ao longo do tempo na corrente sanguínea.

Actualmente existem disponíveis no mercado diversos sistemas de libertação controlada de fármaco. Na sua maioria, a libertação ocorre por difusão do composto activo, com recurso a adesivos transdérmicos ou matrizes poliméricas. Outros processos que incluem a difusão da água dentro do suporte, por osmose ou por inchamento, ou a libertação da substância activa perante certos valores específicos de pH, mecanismo bastante prometedora que permite um tratamento extremamente localizado [2]

Para o desenvolvimento de tais sistemas é necessária uma análise a todas variáveis envolvidas, como a natureza do material que o constitui e suas interações com tecidos biológicos, o tipo de fármaco utilizado, a forma como este é armazenado e o mecanismo da sua libertação, a via de administração e o local de acção.

1.2- Estado de Arte

Com o desenvolvimento de novas metodologias para a obtenção de polímeros condutores biocompatíveis, o ramo dos biodispositivos eletrónicos tem crescido em dimensão e funcionalidades.

A adaptação destes dispositivos em sistemas de distribuição de fármacos tem recebido um interesse crescente por parte de equipas de investigação, pois as suas propriedades de oxidação e redução possibilitam uma nova forma eficiente de controlar a libertação da droga à taxa pretendida. No entanto, apesar dos progressos até agora conseguidos para a elaboração de tais sistemas, ainda não foi produzido um biodispositivo condutor, construído à base de polímeros biocompatíveis, capaz de libertar controladamente fármaco presente no seu interior perante um estímulo eléctrico.

Como já mencionado, a maioria dos sistemas de distribuição de fármacos desenvolvidos e distribuídos no mercado são de aplicação transdérmica, em que a libertação ocorre por difusão. O recurso a fibras poliméricas produzidas por

electrofiação tem revelado nos últimos anos ser um bom suporte para a substância activa neste tipo de libertação.

Em 2007, na faculdade de ciências de Bangkok, um grupo de investigação conseguiu produzir fibras de acetato de celulose com um determinado fármaco no seu interior cujo processo de libertação ocorre por difusão. Neste estudo, as fibras são produzidas por electrofiação a partir de uma solução polimérica que inclui um de quatro fármacos experimentados (Naproxeno, Ipobrufeno, Indometacina ou Sulindaco) e cujo peso corresponde a 20% do peso de acetato de celulose utilizado. Filmes de acetato de celulose com a mesma proporção de fármaco foram produzidos para uma posterior análise comparativa da eficiência dos dois métodos. Os resultados deste estudo demonstram que as fibras produzidas por electrofiação possuem uma quantidade real de fármaco no seu conteúdo superior ao filme, com uma percentagem entre 84% a 93% relativamente ao seu peso inicial adicionado à solução. Quanto ao processo de difusão, a quantidade de fármaco libertada foi estudada num meio líquido com pH fisiológico e foi observado que esta dependia da própria natureza do fármaco. Em qualquer dos casos, esta libertação foi sempre superior nas fibras do que no filme. [3]

Ainda no mesmo ano, membros deste último grupo de investigação conduziram uma segunda experiência, na qual foram obtidas, também por electrofiação, fibras de acetato de celulose com curcumina, composto com características anti-tumorais e anti-oxidantes. A libertação deste pigmento foi estudada tanto num meio líquido, com a imersão das fibras, como por difusão numa pele de porco. Quando as fibras foram imersas, ao fim de dois dias foi verificada a libertação de mais de 90% do composto, enquanto que a difusão transdérmica na pele de porco foi de apenas 1%. [4]

Embora resultados positivos tenham sido observados, a libertação por difusão ocorre de forma pouco controlada e contínua ao longo do tempo. Para que seja possível a elaboração de um sistema que responda a estímulos elétricos, é necessária, como já anteriormente mencionado, que a membrana que contém a droga seja condutora. Tal pode ser possível a partir do seu revestimento por um polímero condutor.

O revestimento de fibras por biopolímeros condutores, embora ainda bastante recente, tem sido alvo de vários estudos e apesar de terem sido elaboradas várias metodologias para tal, ainda é necessária a sua otimização. O biopolímero condutor geralmente escolhido é o polipirrol pela sua condutividade e biocompatibilidade. Em 2010, D. Müller liderou um grupo de investigadores no Brasil que conseguiu revestir membranas de celulose bacteriana com polipirrol através da oxidação *in situ* do pirrol. Nesta experiência a membrana é colocada numa solução aquosa de pirrol e a polimerização do monómero foi possível com a adição de cloreto de ferro (III) como agente oxidante. A proporção entre monómero e agente oxidante foi fixada em 2:1 e várias concentrações de pirrol foram testadas. Os testes realizados demonstram que a resistividade eléctrica destas fibras varia bastante consoante a concentração do monómero e o tempo da reacção de polimerização. O menor valor de resistividade obtido foi bastante próximo da condutividade do polipirrol (0,33 Ω .cm) e foi conseguido utilizando uma concentração de 0,03 mol/L de pirrol e um tempo para a reacção de polimerização de 90 minutos. [5]

No ano seguinte, na universidade do Mumbai, Índia, foram obtidas fibras de celulose vegetal revestidas por polipirrol por um processo semelhante ao anterior de oxidação *in situ* do pirrol. O agente oxidante utilizado foi o cloreto de ferro e o processo de oxidação foi feito em meio aquoso durante 4 horas. De forma a verificar a influência de um tratamento das superfícies das fibras na sua condutividade, foram utilizados três compostos diferentes para este processo, água destilada, hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio. Os estudos efetuados revelaram que as fibras tratadas com hidróxido de cálcio possuem uma condutividade superior às restantes (3 S/cm), enquanto que as fibras sem qualquer tratamento eram as menos condutoras (1,98 S/cm). [6]

Em 2012 D. Müller produz novamente fibras de celulose bacteriana condutoras a partir do seu revestimento por polianilina. Este revestimento foi feito a partir da polimerização da anilina por cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e foi realizada em meio aquoso na presença ou na ausência de ácido clorídrico. A condutividade eléctrica destas fibras manteve-se constante para uma proporção igual ou superior a 2 de FeCl_3 relativamente ao monómero, e para um tempo de reacção de oxidação igual

ou superior a 24 horas. A análise demonstrou que, embora nas fibras revestidas na ausência de HCl tenha ocorrido uma maior incorporação de polianilina, na presença do ácido as fibras obtidas possuíam uma condutividade maior, da ordem dos 10^{-1} S/cm. [7]

No que diz respeito à libertação controlada de fármacos a partir de estímulos eléctricos, embora ainda não sejam aplicados ao ser humano, têm sido desenvolvidos nos últimos anos alguns sistemas funcionais. Na universidade de Pittsburgh, em 2006, foi desenvolvido um dos primeiros sistemas de libertação de fármacos controlada a partir de estímulos eléctricos. Este sistema é composto por dois eléctrodos, sobre os quais foi depositado um filme de polipirrol contendo uma droga anti-inflamatória, a dexametasona que, devido à sua carga negativa, funciona como dopante do biopolímero condutor. A funcionalidade destes eléctrodos foi testada por voltametria cíclica e foi verificado que só a partir do 3 ciclo de varrimento apareciam os picos de redução e oxidação característicos do pirrol e que quanto maior era o número de ciclos, mais intensos são os picos (figura 1.1). [8]

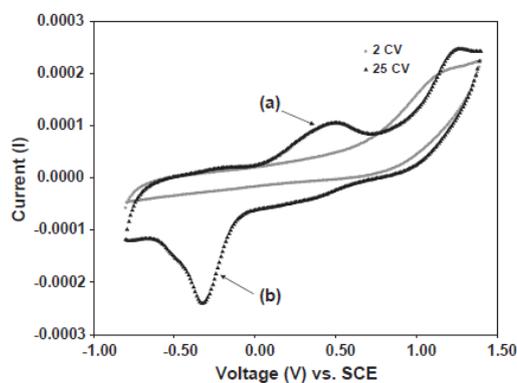


Figura 1.1- Picos de oxidação (a) e redução (b) dos eléctrodos revestidos por polipirrol e dexametasona. [8]

A libertação do fármaco ocorre no pico de redução e foi estimado que ao fim de 30 ciclos de voltametria cíclica, era libertado cerca de 92% da dexametasona incorporada.

Em 2011, também nesta universidade, foi desenvolvido para a mesma droga um sistema de libertação composto por nanotubos de carbono. Estas fibras foram colocada numa solução com o fármaco para que este penetrasse no seu interior

(processo A da figura 1.2). As superfícies destes nanotubos são posteriormente revestidos por polipirrol por electrodeposição (processo B da figura 2) para selar o fármaco no seu interior. Ao serem aplicados estímulos eléctricos contínuos, foi verificada a libertação de todo o fármaco ao fim de 20 horas. [9]

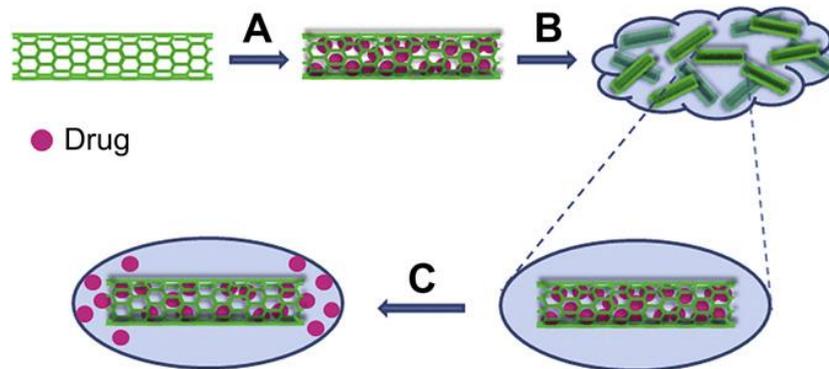


Figura 1.2- Esquema da elaboração de um sistema de libertação de fármacos a partir de nanotubos de carbono [9]

No final de 2012, na Austrália, investigadores desenvolveram um eléctrodo, por electrodeposição, composto por fibras de PEDOT-PSS e quitosano revestidas por polipirrol e o fármaco Ciprofloxacina como seu dopante. A este eléctrodo foram aplicadas tensões, num processo de voltametria cíclica, e foi encontrado o valor de 56 S/cm para a sua condutividade. Foi verificado que no estado de redução existia uma maior libertação de ciprofloxacina, cerca de 80% do seu peso ao fim de 70 horas sobre estímulos eléctricos. [10]

Com estas experiências foi verificado o potencial das reacções de oxidação e redução dos polímeros condutores como mecanismo para controlar a libertação de componentes activos presentes no seu interior.

Capítulo 2- Constituintes do biodispositivo

Neste capítulo será feita uma descrição dos materiais que compõem o biodispositivo proposto, nomeadamente os polímeros da matriz, na qual o fármaco é integrado, bem como o revestimento condutor que permitirá a libertação da droga apenas quando é aplicado um campo eléctrico externo.

Serão também abordados aspectos técnicos do processo de electrofiação, processo através do qual é possível obter nanofibras poliméricas a partir de soluções.

2.1- Constituintes da matriz polimérica

A matriz que irá proporcionar o suporte e transporte do fármaco no sistema a desenvolver será constituída por fibras poliméricas, pois a resistência, estabilidade, área superficial e porosidade elevadas fazem destes materiais um excelente meio para o armazenamento e difusão do fármaco no seu interior. Tais matrizes devem ser biocompatíveis e não podem de forma alguma condicionar ou alterar os efeitos dos fármacos.

2.1.1 - Polímeros

Os polímeros são moléculas em forma de uma cadeia composta pela repetição de elementos, designados monómeros, ligados entre si. Devido ao seu elevado peso molecular, os polímeros são classificados como macromoléculas, com grau de polimerização igual ao número de repetições do monómero na cadeia. As suas propriedades variam, principalmente, consoante os monómeros que o constitui e o tipo de ligação química estabelecida entre estes, podendo existir polímeros elásticos, termoplásticos ou termorrígidos.

Estas macromoléculas podem ser classificadas, relativamente à sua composição química, como homopolímeros, quando o polímero é composto por uma única espécie química repetida ao longo da cadeia, ou copolímeros, quando estão presentes pelo

menos dois tipos de monómeros diferentes. Os polímeros podem ser de origem natural, como os ácidos nucleicos ou a celulose, ou de origem sintética, como o poliacetileno ou o polietileno. Os primeiros são geralmente produzidos através da actividade enzimática, enquanto que os sintéticos podem ser obtidos através de processos como a polimerização por adição, com a quebra de ligações duplas de carbono para criar ligações covalentes entre monómeros, ou por condensação, em que as ligações resultam da reação entre grupos funcionais distintos, na qual existe a libertação de moléculas de água.

Na área da biomedicina, os polímeros, em particular os biocompatíveis, são amplamente utilizados, sendo que as suas aplicações dependem das suas propriedades e forma de degradação em meio fisiológico.

2.1.2 - Acetato de Celulose

O acetato de celulose (AC) é um polímero amorfo derivado da celulose, composto vegetal bastante abundante e de baixo custo. Este éster pode ser formado a partir de dois processos de acetilação da celulose, homogéneo ou heterogéneo. Em ambos os processos, ocorre a formação de triacetato de celulose na presença de um éster de acetato, sendo que a diferença entre os métodos encontra-se no tipo de solvente utilizado. Na formação homogénea, é geralmente usado como solvente o diclorometano e os cristais de triacetato de celulose são dissolvidos à medida que são formados. Por via heterogénea, é utilizado um solvente no qual estes cristais são insolúveis, como o benzeno ou o tolueno, onde a celulose é convertida em triacetato de celulose sem que haja grande variação morfológica das fibras. O acetato de celulose é obtido a partir da hidrólise do triacetato de celulose. [11]

A sua viscosidade em solução varia consoante o grau de acetilação e os solventes em que está dissolvido. É insolúvel em água, mas bastante solúvel em acetona, acetato de metilo ou dimetilformamida. A sua dissolução em determinados solventes, permite a formação de fibras por electrofiação. As membranas produzidas por estas fibras possuem diversas aplicações, especialmente na área dos biomateriais, pela sua biocompatibilidade, não toxicidade e estabilidade quando presente em meio

fisiológico. As matrizes compostas por fibras de AC possuem uma elevada porosidade (entre 80 a 90%) à qual está associada uma área superficial das fibras muito elevada o que facilita a difusão de água no interior, características importantes para a troca de iões e moléculas, quando aplicadas em sistemas biológicos. [12]

Estas propriedades conjugadas com a sua produção muito económica e abundância, tornam este polímero um dos mais importantes na área da biomédica com diversas aplicações.

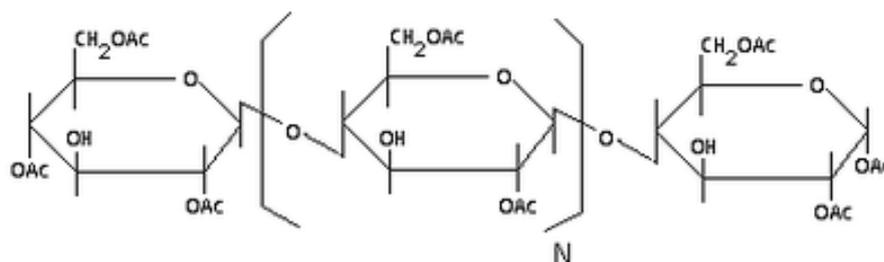


Figura 2.1- Cadeia de Acetato de Celulose.

2.1.3 – Polivinilpirrolidona

A polivinilpirrolidona (PVP) é um polímero sintético amorfo com diversas aplicações em áreas como a indústria farmacêutica, produtos de cosmética e medicina.

Este polímero pode ser obtido com a adição de um agente iniciador, como o peróxido de hidrogénio ou a azobisisobutironitrila, numa solução aquosa que contenha monómeros de vinilpirrolidona. A polimerização é conseguida através da ligação covalente entre os radicais de vinilpirrolidona, formados devido à acção destes agentes. A sua estrutura pode ser observada na figura 2.2 É possível obter polímeros de PVP com variados pesos moleculares que, após um processo de secagem, se apresentam sob a forma de um pó branco. [13]

Uma das características mais relevantes da polivinilpirrolidona é a sua elevada solubilidade na maioria dos solventes comuns, como água, etanol ou ácido acético,

devida à sua afinidade por substâncias polares. A sua viscosidade em solução varia consoante a concentração e tipo de solvente(s) utilizado(s).

Tal como o acetato de celulose, este polímero pode ser utilizado para a produção de fibras por eletrofiação de soluções de PVP. As matrizes de fibras obtidas possuem elevada porosidade e área superficial e são biologicamente inertes, isto é, não causam qualquer reacção ao sistema imunitário. No entanto, a afinidade polar destas fibras dificulta o seu manuseamento, pois facilmente se dissolvem em soluções aquosas ou degradam devido às moléculas de água presentes na atmosfera, sendo necessário o recurso a tratamentos que os tornem menos hidrofílicos para viabilizar a sua aplicação.

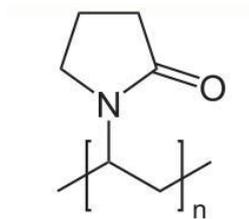


Figura 2.2- Estrutura do PVP.

2.2 - Electrofiação

2.2.1 – Descrição do processo

A electrofiação é um processo que permite a formação de nanofibras a partir de soluções poliméricas.

Nesta técnica é aplicado um potencial eléctrico à solução polimérica, que se encontra numa seringa e é expelida por uma agulha a um determinado fluxo. Na ausência de estímulo eléctrico, a solução que sai da agulha assume a forma de gota devido à sua tensão superficial, no entanto, ao ser aplicada uma tensão suficientemente alta, as suas partículas ficam carregadas e repelem-se. Quando as forças eléctrostáticas atingem valores equiparáveis às forças de tensão superficial, a gota assume uma forma em cone, denominado cone de Taylor. Se o campo eléctrico aplicado for superior a estas forças, é libertado, a alta velocidade, um jacto de solução em direcção a um colector, que se encontra ligado à terra. No percurso, os solventes

são evaporados, permitindo a deposição do polímero sob a forma de fibras com diâmetros na ordem dos micrómetros ou nanómetros. Este processo pode ser observado na figura 2.3 [14].

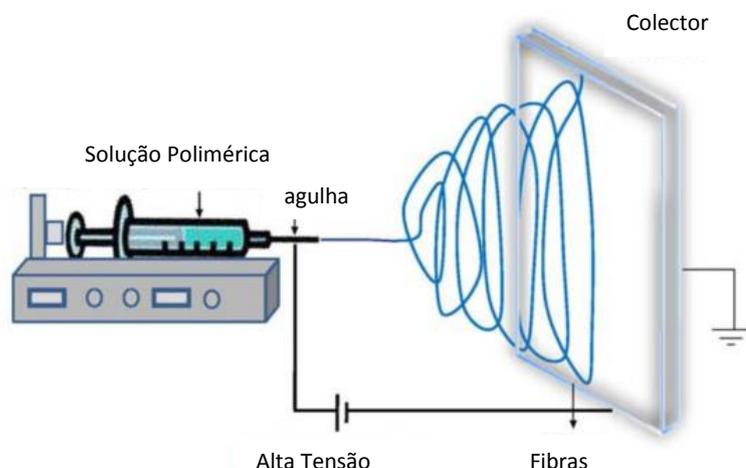


Figura 2.3- Esquema de montagem e funcionamento do processo de Electrofiação (figura adaptada de [26])

2.2.2- Influência dos parâmetros de electrofiação na morfologia nas fibras

A formação de fibras por electrofiação e a sua morfologia depende de diversos factores, podendo estes ser relativos tanto à solução polimérica como aos parâmetros do sistema utilizados ou ainda a factores ambientais.

Quanto às características da solução que mais podem afectar o processo, destacam-se: a concentração de polímero; a tensão superficial; a viscosidade e sua condutividade. A viscosidade é um dos parâmetros com maior influência na formação de fibras e na dimensão dos seus diâmetros. Com uma solução demasiado viscosa, existe uma maior força de coesão entre as moléculas o que provoca instabilidade no fluxo e pode levar a evaporação do solvente da solução quando esta ainda está na ponta da agulha. Por outro lado, com uma viscosidade demasiado baixa, pode não existir a formação de fibras, sendo depositadas gotículas no colector (electrospray), originar fibras com contas ou impedir uma formação contínua de fibras, devido à baixa

concentração polimérica e elevada tensão superficial. O diâmetro das fibras é também afectado pela viscosidade, sendo obtidas fibras com maiores diâmetros para soluções mais viscosas. A concentração e o peso molecular do polímero estão directamente relacionados com viscosidade, pelo que fenómenos semelhantes são observados quando estes parâmetros são alterados.

A tensão superficial da solução varia bastante com os solventes utilizados e a concentração de polímero na solução. Soluções com tensão superficial elevada, tendem a formar fibras com contas, valores de tensão superficial menores permitem a obtenção de fibras mais lisas. Quanto à condutividade, a existência de uma maior densidade de cargas provoca um maior estiramento do jato de solução ejetado devido às forças de repulsão, permitindo a formação de fibras sem contas e com diâmetros menores.

No que diz respeito aos parâmetros do sistema, estão incluídos o diâmetro da agulha e da seringa, o fluxo a que a solução é expelida, a tensão aplicada e a distância entre o colector e a agulha. Com uma distância da agulha ao colector demasiado pequena, pode não existir evaporação do solvente, sendo depositadas no colector gotas da solução. Por outro lado, se esta distância for demasiado grande, o campo eléctrico entre o coletor e agulha diminui e pode não ser suficientemente grande em relação à tensão superficial da solução, impedindo a formação de fibras. O fluxo a que a solução é expelida permite obter fibras com diferentes diâmetros. Um fluxo menor origina uma menor acumulação de solução na ponta de agulha, originando fibras com menor diâmetro, enquanto que fluxos mais elevados originam fibras com diâmetros maiores, podendo ocorrer a formação de contas.

Relativamente ao campo eléctrico aplicado entre a agulha e o coletor, quanto maior este for, maior é o estiramento da solução e, conseqüentemente menores são os diâmetros das fibras obtidas. No entanto, para que seja possível uma formação contínua de fibras, este campo eléctrico não deve ser demasiado elevado, para evitar um estiramento demasiado alto que levaria à quebra das fibras no seu percurso até ao colector.

Factores ambientais como a temperatura e a humidade também podem influenciar o processo de electrofiação. Uma humidade elevada pode dificultar ou mesmo impedir a evaporação de solventes e dificultar a formação de fibras.

Para obter uma formação contínua de fibras com diâmetro de tamanho uniforme e ausente de defeitos nas suas superfícies, é necessária encontrar conformidade entre todos estes parâmetros. [14, 15, 16]

2.3- Revestimento das matrizes poliméricas

2.3.1- Polímeros condutores

O ramo dos polímeros condutores têm sido recentemente alvo de investigação desde a entrega do prémio Nobel da Química, em 2000, a Heeger, MacDiarmid e Shirakawa pela descoberta do poliacetileno, primeiro polímero intrinsecamente condutor desenvolvido.

A condutividade eléctrica destes polímeros deve-se, na sua maioria, à existência da conjugação de ligações duplas, ou seja ligações duplas e simples alternadas ao longo da cadeia. Nestes locais, a energia de ionização dos electrões π é relativamente baixa pelo que facilmente podem ocorrer reacções de oxidação ou redução, sendo libertadas partículas carregadas capazes de se moverem entre estes locais, produzindo um movimento de cargas eléctricas, positivas ou negativas, ao longo da cadeia. Estes polímeros, como o polipirrol e a polianilina, dizem-se intrinsecamente condutores, e podem facilmente transitar de forma reversível de isolante para condutor ou semiconductor através de reacções de oxidação e redução.

A condutividade destes polímeros com a adição de dopantes pode ser aproximada à dos metais condutores. Esses dopantes podem ser agentes oxidantes ou redutores. Estes compostos introduzem uma carga no polímero através da adição ou remoção de electrões, provocando reorganizações nas ligações de certas zonas da estrutura. Estes defeitos e a sua carga (positiva ou negativa) são denominados por

polarões ou bi-polarões e são responsáveis pelo aumento da condutividade do polímero.

2.3.2 - Polipirrol

O polipirrol é um polímero condutor que pode ser obtido a partir da polimerização do monómero pirrol. Embora seja insolúvel na maioria dos solventes, trata-se de um polímero estável em condições ambientais, de fácil produção e elevada condutividade quando comparado com outros polímeros condutores. É um polímero versátil pois no seu estado reduzido, funciona como isolante, enquanto que, quando oxidado, possui condutividade eléctrica elevada. Estudos mais recentes têm demonstrado a sua biocompatibilidade [17,18], pelo que tem sido possível o seu uso em novas aplicações, como biobaterias, biossensores e sistemas de libertação de fármaco. Este polímero pode ser obtido a partir de dois processos de polimerização, química ou electroquímica.

Na polimerização química (figura 2.4), os monómeros de pirrol são adicionados a uma solução que contém fortes agentes oxidantes, como o cloreto de ferro (FeCl_3) ou o sulfato de ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). A oxidação do monómero resulta na formação do seu radical que, devido à sua carga positiva (+1), é instável e facilmente cria ligações covalentes a outro radical ou monómero de pirrol com a eliminação de duas cargas positivas H^+ , originando um dímero neutro. Este composto é também bastante oxidativo, pelo que num mesmo processo forma ligações com outros monómeros, iniciando-se assim uma cadeia de polipirrol. Neste processo, o acoplamento entre monómeros é feito de forma aleatória, o que resulta em cadeias sem uma orientação específica com defeitos na sua estrutura. Quando polimerizado na presença de compostos como o FeCl_3 , o polipirrol fica no seu estado oxidado e é dopado com iões Cl^- na sua cadeia, proporcionando características condutoras ao polímero. [19,20]

A condutividade eléctrica pode variar consoante o solvente utilizado, proporção entre monómero e agente oxidante, duração da reacção de polimerização e temperatura. [20]

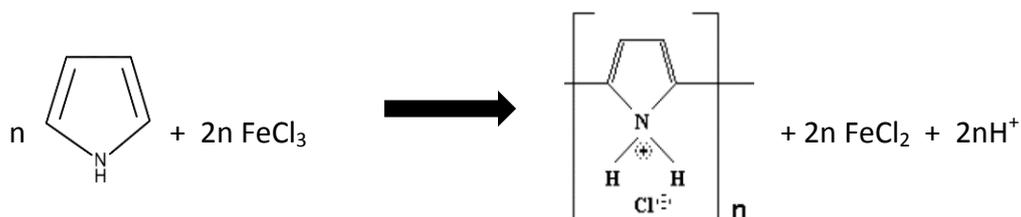


Figura 2.4 – Polimerização química do pirrol com o cloreto de ferro (III) como agente oxidativo.

O processo de polimerização por via electroquímica é bastante semelhante ao anterior, com a formação de radicais de pirrol que se ligam covalentemente a outros radicais. Nesta via de polimerização é aplicada uma tensão, que no caso do polipirrol é positiva, pois o potencial oxidativo do pirrol é de 0,8V. Esta tensão provoca a oxidação e a criação de radicais dos monómeros ao retirar um electrão da sua estrutura. A ligação entre radicais ocorrer preferencialmente numa orientação de 2-5, como pode ser observada na figura 2.5, pelo que o resultado final da polimerização corresponde a um filme de polipirrol, cujo tamanho e espessura podem ser facilmente controlados. A presença de dopante no processo (ião A^- na figura 2.5), resulta na formação de um filme de polipirrol no estado oxidativo, com defeitos na sua estrutura (polarões e bipolarões), responsáveis pelo aumento da sua condutividade. [21, 22, 23]

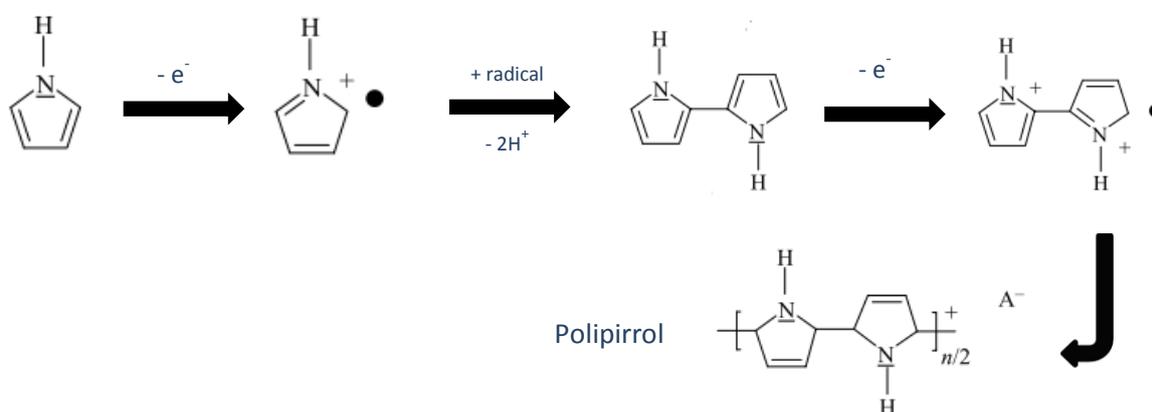


Figura 2.5- Polimerização electroquímica do pirrol com o ião A^- como dopante. (figura adaptada de [17]).

2.4 - Ácido acetilsalicílico (AAS)

O ácido acetilsalicílico, mais conhecido como aspirina, é um fármaco anti-inflamatório com características analgésicas e antipiréticas. É um ácido cristalino, geralmente de cor branca, derivado do ácido salicílico, composto com as mesmas propriedades medicinais mas que devido à sua elevada acidez não pode ser utilizado com a mesma finalidade. A sua síntese é conseguida através de uma reacção de esterificação entre o grupo OH do ácido salicílico e o grupo carboxilo (COOH) do anidrido acético, quando na presença de um catalisador como o ácido sulfúrico ou o ácido fosfórico (figura2.6).

Quanto à sua solubilidade, é bastante solúvel em solventes como a acetona ou etanol mas em água, a sua dissolução é muito inferior e depende bastante da temperatura.

Pelas suas propriedades e interações bem conhecidas e pela sua disponibilidade em laboratório, este fármaco foi o escolhido para incorporar na matriz polimérica e testar a funcionalidade do biodispositivo proposto neste trabalho.

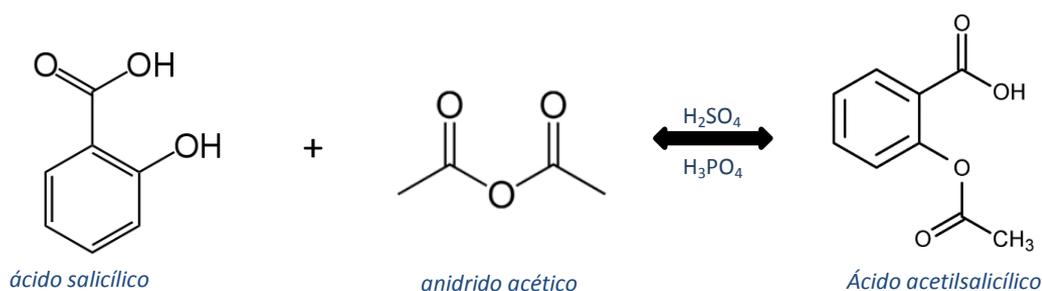


Figura 2.6 – Formação da ácido acetilsalicílico na presença de catalisadores como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou o ácido fosfórico (H_3PO_4).

Capítulo 3 – Métodos experimentais

Neste capítulo encontram-se descritos todos os procedimentos e testes realizados para o desenvolvimento do biodispositivo proposto.

Primeiramente são abordados os procedimentos realizados para a produção das membranas de acetato de celulose e PVP por electrofiação. De seguida, são apresentados os métodos que permitiram o revestimento destas matrizes com polipirrole, bem como as técnicas utilizadas para a caracterização das mesmas. Por último, são descritos todos os ensaios efectuados para avaliação do biodispositivo produzido como um sistema de libertação controlada de fármacos.

3.1 - Produção das membranas

As membranas poliméricas que constituem o biodispositivo, como já mencionado, foram obtidas através da técnica de Electrofiação. Num estudo inicial relativo ao revestimento das matrizes por polímeros condutores, foram produzidas fibras de acetato de celulose e PVP, sendo que posteriormente foi incorporado nas primeiras o ácido acetil salicílico, para um posterior estudo da libertação do fármaco.

3.1.1- Solução Polimérica

- PVP

Para a formação de fibras de PVP, foram preparadas soluções com 8 e 12%(wt/v) deste polímero (Mw 10 000, Sigma Aldrich) utilizando como solventes o etanol (Fisher Scientific) e a dimetilformamida (Merck) numa proporção de 1:1. Em ambas as soluções foi adicionado 8%(wt/v) de FeCl₃ de forma a integrar este agente oxidante nas fibras.

- **Acetato de celulose**

A solução polimérica preparada contém 12%(wt/v) de acetato de celulose (Sigma Aldrich), e foram escolhidos como solventes a acetona (AnalaR Normapur) e o dimetilacetamida (Honeywell Riedel-de Haën), numa proporção de 2:1, respectivamente, por permitir uma formação contínua de fibras uniformes e sem defeitos por electrofiação. [24, 25]

Para o estudo da libertação de fármacos, foi posteriormente adicionado a esta solução polimérica ácido acetilsalicílico (>99% cristalinidade, Sigma Aldrich) em diferentes concentrações, 20%, 30%, 40% e 50% relativamente ao peso de acetato de celulose presente na solução.

3.1.2 - Electrofiação

As membranas, foram produzidas no sistema de electrofiação que pode ser observado na figura 3.1.



Figura 3.1- Montagem experimental utilizada para a produção de fibras por electrofiação

Na produção de ambas as membranas de PVP e AC, a solução polimérica foi introduzida na seringa de capacidade 1 ml e 4,5 mm de diâmetro, na qual foi colocada uma agulha de calibre 25G. Antes de ser adicionada ao sistema, foi verificada a

inexistência de bolhas de ar dentro da seringa, que provocariam interrupções na produção de fibras. A seringa foi colocada e fixada na bomba e foram definidos os parâmetros relativos ao seu diâmetro e caudal a que a solução polimérica é ejetada.

O colector, ligado à terra, foi colocado em posição frontal à seringa a 15 cm de distância desta. Posteriormente, foi estabelecida a ligação entre a fonte de alta tensão (Glassman High voltage, inc.) e a agulha. Foi também colocado um aro metálico, ligado à alta tensão, colocado de forma a que a agulha ficasse no seu centro, para uniformizar o campo eléctrico e, conseqüentemente, permitir uma maior direccionalidade das fibras para o colector.

Durante todo o processo de electrofiação foi assegurada a não acumulação de solução na ponta da agulha para evitar que esta entupisse.

Todos os parâmetros definidos, bem como outros fatores ambientais relevantes para a formação das fibras por electrofiação de PVP e de acetato de celulose encontram-se sumariados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros de electrofiação utilizados para a formação das fibras de AC e PVP

Polímero	Diâmetro da seringa (mm)	Calibre da agulha (G)	Caudal (ml/h)	Distância do colector (cm)	Tensão aplicada à agulha (kV)	Tempo de deposição (h)	Humidade (%)	Temperatura (°C)
PVP	4,5	25	0,5	15	20	2	≈50	20-25
AC	4,5	25	0,2	15	20	3	40-50	20-25

3.2 – Revestimento das matrizes poliméricas

De forma a tornar condutoras as membranas produzidas por electrofiação foi realizado um revestimento com um polímero condutor, o polipirrole.

3.2.1- PVP

O revestimento das fibras de PVP foi conseguido através da sua exposição a vapores de pirrol. A reação entre o cloreto de ferro (III), existente nas fibras, e os monómeros de pirrol permitiu a polimerização do polipirrol na superfície das fibras.

As membranas de PVP foram colocadas no interior da tampa de uma câmara de vapores, a qual continha o monómero pirrol (Sigma Aldrich). A câmara utilizada pode ser observada na figura 3.2. Durante todo o processo de polimerização, a câmara encontrava-se devidamente fechada para manter uma concentração de pirrol elevada no seu interior.



Figura 3.2- Metodologia utilizada para revestir as membranas de PVP por polipirrol

De forma a melhorar o revestimento e otimizar as condutividades das membranas foram testados diferentes tempos de polimerização: 1, 2, 3, 48 e 72 horas.

3.2.2- Acetato de celulose

O revestimento das membranas de acetato de celulose foi conseguido a partir de dois processos de oxidação distintos, *in situ* numa solução aquosa e por exposição a vapores de pirrol.

3.2.2.1- Oxidação in situ em solução aquosa

O processo de revestimento das membranas por oxidação in situ do pirrol teve por base o trabalho reportado por Müller [5]. Foram preparados 20ml de uma solução aquosa com uma determinada concentração de pirrol (0.025, 0.05 ou 0.075mol/L), na qual foi adicionada uma amostra da membrana de acetato de celulose. Esta solução foi posteriormente colocado num agitador magnético para facilitar a difusão de água com o pirrol pela matriz.

Após 10 minutos, a solução é retirada da agitação e é adicionado o cloreto de ferro (III) como agente iniciador. Este composto provoca a oxidação dos monómeros, dando origem a radicais que, por serem instáveis, criam ligações covalentes entre si e formam cadeias de polipirrol em torno das fibras de AC. Após um determinado período de tempo, a membrana foi retirada da solução, lavada com água destilada até eliminar os agregados de polipirrol em excesso e colocada a secar à temperatura ambiente.

Uma vez que nunca tinha sido efectuado anteriormente este tipo de revestimento em fibras de acetato de celulose, foi necessário repetir várias vezes este protocolo com alterações em determinados parâmetros como a concentração de pirrol, proporção entre monómero e iniciador e tempo de polimerização, com o objectivo de maximizar a condutividade das matrizes. Neste estudo foram usadas membranas de acetato de celulose sem o fármaco no seu interior. Nas tabela 3.2 e 3.3 encontram-se todos os parâmetros que foram variados e experimentados no revestimento das matrizes.

Tabela 3.2- Proporções entre $FeCl_3$ e PPy testadas

Concentração de Pirrol: 0,025mol/L	Proporção $FeCl_3$:PPy
Tempo de polimerização: 1h	1:1
	2:1
	3:1
	4:1

Tabela 3.3- Parâmetros experimentados para o revestimento das fibras de AC por PPy

Concentração de Pirrol (mol/L)	Proporção FeCl ₃ : Pirrol	Tempo de polimerização (min)
0,025	2 : 1	30
		45
		60
		90
		1440
0,05	2:1	15
		30
		45
		60
		90
		1440
0,075	2:1	15
		30
		45

3.2.2.2- Oxidação por exposição a vapores de pirrol

Este revestimento foi produzido através de um processo semelhante ao utilizado nas fibras de PVP. Numa primeira tentativa, foi adicionado cloreto de ferro (III) à solução polimérica de AC mas não foi conseguida a produção de fibras por electrofiação, mesmo variando os vários parâmetros que influenciam o processo.

Para integrar o agente oxidante, as membranas foram colocadas numa solução aquosa com 8% (wt/v) de FeCl₃ durante 24 horas e secas à temperatura ambiente.

A membrana de AC com FeCl₃ foi colocada na câmara de vapores durante 30 minutos, na qual foi previamente adicionada uma solução composta por 7ml de água destilada e 7ml de pirrol.

Foram produzidas duas membranas de AC com este revestimento de polipirrol, uma com 30 minutos e a outra com 1 hora de polimerização.

3.3 - Caracterização das Membranas

As membranas com e sem revestimento de polipirrol foram caracterizadas para uma análise comparativa. A estrutura e morfologia foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), enquanto que a condutividade eléctrica foi avaliada pela curva característica de Corrente-Tensão (I-V).

3.3.1 Morfologia – SEM

A microscopia electrónica de varrimento, ao contrário da microscopia óptica, não utiliza a luz mas sim um feixe de electrões focado na superfície da amostra a analisar. Por não estar sujeito ao limite de difração da luz, este microscópio possui uma resolução à escala nanométrica, sendo capaz de revelar informações sobre a morfologia da superfície da amostra.

Quando um feixe de electrões incide numa determinada amostra, a sua interação com os átomos da superfície faz com sejam ejectados electrões secundários. Para imagens com maior resolução é geralmente captado o sinal proveniente dos electrões secundários. A estrutura química e a topografia da superfície determinam a energia e direcção dos electrões secundários. É a detecção e identificação do sinal proveniente destes electrões que permite a formação da imagem da amostra.

3.3.1.1 – Procedimento experimental

A análise da morfologia e qualidade do revestimento das fibras foi realizada para as membranas com e sem polipirrole, no microscópio de varrimento electrónico do Cenimat/I3N. Para tal, foram preparadas pequenas amostras destas matrizes e colocadas num suporte apropriado. Como as membranas não revestidas possuem uma condutividade muito baixa, foi feita a sua ligação eléctrica com a superfície do suporte com fita de carbono. De forma a evitar a acumulação de cargas e melhorar a qualidade das imagens obtidas, todas as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro (< 5nm) antes de serem colocadas na câmara do microscópio.

3.3.2 Condutividade Eléctrica – Curvas IV

A condutividade de todas as matrizes produzidas foi obtida através das suas curvas características de Corrente-Tensão (I-V). Para a obtenção destas curvas, foi aplicado uma gama de potencial eléctrico à amostra e medidos os respectivos valores de corrente. A obtenção dos gráficos da corrente em função do potencial eléctrico permitem, pela lei de Ohm ($I=V/R$), determinar a resistência e, conseqüentemente, a condutividade eléctrica do material, através de:

$$\sigma = \frac{l}{A \times R}$$

Em que R representa a resistência, A a área da membrana atravessada pela corrente e l o seu comprimento.

3.3.2.1 - Procedimento Experimental

Uma amostra da matriz polimérica foi colocada entre dois eléctrodos de alumínio separados entre si de 1mm. A ligação eléctrica entre a extremidade das fibras e o contacto de alumínio foi feita com cola de prata (figura 3.3). Antes de realizar a medição, foi verificado se não existia cola de prata entre os dois eléctrodos de modo a evitar curto-circuitos.



Figura 3.3- Amostras preparadas para a medição da condutividade eléctrica

As pontas de prova de um microprovador foram cuidadosamente colocadas nos eléctrodos. O microprovador encontra-se ligado a um *Semiconductor Parameter Analyser* 4145B, controlado por computador. No programa do computador foram introduzidos os parâmetros de medida, como indicado na tabela 3.4.

Tabela 3.4- Parâmetros utilizados para a obtenção das curvas I-V

Número de Eléctrodos	2, E1 e E3
Tensão aplicada aos eléctrodos	E1- variável, E3- 0V
Tipo de Varimento	Linear
Potencial eléctrico inicial / final	-1V / 1V
Intervalo entre cada medida	50mV
Número de valores medidos	40
Calibração	Autocalibração
Complacência	100 mA

Foram obtidas três curvas I-V para cada amostra e foi calculada a média da condutividade. Para este cálculo, foi necessário estimar a área e comprimento da amostra. Estes foram obtidos através do software *imageJ*, desenvolvido pelo NIH (National Institute of Health), a partir de imagens da amostra obtidas num microscópio óptico. Para a espessura foi utilizada a da membrana de onde foi retirada a amostra.

Como a condutividade depende inversamente da área e a membrana possui uma espessura maior do que a amostra retirada, todos os valores de condutividade foram estimados por defeito, sendo o seu valor real superior ao calculado.

3.4 – Estudo da libertação do fármaco

A libertação do fármaco foi testada através da realização de vários ensaios, nos quais a membrana foi colocada num meio, água destilada ou PBS, e sujeita a determinados estímulos eléctricos. A identificação do ácido acetilsalicílico libertado pelas fibras foi avaliado por espectroscopia UV-Visível. Para tal realizou-se um estudo

prévio da variação da absorvância de diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico dissolvido em água destilada e em solução de PBS. Este estudo serviu de referência para relacionar a concentração de ácido acetilsalicílico dissolvido com o libertado pela membrana.

Neste estudo foram utilizadas as membranas com 20, 30 e 40% de AAS, produzidas por electrofiação, cujo revestimento for realizado nas condições que maximizavam a sua condutividade.

3.4.1- PBS

De modo a observar o processo de libertação de fármaco em meio fisiológico, foi produzida uma solução de PBS.

Esta solução aquosa contém sais que além de permitirem um pH constante de 7, fornecem uma concentração de iões similar à do corpo humano, sendo por isso uma solução bastante utilizada em estudos de efeitos biológicos.

A solução de PBS foi preparada com os sais e as respectivas quantidades dissolvidos em água destilada, indicadas na tabela 3.5.

Tabela 3.5- Sais utilizados e respectivas concentrações para a produção da solução PBS

Sal	Concentração (mM)	Quantidade adicionada para 1L de H ₂ O (g)	Marca
Cloreto de Sódio (NaCl)	1,55	9×10^{-2}	Sigma Aldrich
Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	1×10^{-2}	$1,36 \times 10^{-3}$	Sigma Aldrich
Fosfato de Sódio (Na ₂ HPO ₄)	3×10^{-2}	$4,2 \times 10^{-3}$	Sigma Aldrich

3.4.2 – Espectroscopia UV-Visível

A espectroscopia UV-Visível permite obter o espectro de absorvância ou transmitância de um material ou substância. O espectro reflecte a interação deste material ou substância com os diferentes comprimentos de onda que incidem na amostra. Devido à sua estrutura ou composição, os diferentes comprimentos de onda podem ser transmitidos (T), reflectidos (R) ou absorvidos (A) na amostra ($A+R+T=1$).

O equipamento utilizado permite a obtenção de espectros de absorvância ou transmitância no intervalo de 190-900 nm (marca PGInstruments, modelo T90+).

As medidas foram efectuadas em cuvetes com 3ml da amostra, e os espectros de absorvância obtidos no intervalo de 190-350 nm, pois é neste intervalo que se encontra o pico relativo ao ácido acetilsalicílico.

No caso de amostras líquidas a absorvância é dada pela lei de Lambert-Beer

($A = E \cdot b \cdot c$) em que :

- E - absortividade molar $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (quantidade de luz absorvida por unidade de concentração)
- b - comprimento da amostra, neste caso o comprimento da cuvete
- c - concentração do composto

O equipamento possui dois feixes em que um serve de referência e no outro é colocada a amostra.

Antes de iniciar qualquer aquisição, foi feito um primeiro varrimento com duas cuvetes, ambas com 3ml do meio correspondente ao ensaio realizado para estabelecer a linha base. Desta forma, é eliminado o espectro do meio (PBS ou água), sendo possível identificar os picos de absorvância do fármaco.

3.4.3- Espectros de referência do AAS

De modo a construir uma referência da variação dos espectros de absorção com a quantidade de AAS, foram adquiridos espectros para diferentes concentrações deste fármaco (diluições sucessivas de uma primeira concentração) em água destilada e PBS. Para tal, foi preparado 1L de solução (H₂O e PBS) com uma determinada quantidade de fármaco, a partir da qual foram feitas diluições sucessivas para obter as várias concentrações necessárias para a curva de referência. As concentrações utilizadas encontram-se na tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Soluções padrão preparadas para a curva de referência da concentração AAS com o espectro de absorvância

Meio	[AAS] (µg/ml)							
	H ₂ O	1	0,5	0,25	0,125	$6,25 \times 10^{-2}$	$1,56 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-3}$
PBS	2,5	1,25	0,31	$7,81 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-2}$	$1,95 \times 10^{-2}$	$9,7 \times 10^{-3}$	$4,85 \times 10^{-3}$

3.4.4 – Testes de libertação de fármaco

Os testes de libertação do fármaco do interior das membranas foram realizados segundo a mesma metodologia.

Num copo de precipitação de 50ml, foram colocados 20ml do meio (H₂O ou PBS) correspondente ao ensaio realizado. De seguida, foi estabelecido o contacto eléctrico através de eléctrodos com a fonte de tensão, em que o seu pólo positivo foi ligado à membrana e o negativo a um fio de prata (figura 3.4).

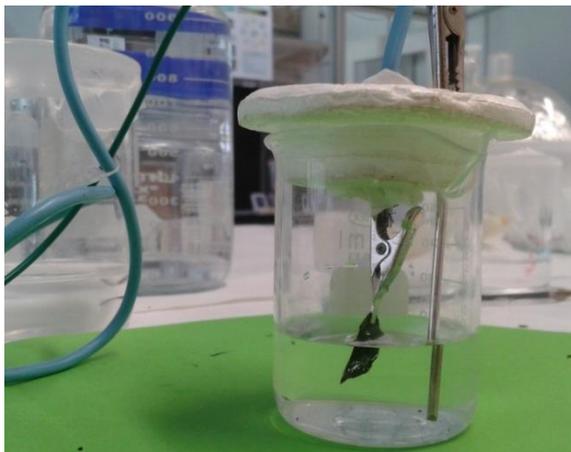


Figura 3.4- Montagem experimental utilizada em todos os ensaios realizados.

Tanto a membrana como a prata foram mergulhadas no meio, com uma distância de aproximadamente 1cm, e foi aplicada uma tensão eléctrica durante determinados períodos de tempo.

A fonte de tensão utilizada foi uma *High Voltage source measure unit*, da marca Keithley.

Em cada ensaio, foram utilizadas várias amostras, com aproximadamente o mesmo tamanho, provenientes de uma só membrana para garantir que todas possuam a mesma condutividade e concentração de AAS. Cada amostra foi testada num meio novo.

Entre os ensaios realizados foram variadas a tensão e/ou o tempo de aplicação da tensão para avaliar o processo de libertação do fármaco.

Os espectros de absorvância foram obtidos nos meios utilizados para todas as amostras testadas.

Os ensaios realizados encontram-se na tabela 3.7. No primeiro ensaio, todos os estímulos foram aplicados à mesma amostra na ordem indicada.

Nos restantes, os estímulos foram aplicados em amostras diferentes provenientes da mesma membrana.

Tabela 3.7- Testes de libertação de fármaco realizados.

Ensaio	meio	%wt AAS	Nº de Amostras	Estímulos aplicados									
				Tensão (V)	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	0
1	H ₂ O	20	1	Tensão (V)	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	0
				Duração (min)	5	5	5	10	10	10	10	10	10
2	PBS	20	2	-5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 1V, 1min a 0V. - 10 ciclos de 1 minuto cada, 30s a 1V, 30s a 0V.									
3	PBS	30	3	- 0V durante 10 minutos. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 1V, 1min a 0V. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a -1V, 1min a 0V.									
4	PBS	20	4	- 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 1V, 1min a 0V. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 2V, 1min a 0V. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 3V, 1min a 0V. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 4V, 1min a 0V									
5	PBS	40	3	- 0V durante 10 minutos. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a 1V, 1min a 0V. - 5 ciclos de 2 minutos cada, 1 min a -1V, 1min a 0V.									

3.5- Citotoxicidade das membranas

A biocompatibilidade das membranas de acetato de celulose revestidas por polipirrol foi avaliada através de testes de citotoxicidade. Apenas foram testadas estas membranas pois as de PVP não foram utilizadas no estudo da libertação de fármaco. O método utilizado foi indirecto, na medida em que as membranas não estiveram em contacto directo com as células mas sim com o meio no qual estas são posteriormente

introduzidas. Foram utilizadas neste procedimento células *vero*, células provenientes do tecido epitelial de uma espécie de primata.

3.5.1- Procedimento experimental

Foram utilizadas duas amostras de acetato de celulose, uma sem polipirrol e a outra com o revestimento deste polímero, realizado nas condições encontradas que maximizam a condutividade da membrana. Todos os procedimentos foram realizados na câmara de segurança microbiológica (CSM), existente no laboratório de Engenharia dos Tecidos no Departamento de Física da FCT-UNL, e os materiais utilizados foram esterilizados com isopropanol para evitar a contaminação das amostras. As amostras das membranas foram esterilizadas em radiação UV durante 2 horas e colocadas, cada uma, em 1,5ml de meio celular durante 24 horas (figura 3.5). Neste período as células foram preparadas para o teste de citotoxicidade.

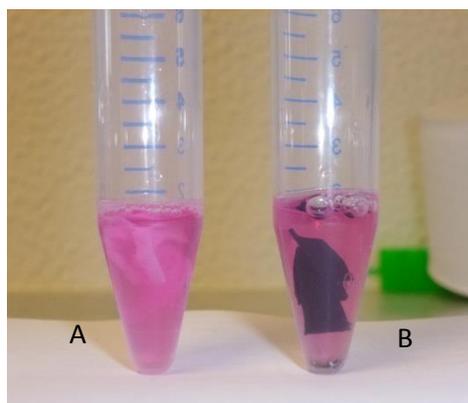


Figura 3.5- Inserção das 2 membranas em meio limpo. No tubo da esquerda (A) encontra-se a membrana de AC e à direita (B) a mesma membrana mas revestida por PPY

- **Preparação da cultura celular**

A cultura celular foi inicialmente observada em microscópio para garantir a ausência de microorganismos e verificar o seu grau de confluência (ocupação da cultura celular no espaço para ela disponível). De seguida, foi retirado o meio da cultura e esta foi lavada com PBS. Como as células estavam aderidas nas paredes do

frasco onde se encontravam, foram adicionados 500µL de tripsina, cuja acção é quebrar esta adesão, e a cultura foi colocada na estufa, a 37°C, durante 6 minutos. A actividade enzimática da tripsina foi interrompida com a adição de 2ml de meio de cultura e foi verificado no microscópio óptico que as células estavam em suspensão no meio.

Posteriormente, a cultura foi colocada em centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 150G e o sobrenadante foi retirado. Ao grânulo de células resultante foram adicionados 5 ml de meio fresco onde as células foram resuspendidas.

Para garantir uma densidade celular apropriada para o teste, foram retirados 100µL da suspensão para efectuar uma contagem de células. A esta amostra foi adicionada a mesma quantidade (100µL) de Trypan Blue, que permite distinguir as células vivas das células mortas, e foi colocada nas duas câmaras de contagem do hemocítmetro. Este dispositivo possui várias grelhas que, sabendo a quantidade de células viáveis nelas existente, permitem estimar a densidade celular. A contagem foi feita e foi estimada uma densidade de 532 mil células por mililitro.

À suspensão inicial foi adicionada a quantidade de meio necessário para a densidade celular desejada, sabendo que cada poço utilizado, tem um volume de 500µL com cerca de 20 000 células

Foram preparados nove poços com esta última solução, dos quais três serviram para o controle de células. Para garantir a viabilidade celular, as células foram colocadas na incubadora, a 37°C durante 24 horas antes de prosseguir o teste.

- **Adição do meio das membranas poliméricas à cultura celular**

Depois de verificada a adesão das células nas paredes dos poços, foi retirado todo o meio de seis poços, nos quais foram adicionados 500 µL dos meios que estiveram em contacto com as membranas (3 réplicas para cada amostra). Foram também adicionados 500µL de novo meio em três novos poços para o controle do

meio. Na tabela 3.8, encontram-se esquematizadas as amostras preparadas, em que cada célula corresponde a um poço.

Tabela 3.8- Esquematização dos poços utilizados no teste de citotoxicidade

		Amostras			
Réplicas		Células + meio de AC	Células + meio de AC/PPY	Controlo de Meio	Controlo de Células
		Células + meio de AC	Células + meio de AC/PPY	Controlo de Meio	Controlo de células
		Células + meio de AC	Células + meio de AC/PPY	Controlo de Meio	Controlo de células

- Avaliação da citotoxicidade das membranas

Para avaliar o nível de toxicidade das membranas nas células, foi adicionado 50µL de resazurina, composto activo do Presto Blue (indicador da viabilidade celular) processado apenas pelas células viáveis. As suas absorvâncias foram adquiradas 4 horas depois, por espectrofotometria, para 570 e 600 nm, comprimentos de onda correspondentes à absorção máxima de resorufina (resazurina reduzida pelas células) e da resazurina, respectivamente.

Capítulo 4 – Análise de resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos todos os resultados obtidos. Primeiro é apresentada a caracterização das fibras condutoras produzidas. Esta inclui a caracterização morfológica e eléctrica. De seguida os ensaios de libertação de fármaco e por último, a determinação da citotoxicidade das membranas.

4.1- Membranas de PVP revestidas com polipirrol

As membranas a revestir foram produzidas por electrofiação a partir de uma solução de PVP/ FeCl_3 , conforme descrito na secção 3.1. Posteriormente, estas membranas foram expostas a vapores de pirrol de modo a promover a polimerização à superfície das fibras. O Cloreto de ferro (III) presente nas fibras leva à formação de radicais do pirrol em vapor. Estes compostos são bastante reactivos e criam ligações covalentes entre si, iniciando a formação de uma cadeia de polipirrol (figura 2.4). Foram estudados diferentes tempos de polimerização: 1, 2, 3, 48 e 72 horas. As membranas resultantes foram caracterizadas morfológica e electricamente, sendo que os resultados obtidos se encontram resumidos nas secções que se seguem.

4.1.1- Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), em membranas com ou sem revestimento de PPy, produzidas com diferentes tempos de polimerização (tabela 4.1).

Tabela 4.1- Imagens de PVP revestidas com PPY para diferentes tempos de polimerização, obtidas por SEM.

Tempo de polimerização	Imagens obtidas por SEM
2 horas	<p>Technical data for 2-hour images: Left image: EHT = 2.00 kV, Mag = 1.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.0 mm, Date :26 Jun 21, Time :14:49:49. Right image: EHT = 2.00 kV, Mag = 10.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.0 mm, Date :26 Jun 2013, Time :14:50:33.</p>
3 horas	<p>Technical data for 3-hour images: Left image: EHT = 2.00 kV, Mag = 2.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.6 mm, Date :24 Apr 2013, Time :10:16:46. Right image: EHT = 2.00 kV, Mag = 10.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.6 mm, Date :24 Apr 2013, Time :10:17:54.</p>
48 horas	<p>Technical data for 48-hour images: Left image: EHT = 2.00 kV, Mag = 2.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.6 mm, Date :24 Apr 2013, Time :10:24:01. Right image: EHT = 2.00 kV, Mag = 10.00 K X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.6 mm, Date :24 Apr 2013, Time :10:22:34.</p>
72 horas	<p>Technical data for 72-hour image: EHT = 2.00 kV, Mag = 500 X, Aperture Size = 30.00 µm, WD = 5.4 mm, Date :24 Apr 2013, Time :10:25:15.</p>

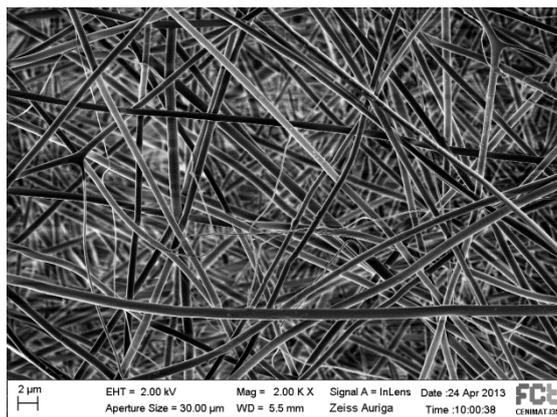


Figura 4.1 Fibras de PVP/FeCl₃ antes do revestimento de polipirrol.

Na imagem da figura 4.1, pode observar-se que antes do revestimento, as fibras de PVP/FeCl₃ produzidas por electrofiação são uniformes e não possuem contas ou outros defeitos. Através do software *imageJ* foram medidos os diâmetros de várias fibras e estimado um valor médio de 740nm.

Quanto ao revestimento, é possível observar pelas imagens SEM da tabela 4.1 que a camada de polipirrol formada na superfície das fibras depende fortemente do tempo de polimerização utilizado. Para um tempo de 2 horas, as fibras já apresentavam uma coloração preta, característica do polipirrol. As imagens mostram que as fibras preservaram a sua forma e estrutura, mas o revestimento apresenta-se pouco uniforme, formando alguns aglomerados em certas regiões das fibras. Com 3 horas de polimerização, verifica-se uma ligeira fusão das fibras de PVP e a formação de uma camada de polipirrole.

A fusão das fibras pode afectar as funcionalidades da membrana enquanto biodispositivo electrónico, pois leva à diminuição da área superficial da membrana e, conseqüentemente, às suas características electro-químicas. Ao fim de 72 horas (3 dias) de polimerização, toda a superfície da membrana ficou coberta por um filme de polipirrol.

4.1.2- Condutividade eléctrica

A condutividade, conforme já mencionado, foi calculada a partir das curvas características de corrente-tensão (I-V), tendo em conta os parâmetros geométricos da amostra:

$$\sigma = \frac{I}{V} \times \frac{l}{A}$$

Em que I/V é a resistência que corresponde ao declive da curva. Na figura 4.2, a título de exemplo, é possível observar uma das curvas I-V obtidas.

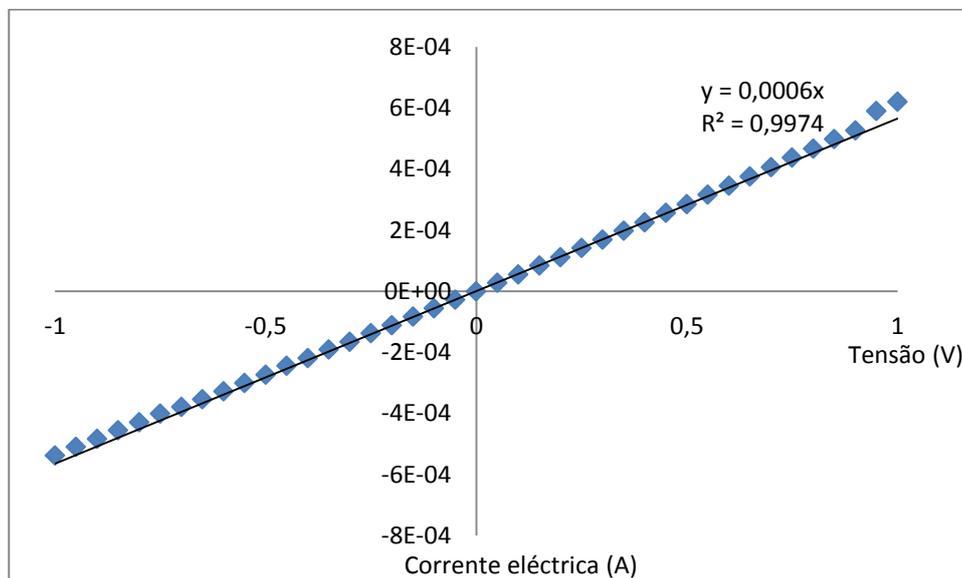


Figura 4.2- Curva I-V de uma das membranas produzidas

Na tabela 4.2 encontram-se as condutividades calculadas para as membranas revestidas, consoante o tempo de polimerização, bem como da membrana de PVP/ FeCl_3 antes do revestimento.

Tabela 4.2- Condutividade estimada consoante o tempo de polimerização utilizado no revestimento

Tempo de Polimerização (horas)	σ (S/cm)
0	$5,9 \times 10^{-11}$
1	$2,4 \times 10^{-7}$
2	$1,37 \times 10^{-4}$
3	$1,24 \times 10^{-5}$
48	$1,03 \times 10^{-5}$
72	$4,92 \times 10^{-5}$
192	$1,54 \times 10^{-4}$

Como se pode observar na tabela 4.2, à medida que o tempo de polimerização aumenta, os valores de condutividade também aumentam. Os valores de condutividade obtidos são sempre superiores aos apresentados pelas fibras não revestidas, mas o maior valor foi conseguido para um tempo de polimerização de 2 horas.

Para tempos superiores ou iguais a 3 horas, não foram verificadas grandes alterações no valor de condutividade. Estes resultados encontram-se de acordo com a análise morfológica das membranas, na medida em que a partir das 3 horas verifica-se o início da fusão das fibras de PVP e a formação de um filme de polipirrol. Uma vez formado este filme, o aumento do tempo de polimerização parece não afectar a condutividade da membrana (a variação dos valores está dentro do erro cometido na medição da espessura e área das membranas). Para uma análise mais completa, seria necessário variar outros parâmetros, como a concentração de pirrol e de FeCl_3 , ou testar diferentes tempos de polimerização próximos de 2 horas. No entanto, os efeitos negativos a nível morfológico causados nas fibras com este revestimento levaram à necessidade de experimentar novas metodologias para este processo.

4.2- Membranas de AC revestidas em vapores de pirrol

As membranas de AC foram revestidas utilizando uma metodologia semelhante à utilizada para as membranas de PVP. As membranas de AC/ FeCl₃ foram produzidas por electrospinning, sendo posteriormente colocadas numa câmara de vapores de Py. As membranas foram revestidas utilizando dois tempos de polimerização: 30 minutos e 1 hora. Depois de produzidas foram analisadas por SEM e determinadas as suas características eléctricas.

4.2.1- Caracterização morfológica

A figura 4.3 mostra imagens obtidas por SEM para uma membrana de AC com e sem revestimento de PPy.

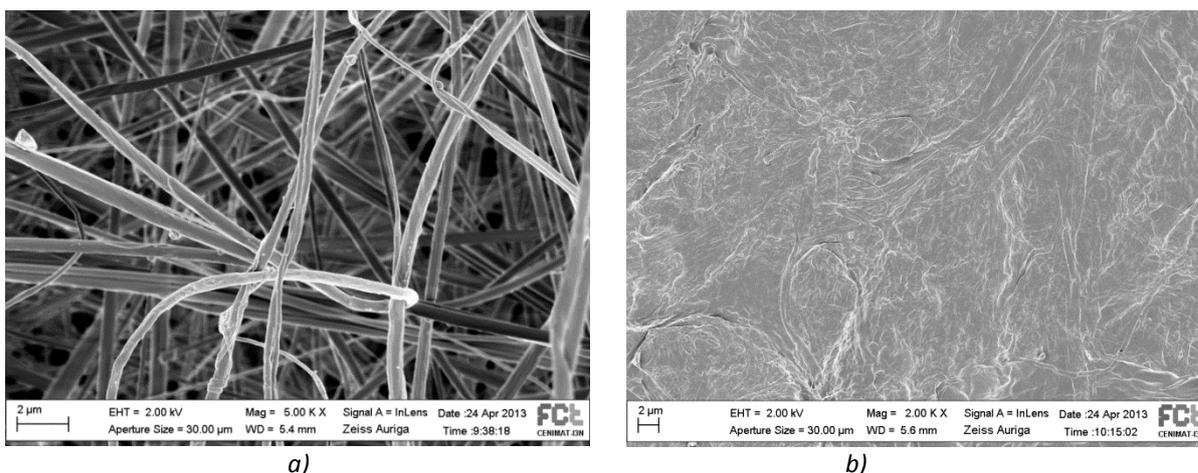


Figura 4.3- a) Imagem SEM da membrana de AC produzida por electrofiação b) Imagem SEM da membrana de AC revestida com 1 hora de polimerização em vapores de pirrol.

Como é possível observar pela imagem SEM da figura 4.3 b), após uma hora de polimerização a membrana perdeu a sua morfologia fibrosa, verificando-se a fusão das fibras de AC e a formação de um filme de PPy à sua superfície.

A diminuição da área superficial irá comprometer as propriedades electroquímicas das membranas. Além disso, a membrana com polipirrol é bastante frágil, o que inviabiliza a sua aplicação em biodispositivos.

No que diz respeito à membrana polimerizada com PPy durante 30 minutos, a sua morfologia pode ser observada na figura 4.4. Neste caso, a membrana manteve a sua estrutura composta por fibras e o polipirrol cobre a superfície das fibras. No entanto, a membrana continua quebradiça.

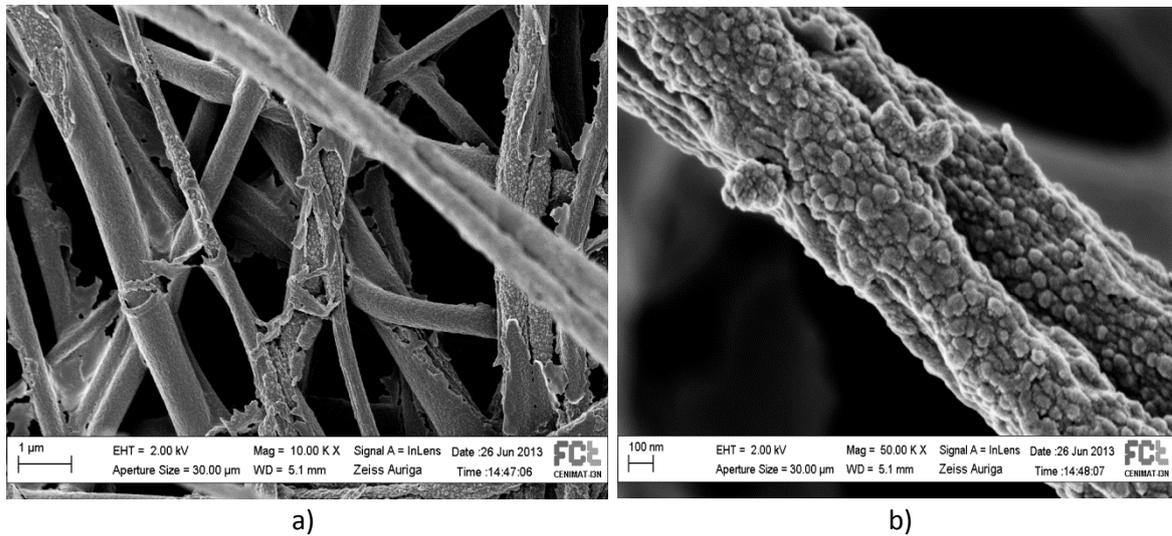


Figura 4.4- Imagens SEM de membrana de AC após 30 minutos de polimerização em vapores de pirrol, com diferentes ampliações, a) 10.00K e b) 50.00 K

4.2.2- Condutividade eléctrica

Na membrana produzida com 1h de polimerização não foi possível determinar a condutividade por ser muito frágil. Na membrana revestida com 30 minutos de polimerização, foi determinada uma condutividade de $5,1 \times 10^{-3}$ S/cm. Este valor é bastante superior à condutividade calculada para a membrana de AC antes do revestimento ($7,08 \times 10^{-11}$ S/cm) e também às de PVP.

No entanto a fragilidade da membrana obtida torna-a inadequada para ser aplicada num biodispositivo. Assim houve a necessidade de explorar outras vias de polimerização.

4.3-Membranas de AC revestidas por oxidação *in situ* do pirrol

O revestimento por oxidação *in situ* do pirrol nas fibras de acetato de celulose produzidas por electrofiação, foi uma das vias escolhidas para obter membranas de AC condutoras e flexíveis.

Neste caso, a polimerização do monómero ocorre em solução aquosa por acção do cloreto de ferro (III) na presença da membrana.

4.3.1- Caracterização morfológica

A figura 4.5 a) mostra uma fotografia da membrana obtida, com as respectivas imagens SEM para duas ampliações diferentes b) e c). Esta membrana foi revestida durante 24 horas de polimerização, utilizando uma concentração de pirrol de 0,05mol/L.

Após o revestimento, a membrana apresenta uma coloração preta e, ao contrário do revestimento conseguido através dos outros procedimentos seguidos, a sua estrutura fibrosa foi preservada apresentando a flexibilidade característica das fibras de acetato de celulose.



a)

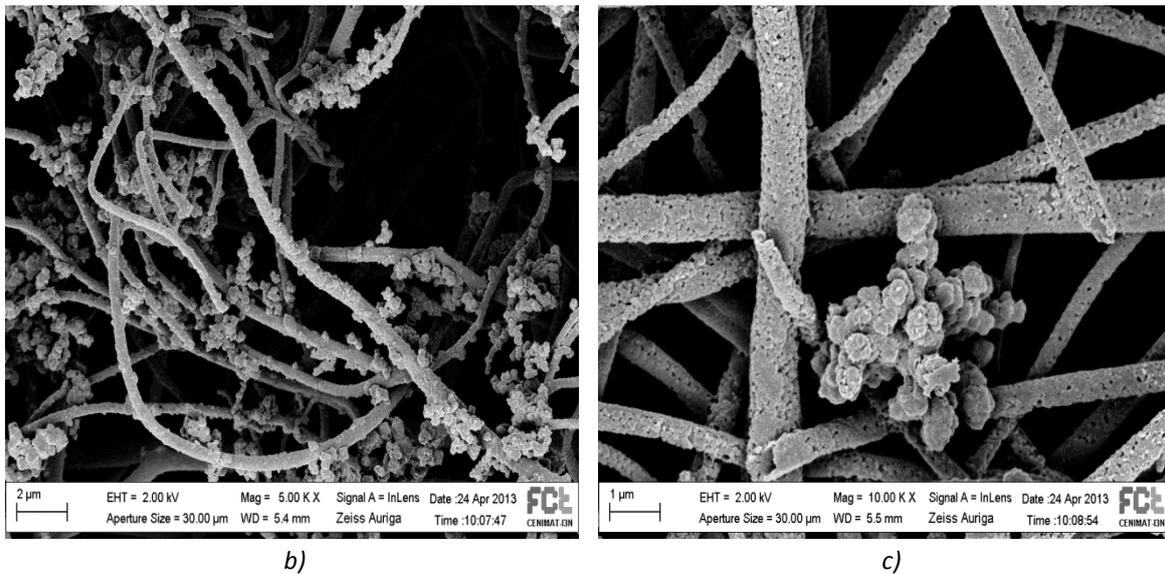


Figura 4.5 – Fotografia (a) e imagens SEM (b e c) das fibras de AC com PPy através da oxidação *in situ* após 24 horas de polimerização, utilizando uma concentração de pirrol de 0,05mol/L.

As imagens SEM da figura 4.5 permitem verificar a deposição do polipirrol em toda a superfície das fibras. Observam-se ainda alguns aglomerados deste polímero, o que sugere que foi utilizado um tempo de polimerização demasiado longo.

De modo a avaliar a influência da concentração de pirrol no revestimento, foram estudadas membranas com diferentes concentrações de pirrol (0,025, 0,05 e 0,075mol/L), mantendo constantes quer a proporção de [agente oxidante]/[monómero] de 2:1 quer o tempo de polimerização (45 minutos). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 4.3.

Tabela 4.3- Imagens SEM de membranas de AC com revestimento realizado em diferentes concentrações de pirrol.

Concentração de PPY	Imagens SEM
0,025 mol/L	
0,05 mol/L	
0,075 mol/L	

Para uma concentração de 0,025mol/L, a membrana apresenta um revestimento sem aglomerados que aparentemente não cobre totalmente as fibras de AC. Esta desuniformidade do revestimento poderá afectar a condutividade das mesmas. Por outro lado, à medida que se aumenta a concentração de pirrol, aumentam os aglomerados de polímero que se distribuem por toda a superfície da membrana. O melhor revestimento foi obtido para a concentração de 0,05mol/L, por

ser uniforme ao longo da superfície das fibras e não apresentar demasiados aglomerados.

A partir das imagens de SEM e com recurso ao software *imageJ*, foi determinado o diâmetro médio das fibras, obtido a partir de várias medições (anexo 1) Antes do revestimento, as fibras apresentam um diâmetro médio de 480 nm, enquanto que a mesma membrana com o revestimento de polipirrol (tabela 4.3, concentração de 0,05mol/L) possui 643 nm. Assim, estima-se a espessura da camada de polipirrol em 81,5 nm.

4.3.2 – Condutividade Eléctrica

A influência da proporção de [agente oxidante]/[monómero], mantendo constantes quer a concentração de pirrol utilizado (0,025mol/L) quer o tempo de polimerização (1 hora), na condutividade das membranas está representada na tabela 4.4.

Tabela 4.4- Condutividades de membranas de AC com diferentes proporções de FeCl₃/Py

	Proporção FeCl ₃ /PPy	σ (S/cm)
Concentração PPy: 0,025mol/L Tempo polimerização: 1h	1	$7,33 \times 10^{-10}$
	2	4×10^{-3}
	3	$5,7 \times 10^{-3}$
	4	$3,61 \times 10^{-3}$
Fibras de AC antes do revestimento	-	$7,08 \times 10^{-11}$

Os valores de condutividade obtidos indicam que quando a concentração de agente oxidante é igual à de pirrol, a condutividade é bastante inferior, sendo semelhante ao valor encontrado para a membrana de AC antes do revestimento. A partir de uma proporção de 2, a condutividade mantém-se sem grandes alterações, mesmo quando é introduzida uma maior quantidade de FeCl₃.

Como o cloreto de ferro (III) é tóxico e pode causar irritação cutânea, foi utilizada a proporção de 2:1 (FeCl₃:Py) para a produção das membranas por ser utilizada uma menor quantidade deste composto sem que seja comprometida a condutividade. A influência do tempo de polimerização das fibras, revestidas com diferentes concentrações, na sua condutividade está indicada na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Condutividades obtidas para membranas de AC revestidas in situ com diferentes tempos de polimerização e concentração de pirrol.

Concentração de Py (mol/L)	Tempo de polimerização (minutos)	σ (S/cm)
0,025	30	$1,51 \times 10^{-6}$
	45	$8,05 \times 10^{-5}$
	60	4×10^{-3}
	90	$6,2 \times 10^{-3}$
	1440 (24 horas)	$4,1 \times 10^{-3}$
0,05	15	$2,3 \times 10^{-3}$
	30	$8,19 \times 10^{-2}$
	45	$3,9 \times 10^{-2}$
	60	$8,6 \times 10^{-3}$
	90	$3,61 \times 10^{-2}$
	1440 (24 horas)	3×10^{-3}
0,075	15	$3,42 \times 10^{-2}$
	30	$8,8 \times 10^{-3}$
	45	$4,1 \times 10^{-3}$
σ (AC não revestido) = $7,08 \times 10^{-11}$ S/cm		

Os resultados mostram que o tempo de polimerização e a concentração de pirrol têm uma influência significativa na condutividade das membranas. Por exemplo, observa-se que aumentando a concentração de 0,025 para 0,05 mol/L, a condutividade aumenta de 10^{-6} para 8×10^{-2} S/cm.

Os menores valores de condutividade foram obtidos em membranas funcionalizadas com a menor concentração de pirrol, 0,025 mol/L, pelo que o polipirrol não deve ser suficiente para cobrir completamente as fibras. Quanto às membranas

produzidas com a maior concentração de polipirrol, foi verificado que a condutividade diminuiu com o aumento do tempo de polimerização, facto que provavelmente deve-se à acumulação de agregados de polipirrol na superfície das fibras. Por outro lado, para uma concentração de 0,05mol/L, foram registadas as melhores condutividades, com um máximo de $8,2 \times 10^{-2}$ S/cm, com tempos de polimerização de 30 minutos, valor bastante próximo dos obtidos na literatura.

Assim, o revestimento com melhores propriedades para a produção do biodispositivo é obtido para concentrações de pirrol de 0,05mol/L e tempo de polimerização de 30 minutos. Estas membranas foram as utilizadas nos testes de libertação de fármaco. Surgiu por isso a necessidade de avaliar a influência da quantidade de fármaco na condutividade destas membranas. Como tal, foram também analisadas membranas de AC com 20, 30, 40 e 50% wt de AAS na sua constituição, revestidas com polipirrol segundo os parâmetros que maximizam a condutividade. Os valores encontrados encontram-se na tabela 4.6.

Tabela 4.6- Condutividade calculada para membranas com diferentes concentrações de AAS, revestidas com PPY.

%wt de AAS	σ(S/cm)
20	$2,3 \times 10^{-2}$
30	$4,4 \times 10^{-2}$
40	$1,4 \times 10^{-2}$
50	$2,31 \times 10^{-4}$

Nesta tabela é possível observar que para uma percentagem de 20, 30 ou 40%wt de AAS, reativa à quantidade de AC utilizada, a condutividade diminui ligeiramente mas mantém a mesma ordem de grandeza encontrada para a membrana sem o fármaco e com o mesmo revestimento. No entanto, para uma percentagem de 50%, a variação é bastante considerável pois neste caso, a condutividade diminuiu em duas ordens de grandeza. Assim, grandes quantidades de fármaco na membrana comprometem a condutividade, pelo que para os ensaios de libertação foram apenas utilizadas membranas com 20, 30 e 40% de AAS.

4.4 – Liberação de fármaco por estímulos eléctricos.

O potencial da membrana desenvolvida como sistema de libertação de fármacos controlado por estímulos eléctricos, foi avaliado através de vários testes realizados. Foram produzidas fibras de acetato de celulose com diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico e revestidas por polipirrol segundo o procedimento referido anteriormente que conduz à maximização da condutividade. Numa fase inicial, foram realizados ensaios preliminares em água destilada para verificar o funcionamento do biodispositivo, sendo posteriormente utilizada uma solução PBS para um estudo em meio fisiológico. A concentração de fármaco libertada foi estimada consoante as curvas de referência obtidas.

4.4.1 - Curva de referência de AAS em H₂O

Na figura 4.6, encontram-se os espectros de absorvância para várias concentrações de AAS em água destilada.

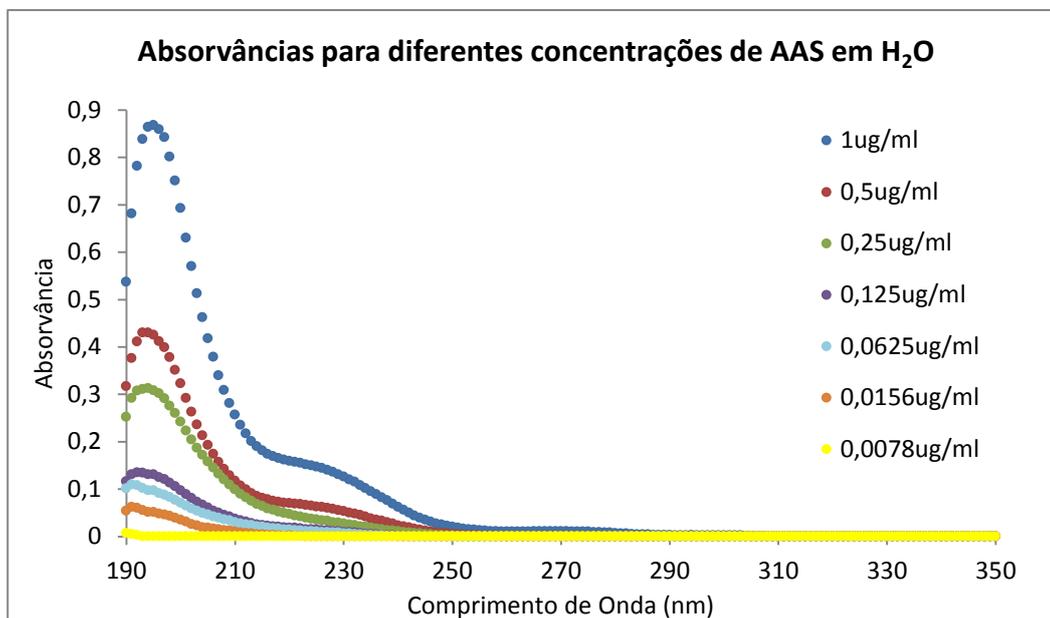


Figura 4.6 - Gráfico das absorvâncias obtidas a partir de soluções de H₂O com diferentes concentrações de AAS.

Como o pico mais evidente para todas as concentrações experimentadas foi o de 200nm, a curva de referência de AAS em água foi elaborada a partir da correspondência do valor deste pico à concentração de fármaco em solução. Esta curva pode ser observada na figura 4.7.

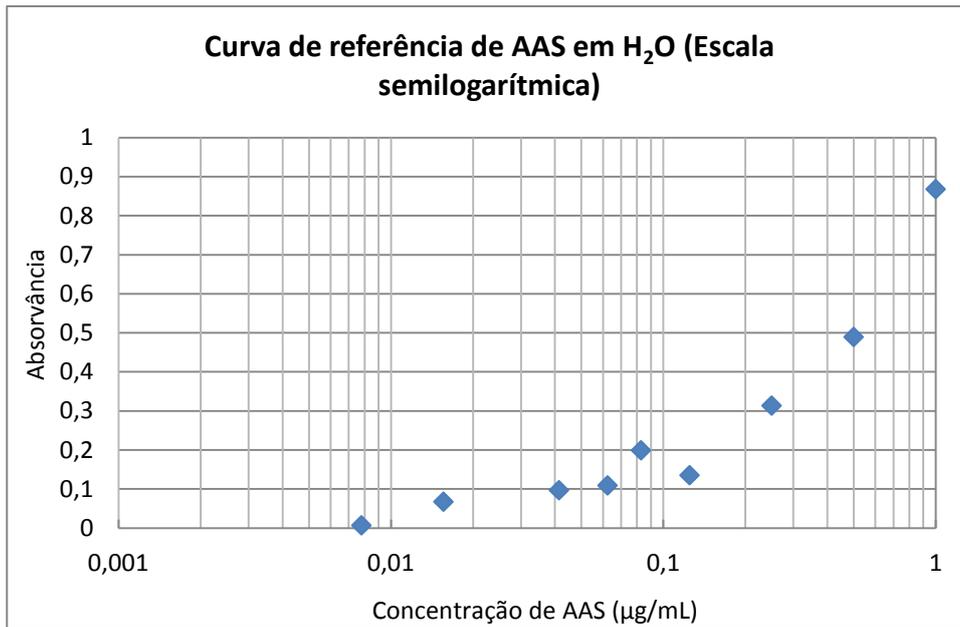


Figura 4.7- Curva de referência de AAS em água destilada.

4.4.2 - Curva de referência de AAS em PBS

As absorvâncias das soluções contendo várias concentrações de AAS em PBS encontram-se na figura 4.8.

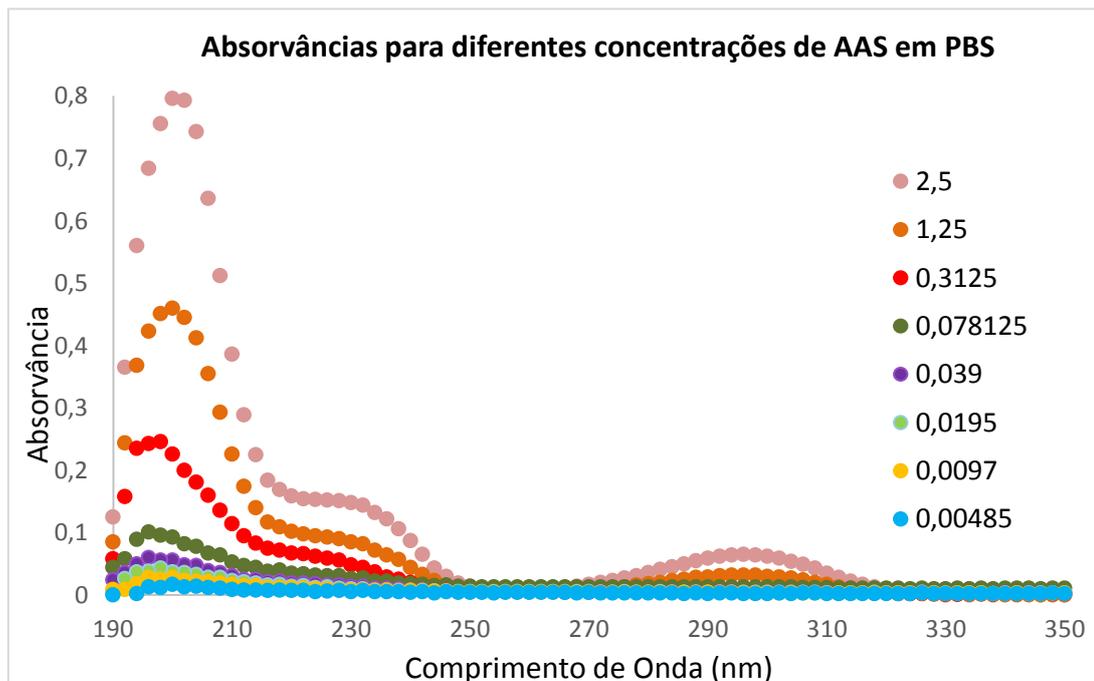


Figura 4.8- Gráfico das absorvâncias obtidas a partir de soluções de PBS com concentrações conhecidas de AAS.

Como é possível verificar nos espectros da figura 4.8, existem picos de absorvância para três comprimentos de onda, 300, 230 e 200 nm, cujo valor aumenta com a concentração de AAS presente no PBS.

Como nos ensaios preliminares de libertação de fármaco em água destilada, verificou-se que os valores obtidos para a libertação de AAS correspondiam às menores concentrações da curva de referência, e o pico a 200nm é o que tem uma maior discriminação de valores, foi também no caso do PBS, o valor de absorvância do pico de 200nm o utilizado como referência para realizar uma curva de referência que depois será utilizada para estimar qualitativa do fármaco em solução.

O pico de absorção a 200nm em função da concentração, está representada no gráfico (em escala semilogarítmica) da figura 4.9.

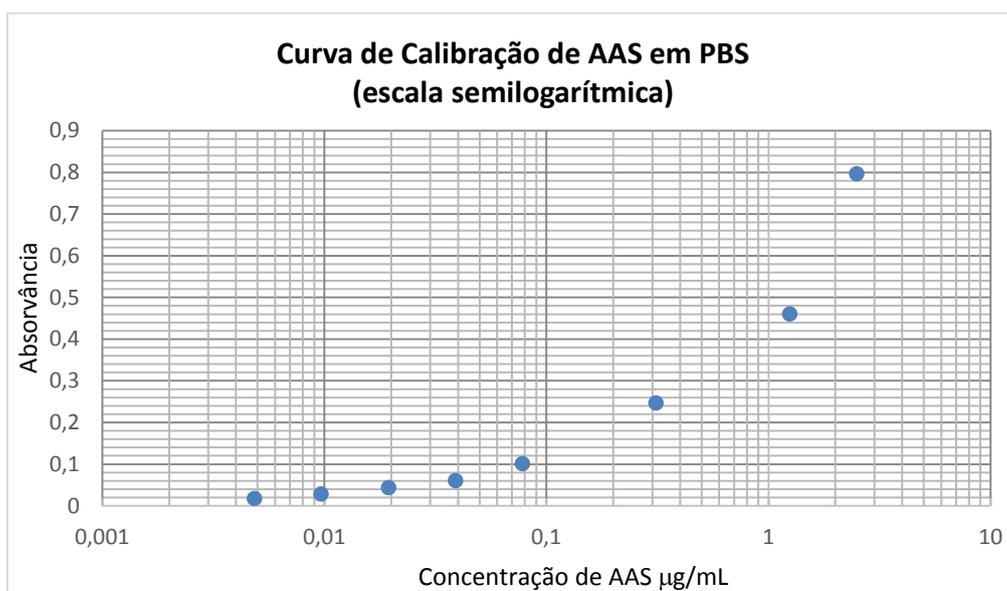


Figura 4.9- Curva de Calibração de AAS em solução PBS.

4.4.3- Libertação em água destilada

Para testar a libertação de fármaco pelo biodispositivo, foi realizado um ensaio preliminar em água destilada, antes de prosseguir com os testes em solução PBS.

4.4.3.1- Estudo da influência do pulso eléctrico aplicado

Num primeiro ensaio de libertação de fármaco, realizado em água destilada, foram aplicados uma série de pequenos estímulos a uma membrana de acetato de

celulose com 20% wt de AAS, revestida com polipirrol. A absorvância da água em que se encontra a membrana foi lida entre cada estímulo, sem que tenha ocorrido mudança deste meio. Assim os resultados obtidos são cumulativos à medida que são aplicados os estímulos. Na figura 4.10, podem ser observados as absorvâncias obtidas (para as amostras a1 a a9) após cada estímulo aplicado. Na tabela 4.7 apresentam-se os estímulos aplicados e a respectiva duração.

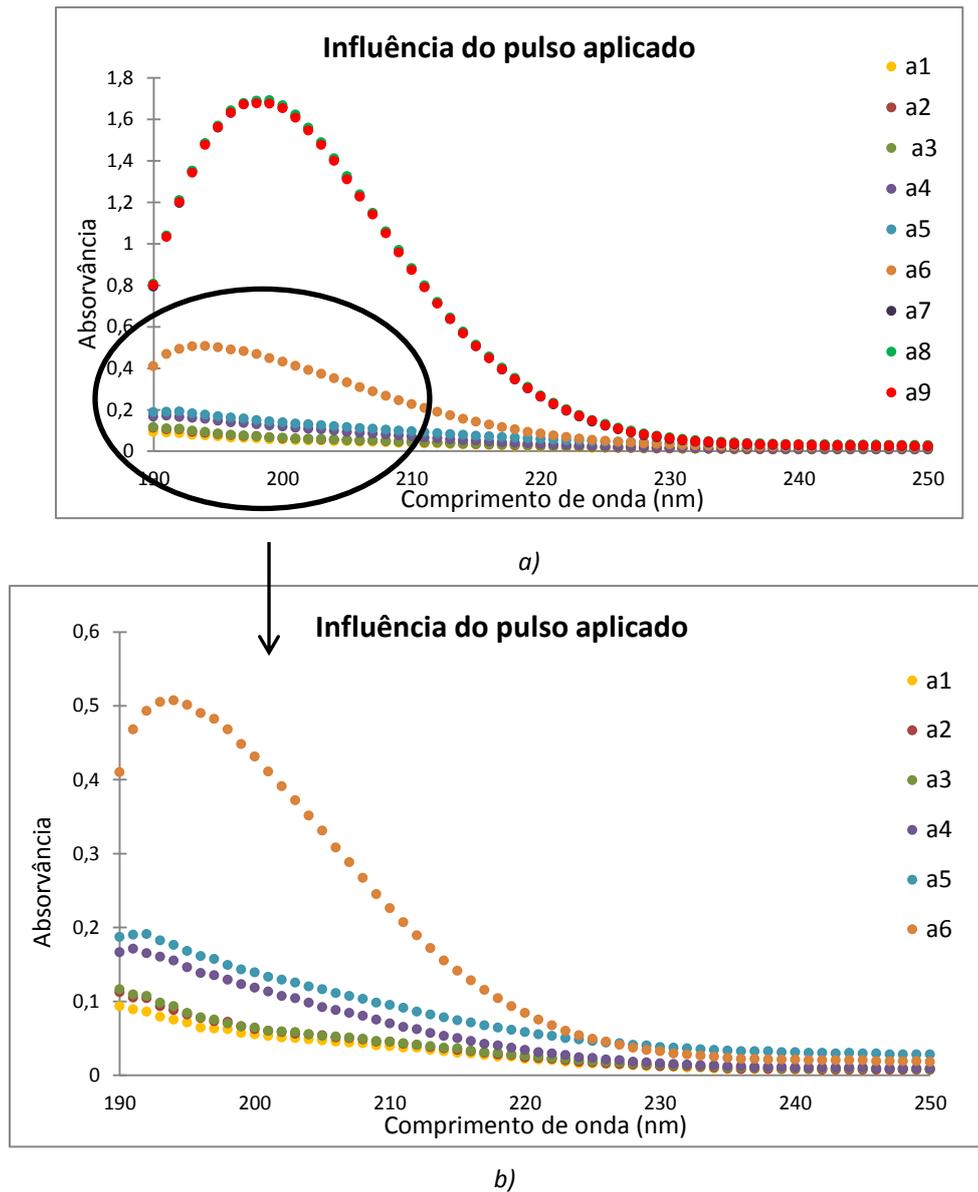


Figura 4.10 - a) Gráfico das absorvâncias obtidas relativas aos pulso aplicados. b) Gráfico das absorvâncias correspondentes aos primeiros 6 estímulos do ensaio.

Tabela 4.7 - Legenda da figura 4.10 que relaciona a amostra com o estímulo eléctrico correspondente..

Amostra	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9
Estímulo aplicado	5min, 1V	5min, -1V	5min, 0V	10min, 1V	10min, -1V	10min, 0V	10min, 1V	10min, -1V	10min, 0V

As análises dos gráficos apresentados na figura 4.10 revelam dados bastante interessantes no que diz respeito a aplicabilidade da membrana utilizada como sistema de libertação de fármaco quando sujeito a um estímulo eléctrico.

Com um primeiro estímulo de 1V, é observado um pico de absorvância similar ao obtido no espectro realizado com as diferentes concentrações de AAS em H₂O, comprovando que houve libertação deste fármaco da membrana para o meio envolvente. Ao fim do segundo estímulo de -1V durante 5 minutos (a2), este pico sobe ligeiramente em relação ao primeiro. Depois de aplicado o terceiro estímulo, não foram registadas grandes alterações nos valores de absorvância, donde provavelmente a polarização negativa não induziu acréscimo na libertação de fármaco.

Estes resultados demonstram que quando é aplicada uma tensão positiva à membrana, a libertação de ácido acetilsalicílico é muito superior do que para um potencial negativo, e que, na ausência de estímulo (a3), a quantidade de fármaco libertada por difusão foi bastante insignificante. Este facto foi comprovado com os dois estímulos seguintes (1V e -1V durante 10 minutos, a4 e a5), com uma subida do pico de absorvância muito superior quando a tensão aplicada é positiva.

Com o sexto estímulo de 0V durante 10 minutos, houve uma grande subida no pico de absorvância, facto que se repetiu também ao fim do estímulo seguinte (a7). Quando foram aplicados os restantes estímulos, não foram registadas mais alterações nos valores de absorvância (a8 e a9). Este fenómeno sugere que a partir do sexto estímulo pode ter ocorrido uma deterioração da membrana e que, como consequência, todo o fármaco presente no seu interior foi libertado.

Este ensaio permitiu comprovar a aplicabilidade da membrana produzida como um sistema de libertação de fármacos, sugerindo também a necessidade de realizar novos testes nestas fibras com estímulos mais curtos.

4.4.4 - Ensaio realizados em PBS

Uma vez comprovado nos testes anteriores o funcionamento do biodispositivo, foram realizados novos ensaios em solução PBS para avaliar a libertação de fármaco em meio fisiológico.

4.4.4.1 – Estudo da influência da duração do pulso eléctrico.

Neste ensaio pretendeu-se avaliar a influência da duração do estímulo aplicado na quantidade de fármaco libertado. Foram utilizadas duas amostras de uma membrana com 20% wt de AAS revestida com polipirrol, nas quais foram aplicados durante 10 minutos estímulos de 1V alternados com 0V. O período a que a tensão era ligada ou desligada (1V ou 0V) foi variado de 30s para 1 minuto entre as duas amostras. As absorvâncias foram registadas para os dois casos (figura 4.11)

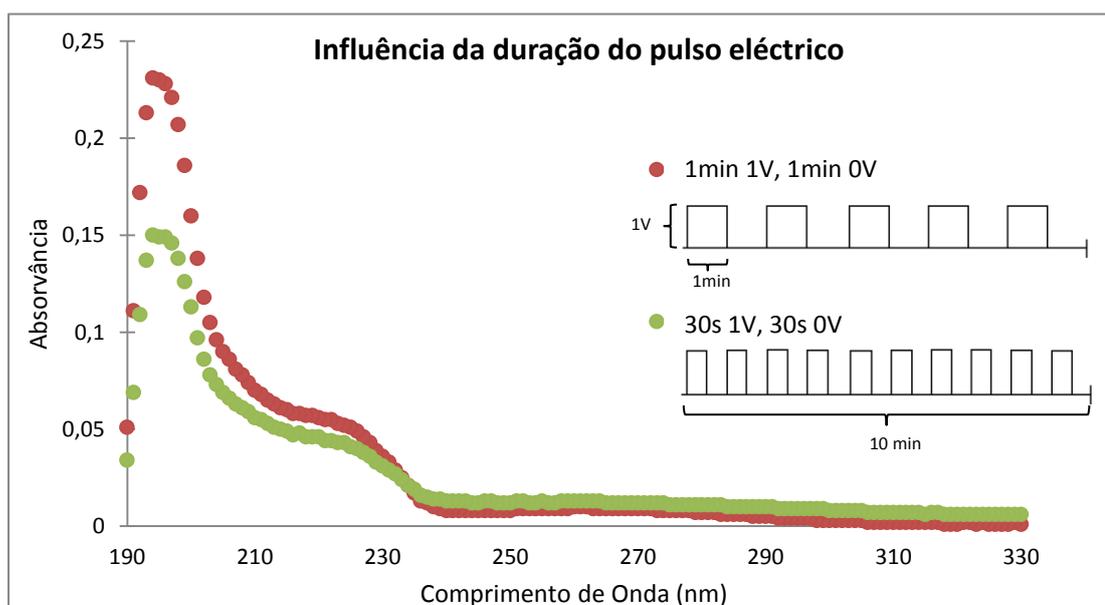


Figura 4.11- Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência da duração do pulso eléctrico aplicado.

É possível verificar que foi libertada uma maior quantidade de fármaco para o estímulo mais longo (1 minuto), pois os seus valores de absorvância foram muito superiores. Segundo a curva de referência construída, para os estímulos de 1 minuto é obtido um pico de absorvância correspondente a uma concentração de AAS de aproximadamente 0,141 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto que para 30 segundos foi de 0,108 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como tal, para todos os ensaio posteriormente realizados, foi utilizado um minuto como a duração do estímulo eléctrico aplicado.

4.4.4.2- Estudo da influência do sinal do pulso eléctrico aplicado numa membrana com 30%wt AAS

Neste ensaio foram utilizadas três amostras de uma membrana com 30%wt de AAS. Numa das amostras, foi aplicado durante 10 minutos, 1V seguido de 0V, alternando a cada minuto. Um mesmo procedimento foi aplicado noutra amostra mas com uma tensão negativa de -1V. A restante esteve em contacto com o meio 10 minutos sem que tenha sido aplicado qualquer estímulo eléctrico. Cada amostra tinha um volume aproximado de 0,0058 cm^3 . As absorvâncias obtidas podem ser observadas na figura 4.12.

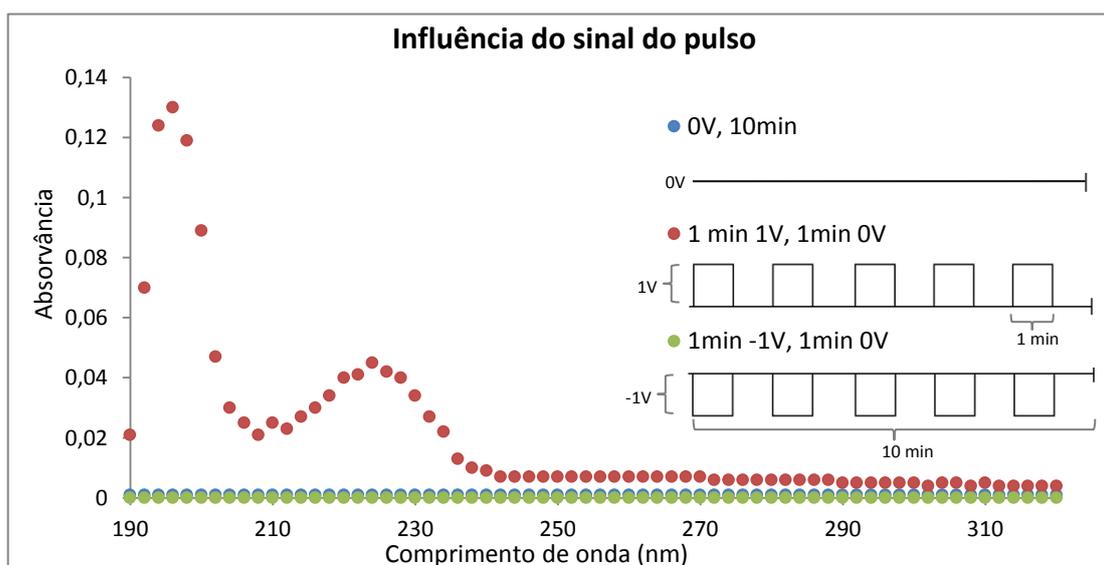


Figura 4.12- Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 30%wt AAS.

Neste ensaio, não foi observada libertação de fármaco nem por difusão nem quando foi aplicado um potencial negativo, ao contrário do que aconteceu nos restantes ensaios. No entanto, quando foi aplicada uma tensão positiva de 1V, foi verificada a libertação de AAS, cujo pico de absorvância corresponde a uma concentração deste fármaco no meio de 0,1 µg/mL.

4.4.4.3- Estudo da influência da amplitude do pulso eléctrico

Este ensaio foi realizado para analisar a influência da amplitude do potencial aplicado na quantidade de fármaco libertado da membrana.

Como tal foram utilizadas quatro amostras de uma mesma membrana com 20%wt de AAS, com um volume aproximado de 0,0042cm³ cada. Uma mesma metodologia foi adoptada, com a aplicação de tensão durante um minuto seguido de um mesmo período a 0V, num tempo total de 10 minutos. A cada amostra foi aplicada uma tensão diferente (1 - 4V) e as suas respectivas absorvâncias foram medidas (figura 4.13).

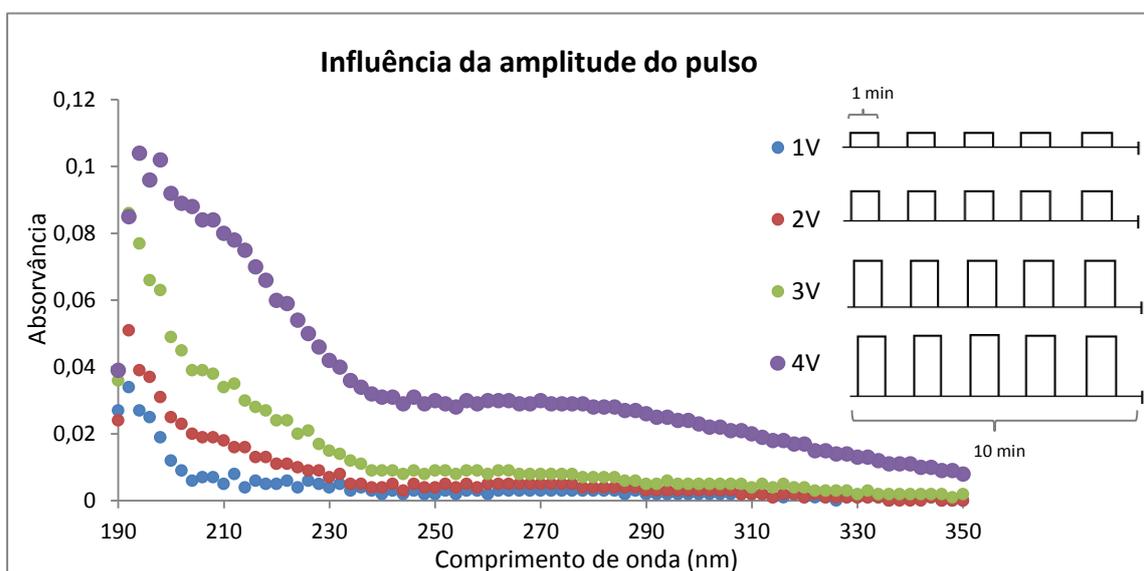


Figura 4.13- Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência da amplitude do pulso eléctrico aplicado na membrana.

Os dados registados no gráfico da figura 4.13 demonstram que para uma maior tensão são obtidos valores de absorvância superiores, ou seja, é libertada uma maior quantidade de fármaco para o meio. Assim, o menor pico observado ocorreu para 1V e

corresponde, pela absorção da solução de referência, a uma concentração de AAS de $0,061\mu\text{g/mL}$, enquanto que o maior ocorreu para 5V, correspondendo a $0,09\mu\text{g/mL}$.

Para além destes valores seria necessário experimentar tensões superiores e analisar as imagens SEM das membranas testados, pois a partir de certa amplitude a sua estrutura pode ser comprometida.

4.4.4.4- Estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 40%wt AAS

Um último ensaio foi realizado para uma membrana com 40%wt de AAS, da qual foram retiradas 3 amostras, cada uma com um volume de aproximadamente $0,0057\text{ cm}^3$. A cada amostra foram aplicados os mesmos estímulos utilizados no 3º ensaio. As absorvâncias obtidas podem ser observadas na figura 4.14.

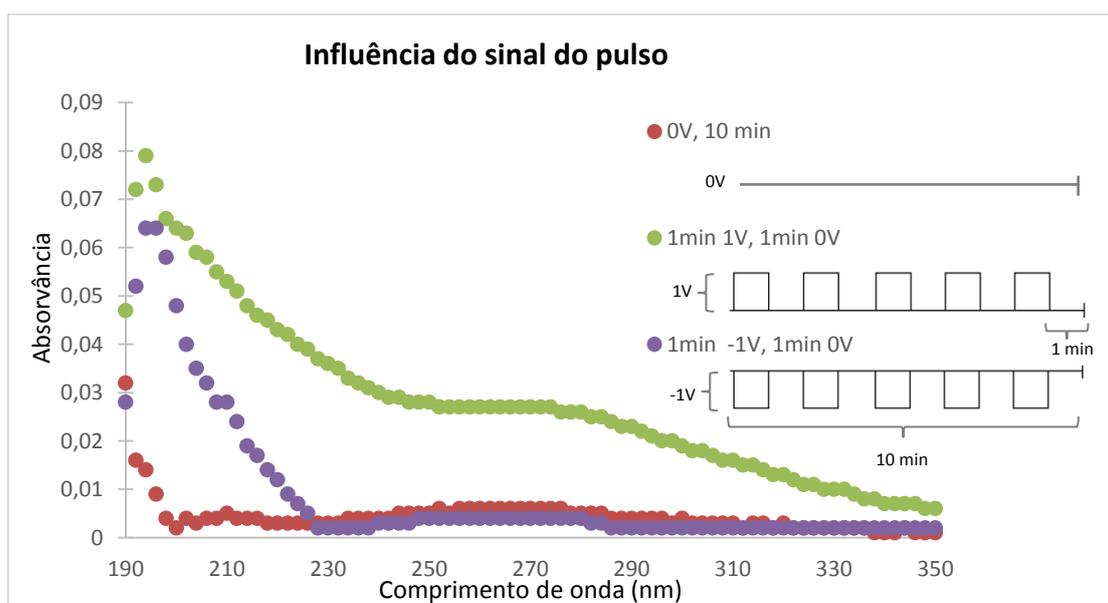


Figura 4.14- Gráfico das absorvâncias obtidas no estudo da influência do sinal do pulso aplicado numa membrana com 40%wt AAS.

Como é possível de verificar, os maiores valores de absorvância foram encontrados quando foram aplicados estímulos de 1V, enquanto que os menores foram observados quando não foi aplicada qualquer tensão.

Estes resultados encontram-se de acordo com os ensaios já efectuados, pois mais uma vez foram observados maiores picos de absorvância quando são utilizados potenciais positivos. Para uma tensão negativa, o pico registado é considerável e

bastante maior do que no caso da libertação por difusão (0V, a vermelho na figura 4.14).

4.4.5- Conclusões dos ensaios realizados

Os testes realizados comprovam o funcionamento do biodispositivo criado para libertação de fármaco, tendo sido verificado que a quantidade de fármaco libertado é dependente do estímulo eléctrico e também da quantidade de fármaco inicial na membrana. No geral, foi observado que quando a tensão aplicada é positiva, existe uma libertação maior de AAS e que este praticamente não se liberta por difusão.

No entanto, para que fosse possível uma melhor caracterização do processo de libertação, seriam necessários novos ensaios. Como o revestimento com PPy ocorre em meio aquoso, algum do fármaco é libertado da membrana durante o procedimento. Este facto dificulta a comparação entre quantidades libertadas em ensaios diferentes e entre membranas com diferentes concentrações de AAS, pois a percentagem de fármaco encapsulado pode não ser sempre igual.

Apesar da evidência do funcionamento das membranas condutoras nos testes de libertação de fármaco, a citotoxicidade destas é um factor importante que pode impedir a sua aplicação na epiderme. Assim foram realizados testes de citotoxicidade a fim de verificar a biocompatibilidade das mesmas.

4.5- Citotoxicidade

Após 24 horas nos meios que estiveram em contacto com as membranas e da adição de resazurina, as células foram observadas num microscópio óptico. A figura 4.15 corresponde a uma imagem obtida por microscópio óptico do poço referente à membrana revestida por polipirrol, onde é possível observar que apenas duas células se encontravam em morte celular (por possuírem forma redonda).

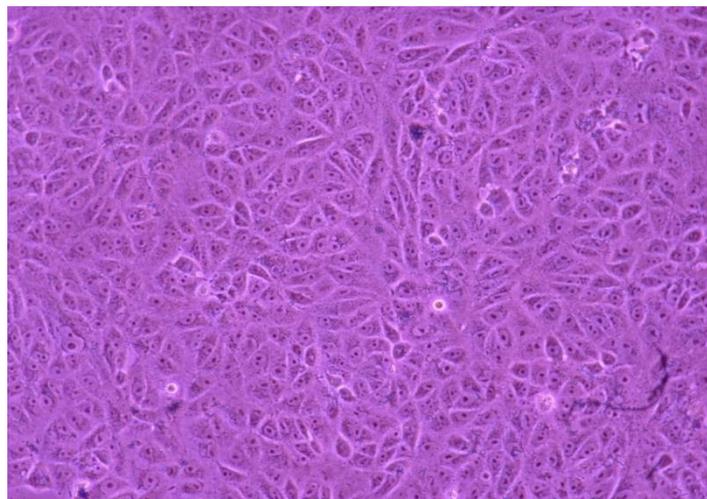


Figura 4.15- Imagem obtida por microscópio óptico do poço correspondente à membrana de AC revestida por polipirrol.

Os dados obtidos por espectrofotometria referentes à cultura celular produzida, foram analisados e normalizados com os referência ao controlo de células e de meio.

Estes valores variam entre 0 e 1 e encontram-se na tabela 4.8, em que a unidade corresponde às absorvâncias normalizadas obtidas nas células de controlo. Assim, valores próximos de 1 provém de culturas com meio pouco citotóxico.

Tabela 4.8- Valores normalizados obtidos do teste de citotoxicidade

	Controlo de Células	Acetato de Celulose	Acetato de Celulose revestida por Polipirrol
Valor de abosrvância normalizado	1	1,03	0,97
Desvio padrão	0,067		

É possível verificar que o valor referente às fibras revestidas é bastante próximo da unidade e a sua variação, sendo inferior ao desvio padrão calculado, é insignificante quando comparada com os valores obtidos no controlo de células, ou relativos à membrana de acetato de celulose, que não é citotóxica.

Este teste demonstra que as membranas de acetato produzidas e revestidas por oxidação in situ do pirrol não são tóxicas para as células, sendo biocompatíveis e possíveis de serem adaptadas para um sistema de libertação de fármaco de aplicação cutânea.

Capítulo 5 - Conclusões do estudo

Este estudo foi composto por duas fases, uma primeira para o desenvolvimento do biodispositivo e a segunda para estudar e avaliar o seu funcionamento e aplicabilidade como sistema de libertação controlada de fármaco.

Na primeira fase, membranas de acetato de celulose e PVP foram produzidas por electrofiação e revestidas com um polímero condutor biocompatível, o polipirrol. Para a produção da membrana de PVP, foi adicionado um agente oxidante, o cloreto de ferro (III). O revestimento foi possível através da exposição desta membrana a vapores de pirrol, pois a presença do agente oxidante permitiu a polimerização deste monómero na superfície das fibras. Foram experimentados vários períodos de exposição da membrana nos vapores de pirrol (tempo de polimerização). Neste caso, a maior condutividade conseguida foi de $1,37 \times 10^{-4}$ S/cm e foi obtida para um tempo de polimerização de 2 horas. No entanto, imagens obtidas por SEM revelaram que a deposição de polipirrol na membrana ocorria sob a forma de filme ficando as fibras unidas, provocando assim uma diminuição da área superficial e um aumento da fragilidade da estrutura, características que impediram a adaptação desta membrana para o biodispositivo pretendido. Como o PVP é solúvel na maioria dos solventes e degrada-se facilmente quando exposto ao ar atmosférico, não foram testados mais procedimentos para o revestimentos das membranas deste polímero.

Para as membranas de acetato de celulose, foram analisados dois processos de revestimento com polipirrol. No primeiro foi seguida a mesma metodologia utilizada no revestimento das membranas de PVP. A membrana com maior condutividade (5×10^{-3} S/cm) foi obtida para 30 minutos de polimerização. O estudo deste revestimento não foi aprofundado, pois tal como para a membrana de PVP, verificou-se a união de algumas fibras devido à deposição do polipirrol.

A última metodologia utilizada foi o revestimento por oxidação *in situ* do pirrol por acção do cloreto de ferro(III) numa solução aquosa com a membrana de AC. As imagens obtidas por SEM revelam fibras com a sua morfologia e flexibilidade intactas, revestidas por uma camada uniforme de polipirrol na superfície. Como tal, foi

elaborado um estudo mais aprofundado sobre este processo, no qual foram analisadas a influência de parâmetros como a concentração de pirrol, tempo de polimerização, proporção entre agente oxidante/monómero. A maior condutividade obtida foi de $8,19 \times 10^{-2}$ S/cm., para uma concentração de pirrol de 0,05mol/L e 30 minutos de polimerização. Testes de citotoxicidade comprovaram a biocompatibilidade destas membranas.

A segunda fase consistiu na adaptação das membranas produzidas para um sistema de libertação controlada de fármaco. Foram introduzidas diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico na solução polimérica para a produção de membranas de acetato de celulose por eletroforse e estas foram revestidas segundo o melhor procedimento encontrado na primeira fase. Foi verificado que para grandes quantidades de fármaco na membrana (> 40% relativamente ao peso usado de acetato de celulose), a sua condutividade é comprometida. Foram realizados vários ensaios para testar o biodispositivo concebido.

Em todos os ensaios foi observado a libertação de fármaco quando são aplicados estímulos eléctricos, sendo o processo de libertação por difusão quase inexistente (sem polarização da membrana). No geral, esta libertação foi superior para potenciais positivos. Estímulos mais longos e de maior amplitude permitem também uma maior libertação de ácido acetilsalicílico da membrana. No entanto, devido ao tempo disponível para a realização deste estudo, não foi possível a repetição dos ensaios realizados que permitiriam obter informações mais conclusivas no que diz às características do funcionamento do biodispositivo, à concentração de fármaco libertada e respectiva correlação com as quantidades introduzidas nas membranas.

Em todos os ensaios realizados, a quantidade de AAS libertada para o meio foi muito pequena. Como o revestimento com polipirrol ocorre em solução aquosa, grande parte do fármaco é libertado da membrana (por difusão) neste processo. Para melhorar o rendimento do sistema criado, seriam necessários estudos futuros de forma a otimizar o encapsulamento do fármaco na membrana.

Bibliografia

- [1] - Liu, Y., Li, K., Liu, B., & Feng, S.-S. (2010). **A strategy for precision engineering of nanoparticles of biodegradable copolymers for quantitative control of targeted drug delivery.** *Biomaterials*, 31(35), 9145–55.
- [2] - Su, J., Chen, F., Cryns, V. L., & Messersmith, P. B. (2011). **Catechol polymers for pH-responsive, targeted drug delivery to cancer cells.** *Journal of the American Chemical Society*, 133(31), 11850–3.
- [3] - Tungprapa, S., Jangchud, I., & Supaphol, P. (2007). **Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats.** *Polymer*, 48(17), 5030–5041.
- [4] - Suwanton, O., Opanasopit, P., Ruktanonchai, U., & Supaphol, P. (2007). **Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance.** *Polymer*, 48(26), 7546–7557.
- [5] - Müller, D., Rambo, C. R., Porto, L. M., & Barra, G. M. O. (2011). **Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers.** *Synthetic Metals*, 161(1-2), 106–111.
- [6] - Badgujar, A. G., Bambole, V. a., & Mahanwar, P. a. (2011). **Preparation and Characterization of Polypyrrole-Modified Henequen Fiber-Reinforced Polymethylmethacrylate Composites.** *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50(12), 1281–1287.
- [7] - Müller, D., Mandelli, J. S., Marins, J. a., Soares, B. G., Porto, L. M., Rambo, C. R., & Barra, G. M. O. (2012). **Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PAni)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC).** *Cellulose*, 19(5), 1645–1654.
- [8] - Wadhwa, R., Lagenaur, C. F., & Cui, X. T. (2006). **Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 110(3), 531–41.
- [9] - Luo, X., Matranga, C., Tan, S., Alba, N., & Cui, X. T. (2011). **Carbon nanotube nanoreservoir for controlled release of anti-inflammatory dexamethasone.** *Biomaterials*, 32(26), 6316–23.
- [10] - Esrafilzadeh, D., Razal, J. M., Moulton, S. E., Stewart, E. M., & Wallace, G. G. (2013). **Multifunctional conducting fibres with electrically controlled release of ciprofloxacin.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 169(3), 313–20.
- [11] - Sass, J. (1995). **Ultrastructural aspects of the acetylation of cellulose,** *CELLULOSE* (1995) 2,111-127 .
- [12] - Zhou, W., He, J., Cui, S., & Gao, W. (2011). **Studies of Electrospun Cellulose Acetate Nanofibrous Membranes,** *The Open Materials Science Journal*, 2011, 5, 51-55
- [13] – Bühler, V. ,(2008). **Kollidon. Polyvinylpyrrolidone for the pharmaceutical industry,** BASF The Chemical Company.

- [14] - Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). **Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.** *Tissue engineering*, 12(5), 1197–211.
- [15] - Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). **A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites.** *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253.
- [16] - Li, Z., & Wang, C. (2013). **One-Dimensional nanostructures**, SpringerBriefs in Materials, DOI: 10.1007/978-3-642-36427-3_2,
- [17] - Ateh, D. D., Navsaria, H. a, & Vadgama, P. (2006). **Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues.** *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 3(11), 741–52.
- [18] - Ramanaviciene, A., Kausaite, A., Tautkus, S., & Ramanavicius, A. (2007). **Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice.** *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(2), 311–5.
- [19] - Search, H., Journals, C., Contact, A., Iopscience, M., & Address, I. P. (1997). **Polypyrrole : a conducting polymer ; its synthesis , properties and applications**, *Russian Chemical Reviews* 66 (5) 443 ± 457 (1997)
- [20] - Eisazadeh, H., Engineering, C., & Box, P. O. (2007). **Studying the Characteristics of Polypyrrole and its Composites**, 2(2), 67–74.
- [21] - Wang, L.-X., Li, X.-G., & Yang, Y.-L. (2001). **Preparation, properties and applications of polypyrroles.** *Reactive and Functional Polymers*, 47(2), 125–139.
- [22] - Memorandum, T. (2005). *Formation and Use Defence R & D Canada – Atlantic*, (January).
- [23] - Ansari, R. (2006). **Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies.** *E-Journal of Chemistry*, 3(4), 186–201.
- [24]- Celebioglu, A., & Uyar, T. (2011). **Electrospun porous cellulose acetate fibers from volatile solvent mixture.** *Materials Letters*, 65(14), 2291–2294.
- [25] - Ghorani, B., Russell, S. J., & Goswami, P. (2013). **Controlled Morphology and Mechanical Characterisation of Electrospun Cellulose Acetate Fibre Webs**, *International Journal of Polymer Science*, Volume 2013, Article ID 256161, 12 pages
- [26] - Zhu, N., & Chen, X. (2013). *Biofabrication of Tissue Scaffolds. Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, Capítulo 12.
- [27] - Luo, X., & Cui, X. T. (2009). **Sponge-like nanostructured conducting polymers for electrically controlled drug release.** *Electrochemistry communications*, 2009 October 1;
- [28] - Chen, C., Jiang, X., Kaneti, Y. V., & Yu, A. (2013). **Design and construction of polymerized-glucose coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for delivery of aspirin.** *Powder Technology*, 236, 157–163.

[29] - Ju, Y.-W., Park, J.-H., Jung, H.-R., & Lee, W.-J. (2007). **Electrochemical properties of polypyrrole/sulfonated SEBS composite nanofibers prepared by electrospinning.** *Electrochimica Acta*, 52(14), 4841–4847.

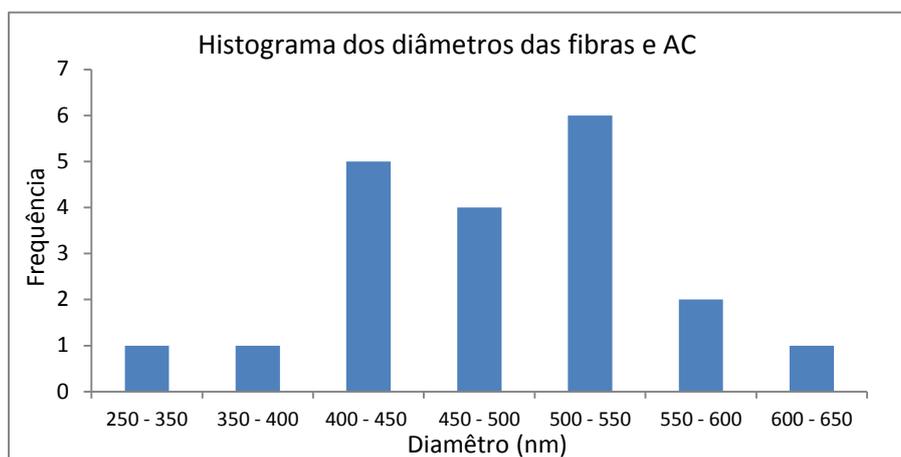
[30] - <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/beers1.htm> (acedido a 4 de Outubro de 2013).

Capítulo 6 - Anexos

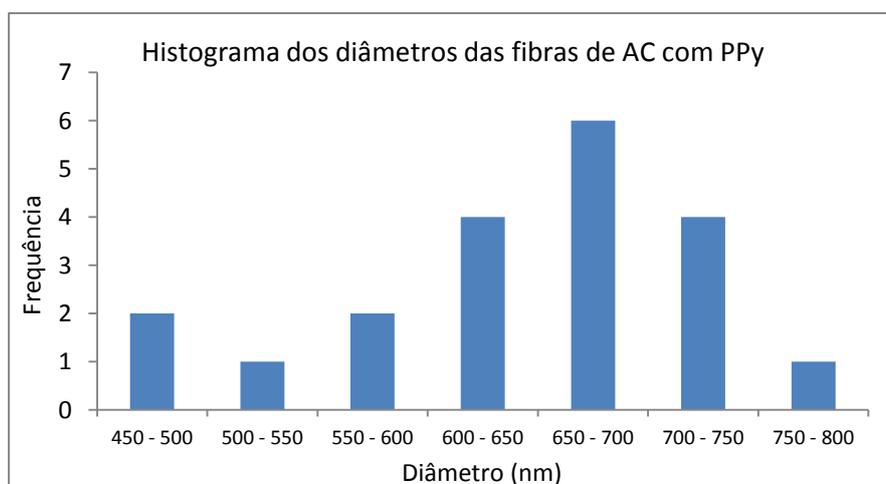
Anexo 1- Histogramas e valores medidos para estimar o diâmetro médio das fibras

Tabela 6.1 – Diâmetros medidos para várias fibras das membranas de AC e AC revestido com PPy

	Diâmetros medidos (nm)																			
AC	442	488	442	419	410	542	270	355	445	589	588	540	507	521	488	640	451	501	459	512
AC + PPy	690	725	700	690	615	647	694	718	463	723	732	660	641	462	765	604	677	561	574	520



a)



b)

Figura 6.1- a) Histograma dos diâmetros para a membrana de acetato de celulose. b) Histograma dos diâmetros da membrana de acetato de celulose revestida com polipirrol

Tabela 6.2 - Desvio padrão e média dos diâmetros obtidos.

	Desvio Padrão (nm)	Média (nm)
AC	81	480
AC + PPy	85	643