



BEATRIZ ALMEIDA LAGO

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

# DESENVOLVIMENTO DE UM PENSO DÉRMICO DE CONTROLO ELETRÓNICO PARA A LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa  
Outubro, 2022





# DESENVOLVIMENTO DE UM PENSO DÉRMICO DE CONTROLO ELETRÓNICO PARA A LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO

**BEATRIZ ALMEIDA LAGO**

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

**Orientadora:** Doutora Ana Catarina Bernardino Baptista,  
Investigadora Doutorada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

**Coorientadora:** Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira,  
Professora Associada com Agregação,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

## **Júri:**

**Presidente:** Doutora Célia Maria Reis Henriques,  
Professora Associada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

**Arguentes:** Doutora Joana Sofia Pereira Neto,  
Investigadora Doutorada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

**Orientador:** Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira,  
Professora Associada com Agregação,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa



## **DESENVOLVIMENTO DE UM PENSO DÉRMICO DE CONTROLO ELETRÓNICO PARA A LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO**

Copyright © Beatriz Almeida Lago, 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Aos meus pais e mana.*



## AGRADECIMENTOS

Com o culminar desta etapa importante, chega o momento de agradecer a todos os que, de forma direta ou indireta me acompanharam, ouviram e incentivaram a fazer sempre mais e melhor.

Um agradecimento muito especial às minhas orientadoras, Professora Doutora Ana Baptista e Professora Doutora Isabel Ferreira, pelo apoio científico, o qual se manifestou na transmissão de conhecimentos, sugestões e críticas construtivas, bem como ao estímulo e dedicação manifestados.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Baptista, um enorme obrigada por todos os sorrisos e confiança, pela enorme acessibilidade e paciência durante o longo processo inerente à escrita da tese. Desde o primeiro dia no laboratório do Departamento de Materiais, onde me apresentou a todos os colegas e me deixou imediatamente à vontade, até ao momento em que termino esta tese, foram várias os dias de trabalho em conjunto. Não podia deixar também de agradecer os *emojis* nos emails enviados, os quais alegravam o meu dia, principalmente na reta final da escrita da dissertação.

À minha coorientadora, Professora Isabel Ferreira, agradeço todas as horas de disponibilidade e afincos demonstrados ao longo deste longo período de trabalho, assim como a tolerância, flexibilidade e coordenação que sempre adotou para garantir o acompanhamento do trabalho. Obrigada pela infinita dedicação e apoio, por me motivar sempre a ir mais além, pela paz de espírito permanente, mesmo nos dias mais conturbados e pela forma única de transformar uma dificuldade num desafio.

À Professora Doutora Cristina Almeida da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa quero agradecer a quantificação do ibuprofeno nos meios de libertação dos sistemas de membranas, por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem.

À Professora Ana Marques quero agradecer por toda a disponibilidade e atenção dedicada à análise das amostras por espectroscopia *Raman*.

Ao Miguel, um grande obrigada, pela forma como me recebeu e acompanhou, desde o primeiro até ao último dia no laboratório. Devido à proximidade na idade e como colega mais experiente, ajudou-me bastante, particularmente nas primeiras semanas, onde foi o meu grande pilar em laboratório. Sem o seu apoio e inesgotável gentileza, com certeza que tudo teria sido muito diferente e mais complicado. Agradeço também pelo convívio que sempre promoveu entre os colegas de laboratório, de modo a fomentar um excelente ambiente de trabalho e cooperação entre todos.

Ao David, Mariana, Eduardo e Inês um muito obrigada pelo bom ambiente de trabalho e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Um agradecimento especial aos meus amigos de laboratório que me acompanharam neste percurso e que foram essenciais.

À Carol, minha colega de mestrado, agradeço-lhe principalmente o seu afeto e sorrisos e por ter sido a minha grande companheira de horas tardias no laboratório. Obrigada por esperares sempre por mim para sairmos juntas, num horário em que todos já tinham regressado a casa, e obrigada por me lebares ao comboio.

À Catarina, amiga com quem desenvolvi uma ligação de cumplicidade, particularmente nas alturas de maior *stress*, agradeço não só a companhia e os momentos de desconpressão e apoio no laboratório, mas também por toda a ajuda e solidariedade demonstradas através de mensagens à distância.

Ao Barragan, obrigada por todos os discursos motivacionais e palavras sentidas, por estar sempre presente e por ser tão atencioso com a nossa amizade.

À minha segunda família, a família FCT agradeço por terem tornado estes 5 anos inesquecíveis. Às Chanelitas e Sereias, obrigada por estarem ao meu lado desde o primeiro dia, pelas memórias que criámos dentro e fora da faculdade e pela incrível viagem que esta amizade tem sido. Aos Infocromos, obrigada por terem alegrado este último ano, pelos churrascos e festas, mas também pela paciência e a ajuda nos momentos mais difíceis. Também gostaria de agradecer aos meus padrinhos, Sara, Tavares e Raquel que considero autênticas referências a seguir. E à Chica que confiou em mim para ser sua madrinha. Obrigada por toda a força e alegria que me deram.

Aos Charolas, obrigada por esta amizade já de 8 anos, mas principalmente obrigada por me motivarem a chegar mais longe e nunca me deixarem desistir sempre que eu me sentia em baixo. Espero um dia poder retribuir todo o carinho que recebo de vocês.

Estou incrivelmente grata à minha família, aqueles quem mais quero orgulhar. Quero agradecer aos meus pais por todos os vossos esforços que me permitiram chegar aqui e pelo exemplo que são de trabalho e determinação. Não consigo imaginar esta viagem sem o vosso apoio, nem sem o chocolate que comíamos à noite em momentos de tese stressantes. À minha irmã pelo seu sentido de humor e também por treinar a minha paciência como ninguém mais o fará! Ao meu Vô, por todos os domingos a brincar comigo e dizer que eu ia para a dificuldade e não para a faculdade.

Acima de tudo, obrigado por estarem sempre presentes a travar comigo as minhas batalhas. Aprendi muito com todos vós.



“My powers are ordinary. Only my application brings me success.” (Isaac Newton).



## RESUMO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos são uma alternativa terapêutica a considerar, principalmente quando se pretende minimizar os efeitos secundários inerentes a terapêuticas prolongadas ou com concentrações elevadas de fármacos via oral ou injetável. Estes sistemas têm a capacidade de libertar uma quantidade específica de fármaco num determinado local. Até à data têm sido investigadas várias formas alternativas de administração controlada de fármacos, nomeadamente, hidrogéis, nanopartículas e dispositivos baseados na impregnação de membranas.

A liberação controlada de fármacos via estimulação elétrica a partir de fibras impregnadas com fármaco foi estudada, usando membranas de acetato de celulose eletrofiadas e o ibuprofeno encapsulado, um dos anti-inflamatórios não esteroides mais consumidos.

Desenvolveram-se cinco sistemas de membranas biocompatíveis que, para possibilitar a aplicação de um estímulo elétrico, foram funcionalizados com dois polímeros condutores, polipirrol e poli(3,4-etilenodioxitiofeno). A cinética de liberação do fármaco foi analisada e os métodos de liberação passiva (difusão) e ativa (estímulo elétrico) foram realizados e comparados.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a liberação de fármaco é sensível a dois potenciais elétricos para cada sistema. Quando aplicado o potencial de  $-0,3$  V os sistemas tendem a reter a liberação de fármaco e quando aplicado o potencial de  $+0,3$  V,  $+0,5$  V ou  $+0,8$  V consoante o sistema, é libertado mais fármaco no meio, face aos resultados obtidos por liberação passiva. Por fim, um pequeno penso adesivo para aplicação cutânea foi construído com estes sistemas de membranas para liberação controlada por estímulos elétricos do ibuprofeno incorporado, o qual verificou um padrão de liberação "ON/OFF".

**Palavras-chave:** sistemas de liberação controlada de fármaco, ibuprofeno, acetato de celulose, eletrofição, polímeros condutores, polipirrol, PEDOT, estímulos elétricos, voltametria cíclica, LC-MS/MS

## ABSTRACT

Controlled drug delivery systems are a therapeutic alternative to be considered, mainly when the intention is to minimize the side effects inherent to prolonged therapies or with high concentrations of drugs via oral or injectable routes. These systems have the capacity to release a specific quantity of drug at a specific location. To date, several alternative forms of controlled drug delivery have been investigated, including hydrogels, nanoparticles, and membrane-impregnated devices.

Controlled drug release via electrical stimulation from drug impregnated fibers has been studied using electrophilic cellulose acetate membranes and encapsulated ibuprofen, one of the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Five biocompatible membrane systems were developed, which to enable the application of an electrical stimulus were functionalized with two conducting polymers, polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). The kinetics of drug release was analyzed, and the methods of passive (diffusion) and active (electrical stimulation) release were performed and compared.

The results obtained led to the conclusion that the drug release is sensitive to two electrical potentials for each system. When a potential of  $-0.3$  V is applied, the systems tend to retain the release of the drug and when a potential of  $+0.3$  V,  $+0.5$  V or  $+0.8$  V is applied depending on the system, more drug is released into the medium, compared with the results obtained by passive release. Finally, a small adhesive patch for cutaneous application was constructed with these membrane systems for controlled release by electrical stimulation of the incorporated ibuprofen, which verified an "ON/OFF" release pattern.

**Keywords:** controlled drug release systems, ibuprofen, cellulose acetate, electrospinning, conducting polymers, polypyrrole, PEDOT, electrical stimuli, cyclic voltammetry, LC-MS/MS



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Contexto e Motivação .....	1
1.2	Objetivos .....	2
1.3	Estrutura.....	3
<b>2</b>	<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>5</b>
2.1	Produção das Membranas.....	5
2.2	Funcionalização das Membranas.....	8
2.3	Libertação do Fármaco.....	9
<b>3</b>	<b>CONSTITUINTES DO BIODISPOSITIVO</b> .....	<b>13</b>
3.1	Matrizes Poliméricas .....	13
3.1.1	Acetato de Celulose .....	13
3.2	Revestimentos Condutores .....	15
3.2.1	Polipirrol .....	16
3.2.2	Poli-(3,4-etilenodioxitiofeno).....	17
3.3	Fármaco Modelo: Ibuprofeno.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	Produção das Membranas.....	23
4.1.1	Solução Polimérica de Acetato de Celulose .....	23
4.1.2	Solução Polimérica de Acetato de Celulose com Ibuprofeno.....	24
4.1.3	Eletrofiação.....	24

4.2	Funcionalização das Membranas .....	29
4.2.1	Oxidação <i>In situ</i> do Pirrol em Solução Aquosa .....	29
4.2.2	Polimerização em Fase de Vapor do EDOT.....	30
4.3	Técnicas de Caracterização das Membranas .....	31
4.3.1	Microscopia Ótica .....	32
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	32
4.3.3	Espetroscopia <i>Raman</i> .....	33
4.3.4	Condutividade Elétrica .....	35
4.3.5	Voltametria Cíclica .....	37
4.4	Estudo da Liberação do Fármaco .....	39
4.4.1	<i>Simulated Body Fluids</i> .....	40
4.4.2	Espetroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	41
4.4.3	Curva de Calibração do Ibuprofeno.....	42
4.4.4	Testes de Liberação em SBF .....	43
4.4.5	Método de confirmação: LC-MS/MS.....	46
4.4.6	Protótipo de Liberação de Fármaco .....	49
<b>5</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1	Análise Química .....	53
5.2	Análise Morfológica .....	57
5.2.1	Microscopia Ótica .....	58
5.2.2	SEM.....	59
5.3	Análise da Condutividade Elétrica .....	65
5.3.1	Evolução da condutividade ao longo do tempo.....	66
5.3.2	Condutividade antes e após ensaio de liberação de fármaco .....	68
5.4	Análise Eletroquímica .....	70
5.5	Testes de Liberação de Fármaco.....	76
5.5.1	Curva de Calibração do Fármaco.....	77

5.5.2	Ensaio de Libertação.....	78
6	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	91



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Membranas funcionalizadas.....	9
Figura 2.2 - Sistemas de libertação controlada de fármacos para aplicações dérmicas.....	12
Figura 3.1 - A transformação da Celulose em Acetato de celulose e vice-versa. ....	14
Figura 3.2 - Fórmula molecular do polipirrol.....	16
Figura 3.3 - Fórmula molecular do poli(3,4-etilenodioxiotiofeno). ....	18
Figura 3.4 - Fórmula molecular do ibuprofeno.....	19
Figura 4.1 - Esquema de um sistema de eletrofição convencional.....	25
Figura 4.2 - Montagem experimental do processo de eletrofição.....	28
Figura 4.3 - Ilustração do processo de polimerização oxidativa <i>in situ</i> do pirrol em solução aquosa. ....	30
Figura 4.4 - Ilustração do processo de polimerização da polimerização em fase de vapor do EDOT.....	31
Figura 4.5 - Porta-amostras com as amostras preparadas e identificadas para o SEM. ....	33
Figura 4.6 - Representação da medição das condutividades, A: planar e B: transversal.....	36
Figura 4.7 - A: Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub> ; B: Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub> ; C: Sistema Rebordo Mix; D: Sistema Único PPI <sub>90</sub> ; E: Sistema Único PEDOT <sub>120</sub> .....	39
Figura 4.8 - Configurações de sistemas de membranas estudados.....	43
Figura 4.9 - Montagem experimental adotada nos testes de libertação. ....	44
Figura 4.10 - A: Montagem experimental do protótipo do Sistema Único PPI <sub>90</sub> . B: Divisor de tensão do circuito.....	50
Figura 4.11 - Simulação do protótipo a ser produzido.....	51
Figura 5.1 - A: Espectros Raman padrão de PEDOT, PPI, AC e IBU. B: Espectros Raman de PPI <sub>90</sub> /AC:IBU, PPI <sub>90</sub> /AC e AC:IBU. C: Espectros Raman de PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU, PEDOT <sub>120</sub> /AC e AC:IBU.....	54

Figura 5.2 - A: Espectros Raman de PPI <sub>90</sub> /AC:IBU e PPI <sub>90</sub> /AC. B: Espectros Raman de PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU e PEDOT <sub>120</sub> /AC.....	56
Figura 5.3 - A: Membrana de AC observada no microscópio ótico com ampliação de 200x; B: Membrana de PPI <sub>90</sub> /AC, observada no microscópio ótico com ampliação de 200x. ....	58
Figura 5.4 - Imagens de SEM das fibras da membrana de AC obtidas por eletrofiação. ....	59
Figura 5.5 - Imagens de SEM das fibras da membrana de AC:IBU obtidas por eletrofiação. ...	60
Figura 5.6 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI <sub>90</sub> /AC obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco.....	60
Figura 5.7 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI <sub>90</sub> /AC obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. ....	61
Figura 5.8 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI <sub>90</sub> /AC:IBU obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco.....	62
Figura 5.9 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI <sub>90</sub> /AC:IBU obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. ....	62
Figura 5.10 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT <sub>120</sub> /AC obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco.....	63
Figura 5.11 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT <sub>120</sub> /AC obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. ....	64
Figura 5.12 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco.....	64
Figura 5.13 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. ....	65
Figura 5.14 - Condutividade (S/cm) planar em função do tempo (meses) de exposição das membranas.....	66
Figura 5.15 - Condutividade (S/cm) transversal em função do tempo (meses) de exposição das membranas.....	67
Figura 5.16 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub> . ....	72
Figura 5.17 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Único PPI <sub>90</sub> .....	73
Figura 5.18 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub> . ....	74
Figura 5.19 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Único PEDOT <sub>120</sub> .....	74

Figura 5.20 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo Mix.....	75
Figura 5.21 - Espectro de absorção para várias concentrações de IBU em SBF. ....	77
Figura 5.22 - Gráfico da curva de calibração, estimada para as absorções registadas. ....	78
Figura 5.23 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Único PPI <sub>90</sub> .....	80
Figura 5.24 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub> .....	81
Figura 5.25 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub> .....	82
Figura 5.26 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Único PEDOT <sub>120</sub> . ....	83
Figura 5.27 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo Mix.....	83
Figura 5.28 - Espectros de absorção da membrana de PPI <sub>90</sub> /AC e PEDOT <sub>120</sub> /AC em SBF.....	86
Figura 5.29 - Gama de trabalho da quantificação do ibuprofeno por UPLC-MS/MS. ....	87
Figura 5.30 - Perfis de libertação dos cinco sistemas de membranas.....	89
Figura 5.31 - Perfis de libertação dos protótipos do Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub> e Sistema Único PPI <sub>90</sub> .....	90



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas do ibuprofeno.....	20
Tabela 4.1 - Parâmetros para a produção das membranas por eletrofiação de AC:IBU e AC. .	29
Tabela 4.2 - Condições de ensaio do varrimento adotados para a caracterização eletroquímica. .....	39
Tabela 4.3 - Reagentes utilizados para a preparação da solução de SBF.....	40
Tabela 4.4 - Concentrações das soluções para a curva de calibração do ibuprofeno em SBF.	42
Tabela 4.5 - Parâmetros dos testes de libertação do fármaco aplicados às membranas produzidas.....	45
Tabela 4.6 - Condições do espectrómetro de massa.....	48
Tabela 4.7 - Gradiente do método cromatográfico em meio básico na análise por LC-MS/MS. .....	48
Tabela 4.8 - Condições ótimas de análise do ibuprofeno por UPLC-MS/MS.....	49
Tabela 5.1 - Condutividade planar e transversal média e desvio-padrão para as membranas de PPI <sub>90</sub> /AC e PEDOT <sub>120</sub> /AC.....	69
Tabela 5.2 - Condutividade planar e transversal média e desvio-padrão para as membranas de PPI <sub>90</sub> /AC:IBU e PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU.....	70
Tabela 5.3 - Tensões dos picos catódicos e anódicos de cada sistema. ....	76
Tabela 5.4 - Tensões a intercalar em cada sistema para ser possível obter um padrão "ON/OFF". .....	84
Tabela 5.5 - Percentagem de ibuprofeno libertado para o meio consoante as respetivas tensões aplicadas ao fim de 11 minutos.....	85
Tabela 5.6 - Avaliação da linearidade e gama de trabalho do método de UPLC-MS/MS para a análise do IBU. ....	87

Tabela 5.7 - Concentração e percentagem de ibuprofeno nas amostras analisadas por UPLC-MS/MS.....	88
---	----

## SIGLAS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

AC	Acetato de Celulose
AC:IBU	Acetato de celulose com ibuprofeno
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
COX	Ciclogenases
DMAc	Dimetilacetamida
EDOT	3,4-etilenodioxítiofeno
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto de ferro (III)
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
GC	<i>Gas chromatography</i> , cromatografia gasosa
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
IBU	Ibuprofeno
LC	<i>Liquid chromatography</i> , cromatografia líquida
LOD	<i>Limit of detection</i> , limite de deteção
log Dow	Coefficiente de distribuição n-octanol-água
log Kow	Coefficiente de partição n-octanol-água
LOQ	<i>Limit of quantification</i> , limite de quantificação
mAC	Membrana de acetato de celulose
mAC:IBU	Membrana de acetato de celulose com ibuprofeno

MI	Modo de ionização
MRM	Multiple Reaction Monitoring, operação em modo SIM no primeiro quadrupolo e modo SIM no terceiro quadrupolo
MS	<i>Mass spectrometry</i> , espectrometria de massa
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> , espectrometria de massa em tandem
PANI	Polianilina
PCL	Policaprolactona
PEDOT	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
PEDOT <sub>120</sub> /AC	Acetato de celulose funcionalizado com poli(3,4-etilenodioxitiofeno) por 120 minutos
PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU	Acetato de celulose com ibuprofeno funcionalizado com poli(3,4-etilenodioxitiofeno) por 120 minutos
pKa	Constante de dissociação ácida
PLGA	Poli (lático-co-ácido glicólico)
PLLA	Ácido poli-L-lático
pMWNT	<i>Pristine multi-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de paredes múltiplas
PPi	Polipirrol
PP <sub>145</sub> /AC	Acetato de celulose funcionalizado com polipirrol por 45 minutos
PP <sub>190</sub> /AC	Acetato de celulose funcionalizado com polipirrol por 90 minutos
PP <sub>190</sub> /AC:IBU	Acetato de celulose com ibuprofeno funcionalizado com polipirrol por 90 minutos
RP	<i>Reverse phase</i> , fase reversa
SBF	<i>Simulated Body Fluids</i> , fluido corporal simulado
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , microscopia de varrimento eletrônico
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> , monitorização seletiva de iões
TUDCA	<i>Tauroursodeoxycholic acid</i> , ácido tauroursodeoxicólico

<b>UHPLC</b>	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
<b>UPLC</b>	<i>Ultra performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de ultra eficiência



# INTRODUÇÃO

## 1.1 Contexto e Motivação

Os sistemas de libertação controlada de fármacos têm um papel importante na saúde humana, não só devido à simplicidade de administração de fármacos, mas também na melhoria da eficácia terapêutica em diversas patologias. A via tradicional de administração de fármacos, oral (comprimidos, cápsulas, xaropes) ou parentérica (injeções) apresenta várias limitações, nomeadamente, no que se refere à relação entre a dose administrada de fármaco e a concentração que atinge o tecido-alvo. A dose de fármaco que alcança o tecido-alvo é sempre muito inferior à administrada, devido não só à metabolização do próprio fármaco, mas também à sua ampla distribuição pelo organismo e sua utilização noutros tecidos [1]. Consequentemente, há um atraso ou retardamento no efeito terapêutico, sendo necessário administrar doses superiores ou prolongadas para atingir determinado efeito [2].

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos sistemas de libertação controlada de fármaco com o objetivo de evitar sobredosagens e os consequentes efeitos secundários nos doentes [3]. Atualmente, a maioria dos sistemas de libertação controlada de fármacos assentam na aplicação transdérmica por difusão. No entanto, a tecnologia transdérmica de libertação de fármacos baseada em mecanismos de libertação passiva avançou para métodos de libertação sofisticados que respondem a estímulos externos, nomeadamente, mecânicos, fotónicos, eletroquímicos e eletrónicos [4]–[6], já que oferecem uma nova forma eficiente de controlar a libertação de fármacos à velocidade desejada.

O uso de um estímulo elétrico para a libertação de fármacos possui várias vantagens quando comparado a outros estímulos externos: proporciona um mecanismo de libertação simples sem a necessidade de instrumentação complexa e tem um controlo de dose adequado,

uma vez que pode ser ajustado através da amplitude de tensão ou de corrente e da duração do pulso [5], [7].

Algumas plataformas à base de polímeros condutores como o polipirrol (PPi), a polianilina (PANI) e o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) têm vindo a ser estudadas para a libertação ativa de fármacos demonstrando um padrão de libertação "ON/OFF" em resposta a um estímulo elétrico específico [7]–[9]. Em comparação com os outros tipos de perfis de libertação de fármacos, ativo e passivo, estes sistemas não só evitam a libertação de uma quantidade excessiva de fármaco após a imersão da membrana na solução, a qual está associada a uma elevada toxicidade, mas também permitem uma ação sobre a área lesionada em tempos pré-definidos, melhorando a eficácia do tratamento [9].

Devido à limitada capacidade regenerativa característica da maioria dos tecidos humanos e com o objetivo de evitar uma lesão e subsequente degeneração derivada desta limitação, emergiram novos conceitos, como os da engenharia regenerativa. Nesta área, a utilização de substratos capazes de controlar a taxa de libertação de fármacos e a regeneração dos tecidos afetados têm sido um tópico principal na investigação e desenvolvimento tecnológico. Entre estes, as fibras eletrofiadas oferecem características únicas em comparação com outros tipos de substratos, nomeadamente uma grande relação área de superfície/volume, elevada porosidade, uniformidade no tamanho das fibras, flexibilidade e facilidade de funcionalização com vários polímeros condutores [10]. Além disso, estes dispositivos são capazes de encapsular e libertar inúmeros fármacos de modo sustentável e controlado [11]. No entanto, poucos estudos relatam o desenvolvimento de um dispositivo totalmente baseado em fibras capazes de respirar livremente e acomodar diferentes deformações mecânicas.

Neste trabalho desenvolveu-se um têxtil eletrónico para aplicação dérmica, capaz de fornecer a dose exata de fármaco em função da necessidade, o qual é de enorme relevância em doenças dermatológicas de longa duração, como por exemplo, as infeções de pele causadas por diabetes.

## 1.2 Objetivos

A principal motivação deste trabalho reside na possibilidade de desenvolver um penso dérmico que possa libertar fármaco periodicamente e localmente de forma controlada. O controlo deste sistema efetua-se através da aplicação de estímulos elétricos que levam à libertação da substância ativa presente no seu interior. No futuro, prevê-se que este seja realizado

remotamente através de uma aplicação de telemóvel, o que seria extremamente útil para cuidados paliativos e/ou de longa duração.

Um sistema com estas características deve contemplar: o encapsulamento do fármaco, a libertação eletronicamente controlada, flexibilidade e biocompatibilidade. O controlo eletrónico pressupõe que exista no penso uma componente com material condutor elétrico e que este seja capaz de libertar o fármaco em resposta a um potencial elétrico baixo. A sua aplicação biomédica requer que este seja biocompatível, ou seja, não provoque uma reação por parte do sistema imunitário, quando em contacto com a pele ou fluidos das feridas. Deve ainda ser flexível e possuir elevada área superficial e porosidade para que permita alojar o fármaco no seu interior.

Para atingir esta meta, as principais tarefas desenvolvidas ao longo deste trabalho foram:

1. Reprodução dos resultados obtidos na dissertação "Desenvolvimento de membranas funcionalizadas para libertação controlada de fármaco em aplicações tópicas", da autoria de Miguel Brito, sob a orientação da Prof. Doutora Ana Baptista, e coorientação da Prof. Doutora Isabel Ferreira.
2. Encapsulamento de um fármaco modelo, ibuprofeno, no interior de fibras de acetato de celulose recorrendo à técnica de eletrofiação.
3. Funcionalização de fibras previamente encapsuladas com fármaco com polímeros condutores como o PPI e o PEDOT.
4. Caracterização química, morfológica, elétrica e eletroquímica das membranas produzidas.
5. Validação da plataforma de libertação de fármaco através de estímulos elétricos.

## 1.3 Estrutura

A presente dissertação foi organizada em seis capítulos. No Capítulo 1 apresentam-se as razões que motivaram este trabalho e os objetivos do trabalho desenvolvido.

O Capítulo 2 é dedicado ao estado da arte, apresentando os principais estudos realizados até à data nesta área temática, nomeadamente, produção de membranas, funcionalização de membranas e libertação controlada do fármaco.

O Capítulo 3 apresenta os materiais que compõem o dispositivo proposto: as matrizes poliméricas de acetato de celulose, os polímeros condutores utilizados para revestir as fibras eletrofiadas, bem como o fármaco usado como modelo nestes estudos.

No Capítulo 4, de carácter experimental, são apresentados os materiais utilizados na produção e funcionalização das membranas, bem como as respetivas técnicas de preparação destas membranas. Este capítulo compreende ainda a descrição das técnicas utilizadas para a caracterização das membranas produzidas.

O Capítulo 5 é dedicado à apresentação e discussão dos resultados obtidos.

No Capítulo 6 apresentam-se as principais conclusões do trabalho experimental realizado, algumas recomendações do trabalho a desenvolver e quais as linhas/estratégias de investigação para os próximos trabalhos.

## ESTADO DA ARTE

A tecnologia de libertação controlada de fármacos progrediu nas últimas seis décadas. A primeira formulação de libertação controlada data de 1952. Esta 1ª geração (1950-1980) de libertação de fármacos focou-se no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada oral e transdérmica e no estabelecimento de mecanismos de libertação controlada de fármacos. Uma 2ª geração (1980-2010) foi dedicada ao desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos que se regulam automaticamente, formulações de depósito de longo prazo e sistemas de libertação baseados na nanotecnologia [12]. Atualmente, encontramos-nos numa 3ª geração, a qual procura ultrapassar as limitações encontradas na geração anterior nomeadamente o estudo da aplicação clínica dos polímeros inteligentes e hidrogéis e o aumento da utilização de polímeros biodegradáveis mais estáveis em formulações de libertação controlada de longa duração [13].

O estudo desenvolvido neste trabalho tem três componentes principais: produção de membranas, funcionalização de membranas e libertação controlada do fármaco. Por conseguinte, a revisão de literatura focou-se nestes tópicos.

### 2.1 Produção das Membranas

Nos últimos anos, o recurso a fibras poliméricas produzidas por eletrofiação revelaram ser um método eficaz de produção de fibras e versáteis em termo de aplicação, onde se inclui o encapsulamento de fármaco [11]. A grande vantagem desta técnica é possibilitar a encapsulação e libertação controlada de uma grande variedade de fármacos de baixa solubilidade, aumentando a biodisponibilidade destes fármacos [14], [15]. Seguidamente, apresentam-se alguns exemplos de trabalhos publicados nesta área.

Apesar de ter sido introduzida alguns anos antes, a eletrofiação só foi aceite como técnica de produção de nanofibras em 1934, com o trabalho desenvolvido e patenteado por Formhals [16], [17]. Desde então, têm sido publicados vários trabalhos dedicados à aplicação desta técnica sob várias condições, com o objetivo de estudar os parâmetros e respetivos valores, de forma a produzir uma membrana contínua e livre de defeitos.

Em 1969, Taylor *et al.* [18] estudaram o efeito da tensão aplicada na qualidade das membranas. Zong *et al.* em 2002 [19], descobriram que é necessário um fluxo mínimo do polímero durante o processo para substituir a solução que se perde quando é ejetada a solução. Em 1971, Baumgarten *et al.* [20] estabeleceram a relação entre a distância ao coletor e o tamanho e morfologia das fibras.

Em 2003, Zeng *et al.* [21] estudaram a influência de surfactantes e fármacos no diâmetro e uniformidade de fibras eletrofiadas de ácido poli-L-lático (PLLA). Relativo aos surfactantes, observou-se uma redução significativa do diâmetro e uma melhor distribuição das fibras. Por outro lado, devido às diferentes solubilidades e compatibilidade existentes entre o sistema fármaco-polímero-solvente foram encapsuladas 15% (m/m) e 25% (m/m) de rifampicina nas fibras bem como uma enzima, proteinase K. A taxa de libertação do fármaco para o meio ocorreu a uma taxa constante e ao fim de 5 horas, detetou-se cerca de 45% e 35% de fármaco no meio aquando do encapsulamento de 25% (m/m) e 15%(m/m) de rifampicina encapsulada inicialmente, respetivamente. Concluiu-se que quando esta enzima não era adicionada à solução não era libertado fármaco para o meio.

Em 2007, Bölgen *et al.* [22] analisaram a adsorção de antibiótico em matrizes de polilactona (PCL) eletrofiada testando-as *in vivo* com o objetivo de estudar as respetivas características de libertação, de modo a prevenir aderências abdominais pós-cirurgia em ratos. Observou-se que 80% do fármaco previamente adsorvido na matriz, foi libertado em apenas três horas, indicando a falta de eficiência do método de adsorção para altas concentrações do fármaco. Neste caso, uma elevada quantidade de fármaco foi agregada à superfície do polímero aquando da execução da técnica de eletrofiação, justificando a rápida e abrupta libertação observada. Em conclusão, o perfil de libertação é altamente dependente do grau de encapsulamento do fármaco na matriz original.

Ainda no mesmo ano, Tunprapa *et al.* [23] estudaram a libertação de quatro fármacos modelo no interior de fibras de acetato de celulose (AC) eletrofiadas (20% do peso de AC utilizado). Para fins comparativos foram produzidos filmes de AC na mesma proporção dos respetivos fármacos. Os resultados demonstraram que as fibras apresentaram maior teor de fármaco no seu interior (84% a 93%) do que os filmes (81% a 90%), que se deve ao facto de as

fibras possuem uma maior área de superfície. Além disso, verificaram que o sistema de solventes mais adequado para preparar as soluções de AC por eletrofiação era acetona/dimetilacetamida (DMAc), numa proporção de 2:1 (v/v), uma vez que esta mistura permitiu que as soluções de AC resultantes fossem eletrofiadas em fibras com diâmetros médios compreendidos entre 100 nm e 1 mm.

As nanofibras de AC eletrofiadas têm suscitado um enorme interesse como matriz polimérica para imobilização não só de fármacos, mas também de outras substâncias bioativas, como as vitaminas. Algumas vitaminas, utilizadas na pele por via tópica, são potentes agentes terapêuticos para o tratamento de patologias cutâneas. Neste grupo, a vitamina A e a vitamina E exibem uma ação biológica multifacetada. Desta forma, Taepaiboon *et al.* em 2007 imobilizou estas duas vitaminas em nanofibras de AC eletrofiadas, com diâmetro médio entre 247 e 265 nm e com morfologia de secção transversal lisa e redonda. Os autores destacaram o aumento gradual da libertação cumulativa das vitaminas durante o período de libertação a partir das fibras eletrofiadas de AC, em contraste com a sua libertação imediata a partir das correspondentes películas fundidas de AC [24].

A resistência antimicrobiana tem-se tornado num problema de saúde pública, o qual exige a utilização de novos antibióticos e a utilização de substâncias com propriedades antimicrobianas que limitem a sua utilização massiva. Os óleos essenciais obtidos das plantas apresentaram propriedades antimicrobianas, podendo modular a resistência antimicrobiana dos microrganismos [25]. Para tal, Liakos *et al.* [26], produziram fibras eletrofiadas de AC encapsuladas individualmente com três tipos diferentes de óleos essenciais (canela, erva-limão e hortelã-pimenta) para aplicação como pensos transdérmicos de tratamento de feridas. As matrizes poliméricas produzidas e encapsuladas com os óleos essenciais não só demonstraram uma elevada compatibilidade celular e nenhuma citotoxicidade, provado por ensaios de biocompatibilidade em modelos de células cutâneas, mas também a capacidade de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, mesmo quando foram utilizadas pequenas quantidades de óleos essenciais. Os pensos produzidos são promissores como dispositivos biomédicos para acelerar a cicatrização de feridas cutâneas.

Em 2009, Kenawy *et al.* [27] desenvolveram tanto fibras de PCL como polímero biodegradável, de poliuretano como polímero não biodegradável, como também fibras a partir da mistura dos dois polímeros, todas elas incorporadas com fármacos. Os resultados demonstraram que apesar das taxas de libertação de fármaco dos três tipos de fibras serem idênticos, as fibras de mistura dos dois polímeros apresentavam melhores propriedades mecânicas.

## 2.2 Funcionalização das Membranas com PPI e PEDOT

A funcionalização das membranas/fibras é realizada de modo a permitir que estas possam apresentar funcionalidades acrescidas, por exemplo, maior resistência, maior flexibilidade, mais estável em meios ácidos ou básicos, melhores propriedades óticas, elétricas, ou magnéticas, entre outras. No caso concreto da aplicação deste trabalho, para que seja possível a elaboração de um sistema que responda a estímulos elétricos, é necessário que a membrana seja condutora elétrica. Tal é possível, funcionalizando a membrana com um polímero condutor como o PPI e o PEDOT [9], [28]. Os trabalhos seguintes são alguns exemplos de fibras funcionalizadas com estes polímeros.

Em 2010, Laforgue *et al.* [29] estudaram a polimerização do PEDOT em fase de vapor para obter fibras eletrofiadas de polivinilpirrolidona. Neste estudo, obtiveram fibras com diâmetros médios de cerca de 350 nm, com elevada organização molecular, obtendo por isso membranas com uma condutividade muito elevada (~60 S/cm). Nesta altura, este valor de condutividade era o mais elevado dos valores reportados para as nanofibras produzidas por esta técnica de polimerização. No entanto, em 2014 foram produzidos nanofios monocristalinos de PEDOT através desta técnica de polimerização, os quais alcançaram condutividades de 8797 S/cm [30].

Em 2011, Müller *et al.* [31] conseguiram revestir membranas de celulose bacteriana com PPI, através da polimerização *in situ* do pirrol. Neste caso, a membrana é colocada numa solução aquosa de pirrol, dando-se a polimerização do monómero pela adição de cloreto de ferro (III),  $\text{FeCl}_3$ , como catalisador. Dos testes realizados, observou-se que a espessura e resistência elétrica da membrana compósita (celulose · PPI) é dependente da concentração de PPI no meio onde se dá a reação e do seu tempo de polimerização. A resistência elétrica da membrana alterou-se de  $9,1 \times 10^{-12} \Omega\text{cm}$  para  $0,33 \Omega\text{cm}$  dada a formação de uma camada contínua de PPI. Para o valor de menor resistividade, foi necessária uma concentração de 0,03 mol/L de pirrol, e um tempo de 90 minutos para a reação de polimerização.

Em 2015, Tang *et al.* [32] produziram membranas compósitas flexíveis e condutoras, uma vez mais através da síntese química *in situ* do pirrol na presença de celulose bacteriana, tendo posteriormente tratado a membrana com uma solução de polisiloxano. Os resultados obtidos evidenciaram uma estrutura contínua constituída pelas partículas de PPI depositadas à superfície da celulose. Com o tratamento de polisiloxano, as fibras passaram de altamente hidrofílicas a hidrofóbicas. Estes resultados demonstram que é possível alterar a molhabilidade das

membranas, sem comprometer a condutividade do PPI, alargando o espectro de possíveis fármacos que se podem incorporar nas fibras.

Em 2018, Baptista *et al.* [33] desenvolveram bio-baterias à base de fibras eletrofiadas flexíveis, leves, biocompatíveis e condutoras à base de acetato de celulose e funcionaram-nas com PPI, através de polimerização *in situ*. As concentrações de monómero, os tempos de polimerização e a concentração do agente oxidante foram alguns dos parâmetros estudados. Os valores de condutividade aumentaram notavelmente até  $10^{-2}$  S/cm. Este trabalho foi utilizado como referência para o desenvolvimento experimental do trabalho desta tese.

Em 2019, Carli *et al.* [34] estudaram pela primeira vez, as propriedades neuroprotectoras e anti-inflamatórias do tauroursodesoxicólico (TUDCA). Este ácido biliar natural foi incorporado em PEDOT e o novo material, PEDOT-TUDCA, promoveu eficientemente uma libertação do fármaco controlada electroquimicamente, preservando ao mesmo tempo as propriedades electroquímicas. Além disso, a baixa citotoxicidade observada com ensaios de viabilidade, torna o PEDOT-TUDCA um bom candidato para prolongar o período dos implantes cerebrais crónicos de registo neuronal.

A Figura 2.1 apresenta alguns exemplos de fibras funcionalizadas com os polímeros condutores PPI e PEDOT.

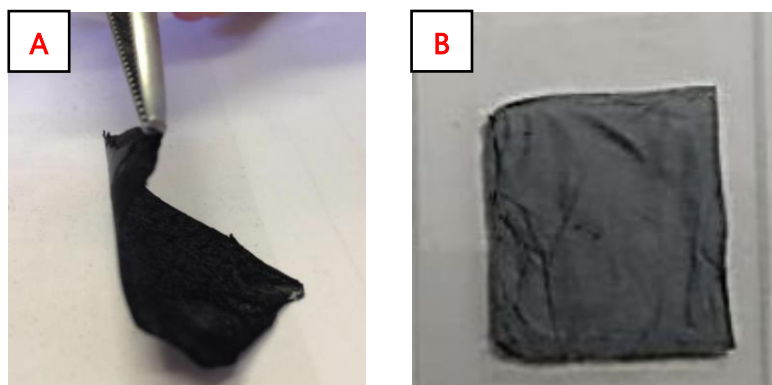


Figura 2.1 - Membranas funcionalizadas. A - Membrana de AC funcionalizada com PPI [35]. B - Membrana de clorofórmio e N,N - dimetilformamida funcionalizada com PEDOT [36].

## 2.3 Libertação do Fármaco

No que diz respeito à libertação controlada de fármacos a partir de estímulos elétricos, embora ainda não sejam aplicados ao ser humano, têm sido desenvolvidos nos últimos anos alguns sistemas funcionais. Hidrogéis eletro-responsivos, polímeros condutores e filmes eletro-responsivos camada por camada são as principais vias estudadas para a libertação

eletrônica controlada de fármacos [3]. De acordo com *Giuseppi-Elie* [37], os dispositivos de libertação eletronicamente controlada de fármaco são dispositivos que produzem um perfil de libertação programado influenciado pela aplicação de tensão ou mesmo de corrente. Para compreender se as membranas produzidas e funcionalizadas neste trabalho são realmente sensíveis ao estímulo elétrico, um dos objetivos propostos é averiguar se os sistemas de membranas estudados são capazes de mostrar uma capacidade de ligar/desligar o interruptor ("ON/OFF"). Isto significa que, ao aplicar determinados estímulos elétricos, a libertação do fármaco deve aumentar mais rapidamente, diminuindo a sua velocidade de libertação durante os períodos de não aplicação ou de aplicação de estímulos que retenham o fármaco no seu interior.

Em 2006, *Wadhwa et al.* [38] desenvolveram um dos primeiros sistemas de libertação de fármacos, cujo controlo é realizado eletronicamente. Este consiste em dois eléctrodos, sobre os quais é depositado um filme de PPI, por eletropolimerização do pirrol, contendo dexametasona (anti-inflamatório) que, devido à sua carga negativa, funciona como dopante do polímero condutor. Foi realizada a libertação do fármaco utilizando a técnica de voltametria cíclica e foi verificado que só a partir do 3º ciclo de varrimento apareciam os picos de redução e oxidação característicos do pirrol e que quanto maior era o número de ciclos, mais intensos eram os picos.

Ainda no mesmo ano, *Abidian et al.* [38] estudaram a libertação controlada de dexametasona através da aplicação de estímulos elétricos externos em nanotubos de PEDOT. Nanofibras de PLLA ou poli (lático-co-ácido glicólico) (PLGA) biodegradáveis foram eletrofiadas e polímeros condutores em torno das nanofibras eletrofiadas foram depositados por um processo eletroquímico. A aplicação de 1 V entre um eléctrodo de platina e os nanotubos carregados com 2 mg do fármaco permitiu obter um controlo linear da libertação do fármaco até 200 horas para uma libertação de 1,5 mg.

Em 2013, *Servant et al.* [8] testaram hidrogéis de PMAA-pMWNT (ácido polimetacrílico - nanotubos de carbono de paredes múltiplas) na libertação de sacarose marcada radioativamente, que por sua vez originavam um perfil de libertação pulsátil de <sup>14</sup>C-sacarose, encapsulada na matriz polimérica por inchamento, quando os pulsos "ON/OFF" de campo elétrico de corrente contínua (10 V durante 15 min) eram aplicados. Cerca de 70% foi libertado após 80 minutos de exposição ao campo elétrico.

Em 2014, *Krukiewicz et al.* [39] desenvolveram com sucesso um sistema à base de PEDOT de libertação eletronicamente controlada de ibuprofeno na forma iónica. A síntese eletroquímica foi otimizada para obter uma matriz condutora com o maior teor de fármaco possível. O

processo de liberação de fármaco através de estímulos elétricos foi estudado através de aplicação de estímulos entre os -0,8 V e os +0,8 V, com um contra-elétrodo de prata, que evidenciaram que a maior quantidade de fármaco libertada ocorreu aquando da aplicação do estímulo de -0,5 V. A concentração de ibuprofeno libertado mostrou-se ser dependente do estado redox da matriz polimérica, portanto, a aplicação de potencial negativo resultou na liberação do fármaco, enquanto os potenciais positivos resultaram na retenção do fármaco.

Em 2017 Samanta *et al.* [7] desenvolveram um sistema de liberação de fármaco reabsorvível e eletro-responsivo que inclui filmes de nanocompósitos de um polímero à base de metilmetacrilato-co-metacrílico, com o objetivo de controlar a dose de fármaco libertada. Concluíram que evolui linearmente consoante o potencial aplicado.

Em 2019, Feiner *et al.* [40] desenvolveram um dispositivo multifuncional capaz de efetuar a liberação controlada de diferentes fármacos e em simultâneo monitorizar a corrente aplicada entre um cátodo, coberto com PPI contendo o fármaco, e um ânodo de prata. Os autores demonstraram que a relação entre a corrente aplicada, o conteúdo encapsulado na camada fibrosa de PPI e a quantidade de fármaco libertada (dexametasona, indometacina e aspirina) é linear.

Em 2021, Baptista *et al.* [41] estudaram a liberação controlada eletronicamente de ibuprofeno impregnado previamente em membranas de gaze e de AC. Obtiveram uma condutividade na faixa de 1-10 mS/cm em gaze funcionalizada com PPI e fibras de AC, proporcionando uma liberação controlada de fármaco por estímulos elétricos num sistema composto por membranas PPI/Ibuprofeno/PPI e um eletrodo de prata. As imagens SEM (do inglês, scanning electron microscopy) evidenciaram a adesão de PPI às fibras e os espectros *Micro Raman* comprovaram a incorporação e liberação do fármaco. Um pequeno penso dérmico construído com essas membranas retém o ibuprofeno a 1,5 V e liberta-o rapidamente aquando da aplicação de -0,5 V.

Ao longo dos últimos anos, ocorreu uma grande evolução no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos para aplicações dérmicas [4], [5], [12], [42]. Atualmente já existem dispositivos que reagem a estímulos mecânicos (Figura 2.2-A) [43], eletricamente flexíveis [10], de iontoforese sob a pele (Figura 2.2-B) [44]; outros multifuncionais, controlados pela temperatura (Figura 2.2-C) [45], e por estímulos elétricos. Os nanocompósitos de hidrogel representam outra família de sistemas de liberação transdérmica de fármacos que têm vindo a ser controlados pela temperatura [46], pelo pH [47], por estímulos elétricos [48] ou autoalimentados [49], e utilizados para a cicatrização de feridas [50].

A Figura 2.2 apresenta várias aplicações de sistemas de libertação controlada de fármacos.

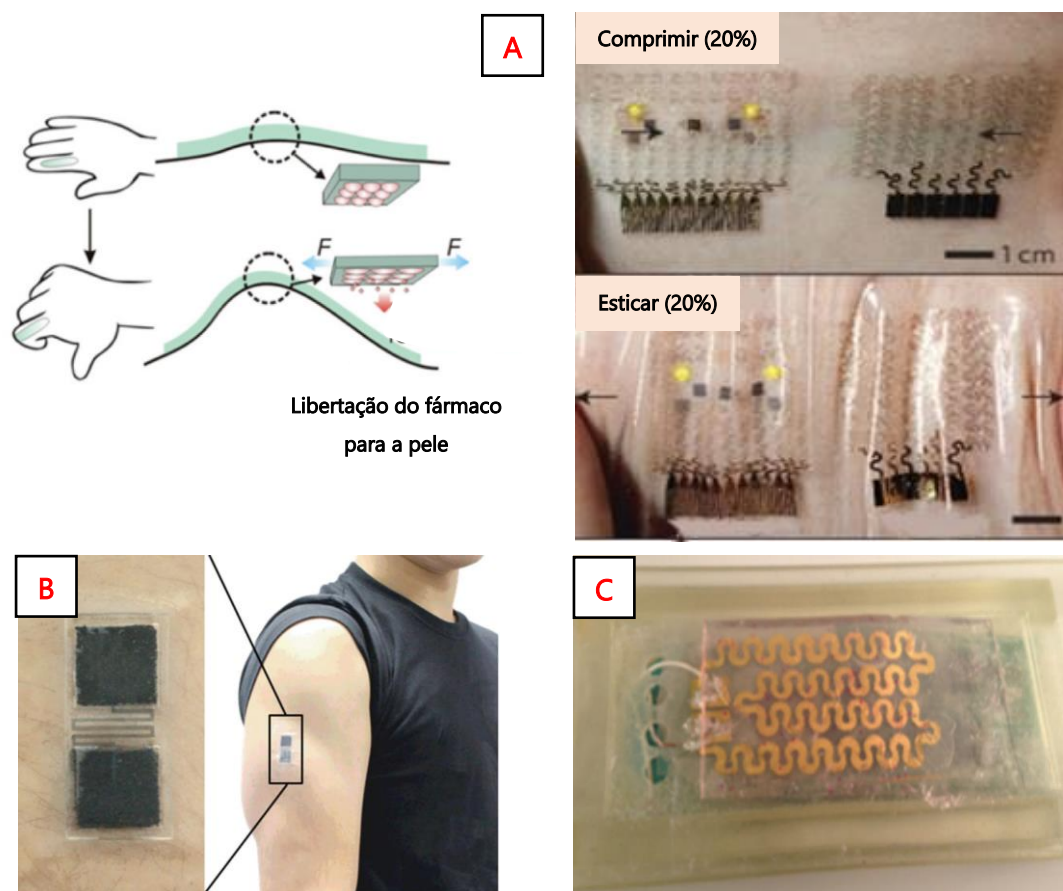


Figura 2.2 - Sistemas de libertação controlada de fármacos para aplicações dérmicas. A - Esquemático (à esquerda) e penso transdérmico de libertação controlada de fármaco através de estímulos mecânicos (à direita) [5], [43]; B - Penso transdérmico de libertação de fármaco através de iontoforese sob a pele [44]; C - Penso transdérmico de libertação controlada de fármaco através da temperatura [45].

*Microchips*, cápsulas, bombas, autoinjectáveis e pensos transdérmicos são exemplos de sistemas eletrónicos de libertação controlada de fármacos disponíveis comercialmente [51]. Embora existam grandes vantagens no uso destes sistemas, há muito trabalho a ser realizado para torná-los mais fáceis de utilizar e melhorar a adesão do doente. Neste campo, a administração tópica regular de medicamentos para doenças de pele talvez seja uma das principais necessidades [52].

Consequentemente, este trabalho abre portas para a produção de sistemas eletrónicos simples e de baixo custo para o controlo da libertação de fármacos no tratamento de doenças dermatológicas prolongadas.

## CONSTITUINTES DO BIODISPOSITIVO

Neste capítulo abordam-se os materiais que compõem o dispositivo proposto: as matrizes poliméricas de acetato de celulose, os polímeros condutores utilizados para revestir as fibras eletrofiadas, bem como o fármaco modelo contido nestas matrizes que sob a ação de um estímulo elétrico será libertado.

### 3.1 Matrizes Poliméricas

Os polímeros são moléculas em forma de uma cadeia composta pela repetição de elementos, designados monómeros, ligados entre si. Devido à sua elevada massa 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 constituem e o tipo de ligação química estabelecida entre estes, podendo existir polímeros elásticos, termoplásticos ou termorrígidos [53].

As matrizes poliméricas produzidas por eletrofição são utilizadas como suporte de fármacos e polímeros condutores, devido à sua alta resistência, estabilidade, área superficial e porosidade. Os materiais a utilizar no fabrico destas matrizes devem obedecer a três características importantes: a biocompatibilidade, a capacidade de não alterar as interações fármaco-tecido e a inocuidade [54].

#### 3.1.1 Acetato de Celulose

Atualmente, os biopolímeros têm ganho relevância como sistemas de libertação de fármacos quando comparados aos polímeros sintéticos devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e citotoxicidade. A versatilidade da síntese e

formulação de biopolímeros oferece vantagens em termos de encapsulamento de fármacos e liberação controlada dos mesmos. Polímeros biodegradáveis devem ser facilmente degradados a substâncias não tóxicas e excretados por vias fisiológicas, bem como devem ser livres de reações inflamatórias *in vivo* [55], [56].

A celulose, o biopolímero mais abundante na natureza, é composta por uma cadeia linear de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -D-1,4. Em geral, é utilizada na composição de biomateriais devido às propriedades mecânicas elevadas em comparação com outros polissacarídeos e a sua elevada estabilidade térmica. Na sua forma nativa apresenta alta cristalinidade e rigidez, sendo insolúvel em água e soluções aquosas, levando à necessidade de derivação da sua estrutura [57]. Para melhorar o valor ou expandir a versatilidade da celulose, através da sua funcionalidade química, vários derivados de celulose foram desenvolvidos e utilizados em indústrias biomédicas consoante a finalidade atribuída e, por isso, muitas novas áreas de aplicação também têm sido exploradas, como engenharia de tecidos [58], tratamento de feridas [59] e sistemas de liberação de fármacos [56], [60].

Dentro destes derivados, o acetato de celulose (AC) derivado da celulose natural pelo processo de acetilação, ou seja, pela substituição dos grupos hidroxilo de cada unidade de glicose por grupos acetil, tem sido amplamente usado para produção de fibras eletrofiadas e depois transformado em fibras de celulose por desacetilação ou hidrólise aquosa (Figura 3.1) [61].

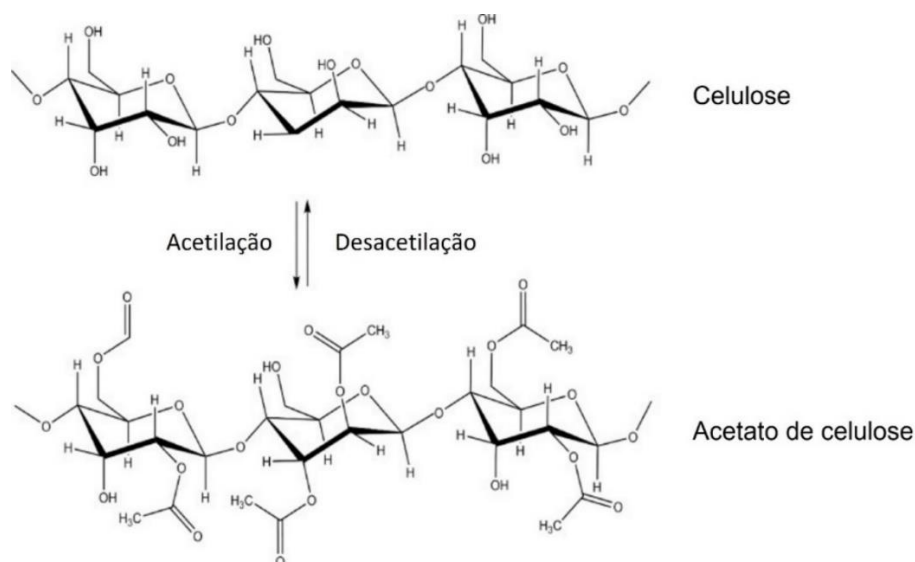


Figura 3.1 - A transformação da Celulose em Acetato de celulose e vice-versa. Adaptado de [61].

Como consequência podem-se obter polímeros com diferentes graus de substituição, sendo o grau de substituição o número médio de grupos acetil que substituem os grupos

hidroxilo por unidade glicosídica, o qual pode variar de zero a três. O grau de substituição é um parâmetro de extrema importância, pois afeta a cristalinidade do polímero, o potencial de biodegradabilidade e a solubilidade em diferentes solventes. Por exemplo, a celulose tem um grau de substituição igual a zero sendo por isso insolúvel na maioria dos solventes [62], enquanto que o AC com um grau de substituição de 2,5 tem sido amplamente utilizado em aplicações biomédicas e produção de nanofibras através de técnicas de eletrofiação por apresentar propriedades únicas para sistemas de liberação de fármacos [56]. Destas propriedades destacam-se a biodegradabilidade a longo-prazo, a biocompatibilidade, vantajosas propriedades mecânicas e térmicas, baixa densidade e custo de produção relativamente baixo, insolubilidade em água, não toxicidade, alta afinidade, boa estabilidade hidrolítica e excelente resistência química [56], [61], [63], [64]. Contudo, as propriedades dos derivados de celulose não são determinadas apenas pelo tipo e grau de substituição, mas também pelo padrão de funcionalização ao longo da cadeia polimérica [63].

Para além destas propriedades, a solução de AC apresenta uma elevada condutividade iónica o que permite que aquando do processo de eletrofiação a solução seja eficazmente ejetada da agulha da seringa quando sujeita a um campo eléctrico e depositada no alvo (ligado à terra) sob a forma de fibras. Por sua vez, estas fibras podem ser utilizadas com sucesso no desenvolvimento de sistemas de liberação de antioxidantes, vitaminas e anti-inflamatórios não esteroides como é o caso do ibuprofeno [61].

Escolhendo os parâmetros adequados ao processo de eletrofiação, as membranas fibrosas de AC produzidas podem ter diversas aplicações na área dos biomateriais tirando partido do elevado rácio área superficial/volume, leveza e flexibilidade. O AC para além mostrar estabilidade em meio fisiológico, é bastante utilizado em aplicações médicas devido à sua biocompatibilidade [65]. Por estes motivos o AC foi escolhido como matriz para o desenvolvimento do biodispositivo.

## 3.2 Revestimentos Condutores

Os polímeros condutores são polímeros orgânicos com elevada condutividade eléctrica intrínseca. Actualmente, os principais polímeros condutores são maioritariamente derivados de polipirrol (PPI) e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) [66].

Os polímeros condutores têm em comum uma estrutura conjugada de ligações duplas de carbono alternadas com ligações simples que lhes confere condutividade. Esta propriedade deve-se à existência de reacções de oxidação-redução nos locais das ligações duplas uma vez

que nesses locais a energia de ionização é relativamente baixa e ocorre consequente libertação de iões, que se podem mover para dentro ou para fora do polímero, dependendo da carga do mesmo [67].

Com a adição de dopantes a condutividade destes polímeros pode ser aproximada à dos metais condutores. Estes dopantes podem ser agentes oxidantes ou redutores e introduzem uma carga no polímero através da adição ou remoção de eletrões, provocando reorganizações nas ligações em certas zonas da estrutura [68]. Os compósitos poliméricos condutores apresentam boa flexibilidade, fácil processamento e excelentes propriedades mecânicas e elétricas. Por este motivo, são mais úteis do que os metais para o fabrico de têxteis eletrónicos [69].

Neste trabalho foram estudados processos distintos de polimerização, nomeadamente *in situ* em solução aquosa para o PPI e em câmara de vapores para o PEDOT.

### 3.2.1 Polipirrol

O polipirrol (Figura 3.2) é um polímero condutor promissor nas áreas eletrónica, ótica, biológica e médica devido à sua simples polimerização, biocompatibilidade, baixo custo, natureza não tóxica, estabilidade ambiental e condutividade elétrica relativamente alta que pode ser controlada consoante o dopante utilizado, tal como mencionado anteriormente. Para além disto apresenta amplas perspetivas em aplicações comerciais, tais como dispositivos biomédicos, biossensores, sistemas de libertação controlada de fármacos, regeneração de tecidos e dispositivos eletrónicos como substituto de condutores metálicos ou semicondutores [1], [70], [71].

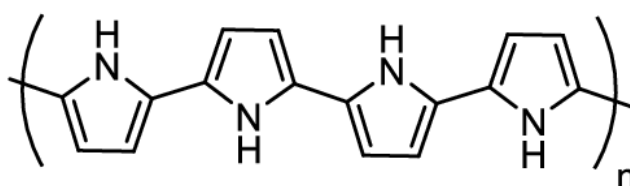


Figura 3.2 - Fórmula molecular do polipirrol. Adaptado de [72].

Este polímero pode ser sintetizado através de duas formas de polimerização do monómero pirrol, quer química quer eletroquímica. A polimerização química *in situ* divide-se em três tipos: polimerização em fase de solução, polimerização em fase de vapor, e deposição química oxidativa de vapor, sendo esta segunda técnica a que produziu a mais elevada condutividade até à data. A polimerização química tem a vantagem de combinar este polímero com vários substratos não condutores para formar compósitos com propriedades

interessantes e adaptadas, enquanto a polimerização eletroquímica só pode ser realizada em substratos condutores de corrente elétrica [71].

Na polimerização química ocorre a reação de monómeros de pirrol em solução aquosa com um agente oxidante tal como o cloreto de ferro III ( $\text{FeCl}_3$ ). Neste mecanismo, a etapa inicial passa pela produção de um radical livre de carga positiva, através da oxidação dos monómeros de pirrol. Esta carga torna-o instável e altamente reativo, o que pode levar à formação de um dímero neutro. Por sua vez, também este composto é altamente oxidativo, pelo que num mesmo processo forma ligações com outros monómeros, originando uma reação em 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. Nesta oxidação *in situ*, o polímero permanece no seu estado oxidado e é dopado com aniões de  $\text{Cl}^-$ , proporcionando características condutoras ao polímero [73]. Dependendo do solvente utilizado, da proporção monómero/agente oxidante, da duração da reação e da temperatura a que se dá, consegue-se controlar a condutividade elétrica [71].

A síntese eletroquímica é mais simples e semelhante ao caso anterior, contudo, é necessária a aplicação de uma tensão positiva que provocará a oxidação, com a extração de um eletrão da estrutura e a criação de radicais livres do pirrol. Estes radicais ligam-se covalentemente uns aos outros ou a outros radicais livres presentes na solução, levando à criação de filmes finos de polipirrol [74].

### 3.2.2 Poli-(3,4-etilenodioxitiofeno)

O poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (Figura 3.3) é um dos polímeros condutores mais bem-sucedidos devido à sua flexibilidade, elevada transparência e condutividade, biocompatibilidade, e grande estabilidade térmica e ambiental [75]. Estas propriedades intrínsecas tornaram o PEDOT de interesse fundamental, uma vez que permitem a utilização do polímero em diversas aplicações de conversão e armazenamento de energia tais como por exemplo, visores OLED, janelas electrocrómicas e fotovoltaicas, e na área da biomédica, como biossensores ou em sistemas de libertação controlada de fármacos [76], [77].

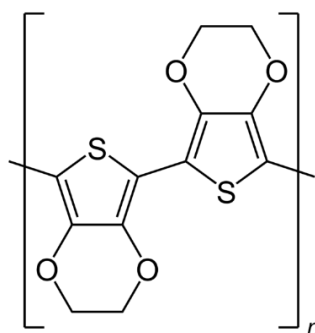


Figura 3.3 - Fórmula molecular do poli(3,4-etilenodioxiotiofeno). Adaptado de [78].

O método de síntese do PEDOT é muito importante, uma vez que origina diferentes propriedades que determinam as suas aplicações. Desde que foi desenvolvido pela primeira vez, a condutividade do PEDOT evoluiu de 2 S/cm para valores superiores a 1500 S/cm, apresentando condutividades superiores à do polipirrol. Esta gama de condutividade que abrange três ordens de grandeza deve-se, em parte, ao facto de o PEDOT poder ser produzido por métodos de polimerização diferentes e simples: polimerização eletroquímica e polimerização química oxidativa, que se divide em polimerização oxidativa de dispersão PEDOT e polimerização química *in situ* [75]–[77].

A síntese do PEDOT por polimerização química oxidativa ou por polimerização eletroquímica é semelhante às respetivas polimerizações do PPI. A polimerização química *in situ* em fase de vapor é o método de síntese comum para polimerizações *in situ*, no qual os reagentes participam na reação em estado gasoso e a polimerização tem lugar à superfície do substrato. Esta técnica envolve três etapas: 1) depositar um solvente contendo um agente oxidante tal como o  $\text{FeCl}_3$  sobre um substrato; 2) expor o substrato revestido e já seco ao vapor de monómero EDOT (3,4-etilenodioxiotiofeno) numa câmara fechada para polimerização; 3) lavar a película depositada para remover o oxidante residual e o monómero adsorvido. A reação de oxidação ocorre na interface entre oxidantes e monómeros em fase gasosa. Os parâmetros controlados durante esta polimerização são: concentração de monómero, temperatura do substrato e tempo de polimerização [76], [77].

Embora a polimerização em fase de vapor seja uma técnica que produz revestimentos menos defeituosos e mais condutores que outras técnicas de polimerização *in situ*, deve garantir-se a homogeneidade dos vapores para que a uniformidade do revestimento não seja comprometida [76].

### 3.3 Fármaco Modelo: Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU) ou ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico (Figura 3.4) é um fármaco que pertence à classe terapêutica dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE), sendo o primeiro AINE de venda livre no mercado [79].

Este fármaco foi desenvolvido em 1960 quando se pesquisava uma alternativa mais segura para a aspirina [80]. O ibuprofeno foi patenteado em 1961 e o seu primeiro medicamento, contra a artrite reumatoide, foi lançado em 1969 no Reino Unido e em 1974 nos EUA.

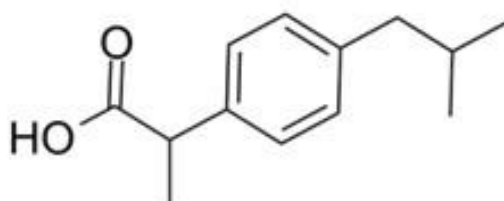


Figura 3.4 - Fórmula molecular do ibuprofeno. Adaptado de [81].

Os AINE são uma classe de fármacos extensamente reconhecida por diversas ações terapêuticas, nomeadamente, antipirética, analgésica e anti-inflamatória [82], [83]. Eles são eficazes no tratamento da dor, de pequena a moderada intensidade, sem apresentarem os efeitos indesejáveis dos opiáceos sob o sistema nervoso central, nomeadamente, a dependência física e a depressão respiratória [84].

A analgesia dos AINE é uma ação particularmente útil no estado febril, nas dores associadas a pós-operatórios ou nos processos inflamatórios [82], [85].

O ibuprofeno é o AINE mais utilizado em Portugal, administrado principalmente por via oral e tópica, tendo sido dispensadas 9 408 077 de embalagens nas farmácias comunitárias de Portugal Continental e utentes do Serviço Nacional de Saúde no período de 2016 a 2020 [86].

A classificação dos AINE varia conforme a seletividade de inibição das isoformas das ciclooxigenases (COX), uma família de isoenzimas que catalisam as reações de formação de marcadores inflamatórios. Dentro desta família de isoenzimas são conhecidas as ciclooxigenases 1 (COX-1), ciclooxigenases 2 (COX-2) e ciclooxigenases 3 (COX-3). Os AINE podem classificar-se como inibidores não seletivos das COX-1 e COX-2 ou inibidores seletivos da COX-2 [85]. O ibuprofeno é um inibidor não seletivo da COX-1 e da COX-2,

O IBU apresenta uma forte ligação às proteínas plasmáticas (> 98%) e é rapidamente metabolizado e eliminado na urina, cerca de 70% a 80% da dose terapêutica [83], [87].

As propriedades físico-químicas de um fármaco definem qual o seu comportamento, quer ao nível do organismo, nos processos de absorção, distribuição, metabolização e

excreção, quer fora dele, como no caso dos biodispositivos [88]. Nas propriedades dos fármacos destacam-se a sua massa molecular, densidade, solubilidade, ionização e hidrofobicidade. Estas propriedades são essenciais não só para avaliar a ação farmacológica e tóxica de um fármaco, mas também são importantes para avaliar o comportamento do composto nos biodispositivos [88], [89].

Para compreender e determinar o comportamento de uma molécula num determinado meio é necessário conhecer as propriedades intrínsecas do composto, tais como a constante de dissociação ácida ( $pK_a$ ), o coeficiente de partição em diferentes meios, nomeadamente n-octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) e o coeficiente de distribuição n-octanol-água ( $\log D_{ow}$ ) [90]. A Tabela 3.1 apresenta algumas das propriedades físico-químicas do IBU.

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas do ibuprofeno. Adaptado de [91].

Propriedades	Ibuprofeno
Fórmula molecular	$C_{13}H_{18}O_2$
Massa molecular, g/mol	206,28
Solubilidade em água, $mg\ L^{-1}$ (25 ° C)	21
$pK_a$	4,9
$\log K_{ow}$	3,97
$\log D_{ow}$ , pH 7,4	0,45 [90]

O IBU é um ácido orgânico fraco, com um valor de  $pK_a$  relativamente baixo [83].

O  $\log K_{ow}$  descreve a lipofilicidade intrínseca dos grupos funcionais e do esqueleto do carbono de uma molécula, na ausência de ionização. Este coeficiente representa a solubilidade de uma molécula em solventes orgânicos e determina a afinidade por compostos de natureza apolar. Esta propriedade permite aferir o destino de moléculas orgânicas num determinado meio. Se  $\log K_{ow}$  for superior a 3,0 temos compostos de natureza lipofílica com tendência a ligarem-se a compostos apolares. Já os compostos com  $\log K_{ow}$  inferior a 3,0 são considerados hidrofílicos e consequentemente têm maior afinidade para se ligarem a meios polares [92], [93].

O ibuprofeno é um composto apolar uma vez que tem um grupo de função carboxilo polar (COOH), mas os grupos alquilo não polar e o anel aromático reduzem significativamente a sua polaridade [94].

Já o coeficiente de distribuição (*log D*) corresponde ao coeficiente de partição de uma molécula ionizada ou que é influenciada por um determinado pH, tendo em conta a distribuição da carga de uma molécula. Este índice constitui um parâmetro importante nos estudos de mobilidade de compostos em meios de diferentes polaridades para prever qual a partição em meios de diferentes polaridades [92].

O ibuprofeno é um fármaco com elevada solubilidade em água, o que possibilita que se atinjam concentrações superiores em meios aquosos, no entanto, de forma geral este fármaco é pouco solúvel em meios aquosos, pelo que a taxa de dissolução a partir das formas de dosagem sólida atualmente disponíveis é limitada. Isto leva a uma fraca biodisponibilidade em doses elevadas após administração oral, aumentando assim o risco de efeitos adversos indesejados. A fraca solubilidade é um problema para o desenvolvimento de formas de dosagem de soluções injetáveis. Devido à sua fraca permeabilidade da pele, é difícil obter uma concentração terapêutica eficaz a partir de preparações tópicas. Consequente, independentemente da larga utilização dos AINE e das vantagens da sua utilização, eles apresentam vários efeitos secundários ou indesejáveis [95].

Este fármaco é geralmente bem tolerado, mas poderá desencadear dor de cabeça, dor de estômago, vômitos, diarreia, úlceras no estômago e duodeno [83]. Alguns destes efeitos são significativos em tratamentos de longa duração ou nos casos de necessidade de dosagens mais elevadas. Os dispositivos de libertação controlada têm por objetivo mitigar estes problemas, através da libertação de menores concentrações de fármaco por períodos mais longos, alcançando uma melhor ação terapêutica.

A eficácia terapêutica de qualquer fármaco administrado topicamente é função da sua penetração através da pele. Como o IBU é o AINE que apresenta o melhor fluxo cutâneo então é o fármaco escolhido e o mais adequado para a administração tópica, como acontece num penso transdérmico [94].



## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão presentes os métodos, os materiais e os respetivos procedimentos realizados para o desenvolvimento do biodispositivo proposto. Assim, são apresentadas as seguintes etapas: produção das membranas e respetiva funcionalização, a sua análise através de técnicas de caracterização morfológicas, estruturais, elétricas e eletroquímicas, e por fim, os testes de libertação do fármaco encapsulado.

### 4.1 Produção das Membranas

Neste estudo, foram produzidas tanto membranas poliméricas de acetato de celulose (mAC) como membranas poliméricas de acetato de celulose com incorporação do fármaco (mAC:IBU). Ambas as membranas foram produzidas com recurso à técnica de eletrofiação.

#### 4.1.1 Solução Polimérica de Acetato de Celulose

A solução polimérica preparada contém 12% (m/v) de acetato de celulose ( $M_n \sim 50000$  com 40% de grupos acetil, *Sigma Aldrich*), dissolvidos num sistema de solventes de acetona (*Honeywell Riedel-de Haën*, 99,5%) e dimetilacetamida (DMAc) (*Carlo Erba Reagents S.A.S.*), numa proporção de 2:1, respetivamente. Esta dissolução ocorreu sob constante agitação magnética a 100 rpm, à temperatura e humidade ambiente. A agitação magnética permaneceu constante até o AC estar completamente dissolvido, o que é visível por a solução tornar-se translúcida e a ausência de partículas sólidas em suspensão, obtendo-se uma solução homogénea.

O DMAc tem maior tensão superficial, viscosidade e ponto de ebulição em comparação com a acetona, misturando-as como um solvente binário, pelo que as propriedades da solução

polimérica podem ser melhoradas [56]. A tensão superficial dos solventes utilizados na solução polimérica tem um papel importante na qualidade das fibras obtidas por eletrofiação. É possível obter fibras uniformes e sem defeitos se a tensão superficial da solução polimérica for baixa. Assim, a proporção de solventes, neste caso acetona e DMAc (2:1), já tinha sido otimizada previamente [11].

## 4.1.2 Solução Polimérica de Acetato de Celulose com Ibuprofeno

Para a produção de fibras de AC com ibuprofeno (AC:IBU), preparou-se uma solução idêntica à solução polimérica de AC na qual foi adicionado 1mg de ibuprofeno à solução de 2g de AC (Farma-Quimica Sur S.L., 99,3%).

## 4.1.3 Eletrofiação

### 4.1.3.1 Processo

Desde o advento da nanotecnologia, várias metodologias têm vindo a ser desenvolvidas para a criação de nanoestruturas unidimensionais, tal como métodos que permitam a produção de um material em larga escala. Dentro desta área, destacam-se as várias tecnologias de fiação que resultam na preparação contínua e constante de fibras de diferentes materiais e consequentemente propriedades diversas, as quais dependem também da especificidade dos parâmetros e métodos adotados. Dentre as diferentes técnicas de fiação, a eletrofiação evidencia-se como uma técnica de síntese versátil capaz de produzir fibras com uma larga variedade de composições, morfologias e diâmetros que variam de micrómetros a nanómetros, podendo levar à produção de fibras com diâmetro inferior a 1 nanómetro. As nanofibras obtidas pela técnica de eletrofiação podem ser utilizadas num número elevado de aplicações biomédicas, tecnológicas e ambientais devido à combinação única de elevada razão área superficial/volume, porosidade, flexibilidade, desempenho mecânico, simplicidade de processamento e custo relativamente baixo [96], [97].

Nos últimos vinte anos, a eletrofiação é uma das técnicas mais utilizadas na produção de membranas fibrosas para aplicações biomédicas. Nomeadamente para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada, membranas para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos e no desenvolvimento de biossensores vestíveis. Vários estudos relatam o uso da técnica de eletrofiação para o desenvolvimento de membranas para aplicação em curativos, invólucros para encapsulamento de fármacos/moléculas bioativas, entre outros sistemas, tirando proveito do efeito da taxa de dissolução de um fármaco aumentar com o aumento da área

superficial [14], [21], [94]. Por isso a produção de nanofibras eletrofiadas tem sido alvo de intensa investigação e refinamento nas últimas décadas, mostrando-se promissora tanto em escala laboratorial quanto industrial [98].

No processo de eletrofiação (*electrospinning*) é aplicado um potencial elétrico a uma solução polimérica que se encontra numa seringa. Esta solução é expelida por uma agulha a um determinado fluxo. Na ausência de estímulo elétrico, a solução que sai da agulha assume a forma de uma 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 eletrostáticas atingem valores equiparáveis às forças de tensão superficial, a gota assume a forma de um cone, denominado cone de *Taylor*. Quando o campo elétrico aplicado for superior a estas forças, um jato de solução é libertado a alta velocidade em direção a um coletor metálico, 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 [99]. Este processo está esquematizado na Figura 4.1.

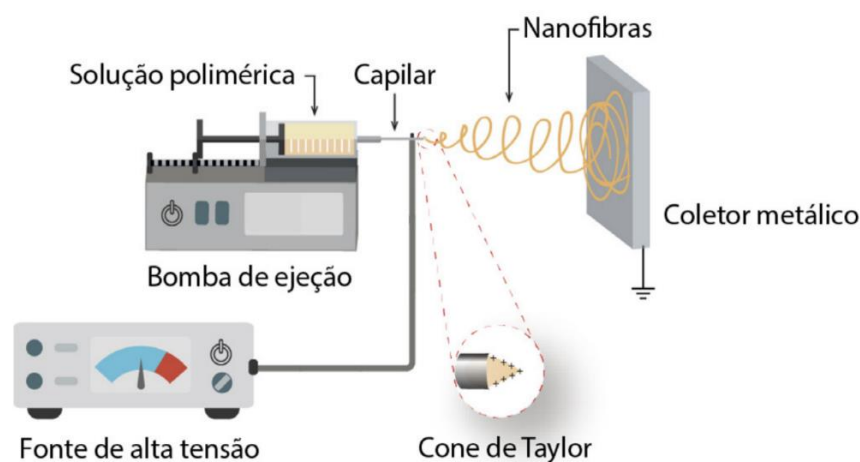


Figura 4.1 - Esquema de um sistema de eletrofiação convencional. Adaptado de [98].

Apesar do processo de eletrofiação ser conceptualmente simples, na prática existem muitos parâmetros necessários controlar para que se possa obter a fiação da solução polimérica e as fibras com as características pretendidas e também para que a sua reprodutibilidade seja efetiva [14], [56].

#### 4.1.3.2 Parâmetros

Muitos parâmetros podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras, nomeadamente: *as propriedades da solução*, como a concentração e viscosidade, a condutividade, e a tensão superficial; *variáveis do sistema* como o caudal e o potencial elétrico na agulha, e a distância ao alvo (distância entre a ponta da agulha e o coletor metálico); e os *parâmetros ambientais*, tais como a temperatura da solução e da câmara de eletrofiação, e a humidade no interior desta [98].

As propriedades físico-químicas do solvente, do polímero e as interações polímero-solvente têm um papel significativo no diâmetro e morfologia das fibras resultantes. O uso de solventes com baixa volatilidade leva à formação de filmes ou a obtenção de fibras achatadas. Por outro lado, se a volatilidade do solvente for muito alta, poderá ocorrer a solidificação do polímero na ponta da agulha, impedindo o processo de obtenção de fibras. Para obtenção de fibras uniformes e com distribuição estreita de diâmetro, o polímero deve apresentar massa molecular adequada e a solução polimérica deve ter viscosidade apropriada de forma a garantir a formação de um jato contínuo, evitando assim a rutura do mesmo no trajeto da ponta da agulha até ao coletor [98]. Em geral, uma viscosidade mais baixa favorece a formação de fibras mais finas e homogêneas. Por outro lado, para altos valores de viscosidade, as cargas elétricas na superfície da gota podem não ser suficientes para gerar a força necessária para formação do jato polimérico. Além disso, dependendo da volatilidade do solvente empregado, uma viscosidade muito elevada pode favorecer o entupimento da agulha, interrompendo o processo de eletrofiação [100]. Como mencionado anteriormente, para que o processo de eletrofiação se inicie, o campo elétrico aplicado deve ser suficientemente alto para superar a tensão superficial da solução. Sendo assim, em geral, a redução na tensão superficial está associada com a formação de jatos mais estáveis e, conseqüentemente, de fibras sem defeitos. A condutividade da solução também pode ser ajustada a fim de se favorecer a formação de fibras homogêneas. Uma maior condutividade está associada com uma maior densidade de cargas na solução, o que favorece o processo de alongamento do jato polimérico e a formação de fibras com menos defeitos e menores diâmetros [85], [98].

Como mencionado anteriormente, o campo elétrico é a força que garante o alongamento da gota e formação do jato que será responsável pela formação das fibras. Se o campo elétrico for muito abaixo do valor característico do sistema polímero/solvente, o jato da solução polimérica não é estabilizado, o que dificulta a formação de fibras ou leva a obtenção de fibras com defeitos. Por outro lado, um campo elétrico elevado pode favorecer um maior

alongamento do jato da solução polimérica e a formação de fibras com menores diâmetros [101]. O caudal da solução polimérica também é um parâmetro importante do processo, pois influencia o tamanho da gota, a velocidade do jato e a taxa de transferência de material, exercendo grande influência no diâmetro e morfologia das fibras. Um caudal muito baixo leva à formação de fibras não uniformes, pois não há transferência de material suficiente, por outro lado, um caudal acima do valor crítico pode levar à formação de fibras de maiores diâmetros e com defeitos, devido à secagem incompleta do jato durante o percurso da ponta da agulha até ao coletor [98]. A distância entre a ponta da agulha e o coletor deve ser tida em conta. Uma redução da distância de trabalho pode resultar na supressão de estágios posteriores ao alongamento da fibra e evaporação do solvente, podendo acarretar o aumento do diâmetro da fibra ou fibras com defeitos, devido à evaporação incompleta do solvente. Por outro lado, quando a força do campo elétrico é suficiente para manter o processo de eletrofiação, o aumento da distância de trabalho fornece maior percurso para o alongamento do jato e evaporação do solvente, favorecendo a formação de fibras com menores diâmetros [94].

Outros parâmetros a serem considerados no processo de eletrofiação são as condições ambientais de temperatura e humidade relativa. Em ambientes com menor humidade relativa observa-se uma maior tendência para rápida evaporação do solvente o que, geralmente, acarreta a formação de fibras mais finas [101]. No entanto, taxas de evaporação do solvente muito elevadas podem levar à solidificação do polímero na ponta da agulha, impedindo o processo de formação de fibras. O aumento da humidade relativa pode levar a formação de poros na superfície das fibras, que por sua vez está relacionada ao processo de evaporação do solvente [94]. Face à temperatura, estudos demonstram que o aumento da temperatura pode induzir a formação de fibras com menores diâmetros por dois mecanismos distintos: aumentando a taxa de evaporação do solvente e diminuindo a viscosidade da solução polimérica [101].

#### 4.1.3.3 Técnica

Depois da solução estar em agitação e completamente homogeneizada, foi introduzida numa seringa de 1 mL de capacidade (*Injekt, B.Braun*) com bastante cuidado de forma a evitar a formação de bolhas de ar que podem interromper a produção de fibras. Seguidamente colocou-se uma agulha metálica de diâmetro interno 4,50 mm (modelo 21G ITEC, *Iberiana Technical*) na ponta da seringa, sendo esta última disposta numa bomba infusora (modelo 100 series, *Kd. Scientific*) para ejetar a solução polimérica a uma taxa constante e controlada (caudal de 0,20 mL/h). Enquanto a bomba infusora empurra o êmbolo da seringa com o caudal previamente definido, uma fonte de alta tensão (*Keithley 237 High Voltage Source Measure Unit*)

está a ser aplicada entre a agulha de um coletor estático ligado à massa a 15 cm de distância desta, revestido com uma folha de papel de alumínio. Foi também colocado um aro metálico de cobre, ligado à fonte de alta tensão, colocado de forma que a agulha ficasse no seu centro, para uniformizar o campo elétrico e, conseqüentemente, permitir uma maior direcionalidade e colimação das fibras para o coletor. A montagem experimental previamente descrita encontra-se representada na Figura 4.2.



Figura 4.2 - Montagem experimental do processo de eletrofiação.

A eletrofiação de 1mL de solução de AC demora 5 horas a executar, enquanto a produção das membranas de AC:IBU demora 10 horas que se dividem em duas deposições de 5 horas consecutivas. Este tempo é o necessário para ejetar toda a solução, cerca de 2 mL. Estas condições permitem obter membranas circulares de grandes dimensões e com espessura suficiente (entre os 80  $\mu\text{m}$  e os 90  $\mu\text{m}$ ) para que as amostras sejam facilmente recolhidas do coletor. De modo que todas as membranas a serem estudadas apresentassem o mesmo tamanho e no caso das membranas de AC:IBU apresentassem cada uma a mesma quantidade de fármaco então recortaram-se as membranas em triângulos, sendo possível recortar 16 triângulos após cada deposição terminada e deixando-as a secar à temperatura ambiente durante 24 horas.

Durante todo o processo de eletrofiação foi assegurada a não acumulação de solução na ponta da agulha para evitar que esta entupisse. Todos os parâmetros foram definidos e regulados com base no estudo de Baptista *et al* [33], bem como outros fatores ambientais relevantes para a formação das fibras por eletrofiação de AC com e sem ibuprofeno que se indicam na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Parâmetros para a produção das membranas por eletrofição de AC:IBU e AC.

Parâmetros	mAC:IBU	mAC
Diâmetro da seringa (mm)	4,50	
Caudal (mL/h)	0,20	
Calibre da agulha	21G	
Distância da agulha ao alvo (cm)	15	
Diferença de potencial (kV)	20	18
Tempo de deposição (h)	10	5
Temperatura (°C)	20-25	
Humidade relativa (%)	35-45	

## 4.2 Funcionalização das Membranas

As membranas produzidas logo após o processo de eletrofição, devido à sua composição (acetato de celulose e uma quantidade muito reduzida de fármaco), são consideradas não condutoras. Por isso é necessária a sua funcionalização com PPI e PEDOT, para tornar em membranas eletricamente condutoras, de modo a que os testes de libertação controlada por estímulo elétrico possam ser realizados. A influência de parâmetros como concentração de monómero, agente oxidante, fração molar, concentração de monómero/agente oxidante, tempo de polimerização e temperatura de reação na morfologia da fibra foram consideradas para esta metodologia.

As membranas de AC e AC:IBU foram recortadas em 16 partes e retiradas da folha de alumínio que reveste o coletor, com as dimensões de aproximadamente 1,5 cm de base por 3,5 cm de altura. Estas são então pesadas e medida a sua espessura.

### 4.2.1 Oxidação *In situ* do Pirrol em Solução Aquosa

Preparou-se uma solução aquosa de 0,05 mol/L de pirrol (*Sigma-Aldrich*, Mw=67,09 g/mol, 98%) e num volume de 10 mL desta solução, adicionou-se uma membrana triangular (1,5 cm de base por 3,5 cm de altura) que é deixada a agitar por 10 minutos à temperatura ambiente, permitindo a impregnação do monómero pirrol. Após este período, adicionou-se suavemente a solução de 10 mL de agente oxidante - cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , *Chem-Lab NV*, pureza = 99%) - na proporção 2:1 ( $\text{FeCl}_3$ :pirrol) [33]. Este composto

provoca a oxidação dos monómeros de pirrol, que devido à sua instabilidade, criam ligações entre si, formando cadeias de PPI em torno das fibras das membranas. Durante a polimerização oxidativa do pirrol, as membranas de AC passaram de branco a preto em poucos minutos, o que confirmou a formação do PPI, tal como ilustrado na Figura 4.3.

Após a adição do agente oxidante, a solução foi mantida em agitação para dois tempos de polimerização diferentes, 45 min e 90 min. Passados estes intervalos de tempo, as membranas são retiradas das soluções cuidadosamente e lavadas com água ultrapura (sistema de purificação Elix<sup>®</sup>, Merck Millipore) e etanol (*Honeywell Ricomel-de Haën*, 99,5%), a fim de extrair os subprodutos e resíduos da reação. As membranas foram deixadas a secar ao ar, à temperatura ambiente. Foram funcionalizadas membranas de AC e AC:IBU de modo a ser possível construir os sistemas de membranas a serem estudados.

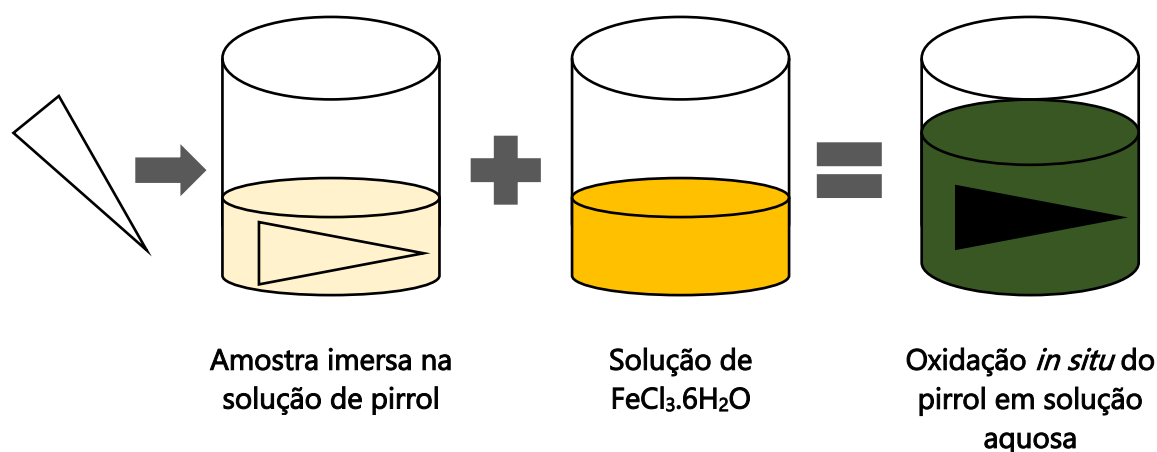


Figura 4.3 - Ilustração do processo de polimerização oxidativa *in situ* do pirrol em solução aquosa. Adaptado de [102].

#### 4.2.2 Polimerização em Fase de Vapor do EDOT

O processo de funcionalização das membranas com PEDOT, através da exposição destas a vapores de EDOT, tem por base um procedimento experimental adaptado da literatura [103].

As membranas eletrofiadas e com as dimensões previamente estabelecidas foram imersas numa solução aquosa de 40 g/l de agente oxidante, cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , *Chem-Lab NV*, pureza = 99%), em 10 mL de volume, durante 20 minutos sob uma agitação suave.

Após este período, as membranas impregnadas com o agente oxidante foram retiradas cuidadosamente da solução e deixadas a secar à temperatura ambiente durante 1 hora. Uma vez secas, são penduradas no interior de uma câmara fechada com 0,5 mL do monómero EDOT

(Sigma-Aldrich,  $M_w=142,18$  g/mol, 97%) no fundo do recipiente. As câmaras foram introduzidas num forno (Mettler) a  $90^\circ\text{C}$  durante 120 minutos, de modo a serem expostas aos vapores do monómero. Durante esta polimerização do EDOT, as membranas passaram do branco para o preto, o que indicou a formação de PEDOT, tal como ilustrado na Figura 4.4.

As membranas revestidas foram retiradas da câmara e lavadas com água ultrapura (sistema de purificação Elix<sup>®</sup>, Merck Millipore) e etanol (Honeywell Riedel-de Haën, 99,5%) abundantes para remover subprodutos da reação. Finalmente, as amostras foram secas à temperatura ambiente. O tempo de exposição da membrana a vapores de monómero foi avaliado exclusivamente para 120 minutos. Foram funcionalizadas membranas de AC e AC:IBU de modo a construir os sistemas de membranas a serem estudados.

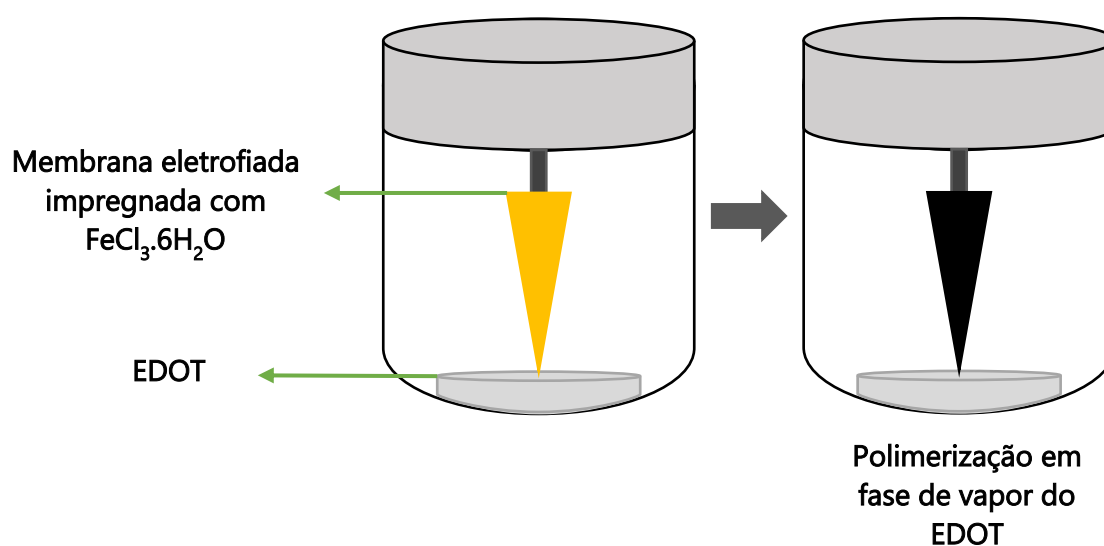


Figura 4.4 - Ilustração do processo de polimerização da polimerização em fase de vapor do EDOT.

### 4.3 Técnicas de Caracterização das Membranas

Para um correto funcionamento do penso transdérnico é essencial analisar em pormenor cada componente que o constitui, verificar se a sua produção foi realizada da forma adequada e garantir que a mesma é resistente o suficiente para uma utilização com qualidade e durabilidade. Na caracterização das membranas utilizou-se microscopia ótica para uma primeira observação das membranas quanto à existência de fibras e a microscopia eletrónica de varrimento para melhor visualizar a morfologia, uniformidade e diâmetro médio das fibras que constituem as membranas.

Para comprovar a presença dos compostos adicionados às membranas de AC, tais como o IBU, o PPI ou o PEDOT, realizou-se uma análise química por espectroscopia *Raman*. Avaliou-se também o comportamento elétrico e eletroquímico antes e após a liberação por meio de técnicas de medidas de condutividade elétrica e voltametria cíclica, respetivamente.

### 4.3.1 Microscopia Ótica

A microscopia ótica é uma das técnicas mais antigas utilizadas na biomedicina para estudar amostras até à escala dos micrómetros. Os microscópios óticos consistem num sistema de lentes que focam a imagem de uma amostra com a ampliação desejada e uma fonte de luz, na região do visível do espectro da radiação eletromagnética, para iluminar a amostra. A amostra é colocada numa lâmina de vidro, entre a fonte de iluminação e as lentes. Existem vários microscópios com diferentes funcionalidades que permitem uma fácil manipulação e preparação das amostras, melhor resolução da imagem obtida, observada diretamente através de lentes oculares, ou através de um computador ligado ao microscópio [104].

Com a microscopia eletrónica, devido ao seu princípio de funcionamento podem ser obtidas ampliações muito maiores sendo possível observação da superfícies dos materiais à escala nanométrica [104]. Para a microscopia ótica, colocaram-se as amostras numa lâmina de vidro para microscópio (*Deltalab S.L.*) que foi introduzida no respetivo suporte do microscópio ótico invertido da marca *Leica* e modelo DMI8, onde as imagens foram obtidas em modo reflexão e captadas com a ampliação de 50x, 100x ou 200x. Através desta técnica foram analisadas uma membrana de AC, de PPI<sub>90</sub>/AC (AC funcionalizado com PPI por 90 minutos) e de PEDOT<sub>120</sub>/AC (AC funcionalizado com PEDOT por 120 minutos).

### 4.3.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*, SEM) é uma técnica que por não estar sujeita ao limite de difração da luz, possui uma resolução à escala nanométrica, sendo capaz de revelar informações sobre a morfologia da superfície da amostra. O SEM beneficia de uma grande profundidade de campo, pelo que a maior parte da superfície da amostra está simultaneamente em foco, independentemente da rugosidade da superfície [105].

Neste microscópio eletrónico os eletrões incidentes têm tipicamente energias de 2-40 keV. Duas ou três lentes condensadoras controladas por um gerador de varrimento focalizam o feixe numa área selecionada da superfície da amostra. A profundidade de penetração do

feixe de elétrons aumenta quanto maior for a energia do feixe incidente, ângulo de incidência, e massa atômica da amostra. A interação do feixe de elétrons com a amostra produz elétrons secundários, recolhidos por vários detectores de elétrons na câmara da amostra. O sinal de cada detector pode ser enviado para um monitor, que está em contínua sincronização com o feixe de elétrons. É a detecção e identificação do sinal proveniente destes elétrons que permite a formação da imagem da amostra [106]. A interação entre o feixe de elétrons e a amostra ocorre em vácuo para evitar a presença de outros átomos e moléculas que poderiam interferir com o feixe de elétrons e reduzir a qualidade da imagem [107].

Para o estudo realizado, cortaram-se amostras de dimensões de 0,5 cm por 0,5 cm, aproximadamente, de diferentes tipos de membranas. Foram analisadas membranas de AC e de AC:IBU, de PPI<sub>90</sub>/AC, de PEDOT<sub>120</sub>/AC, de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU (AC:IBU funcionalizado com PPI por 90 minutos e de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU (AC:IBU funcionalizado com PEDOT por 120 minutos), sendo que para os últimos 4 tipos analisou-se o antes e após a libertação.

Depois, foram coladas sobre um suporte de amostras metálico e circular através de uma fita condutora à base de carbono (*Electron Microscopy Sciences*), tal como ilustrado na Figura 4.5. As amostras foram cobertas por uma camada fina da fita de carbono para evitar o carregamento de elétrons e melhorar o sinal. O modelo utilizado para realizar a técnica foi o *S2400 Hitachi* e as imagens resultantes foram analisadas utilizando o *software* de processamento de imagem (*ImageJ®*, *NIST*) para estudar os diâmetros das fibras, considerando 30 medições diferentes para cada amostra (6 medições para cada uma das 5 fibras mais superficiais).



Figura 4.5 - Porta-amostras com as amostras preparadas e identificadas para o SEM.

### 4.3.3 Espetroscopia *Raman*

Em 1928, um físico indiano *Chandrashekhara Venkata Raman* descobriu o fenómeno da dispersão inelástica da luz, conhecido como o efeito *Raman*. A irradiação de uma molécula

com uma luz monocromática resulta sempre em dois tipos de dispersão de luz, elástica e inelástica. Quando um fóton de luz interage com uma molécula, pode induzir uma transição de curta duração para um estado de energia virtual. Este aumento temporário de energia significa que a molécula está num estado de energia mais elevado ou virtual. A molécula pode regressar ao estado fundamental libertando a mesma quantidade de energia que a dos fótons de excitação, dispersão de *Rayleigh* ou dispersão elástica. Como a energia de um fóton é proporcional à sua frequência, e como não ocorre qualquer alteração na frequência do fóton nem qualquer alteração no seu comprimento de onda ou energia, esta dispersão não produz qualquer informação sobre a amostra a ser analisada. Por outro lado, a dispersão inelástica é acompanhada pela mudança na frequência do fóton devido à excitação ou desexcitação das vibrações moleculares onde o fóton pode perder alguma quantidade de energia ou ganhar energia, diferente da do fóton incidente. Este fenómeno é conhecido como dispersão de *Raman* [108].

Assim é explicada a mudança no comprimento de onda de uma pequena fração de radiação espalhada por moléculas, tendo uma frequência diferente da do feixe incidente. Este desvio no comprimento de onda depende da estrutura química das moléculas responsáveis pela dispersão. Como a intensidade do espectro *Raman* está relacionada com a concentração das moléculas e dado que as ligações moleculares vibram a determinadas frequências características, a interpretação dos espectros *Raman* pode ser utilizada para inferir a composição química de uma amostra. O espectro típico de *Raman* representa a intensidade da dispersão da radiação eletromagnética (em unidades arbitrárias) em função da variação do comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) (variável que é proporcional à frequência) das radiações incidente e dispersa [109].

Através desta técnica de análise química não destrutiva, torna-se possível estudar a libertação transdérmica de fármacos de forma não invasiva para obter informações detalhadas sobre a composição química e gradientes de concentração do fármaco na pele sem comprometer a regeneração da mesma [110].

Todas as análises foram realizadas num espectrofotómetro *Confocal Raman (Witec Alpha 300 RAS)* utilizando um laser de 532 nm e uma potência de 0,5 mW. Foram preparadas 13 amostras para identificar a presença dos compostos adicionados: IBU (em pó, como amostra de controlo), PPI (em líquido, como amostra de controlo), PEDOT (em líquido, como amostra de controlo), uma membrana de AC e de AC:IBU, de PPI<sub>90</sub>/AC, de PEDOT<sub>120</sub>/AC, de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU e de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU, sendo que para os últimos 4 tipos analisou-se o antes e após a libertação.

#### 4.3.4 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica é uma propriedade dos materiais que pode ser definida como a capacidade que cada material tem de conduzir corrente elétrica. A condutividade elétrica foi calculada através das curvas características de corrente-tensão (curvas  $I-V$ ) que mostram a relação entre a corrente que flui através de um dispositivo eletrônico e a tensão aplicada aos seus terminais. Ao aplicar qualquer valor de tensão a um elemento resistivo, a corrente resultante é obtida diretamente da curva  $I-V$ .

Pela Lei de Ohm,

$$V = R \times I \quad (4.1)$$

a corrente que atravessa o dispositivo é função do potencial aplicado, pois  $I$  é proporcional à diferença de potencial,  $V$ , vezes a constante de proporcionalidade,  $1/R$ . Assim, numa resistência ideal, esta relação é linear, fazendo com que  $1/R$  seja a inclinação da reta que representa a corrente contra a diferença de potencial.

Assim, obtendo as curvas  $I-V$  e calculando a resistência ( $R$ ), a condutividade da membrana funcionalizada é obtida pela seguinte expressão,

$$\sigma = \frac{l}{A \times R} \quad (4.2)$$

Onde  $\sigma$  é a condutividade elétrica (S/cm),  $R$  é a resistência ( $\Omega$ ) obtida pelo declive da reta  $I-V$ ,  $A$  é a área da secção transversal da membrana atravessada pela corrente ( $\text{cm}^2$ ) e  $l$  a distância entre os elétrodos (cm) [33].

A caracterização elétrica foi realizada logo após a etapa de funcionalização das membranas, para medir as condutividades das membranas, com e sem o fármaco, antes de submetê-las a um estímulo elétrico para posteriormente compará-las aos valores de condutividade obtidos após a realização dos testes de libertação.

O processo de medição de condutividades é realizado através de um pico-amperímetro/fonte de tensão (modelo 6400, *Keithley Instruments*), duas pontas de prova (*Alessi REL-450*) e com o auxílio de um computador registou-se os valores de corrente-tensão ( $I-V$ ).

Para determinar a condutividade de cada membrana é necessária a espessura média das membranas, a área da secção transversal das mesmas, a distância entre os elétrodos, a dimensão destes, e a média dos declives dos gráficos  $I-V$  obtidos para cada amostra. Para se obter a espessura média de cada membrana recorreu-se a um micrómetro e mediu-se a espessura

em 15 zonas diferentes da membrana e calculou-se a média. As medidas  $I-V$  foram repetidas 3 vezes para cada mesma amostra calculou-se a média dos declives obtidos para cada membrana e para cada tipo de condutividade estudada, planar ou transversal.

A condutividade planar é medida na superfície da membrana e para tal utilizou-se uma tinta condutora de carbono (*Bare Conductive*<sup>®</sup>) para obter os elétrodos com formato retangular de dimensões 5 mm por 3 mm que distam 1 mm um do outro, tal como representado na Figura 4.6-A. As pontas de prova foram colocadas nos contactos realizando-se de seguida a aquisição dos valores de  $I$  função da tensão aplicada. Neste caso, a secção transversal é delimitada pela distância entre os elétrodos e espessura da membrana. A condutividade transversal é medida ao longo da espessura da membrana e para tal pressionou-se uma membrana entre duas lâminas de microscópio (*Deltalab S.L.*) às quais estavam colados dois elétrodos de fita condutora de alumínio, um em cada lâmina, com dimensões 6 mm por 6 mm relativamente à área em contacto com a membrana, tal como representado na Figura 4.6-B. Neste caso, a secção transversal corresponde à área da fita de alumínio em contacto com a membrana.

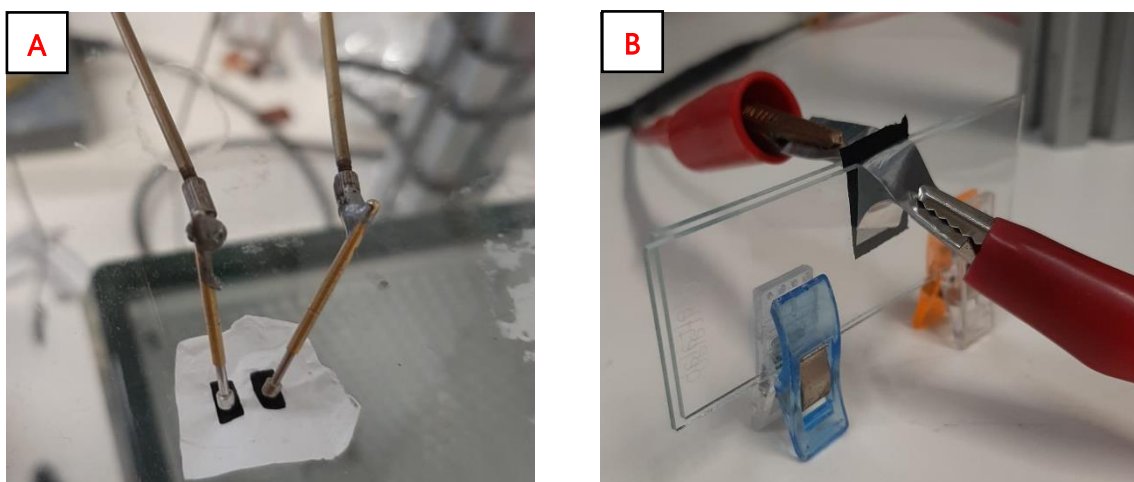


Figura 4.6 - Representação da medição das condutividades, A: planar e B: transversal.

A condutividade foi também obtida ao longo do tempo para funcionalizações e tempos de polimerização diferentes ( $\text{PPI}_{45}/\text{AC}$ ,  $\text{PPI}_{90}/\text{AC}$  e  $\text{PEDOT}_{120}/\text{AC}$ ), e antes e após a libertação de membranas com e sem IBU encapsulado ( $\text{PPI}_{90}/\text{AC}$ ,  $\text{PPI}_{90}/\text{AC}:\text{IBU}$ ,  $\text{PEDOT}_{120}/\text{AC}$  e  $\text{PEDOT}_{120}/\text{AC}:\text{IBU}$ ).

### 4.3.5 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica utilizada para obter informações qualitativas e quantitativas de materiais e sistemas que apresentam algum comportamento eletroquímico. Através desta técnica foi possível prever a gama de tensões e em alguns casos o valor de tensão específico para os quais cada sistema de membranas retinha o fármaco no seu interior ou estimulava a sua libertação.

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria podem ser compostas por dois ou três elétrodos: o eletrodo de trabalho, o contra-elétrodo e o eletrodo de referência. De modo a assegurar uma adequada condutividade elétrica ao sistema, uma força iónica ajustada e um pH constante, utiliza-se uma solução com concentrações relativamente elevadas de sais inertes para estabelecer o contacto eletrónico entre os elétrodos [111]. É medida a corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o contra-elétrodo quando se induz uma diferença de potencial a uma velocidade constante entre os mesmos, registando-se uma curva de corrente ( $I$ ) em função do potencial aplicado ( $V$ ) denominada de voltamograma, no qual o potencial e a corrente resultante são registados simultaneamente [112].

Nesta técnica inicia-se a aplicação do potencial num valor no qual nenhuma redução ocorre. Com a variação de potencial para regiões mais negativas ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso (regiões positivas) até ao valor inicial. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução, pico de oxidação [111]. Enquanto o sistema tenta alcançar o estado de equilíbrio com a ajuda de reações redox, esforça-se por alcançar a mesma posição em que começou. Segue um padrão cíclico, no qual se pode observar as mudanças para os diferentes valores de tensão, velocidade de varrimento e ao longo do tempo. A análise das curvas obtidas podem fornecer informação importante relativamente à sua natureza capacitiva bem como reversibilidade e estabilidade [113].

Esta técnica é bastante expedita para fornecer informações sobre os processos de oxidação-redução, nomeadamente sobre a cinética das reações de transferência de eletrões [114]. Logo, a reação eletroquímica é composta primeiro pelo transporte da espécie em estudo até à superfície de um dos elétrodos e segundo, a reação que ocorre no eletrodo, que se inicia com a transferência de massa, ou seja, a transferência da espécie presente na solução para a superfície do eletrodo; depois tem de existir uma transferência de eletrões na superfície do

elétrodo (transferência de carga); e, por fim, dão-se as reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons [111].

A voltametria cíclica pode ser realizada num ciclo ou múltiplos ciclos e a velocidade de varrimento da tensão à medida que são produzidos os ciclos e obtidos os picos também pode ser variada. Com base na velocidade de varrimento, podem-se obter alterações nas correntes de pico de oxidação e redução e nos potenciais de pico. Uma elevada velocidade de varrimento resulta num maior número de reações redox. Para uma velocidade de varrimento mais lenta podem não ser detetados picos devido ao tempo suficiente disponível para os produtos da redução ou oxidação participarem numa reação química cujos produtos podem não ser eletricamente responsivos [113].

As caracterizações eletroquímicas dos vários sistemas de membranas foram realizadas utilizando um potencióstato *Gamry Instruments (Reference 3000)*. A configuração escolhida foi a de dois elétrodos, ou seja, ligou-se o contra-elétrodo ao elétrodo de referência, sendo o potencial medido entre este conjunto e o elétrodo de trabalho. Neste estudo analisaram-se 5 sistemas de membranas diferentes (Figura 4.7):

- i. Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, constituído por duas membranas de AC idênticas polimerizadas com PPI por 90 min, com uma membrana de AC:IBU no meio. Este sistema apresenta fita adesiva isoladora (*Kapton® tape*) à sua volta para selar as laterais do dispositivo e garantir que a libertação não se dê pelas "bordas";
- ii. Sistema Único PPI<sub>90</sub>, constituído por uma membrana de AC:IBU polimerizada com PPI por 90 min;
- iii. Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, constituído por duas membranas de AC idênticas polimerizadas com PEDOT por 120 min, com uma membrana de AC:IBU no meio. Este sistema apresenta fita adesiva isoladora (*Kapton® tape*) à sua volta;
- iv. Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>, constituído por uma membrana de AC:IBU polimerizada com PEDOT por 120 min;
- v. Sistema Rebordo Mix, constituído por duas membranas de AC idênticas mas uma polimerizada com PPI por 90 min e outra com PEDOT por 120 min, com uma membrana de AC:IBU no meio. Este sistema apresenta fita adesiva isoladora (*Kapton® tape*) à sua volta.

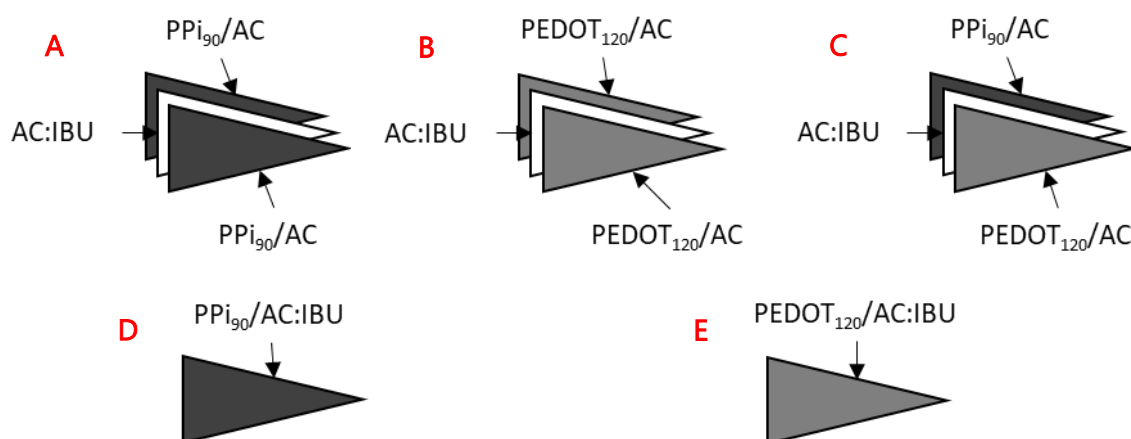


Figura 4.7 - A: Sistema Reborde PPI<sub>90</sub>; B: Sistema Reborde PEDOT<sub>120</sub>; C: Sistema Reborde Mix; D: Sistema Único PPI<sub>90</sub>; E: Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>.

Em todos os sistemas foi colocada uma fita adesiva condutora de cobre/níquel (*Electronic Microscopy Sciences*) na parte superior de cada sistema para que o potencial aplicado possa ser distribuído uniformemente pelas membranas condutoras. Estes sistemas foram fixos num crocodilo do elétrodo de trabalho e mergulhados em 20 mL de SBF (do inglês, *Simulated Body Fluids*) a 1 cm de distância de um fio de prata (contra-elétrodo), sendo que a área de contacto dos sistemas de membranas com o meio corresponde a cerca de 1 cm<sup>2</sup>. Para cada sistema de membranas foram obtidos 5 ciclos para cada velocidade de varrimento, sendo utilizado o terceiro ciclo para fins comparativos.

As medidas de Voltametria Cíclica foram realizadas de modo a analisar a presença de reações de oxidação-redução (reações redox). Os parâmetros de varrimento adotados encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Condições de ensaio do varrimento adotados para a caracterização eletroquímica.

Parâmetros	
Gama de varrimento (V)	-1 a +1
Velocidade de varrimento (mV/s)	25, 50, 100, 150
Número de ciclos	5

## 4.4 Estudo da Libertação do Fármaco

Após a produção das membranas por eletrofação, correspondente funcionalização e montagem dos sistemas de membranas, realizaram-se ensaios de libertação do fármaco em

SBF, meio que simula os fluidos corporais. Os sistemas de membranas foram mergulhados num recipiente com este meio e através de uma fonte de tensão foram aplicadas diferenças de potencial, correspondentes a estímulos elétricos contínuos, entre as membranas e um eletrodo de prata. O estímulo com uma determinada amplitude e durante um certo período, foi repetido várias vezes numa sequência determinada, correspondendo a um ciclo de libertação controlada do fármaco. A libertação do fármaco foi avaliada por espectroscopia UV-Visível após cada estímulo, sendo possível relacionar a concentração de fármaco libertada para o meio, através da utilização da curva de calibração do ibuprofeno em SBF, com a quantidade de fármaco presente antes da libertação.

#### 4.4.1 *Simulated Body Fluids*

O SBF é uma solução isotónica que mantém o pH das soluções, é não-tóxica e simula a parte inorgânica do plasma sanguíneo [115].

A preparação da solução teve por base o procedimento descrito por Kokubo *et al* [116]. Os reagentes utilizados, bem como as quantidades respetivas, encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Reagentes utilizados para a preparação da solução de SBF.

Reagente	Iões	Quantidade (g/L)	Marca
NaCl	Na <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	6,547	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaHCO <sub>3</sub>	Na <sup>+</sup> ; HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,268	<i>PanReacAppliChem</i>
KCl	K <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	0,373	<i>Scharlau</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Na <sup>+</sup> ; HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,178	<i>FLuka Analytical</i>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Mg <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	0,305	<i>PanReacAppliChem</i>
1M HCl	H <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	15 mL	-----
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Ca <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	0,368	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sup>+</sup> ; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,071	<i>Sigma-Aldrich</i>
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	-----	6,057	<i>Sigma-Aldrich</i>
1M HCl	H <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	Titular até ser atingido um pH = 7,4	-----

Os reagentes são adicionados um a um a 700 mL de água ultrapura (sistema de purificação Elix<sup>®</sup>, *Merck Millipore*) em agitação constante, pela ordem que se apresenta na Tabela

4.3 e, após a adição do último reagente, aqueceu-se a solução desde a temperatura ambiente até atingir 37°C. Por fim, acrescentou-se água ultrapura até perfazer 1 L de solução e esta pôde ser utilizada durante um mês, armazenada num frigorífico a 5°C.

#### 4.4.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Esta técnica baseia-se na interação da radiação eletromagnética com um material. A incidência de uma radiação contínua (feixe de luz monocromática) sobre uma amostra resulta numa absorção da radiação, onde átomos e moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental) para um estado de energia mais elevado (estado excitado). A radiação absorvida é quantizada, ou seja, tem um valor igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental [117].

A absorção de energia depende da estrutura eletrónica da molécula, e por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis tem uma ampla aplicação na caracterização de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Como a energia absorvida é quantizada, o espectro de uma única transição eletrónica deveria corresponder a uma linha discreta, mas tal não acontece uma vez que a absorção eletrónica se sobrepõe a subníveis rotacionais e vibracionais. Assim, um espectro de UV-Vis tem o aspeto de uma banda. As principais características de uma banda de absorção correspondem ao valor de comprimento de onda em que ocorre a máxima absorção de energia e sua intensidade. Este comprimento de onda corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrónica. E a intensidade depende, principalmente, da interação entre a energia incidente e o material [118].

No espectrofotómetro, a radiação eletromagnética atravessa uma amostra contida numa célula. A radiação no intervalo de comprimentos de onda de interesse é lida ao mesmo tempo que a radiação com a mesma frequência e intensidade atravessa a célula de referência apenas contendo o solvente. O fotómetro deteta a radiação transmitida e o espectrómetro, que comparando a intensidade de radiação que atravessa a célula com a amostra com a célula de referência, regista a absorção. Como o vidro comum absorve radiação a partir de 365 nm, para um espectrofotómetro que opere nestes comprimentos de onda, devem ser utilizadas células de sílica pura que absorve para radiações inferiores aos 200 nm.

A quantidade de luz absorvida corresponde à diferença entre a intensidade da radiação incidente  $I_0$  e a intensidade da radiação transmitida  $I$ . Através da lei de *Lambert-Beer*, a fração de luz absorvida por cada camada da amostra é a mesma. Ou seja, estabelece que a

absorvência (A) é diretamente proporcional ao comprimento do percurso de luz que atravessa a solução (*l*, cm), à concentração da solução (*C*, mol/L) e à constante de absorção molar ( $\epsilon$ , L/mol/cm):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = Cl\epsilon \quad 4.3$$

O equipamento disponível (T90+ UV/VIS *Spectrometer*, *PG Instruments Ltd.*) possui uma gama de comprimento de onda de 190 nm a 900 nm e é controlado por computador via *software* (*UVWin Spectrometer Software*, Versão 5.2.0.).

No início de cada ensaio, duas células de quartzo contendo SBF são posicionadas nas duas cavidades para a realização da linha de base (possibilita a eliminação da absorção do meio), deixando-se a célula da referência no devido encaixe. Durante o teste de libertação, são colocados 3 mL de amostra na outra célula, obtendo-se o espectro de absorção para o intervalo 190 - 300 nm, por ser nesta gama que se encontra o pico de absorção do IBU.

Assim, é possível obter uma gama de valores de absorvência em função de concentrações conhecidas, obtendo-se uma relação linear, como teoricamente esperado pela lei de *Lambert-Beer*, cujo gráfico pode ser usado como uma curva de calibração.

#### 4.4.3 Curva de Calibração do Ibuprofeno

A variação da concentração de IBU libertado pelas fibras em SBF foi possível conhecendo previamente a absorvência para diferentes concentrações conhecidas de IBU dissolvido em SBF. Desta forma, adquiriram-se os espectros para várias diluições sucessivas deste fármaco em SBF, retiraram-se os valores dos picos máximos característicos do fármaco no meio e com estes valores, construiu-se uma curva de calibração da absorvência em função da concentração.

Começou-se por preparar uma solução mãe de 20 mg/L de IBU em SBF. Por diluições sucessivas desta solução, obtiveram-se soluções com as concentrações constantes na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Concentrações das soluções para a curva de calibração do ibuprofeno em SBF.

Concentrações de ibuprofeno em SBF (mg/L)																				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

#### 4.4.4 Testes de Libertação em SBF

Os ensaios de libertação de fármaco foram realizados para cinco configurações de sistema diferentes, Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, Sistema Único PPI<sub>90</sub>, Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, Sistema Único PEDOT<sub>120</sub> e Sistema Rebordo Mix, previamente explicados no subcapítulo anterior e representados na Figura 4.8. Através do estudo prévio [41], mostrou-se que o sistema com rebordo é um sistema que permite controlar a libertação de fármaco. Optou-se por reproduzi-lo de modo a ter um sistema de comparação para o novo sistema desenvolvido neste trabalho. O sistema anterior é constituído por uma membrana AC ensanduichada entre duas membranas funcionalizadas com PPI (sistema rebordo). O novo sistema a testar é formado por uma única membrana funcionalizada que contem o fármaco. Para a funcionalização para além do PPI testou-se também o PEDOT e foi realizado um sistema em que uma membrana é funcionalizada com PEDOT e a outra membrana PPI (sistema rebordo mix). Deste modo, optaram-se por estes dois sistemas diferentes para criar as cinco configurações e prosseguir com os ensaios de libertação com estímulos elétricos.

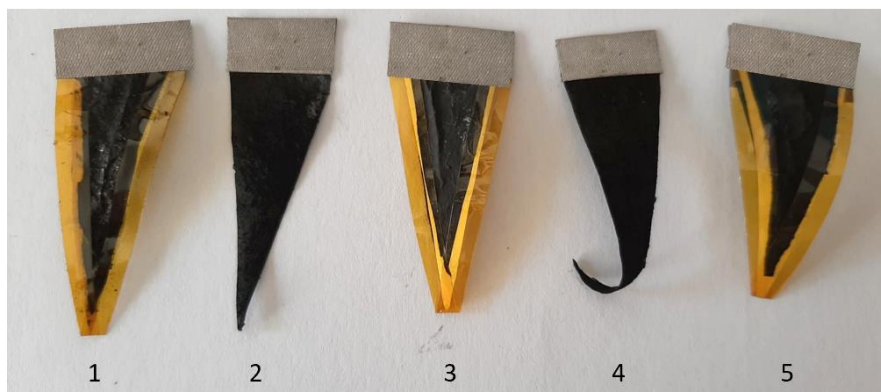


Figura 4.8 - Configurações de sistemas de membranas estudados. 1 - Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>; 2 - Sistema Único PPI<sub>90</sub>; 3 - Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>; 4 - Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>; 5 - Sistema Rebordo Mix.

Em todos os sistemas foi colocada uma fita adesiva condutora de cobre/níquel (*Electronic Microscopy Sciences*) para que o potencial aplicado possa ser distribuído uniformemente pelas membranas condutoras. Estes sistemas foram fixos num crocodilo ligado ao polo positivo da fonte de tensão (*Keithley 237 High Voltage Source Measure Unit*) e mergulhados num recipiente de vidro com 20 mL de SBF a 1 cm de distância de um contra elétrodo de prata (polo negativo), sendo que a área de contacto dos sistemas de membranas com o meio corresponde a uma área de cerca de 2 cm<sup>2</sup>. É importante manter a distância entre os sistemas de membranas

e o elétrodo de prata para todos os ensaios, de modo a minimizar o erro e manter o campo elétrico constante. Aplicaram-se pulsos elétricos de duração pré-definida. A montagem experimental utilizada para os testes de libertação encontra-se na Figura 4.9.



Figura 4.9 - Montagem experimental adotada nos testes de libertação. À esquerda, elétrodo positivo em contacto com o sistema de membranas, à direita contra-elétrodo de prata.

Para evitar erros experimentais, para cada ensaio foi sempre utilizado um sistema novo, com aproximadamente o mesmo tamanho, provenientes de uma só membrana inicialmente produzida para garantir que todas possuam a mesma condutividade e concentração de AC e IBU. Por outro lado, para evitar a contaminação de amostras, é utilizado um meio novo para cada teste de libertação.

Durante um teste e após aplicação de um estímulo, o aparelho (membrana e elétrodos) é retirado do recipiente, e com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* enche-se uma célula com 3 ml do meio, coloca-se a célula no espectrofotómetro e obtém-se o espectro de absorção. Depois de obtido o espectro, devolve-se o líquido ao recipiente, volta-se a colocar o aparelho com o sistema de membranas e os elétrodos, e aplica-se um novo estímulo durante o tempo estipulado para o teste que está a decorrer.

Na Tabela 4.5 encontram-se discriminados os diferentes testes realizados.

Uma vez que o fármaco modelo utilizado, IBU, é solúvel em água e em SBF, é importante analisar o quanto do fármaco é libertado por difusão passiva, apenas por ser imerso em SBF. O procedimento neste caso é igual, mas sem tensão aplicada entre os elétrodos.

Este estudo é ainda mais importante nos sistemas únicos uma vez que durante a etapa de polimerização, as membranas de AC:IBU estão totalmente imersas enquanto são revestidas com os polímeros condutores, acabando eventualmente por perder algum fármaco.

Tabela 4.5 - Parâmetros dos testes de libertação do fármaco aplicados às membranas produzidas.

Designação do sistema	Tensão aplicada (V) / Difusão		Duração
Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	-0,3		1 min
	+0,3		
	+0,5		
	+1,0		
	Difusão		
	-0,3	+0,5	
Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-1,5		1 min
	-0,3		
	0		
	+0,3		
	+0,8		
	+1,2		
	Difusão		
	-0,3	+0,3	
Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub>	-0,3		1 min
	+0,3		
	+0,5		
	Difusão		
	-0,3	+0,5	
Sistema Único PEDOT <sub>120</sub>	-0,3		1min
	+0,3		
	+0,8		
	Difusão		
	-0,3	+0,8	
Sistema Rebordo Mix	-0,3		1 min
	+0,3		
	+0,8		
	+1,2		
	Difusão		
	-0,3	+0,8	
Protótipo Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	-0,3	+0,5	1 min
Protótipo Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-0,3	+0,3	1 min

#### 4.4.5 Método de confirmação: LC-MS/MS

A versatilidade da cromatografia faz dela uma técnica muito utilizada na quantificação de fármacos, a qual é justificada pelos seguintes fatores: i) disponibilidade de métodos de detecção muito sensíveis para todos os tipos de técnicas cromatográficas; ii) elevada velocidade relativa na separação dos vários componentes da amostra (rapidez); iii) facilidade de utilização quando comparada a outros métodos analíticos; iv) possibilidade de desenvolver métodos analíticos precisos e de elevada veracidade (exatos) [119].

Embora a cromatografia gasosa (GC) tenha elevado poder de resolução e tenha sido aplicada na determinação de vários fármacos, eles são na sua maioria polares e pouco voláteis ou termicamente instáveis, o que impossibilita a sua determinação direta por GC, sendo necessário uma etapa preliminar de derivatização. Portanto, a cromatografia líquida (LC) tornou-se a técnica de eleição, pois permite a quantificação de fármacos de diferentes classes terapêuticas e com diferentes propriedades físico-químicas [120].

A cromatografia líquida baseia-se na diferença de velocidade de movimentação de um soluto transportado por uma fase móvel através de uma fase estacionária. Os componentes com maior afinidade para a fase estacionária movem-se mais lentamente que aqueles que apresentam menor afinidade. Como consequência destas diferenças de mobilidade, os componentes da amostra separam-se em bandas por ordem de afinidade, constituindo a ordem de eluição com tempos de retenção característicos. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) difere da cromatografia clássica pelo diâmetro interno da coluna, que é significativamente inferior e pelo facto do fluxo do eluente ser impulsionado a velocidade superior por intermédio de uma bomba [119].

A quantificação de fármacos por HPLC pode ser realizada com recurso a várias técnicas de detecção, como os detetores de ultravioleta e os de díodos, de fluorescência ou os espectrómetros de massa (MS) [121], [122]. O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrómetro de massa (LC-MS) combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as da espectrometria de massa (informações estruturais, massa molar e maior seletividade e detetabilidade), fazendo desta técnica uma das mais utilizadas [123].

A espectrometria de massa baseia-se no princípio de que partículas carregadas, movendo-se num campo elétrico ou magnético, podem ser separadas de acordo com a sua massa ou, mais rigorosamente, com a sua relação massa/carga ( $m/z$ ). Este processo requer uma fase de ionização e fragmentação. A relação entre as abundâncias relativas e os respetivos valores de  $m/z$  constitui um espectro de massa [120].

O LC-MS é uma técnica hifenada, em que os dois instrumentos são complementares entre si, fornecendo informação estrutural e analítica dos compostos em análise. Os componentes do sistema de LC acoplado a um detetor por espectrometria de massa são o circuito de fase móvel, a bomba, o injetor, a coluna cromatográfica (fase estacionária) e o detetor [120].

O HPLC passou por algumas melhorias consideráveis, especialmente em termos de fases estacionárias inovadoras e instrumentação, nomeadamente: colunas mais curtas e de menor diâmetro, enchimentos de maior porosidade com partículas de 2 µm ou menores e equipamentos de menores dimensões, mas que suportam pressões na ordem dos 1.000 – 1.300 bar. Este tipo de cromatografia é conhecido como cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) ou cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). O equipamento de UPLC usa partículas de pequeno diâmetro (tipicamente 1,7 µm) na fase estacionária e colunas curtas, que permitem pressões mais altas e, finalmente, picos de LC mais estreitos (5-10 s de largura). Além de fornecer picos estreitos e melhor resolução cromatográfica, o UPLC reduz drasticamente os tempos de análise, geralmente para 10 minutos ou menos [123]. Portanto, apresenta várias vantagens, nomeadamente: emprega menor volume de amostra, proporciona análises mais rápidas, menor consumo de fase móvel, maior resolução dos picos cromatográficos, melhor detetabilidade e maior relação sinal/ruído, que, por sua vez, diminui o limite de quantificação (LOQ) [119].

Embora a variedade de colunas atualmente disponíveis para HPLC e UPLC seja ampla e variada, a maioria dos métodos aplicados à análise de fármacos recorre ao uso de colunas de fase reversa C18 (RP).

As colunas UPLC BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) de 1,7 µm e 1,8 µm são as mais utilizadas em UPLC e UHPLC. Devido à estabilidade química intrínseca da tecnologia de partículas híbridas, elas permitem uma ampla faixa de pH (pH 1-12). Portanto, tem sido aplicado à análise de diversos tipos de fármacos [124].

O UPLC acoplado à espectrometria de massas foi, sem dúvida, o desenvolvimento mais significativo (quase a um nível exponencial) para aplicações no campo da investigação, mas sobretudo na análise de rotina. Esta associação (UPLC-MS) permitiu o aumento da sensibilidade (assim como a precisão e veracidade) como aumentou o poder de resolução, reduziu os fenómenos da supressão iónica e melhorou a simetria dos picos [125].

A espectrometria de massas em tandem (MS/MS) tem sido considerada uma ferramenta de identificação e confirmação. A monitorização dos fragmentos fornece uma discriminação muito superior do que um único quadrupolo (MS) [119], [126].

Face ao exposto, o UPLC-MS/MS foi utilizado como método de confirmação da libertação do ibuprofeno das matrizes poliméricas.

A análise foi realizada usando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência associado à espectrometria de massa tandem (UPLC-MS/MS), *Dionex Ultimate 3000 system, Thermo Scientific*, equipado com: bomba binária, injetor automático e forno de temperatura; coluna cromatográfica, C18, *Kinetex EVO 2,1 mm x 50 mm x 2,6 µm, Phenomenex*; e espectrômetro de massa de triplo quadrupolo, *TSQ Endura, Thermo Scientific* com sonda de ionização por *electrspray* (ESI).

As Tabelas 4.6 e 4.7 apresentam as condições de operação do espectrômetro de massa e a composição do gradiente de eluição da análise cromatográfica, respetivamente.

Tabela 4.6 - Condições do espectrômetro de massa.

Gás de nebulização, dessolvatação e de cone	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Ionização	<i>Electrospray</i>
Extrator (V)	2
Temperatura da fonte (°C)	200
Temperatura de vaporização (°C)	300
Fluxo do gás no cone (L/h)	50

Tabela 4.7 - Gradiente do método cromatográfico em meio básico na análise por LC-MS/MS. Solvente A (água ultrapura + amónia 0,05%). Solvente B (Metanol grau LC, 99.9%, Merck).

Tempo (min)	Gradiente cromatográfico (fluxo: 0,5 mL/min)	
	Solvente A, %	Solvente B, %
0,0	70	30
3,0	30	70
5,5	10	90
8,0	10	90
10,0	70	30
11,0	70	30
14,0	---	---

O ião precursor é obtido através da ionização do composto, por *electrospray*, sendo utilizado o azoto como gás de nebulização, dessolvatação e de cone, e por aplicação de voltagem na fonte de ionização (voltagem do capilar) e no cone de extração (voltagem de cone).

A Tabela 4.8 apresenta a janela de tempo de retenção para a análise do ibuprofeno, nas quais são definidas as condições de monitorização: modo de ionização (MI), voltagem de cone, transição MRM1 e energia de colisão.

Tabela 4.8 - Condições ótimas de análise do ibuprofeno por UPLC-MS/MS.

Fármaco	MI	Voltagem cone (V)	Janela de tempo de retenção (tempo de retenção, tR) (min)	Transição MRM Ião precursor – Ião produto		Energia de colisão (eV)
Ibuprofeno	-	15	1,0-4,0 (1,62)	MRM1	205,1 → 161,1	10

Para quantificar o ibuprofeno, injetaram-se 6 padrões de calibração de ibuprofeno em água, numa gama de concentrações entre 1,6 µg/L a 14,5 µg/L. A curva de calibração ( $y = bx + a$ ), área versus concentração teve como critérios de aceitação para o coeficiente de determinação e para o coeficiente de variação,  $R^2 \geq 0,995$  e  $CV_m \leq 5,0\%$ , respetivamente.

Os meios de libertação analisados através desta técnica foram escolhidos de forma aleatória e numa fase inicial dos testes de libertação, uma vez ter sido uma técnica usada como método de confirmação de libertação de IBU. Deste modo, foram analisados os meios para dois estímulos do Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, seis estímulos do Sistema Único PPI<sub>90</sub>, dois estímulos do Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub> e dois estímulos do Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>, apresentados na Tabela 5.7 do capítulo seguinte.

#### 4.4.6 Protótipo de Libertação de Fármaco

Depois de todos os testes de libertação efetuados, analisaram-se os resultados de modo a verificar quais as tensões que melhor controlam a libertação de fármaco, a que mais retém o fármaco e a que melhor estimula a sua libertação. Posteriormente, verificaram-se estes em dois protótipos de um sistema transdérmico de libertação controlada de fármaco usando o sistema Rebordo PPI<sub>90</sub> e o sistema Único PPI<sub>90</sub>.

O protótipo desenvolvido é constituído por um divisor de tensão constituído por uma bateria externa, uma resistência, um potenciómetro, um fio de prata, os respetivos sistemas de membranas escolhidos, fita condutora e um penso adesivo de feridas.

A bateria externa usada foi uma pilha comercial de botão de 1,5 V. Uma vez que as tensões estudadas são bastante reduzidas, no protótipo foram incluídas resistências. Para além disso, utilizou-se um potenciômetro de modo a ajustar a resistência necessária a cada sistema de libertação, e conseguir intercalar entre duas tensões distintas num único circuito.

Para se proceder ao estudo da libertação com o protótipo montou-se o circuito elétrico e ligou-se o mesmo ao sistema de membranas escolhido para teste através de um crocodilo ligado à fita condutora que está colada à parte superior da membrana. Por cima da membrana foi colocado um penso adesivo de feridas para simular o penso a ser estudado e ao lado foi colado um fio de prata com 0,1 mm de diâmetro (correspondendo ao que havia disponível) à parte inferior do adesivo do penso. Durante toda a libertação teve-se um multímetro ligado ao circuito de modo a garantir que as tensões a serem aplicadas estavam corretas e não sofriram alterações durante o estudo.

A montagem experimental do protótipo encontra-se representada na Figura 4.10.A e o esquemático do divisor de tensão na Figura 4.10.B. Neste divisor de tensão  $V_{in}$  corresponde à fonte de tensão que neste caso é a pilha de 1,5 V,  $R_1$  é uma resistência de 320  $\Omega$ ,  $V_{out}$  corresponde à tensão de saída que está a ser aplicada na membrana e  $R_2$  refere-se ao potenciômetro que funciona entre 0 e 47  $\mu\Omega$ .

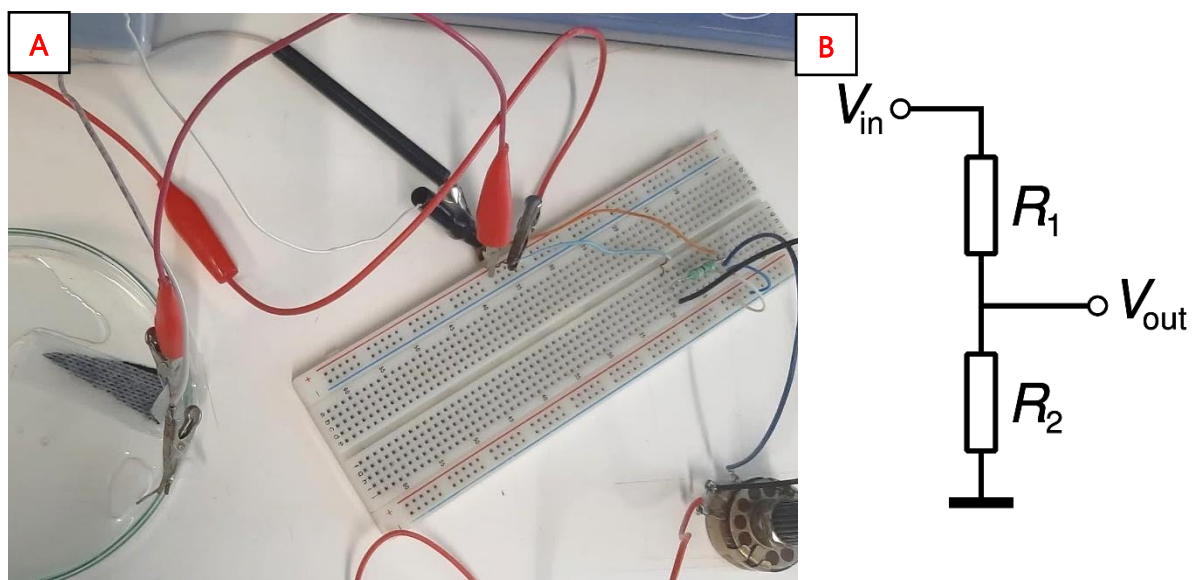


Figura 4.10 - A: Montagem experimental do protótipo do Sistema Único PPI<sub>90</sub>. B: Divisor de tensão do circuito.

Aquando do teste de libertação colocaram-se 20 mL de SBF numa placa de *petri* de vidro e montou-se o circuito de modo que o primeiro estímulo aplicado fosse o da tensão que retém

o fármaco, ou seja, o estímulo de tensão negativa. Posteriormente, inseriu-se o sistema de membranas na placa ligou-se o circuito e começou-se a contar o tempo. Findo o tempo estipulado analisou-se o meio, obteve-se o espectro de absorção do primeiro minuto e colocou-se o meio de volta à placa de *petri*. De seguida, rodou-se o potenciômetro de modo a alcançar o outro valor de tensão e inverteram-se os terminais da pilha de modo à tensão ficar positiva e estimular a libertação do fármaco. Este processo foi intercalado até o estudo ser terminado.

A ideia futura com este protótipo é produzir um penso como o simulado na Figura 4.11 no qual, durante a sua utilização, está sempre a ser aplicado um estímulo negativo para reter o fármaco e por isso a luz vermelha está sempre acionada. No entanto, quando se pretende libertar o fármaco para atingir o seu alvo terapêutico, pressiona-se o botão que induz à libertação e enquanto o mesmo está em utilização a luz vermelha apaga-se e a luz verde acende-se.

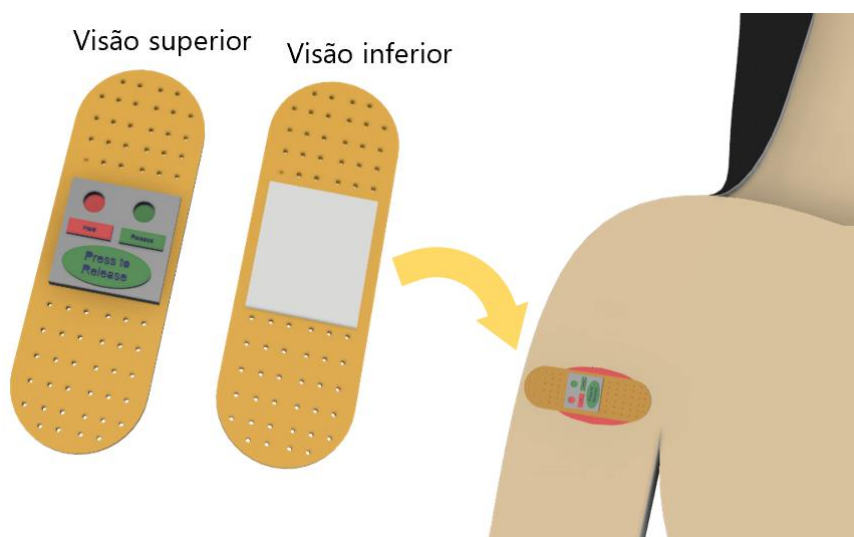


Figura 4.11 - Simulação do protótipo a ser produzido.



## APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados do trabalho experimental desenvolvido. Em primeiro lugar, apresentam-se os resultados relativos à presença de fármaco (ibuprofeno) e à correta funcionalização das membranas, através da análise por espectroscopia *Raman* e depois a análise morfológica das membranas por microscopia ótica e por SEM. A funcionalização das membranas e o respetivo impacto na condutividade elétrica em duas configurações, planar e transversal, também é discutida. Segue-se a avaliação do comportamento eletroquímico das membranas através da análise por voltametria cíclica. Por fim discutem-se os resultados referentes à libertação controlada do fármaco das membranas produzidas.

### 5.1 Análise Química

O correto encapsulamento do ibuprofeno (IBU) e funcionalização das membranas de acetato de celulose (mAC) com polipirrol (PPI) e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) foram avaliados por espectroscopia *Raman*. A Figura 5.1-A mostra os espectros obtidos dos constituintes individuais das membranas no seu estado original, nomeadamente, o PEDOT, o PPI, o AC e o IBU. Através da análise destes espectros é possível identificar os picos característicos de cada composto isoladamente, os quais permitem a sua identificação posterior nas membranas funcionalizadas. A Figura 5.1-B apresenta os espectros referentes às membranas funcionalizadas com PPI, nomeadamente PPI<sub>90</sub>/AC:IBU e PPI<sub>90</sub>/AC, bem como de uma membrana de acetato de celulose com ibuprofeno (AC:IBU). A Figura 5.1-C apresenta os espectros referentes às

membranas funcionalizadas com PEDOT, nomeadamente PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU e PEDOT<sub>120</sub>/AC, e mais uma vez uma membrana de AC:IBU.

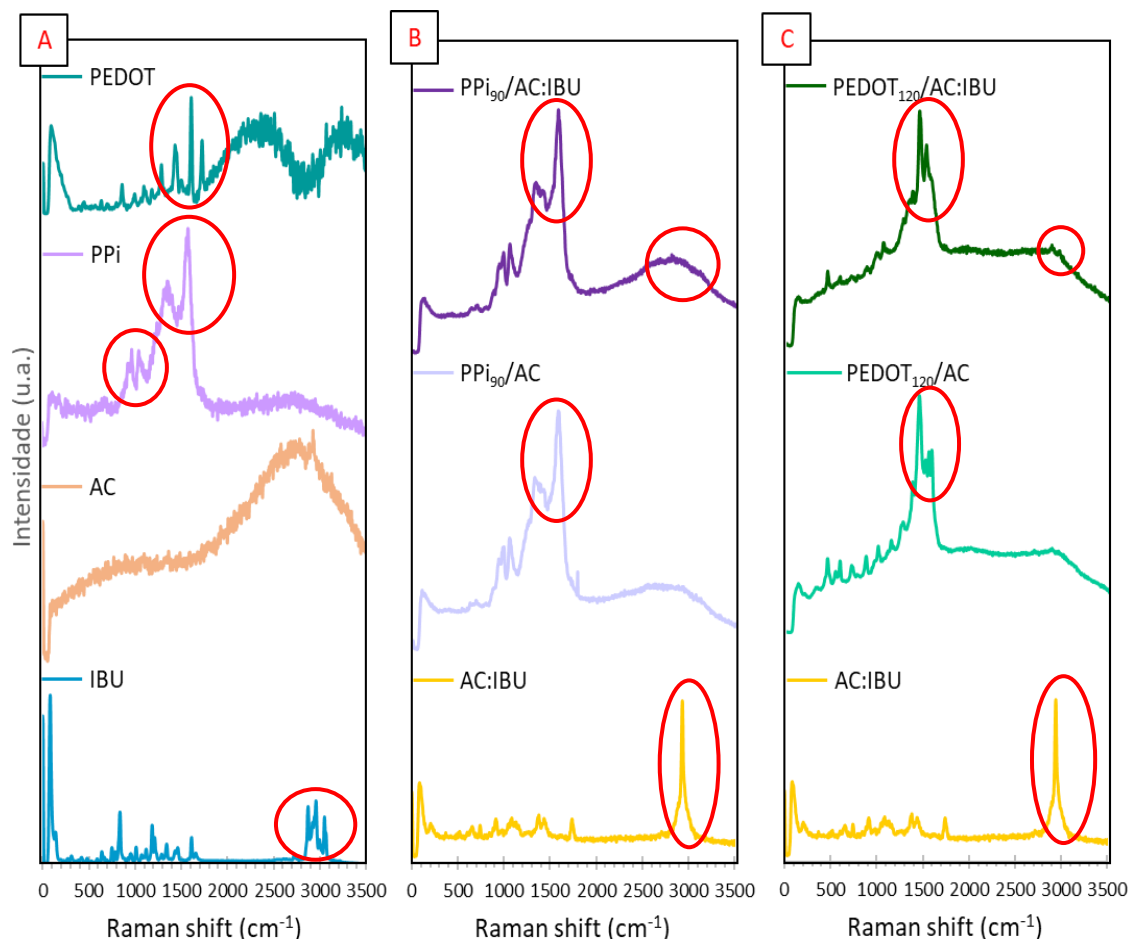


Figura 5.1 - A: Espectros Raman padrão de PEDOT, PPI, AC e IBU. B: Espectros Raman de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, PPI<sub>90</sub>/AC e AC:IBU. C: Espectros Raman de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU, PEDOT<sub>120</sub>/AC e AC:IBU.

Como cada composto tem um espectro característico e único, o conjunto de picos que o identifica nunca é idêntico ao de um outro composto. Por esse motivo torna-se possível identificar a sua presença num dado material através da pesquisa dos seus picos característicos. A Figura 5.1-B e 5.1-C mostra claramente a assinatura espectral de novos grupos funcionais nas membranas de acetato de celulose, principalmente, os que estão destacados nos círculos a vermelho.

Como anteriormente relatado [127], os picos característicos do PPI situam-se nos 928 cm<sup>-1</sup>, 971 cm<sup>-1</sup>, 1048 cm<sup>-1</sup>, 1365 cm<sup>-1</sup> e 1584 cm<sup>-1</sup>. Os dois primeiros picos são fracos e correspondem a vibrações de deformação do anel de glicose, o pico a 1048 cm<sup>-1</sup> é devido à deformação simples no plano C-H e os dois últimos picos podem ser atribuídos ao alongamento do

anel e da ligação C=C e aos modos de vibração de alongamento. Na Figura 5.1-B identificaram-se os picos  $971\text{ cm}^{-1}$ ,  $1048\text{ cm}^{-1}$ ,  $1365\text{ cm}^{-1}$  e  $1584\text{ cm}^{-1}$ , o que evidencia claramente que a funcionalização do PPI foi bem-sucedida, ou seja, o PPI está a revestir a superfície das fibras das membranas.

Relativamente aos picos característicos do PEDOT, estes situam-se nos  $1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1380\text{ cm}^{-1}$ ,  $1451\text{ cm}^{-1}$  e  $1519\text{ cm}^{-1}$  [128], tal como observado no espectro de referência. Estes picos correspondem aos modos de vibração de alongamento da ligação C-C, ao alongamento da ligação C-C, ao alongamento da ligação simétrica C=C e ao alongamento da ligação assimétrica C=C, respetivamente. Na Figura 5.1-C identificaram-se os picos  $1451\text{ cm}^{-1}$  e  $1519\text{ cm}^{-1}$ , o que evidencia claramente que a funcionalização do PEDOT ocorreu com sucesso.

Ao analisar os espectros de referência do IBU, os picos característicos identificados e os mais relevantes para a amostra em estudo foram  $2869\text{ cm}^{-1}$ ,  $2957\text{ cm}^{-1}$  e  $3047\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo a uma banda na região  $2850\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  [129]. Estes picos correspondem ao alongamento da ligação C-H, ao alongamento simétrico da ligação  $\text{CH}_3$  e ao alongamento antissimétrico da ligação H-C-C-H, respetivamente [130]. Como indicado na Figura 5.1-B e 5.1-C, esta banda é proeminente no espectro Raman das membranas PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU e AC:IBU, evidenciando também que o fármaco está incorporado nas mesmas. É de notar que na membrana PPI<sub>90</sub>/AC:IBU a presença de IBU não é tão evidente quanto a do polímero condutor, uma vez que a quantidade de fármaco presente nas membranas é bastante reduzida em proporção com as quantidades dos restantes materiais. No entanto, na região da banda dos picos característicos de IBU é possível identificar uma intensidade superior do espectro em comparação com a mesma região do espectro da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC sem IBU, evidenciando que o composto pode estar presente, mas não em quantidades significativas que o permitam ser identificado. O mesmo acontece nos espectros relativos à funcionalização com PEDOT, contudo, no espectro de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU é possível identificar os picos a  $2869\text{ cm}^{-1}$  e  $2957\text{ cm}^{-1}$ , embora com uma intensidade bastante reduzida. Face ao espectro de AC:IBU identificou-se o pico de  $2957\text{ cm}^{-1}$  para a presença de IBU.

Não era expectável observar grandes diferenças de composição nas amostras com e sem IBU, uma vez que a concentração do fármaco é baixa relativamente à quantidade de polímero, e muito difícil de detetar por esta técnica de Raman. Deste modo, os espectros aqui apresentados evidenciam principalmente a assinatura espectral do polímero utilizado, porém, em alguns dos casos, a assinatura espectral do ibuprofeno é identificada.

Após este estudo, as membranas foram subsequentemente usadas para produzir os sistemas de membranas direcionados para a libertação controlada do fármaco através de um

estímulo elétrico. Após os testes de libertação, a espectroscopia Raman também foi usada nas membranas revestidas com PPI e com PEDOT, as quais foram utilizadas para construir os sistemas de rebordo nas membranas inicialmente impregnadas com o fármaco e revestidas também com os polímeros condutores, de forma a criar um sistema único. O objetivo desta análise é verificar se, o fármaco migrou para as membranas funcionalizadas adjacentes ou não no caso dos sistemas de rebordo, e se o fármaco migrou para a superfície da membrana ou se foi todo libertado para o meio, no caso dos sistemas únicos.

A Figura 5.2 apresenta os espectros Raman obtidos após os testes de libertação do fármaco. Na Figura 5.2-A encontra-se o espectro PPI<sub>90</sub>/AC:IBU que corresponde à membrana do Sistema Único PPI<sub>90</sub> e o espectro PPI<sub>90</sub>/AC que corresponde a uma das membranas adjacentes funcionalizadas do Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>. Na Figura 5.2-B encontra-se o espectro PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU que corresponde à membrana do Sistema Único PEDOT<sub>120</sub> e o espectro PEDOT<sub>120</sub>/AC que corresponde a uma das membranas adjacentes funcionalizadas do Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>.

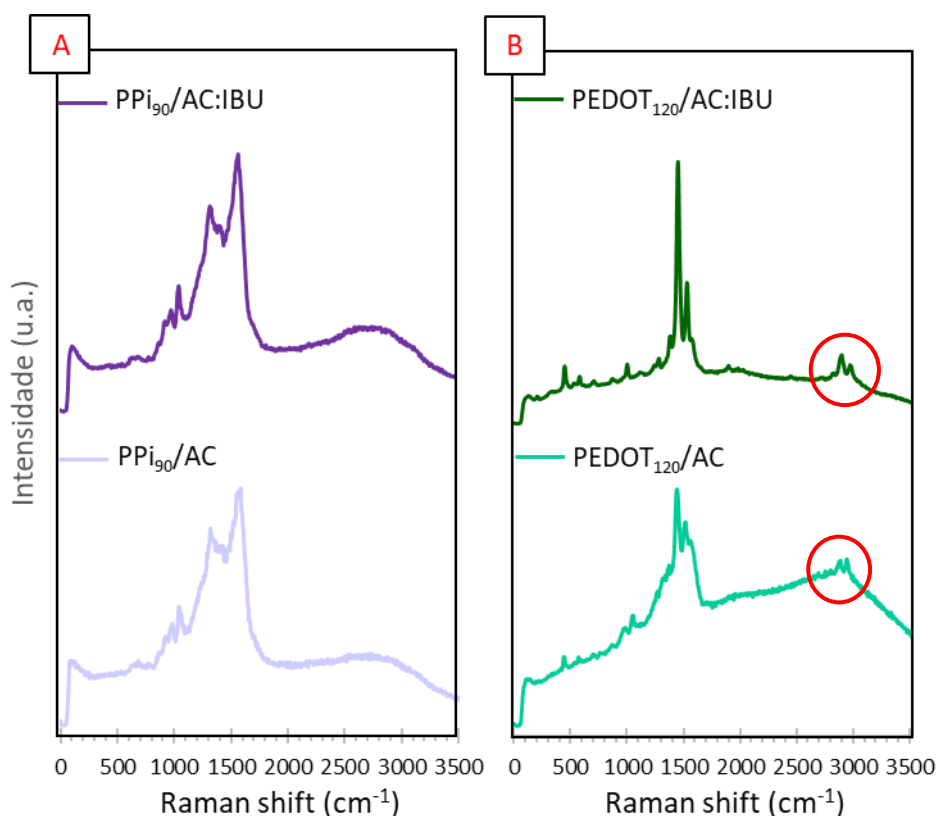


Figura 5.2 - A: Espectros Raman de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU e PPI<sub>90</sub>/AC. B: Espectros Raman de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU e PEDOT<sub>120</sub>/AC.

Os espectros Raman da Figura 5.2-A coincidem com os espectros de PPI da Figura 5.1-B. A membrana PPI<sub>90</sub>/AC:IBU do Sistema Único PPI<sub>90</sub> analisado antes da libertação não apresenta vestígios de fármaco. Isso pode estar relacionado com a quantidade de fármaco ser muito baixa, devido à não uniformidade da distribuição de fármaco durante a eletrofiação, implicando uma distribuição não uniforme do fármaco nas 16 membranas pequenas e triangulares, recortadas da membrana total produzida. Outra causa pode ser a concentração de ibuprofeno muito baixa o que implica que o fármaco liberta-se todo para o meio durante a funcionalização e consequentemente não se obtém nenhum pico característico do IBU no espectro de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU após o teste de libertação. Relativamente ao espectro de PPI<sub>90</sub>/AC a hipótese para a inexistência de picos de IBU é a mesma da sugerida para o espectro de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, sendo que esta análise Raman é feita na face interna destas membranas que está em contacto com a membrana central de AC:IBU. Portanto, pode-se colocar a hipótese de o IBU ser completamente libertado da membrana central de AC:IBU existente no Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, posteriormente atraído pelas membranas adjacentes de PPI e, por fim, libertado, dado o estímulo elétrico aplicado durante o ensaio de libertação.

A Figura 5.2-B mostra um espectro de Raman do PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU onde se identificam picos característicos do IBU aos 2869 cm<sup>-1</sup> e aos 2957 cm<sup>-1</sup>, o que leva a concluir que o IBU não foi completamente libertado durante o teste de libertação do Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>. Além disso, a análise Raman efetuada na face interna de uma das membranas PEDOT<sub>120</sub>/AC adjacentes à membrana central de AC:IBU existente no Rebordo PEDOT<sub>120</sub> evidencia também a presença de IBU através dos picos 2869 cm<sup>-1</sup> e aos 2957 cm<sup>-1</sup>, o que leva a concluir que o IBU foi libertado da membrana central de AC:IBU existente no Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, posteriormente atraído pelas membranas adjacentes de PEDOT e, por fim, retido devido ao estímulo elétrico aplicado durante a libertação.

Estes resultados comprovam a possibilidade de encapsular IBU em membranas de AC e controlar a sua libertação através de estímulos elétricos de baixo potencial.

## 5.2 Análise Morfológica

As membranas eletrofiadas e revestidas com polímeros condutores (PPI e PEDOT) foram avaliadas quanto à sua morfologia através da microscopia ótica e da microscopia eletrónica de varrimento (do inglês, SEM). O objetivo destas análises é verificar se as membranas produzidas por eletrofiação possuem uma distribuição uniforme de diâmetros, se o material depositado

para funcionalizar as fibras cobre uniformemente as mesmas e se os testes de libertação afetaram a morfologia das fibras.

### 5.2.1 Microscopia Ótica

A observação através do microscópio ótico realizou-se com a intenção de comparar a superfície de uma membrana de acetato de celulose normal com uma membrana de acetato de celulose funcionalizada.

A Figura 5.3-A mostra uma imagem da membrana de AC onde é possível identificar algumas fibras de diâmetros muito reduzidos e difíceis de analisar, mesmo a partir da ampliação mais elevada do microscópio utilizado (200x). Para além disso, torna-se difícil visualizar se existem fibras fundidas e se a sua distribuição é uniforme. A Figura 5.3-B mostra uma imagem da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC onde é possível observar texturização da superfície devido à polimerização sem que, no entanto, seja possível distinguir as fibras que a constituem e por isso avaliar se o PPI cobriu uniformemente as mesmas.

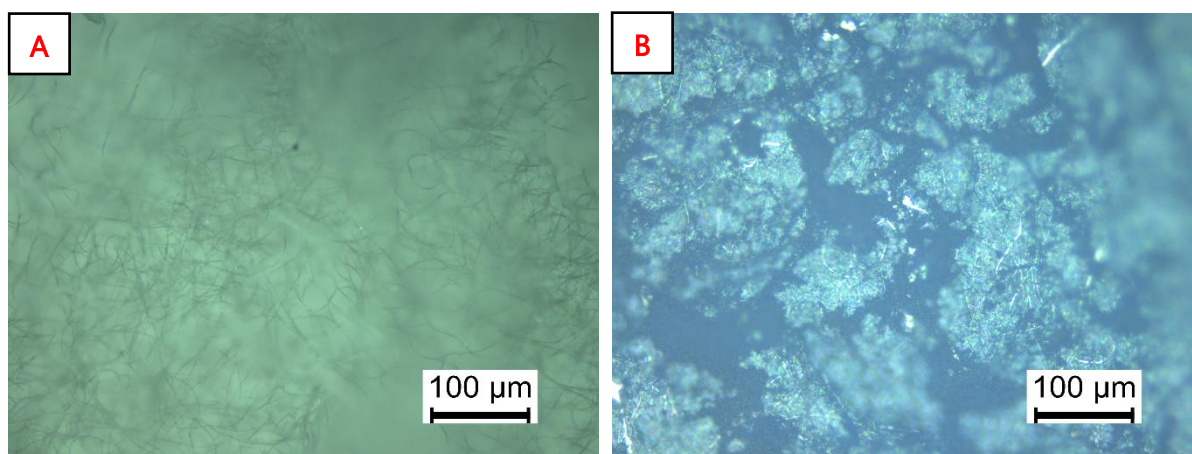


Figura 5.3 - A: Membrana de AC observada no microscópio ótico com ampliação de 200x; B: Membrana de PPI<sub>90</sub>/AC, observada no microscópio ótico com ampliação de 200x.

Dada a reduzida dimensão das fibras da membrana de AC e da limitação de ampliação desta técnica, não foi possível fazer uma análise comparativa das membranas de PPI e PEDOT, de modo a avaliar a uniformidade no revestimento das fibras. Por este motivo as membranas foram analisadas por SEM.

## 5.2.2 SEM

Como referido na secção 4.3.2 a morfologia das membranas poder ser observada à nanoescala com esta técnica, permitindo visualizar as fibras que as constituem e também o revestimento quando funcionalizadas com PPI ou PEDOT.

### 5.2.2.1 Membranas de AC e AC:IBU

A Figura 5.4 apresenta as imagens de SEM das fibras da membrana de AC. As imagens evidenciam a aleatoriedade das direções das fibras, bem como uma distribuição relativamente elevada dos diâmetros das fibras,  $467 \pm 196$  nm (Figura 5.4-B). Estes valores foram estimados utilizando o programa de processamento de imagem *ImageJ*<sup>®</sup>, realizando 30 medições aleatórias por membrana na imagem de maior ampliação.

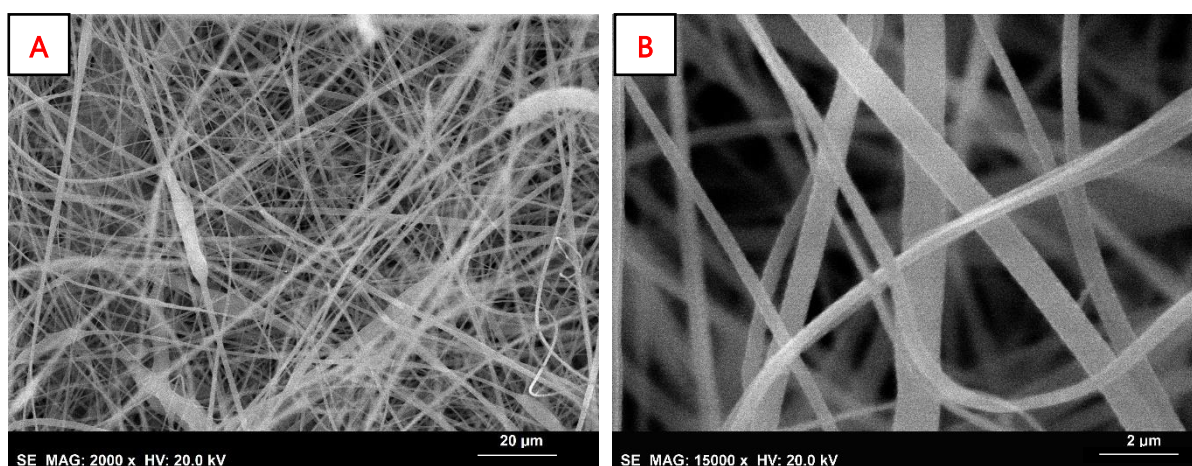


Figura 5.4 - Imagens de SEM das fibras da membrana de AC obtidas por eletrofiação. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respetivamente.

Comparando as fibras da Figura 5.4 com as da Figura 5.5 correspondentes às membranas de AC:IBU observa-se também a mesma deposição aleatória de fibras bem como a sua elevada dispersão em termos do diâmetro das fibras,  $667 \pm 191$  nm. Pelas imagens não é possível detectar a presença de IBU nas fibras, contudo, o diâmetro das fibras com IBU é superior ao das fibras sem o fármaco. Esta diferença pode ser explicada pelo aumento da viscosidade da solução com a adição do fármaco, levando à formação de fibras de maiores diâmetros, correspondendo neste caso a um aumento de cerca de 30% no diâmetro médio das fibras. A Figura 5.5-B revela algumas fibras fundidas que podem ser justificadas por uma alteração dos parâmetros ideais de humidade e temperatura durante o processo de eletrofiação, que podem afetar a

viscosidade da solução, mas principalmente provocam uma alteração na taxa de evaporação do solvente, levando assim à formação de fibras não uniformes e defeituosas.

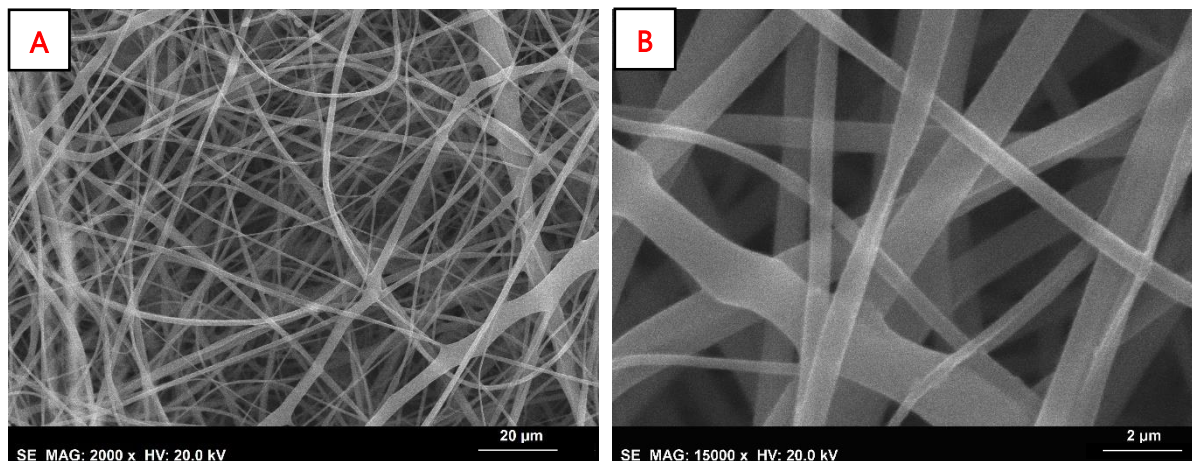


Figura 5.5 - Imagens de SEM das fibras da membrana de AC:IBU obtidas por eletrofiação. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respectivamente.

#### 5.2.2.2 Membranas de AC e AC:IBU funcionalizadas com PPI

As imagens das Figura 5.6 e a Figura 5.7 são referentes à membrana PPI<sub>90</sub>/AC antes e após o teste de libertação de fármaco (utilizada no Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>), respectivamente.

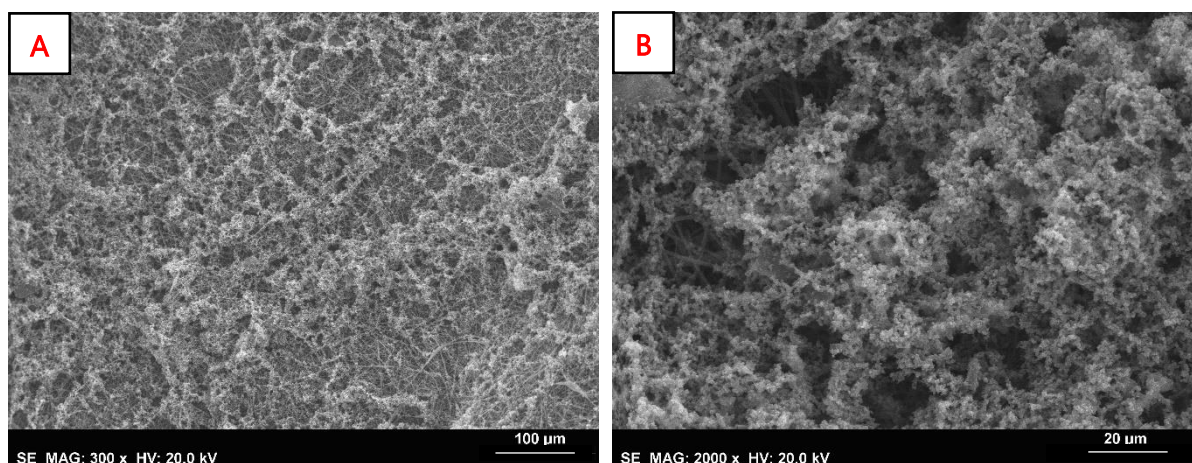


Figura 5.6 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 300x. B: Ampliação de 2000x. A barra é referente a uma escala de 100 µm e 20 µm, respectivamente.

A Figura 5.6, mostra claramente que existe uma camada de PPI ao longo de toda a superfície das fibras, observando-se inclusive a existência de aglomerados deste polímero na

Figura 5.6-B. Atendendo a que a polimerização foi de 90 minutos, seria expectável obter-se um bom recobrimento das fibras pelo PPI [33].

Da Figura 5.7, observa-se que depois do teste de libertação, a membrana apresenta menos aglomerados do polímero condutor, sendo possível observar as fibras, o que não era tão evidente na imagem de SEM antes da libertação. Tal leva à conclusão de que há uma perda de revestimento para o meio. É também evidente uma diminuição no diâmetro médio das fibras. Inicialmente estas fibras possuíam  $596 \pm 151$  nm de diâmetro, obtendo-se um diâmetro de  $476 \pm 165$  nm nas membranas utilizadas no sistema de libertação do fármaco, o que pode estar relacionado com alguma variação do diâmetro das fibras ao longo membranas.

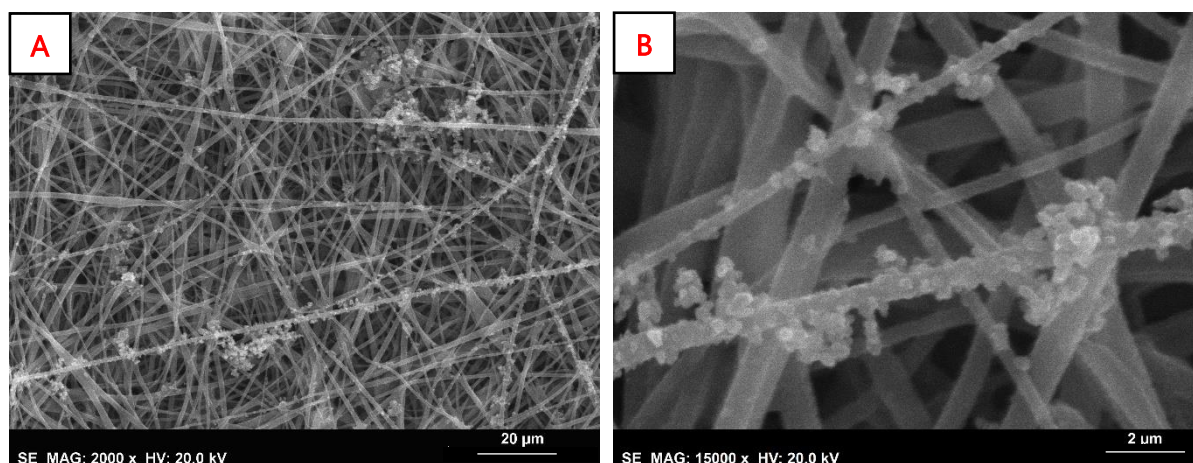


Figura 5.7 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respetivamente.

As Figura 5.8 e a Figura 5.9 mostram as imagens de SEM de uma membrana PPI<sub>90</sub>/AC:IBU antes e após o teste de libertação de fármaco, respetivamente, membrana utilizada para produzir o Sistema Único PPI<sub>90</sub>.

As membranas polimerizadas com PPI, mas sem IBU, não apresentam redução significativa do diâmetro médio das fibras após o ensaio de libertação do fármaco. Apesar do valor médio ser ligeiramente inferior, a variação é maior nas fibras depois da libertação, pelo que não se pode afirmar estar diretamente relacionado com o processo de libertação, mas sim com a variação do diâmetro das fibras ao longo da membrana,  $513 \pm 79$  nm nas membranas antes e  $507 \pm 173$  nm após libertação. No entanto, comparando a Figura 5.8-B com a Figura 5.9-B, também é possível verificar que após a libertação não ocorreu uma perda do revestimento de PPI, apesar da imagem de maior ampliação poder indicar isso (o que se deve à ampliação de

uma zona menos coberta por PPI), mas a imagem de menor ampliação mostra claramente um elevado revestimento das fibras.

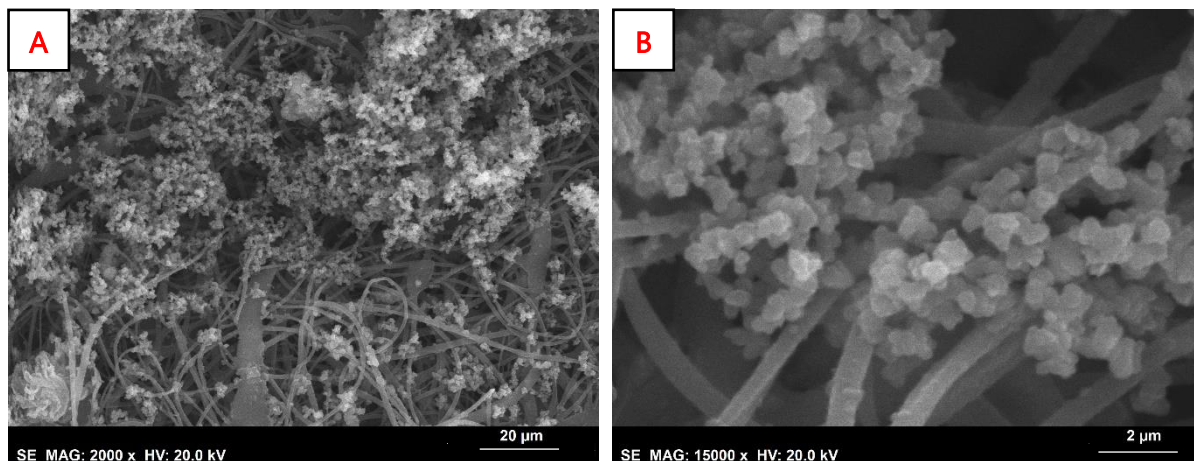


Figura 5.8 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU obtidas por eletrofição, antes do teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respetivamente.

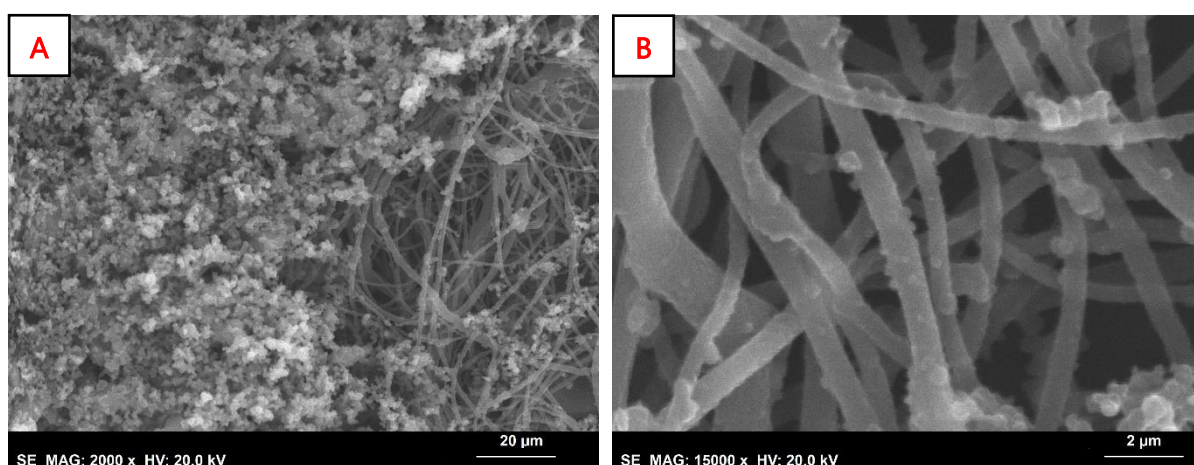


Figura 5.9 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU obtidas por eletrofição, após o teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respetivamente.

### 5.2.2.3 Membranas de AC e AC:IBU funcionalizadas com PEDOT

As Figura 5.10 e a Figura 5.11 apresentam as imagens de SEM das membranas de AC funcionalizadas com PEDOT e as de uma membrana PEDOT<sub>120</sub>/AC antes e após o teste de libertação de fármaco, respetivamente (Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>).

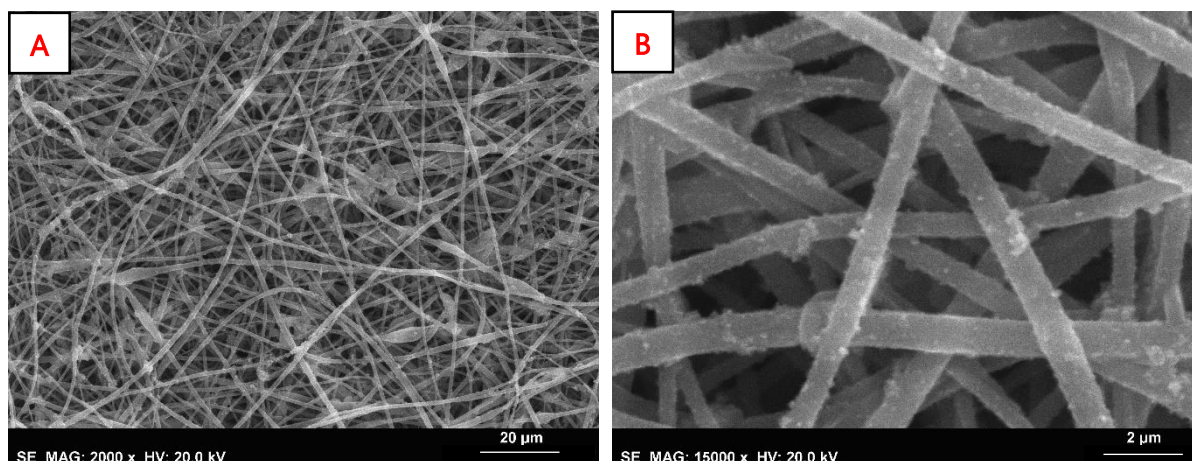


Figura 5.10 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT<sub>120</sub>/AC obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respetivamente.

Na Figura 5.10-A, observam-se bastantes fibras aleatoriamente distribuídas, mas com um revestimento bastante uniforme de PEDOT ao longo de toda a superfície das fibras, mais evidenciado comparando as fibras de AC da figura 5.4 com as da Figura 5.10-B. A forma como o PEDOT reveste as fibras é mais uniforme e aparentemente mais homogénea do que o PPI. Isto deve-se ao facto de a polimerização do PEDOT ocorrer na fase gasosa. Mesmo que se possam ter formado alguns aglomerados durante a funcionalização, a lavagem das membranas após funcionalização elimina restos de PEDOT não aderidos às fibras.

Na Figura 5.10-A identificam-se algumas fibras fundidas, bem como alguns nódulos. Comparando com a Figura 5.11, observa-se que depois do teste de libertação a membrana apresenta menos vestígios do polímero condutor, o que indica que o mesmo pode ter sido libertado para o meio durante o processo de libertação de fármaco. Observa-se uma diminuição no diâmetro médio das fibras nas membranas após o teste de libertação, que pode estar relacionado com uma variabilidade da dimensão das fibras ou à libertação de fármaco. O diâmetro médio das fibras da Figura 5.10-B é  $777 \pm 211$  nm das fibras da Figura 5.11-B é  $684 \pm 110$  nm.

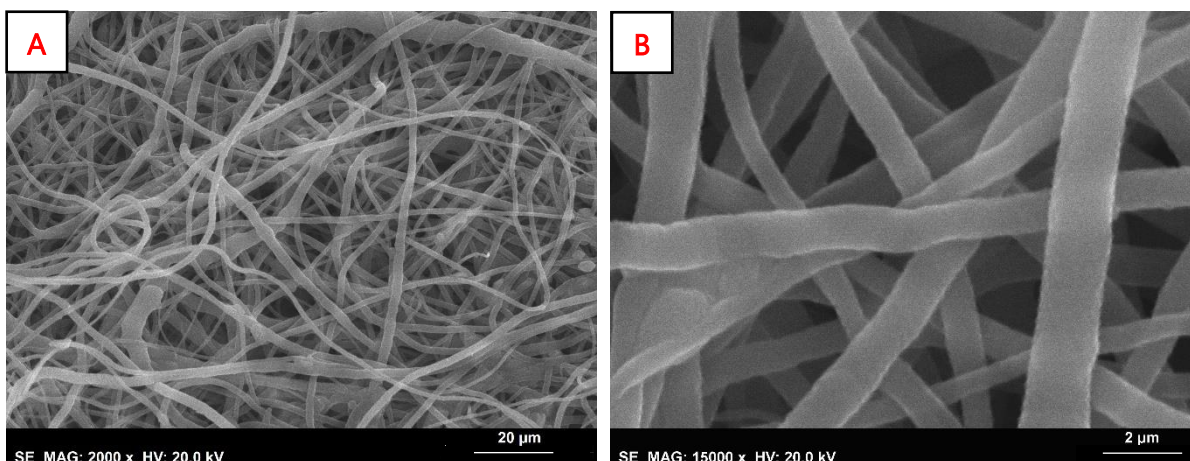


Figura 5.11 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT<sub>120</sub>/AC obtidas por eletrofiação, após o teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 2000x. B: Ampliação de 15000x. A barra é referente a uma escala de 20 µm e 2 µm, respectivamente.

Relativamente às membranas de AC:IBU funcionalizadas com PEDOT, as Figura 5.12 e a Figura 5.13 mostram as imagens de SEM de uma membrana PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU antes e após o teste de libertação de fármaco, respectivamente. De forma análoga às membranas de PPI, esta membrana foi utilizada no Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>.

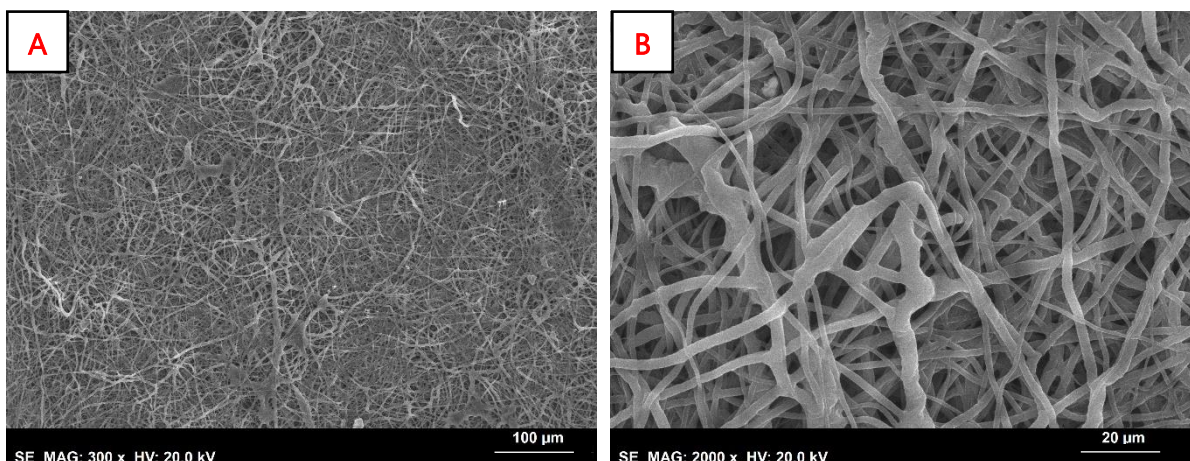


Figura 5.12 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU obtidas por eletrofiação, antes do teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 300x. B: Ampliação de 2000x. A barra é referente a uma escala de 100 µm e 20 µm, respectivamente.

O diâmetro médio medido nas imagens da Figura 5.11-A e 5.12-B são, respectivamente,  $777 \pm 211$  nm e  $945 \pm 143$  nm, o que pode estar relacionado com a variabilidade da dimensão das fibras ao longo da membrana ou devido à incorporação do fármaco. Esta última

possibilidade é razoável considerando que a presença de IBU em solução torna a solução mais viscosa levando a fibras de diâmetros maiores uma vez que o alongamento das gotas de solução é menor.

A Figura 5.13-B mostra a aleatoriedade e a não uniformidade das fibras, existindo fibras fundidas e nódulos.

A aparente redução do diâmetro das fibras, após os ensaios de libertação de fármaco, também se verifica nestas membranas o diâmetro médio das fibras, diminuiu de  $945 \pm 143$  nm para  $869 \pm 151$  nm. Apesar de haver alguma consistência nesta diminuição das fibras das membranas após libertação de fármaco, não se pode afirmar que esta exista devido à variação da dimensão das fibras ao longo das membranas.

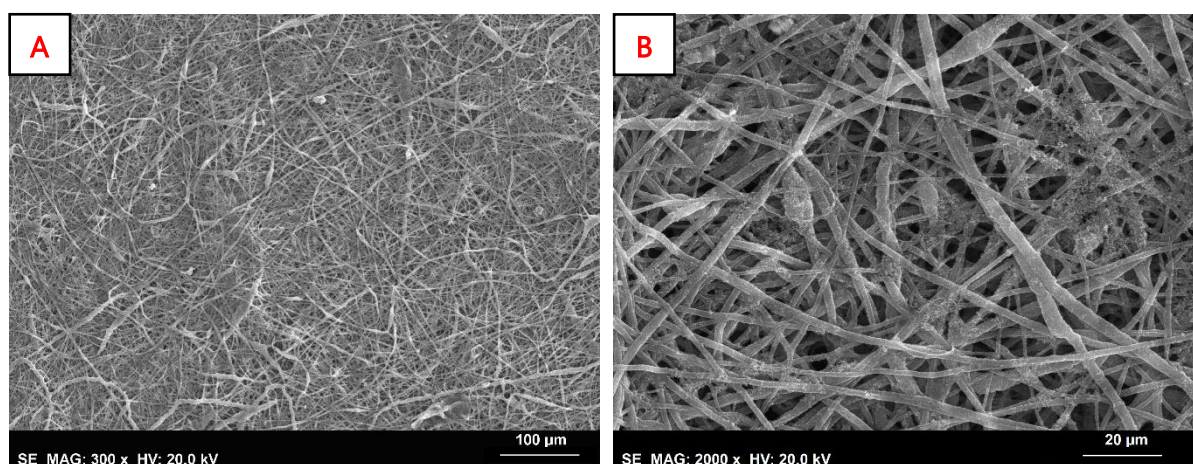


Figura 5.13 - Imagens de SEM das fibras da membrana de PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU obtidas por eletrofição, após o teste de libertação do fármaco. A: Ampliação de 300x. B: Ampliação de 2000x. A barra é referente a uma escala de 100 µm e 20 µm, respetivamente.

A morfologia das fibras das membranas funcionalizadas com PPI ou com PEDOT, com ou sem IBU, mantém-se praticamente inalteradas após serem submetidas aos testes de libertação de fármaco. Deste modo, estas membranas mantêm a sua integridade face aos testes de libertação.

### 5.3 Análise da Condutividade Elétrica

A funcionalização foi verificada medindo a condutividade das membranas, como referido na secção 4.3.4. De modo a avaliar a uniformidade dos revestimentos das fibras mediu-se a condutividade planar (na superfície da membrana) e transversal (entre as duas faces da

membrana). A condutividade foi medida nas membranas logo após a funcionalização e passado algum tempo, para avaliar a degradação do revestimento quando exposto às condições atmosféricas. Para além disso, a condutividade das membranas foi também medida após os ensaios de libertação do fármaco para verificar a degradação do mesmo.

### 5.3.1 Evolução da condutividade ao longo do tempo

As membranas de AC foram funcionalizadas tanto com PPI como com PEDOT. Com base em trabalhos anteriores para a funcionalização das membranas com PPI foram selecionados dois tempos de polimerização diferentes, 45 minutos e 90 minutos e para a funcionalização das membranas com PEDOT 120 minutos. A Figura 5.14 mostra os valores de condutividades planares médias (3 réplicas) para membranas de AC, PPI<sub>45</sub>/AC, PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC, obtidos logo após a sua funcionalização e ao fim de 3 e 5 meses.

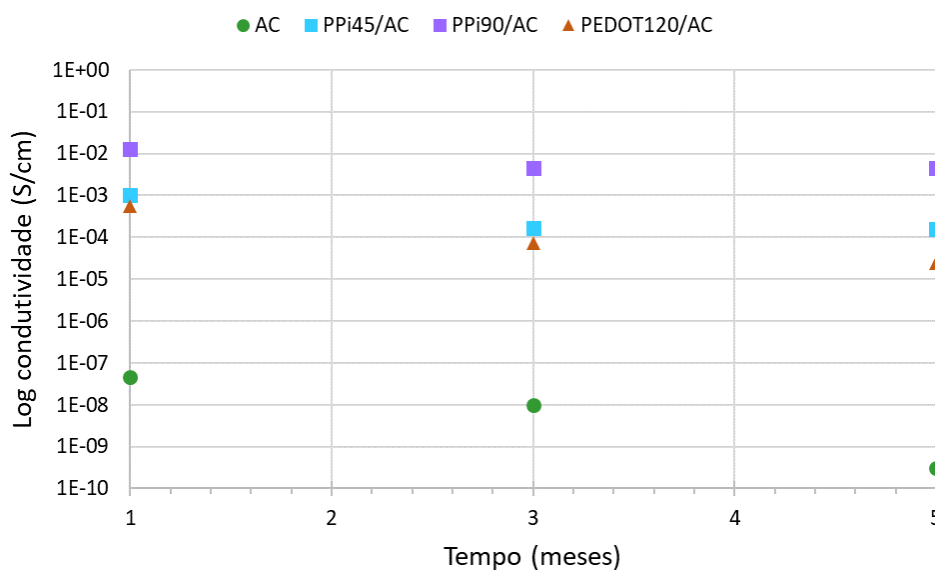


Figura 5.14 - Condutividade (S/cm) planar em função do tempo (meses) de exposição das membranas de AC, PPI<sub>45</sub>/AC, PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC à pressão e condições atmosféricas do laboratório.

A condutividade planar para a membrana de AC é muito baixa,  $4,71 \times 10^{-8} \pm 2,26 \times 10^{-9}$  (S/cm), e decresce em duas ordens de grandeza após 5 meses,  $3,02 \times 10^{-10} \pm 3,26 \times 10^{-11}$  (S/cm). As membranas polimerizadas com PPI, para um tempo de polimerização de 90 minutos, apresentam os valores mais elevados de condutividade,  $1,29 \times 10^{-2} \pm 1,73 \times 10^{-4}$  (S/cm), que ao fim de 5 meses diminuíram numa ordem de grandeza para  $4,47 \times 10^{-3} \pm 1,30 \times 10^{-5}$  (S/cm).

Observa-se que com o passar do tempo 3 e 5 meses, em todas as membranas, há um ligeiro decréscimo de condutividade elétrica. No caso das membranas revestidas com PPI o decréscimo poderia estar relacionado com uma oxidação do polímero devido ao facto de as membranas após funcionalizadas ficarem a secar à temperatura ambiente e por isso ficam em contacto com o ar do meio envolvente [131], [132].

A condutividade das membranas funcionalizadas com PEDOT apresenta valores semelhantes às de PPI<sub>45</sub> na ordem dos  $10^{-4}$  (S/cm) e  $10^{-5}$  (S/cm) logo após a produção e passados 5 meses, respetivamente, com um desvio padrão associado na ordem dos  $10^{-6}$  (S/cm).

Em relação à condutividade transversal, tal como no caso anterior, as medições foram repetidas logo após a respetiva produção, após 3 e 5 meses para as mesmas membranas, sendo estes resultados demonstrados no gráfico da Figura 5.15 uma média de 3 medições efetuadas de condutividade para cada membrana.

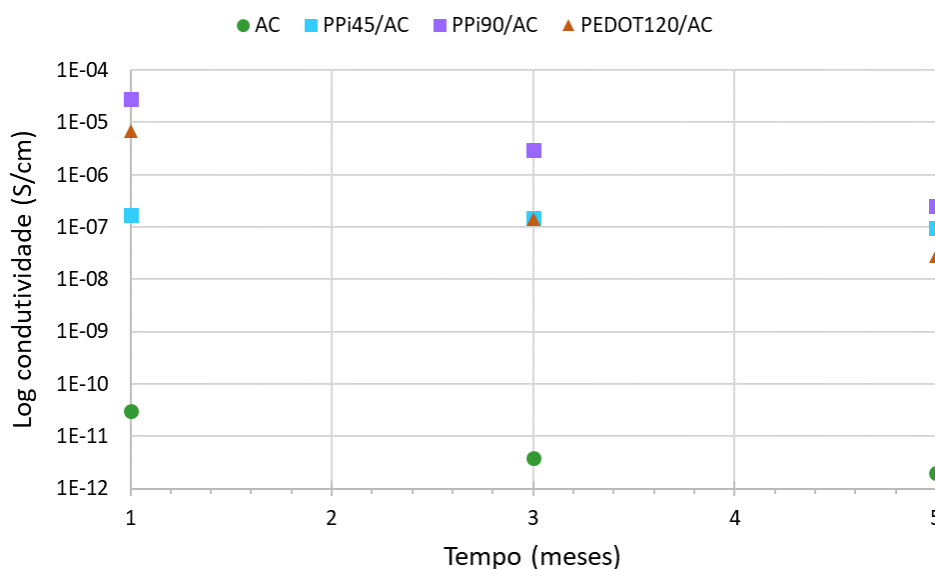


Figura 5.15 - Condutividade (S/cm) transversal em função do tempo (meses) de exposição das membranas de AC, PPI<sub>45</sub>/AC, PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC à pressão e condições atmosféricas do laboratório.

A condutividade transversal da membrana de AC apresenta valores menores,  $3,04 \times 10^{-11} \pm 4,15 \times 10^{-12}$  (S/cm), e decresce em uma ordem de grandeza após 5 meses, para  $1,95 \times 10^{-12} \pm 6,37 \times 10^{-14}$  (S/cm). As membranas de PPI e PEDOT apresentam uma degradação da condutividade com o tempo devido à respetiva reação com o oxigénio tal como já mencionado [131], [132], que afeta maioritariamente a superfície das membranas. No geral a variação da condutividade com o tempo tem a mesma tendência de a apresentada na

condutividade planar. No entanto os valores de condutividade planar, são superiores à condutividade transversal (ao longo da espessura). Isto acontece porque o revestimento à superfície (planar) forma um filme uniforme que possivelmente não atravessa a espessura da membrana de um modo uniforme e/ou contínuo. Isso deve-se ao facto de que tanto o agente oxidante, neste estudo o  $\text{FeCl}_3$ , como o monómero, neste caso o PPI ou o PEDOT, não penetrem ao longo da espessura da amostra, o que leva a uma menor existência de pontos de contacto entre as fibras revestidas com estes polímeros condutores. Como há mais espaços vazios entre fibras, há um menor número de pontos de contacto entre o polímero e por isso a deposição do polímero condutor não será uniforme, que desta forma dificulta os percursos dos eletrões, o que pode causar a menor condutividade transversal obtida ( $2,84 \times 10^{-5} \pm 1,46 \times 10^{-7}$  S/cm) em relação à condutividade planar ( $1,29 \times 10^{-2} \pm 1,73 \times 10^{-4}$  S/cm) no caso da membrana PPI<sub>90</sub>/AC.

Por outro lado, quanto maior o tempo de imersão em  $\text{FeCl}_3$ , maior será a quantidade de agente oxidante ao longo da espessura da amostra, no qual a polimerização ocorrerá mais facilmente, aumentando a condutividade transversal. Consequentemente, a espessura da membrana influencia de forma bastante significativa a impregnação do agente oxidante. Como as membranas estudadas apresentavam sensivelmente a mesma espessura, então para um tempo de polimerização maior, a condutividade transversal também será maior, justificando o facto de as membranas de PPI<sub>90</sub>/AC apresentarem condutividades superiores às de PPI<sub>45</sub>/AC.

Face às membranas de PEDOT<sub>120</sub>/AC, o seu decréscimo de condutividade ao longo dos meses acompanhou o das membranas de PPI<sub>90</sub>/AC, apresentando sempre valores inferiores uma ordem de grandeza. Logo após a produção as membranas de PEDOT<sub>120</sub>/AC apresentavam uma condutividade de  $6,85 \times 10^{-6} \pm 3,97 \times 10^{-7}$  (S/cm) que ao fim de 5 meses decresceu para valores de  $2,74 \times 10^{-8} \pm 1,41 \times 10^{-8}$  (S/cm).

Dados estes resultados de condutividade tanto planar como transversal, optou-se por utilizar membranas de PPI<sub>90</sub>/AC e de PEDOT<sub>120</sub>/AC para fins comparativos entre polímeros diferentes. Deste modo, os cinco sistemas de membranas que serão sujeitos aos testes de libertação de fármaco serão criados com estes tempos de polimerização para os respetivos polímeros condutores.

### 5.3.2 Condutividade antes e após ensaio de libertação de fármaco

Para além do estudo da evolução temporal da condutividade, em ambos os tipos de planos, das membranas polimerizadas de AC após a sua produção, foi também analisado a

condutividade das membranas antes e após um ensaio de libertação de fármaco para membranas com e sem IBU.

Os valores obtidos nas Tabelas 5.1 e 5.2, correspondem aos valores da condutividade planar e transversal para o antes e o após ensaio de libertação de fármaco, aplicando um estímulo elétrico de +0,3 V durante 11 minutos.

Tabela 5.1 - Condutividade planar e transversal média e desvio-padrão para as membranas de PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC, antes e após o teste de libertação de fármaco com estímulo +0,3 V, durante 11 minutos.

Amostras	Condutividade Planar (S/cm)	
	Antes do ensaio	Após ensaio
PPI <sub>90</sub> /AC	$1,74 \times 10^{-2} \pm 3,76 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^{-3} \pm 3,04 \times 10^{-7}$
PEDOT <sub>120</sub> /AC	$3,55 \times 10^{-4} \pm 8,71 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-5} \pm 1,04 \times 10^{-6}$
Amostras	Condutividade Transversal (S/cm)	
	Antes do ensaio	Após ensaio
PPI <sub>90</sub> /AC	$1,00 \times 10^{-5} \pm 4,67 \times 10^{-8}$	$1,93 \times 10^{-7} \pm 4,62 \times 10^{-10}$
PEDOT <sub>120</sub> /AC	$2,08 \times 10^{-6} \pm 2,50 \times 10^{-8}$	$3,79 \times 10^{-8} \pm 1,05 \times 10^{-8}$

A Tabela 5.1 mostra que para ambas as configurações de condutividade planar e transversal os valores de condutividade antes do ensaio de libertação são sempre superiores aos de após o ensaio. Este resultado deve-se ao facto de parte do revestimento condutor perder a sua adesão à superfície das fibras após os ensaios de libertação do fármaco, independentemente da condição de libertação, o que foi verificado através da análise das imagens de SEM. Outra possível causa pode ser devida ao facto de os sistemas de membranas durante os testes de libertação de fármaco estarem em contacto com o SBF. Supõe-se que as moléculas de água do SBF reajam com as cargas positivas das moléculas de azoto dos polímeros condutores, tornando-as neutras e por isso a condutividade diminui. Portanto, o decaimento da condutividade pode ser atribuído à eliminação das cargas positivas das moléculas de azoto após as moléculas de água neutralizarem os centros eletroativos dos polímeros condutores [133].

Além disso, tal como explicando anteriormente, as condutividades transversais são sempre inferiores às planares devido ao interior das membranas não apresentar uma rede interligada de polímero de um lado ao outro. Na condutividade planar o decréscimo é de  $10^{-2}$  S/cm para  $10^{-3}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC é de  $10^{-4}$  S/cm para  $10^{-5}$  S/cm. A diferença

é de uma ordem de grandeza. Na condutividade transversal o decréscimo é de  $10^{-5}$  S/cm para  $10^{-7}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC é de  $10^{-6}$  S/cm para  $10^{-8}$  S/cm. A diferença é de duas ordens de grandeza.

Tabela 5.2 - Condutividade planar e transversal média e desvio-padrão para as membranas de PPI<sub>90</sub>/AC:IBU e PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU, antes e após o teste de libertação de fármaco com estímulo +0,3 V, durante 11 minutos..

Amostras	Condutividade Planar (S/cm)	
	Antes do ensaio	Após ensaio
PPI <sub>90</sub> /AC:IBU	$1,36 \times 10^{-2} \pm 5,08 \times 10^{-6}$	$2,28 \times 10^{-4} \pm 9,45 \times 10^{-7}$
PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU	$5,57 \times 10^{-3} \pm 2,89 \times 10^{-4}$	$2,53 \times 10^{-5} \pm 1,27 \times 10^{-6}$
Amostras	Condutividade Transversal (S/cm)	
	Antes do ensaio	Após ensaio
PPI <sub>90</sub> /AC:IBU	$1,05 \times 10^{-5} \pm 1,28 \times 10^{-7}$	$6,46 \times 10^{-8} \pm 2,53 \times 10^{-9}$
PEDOT <sub>120</sub> /AC:IBU	$1,15 \times 10^{-6} \pm 1,32 \times 10^{-7}$	$4,74 \times 10^{-9} \pm 2,75 \times 10^{-10}$

A Tabela 5.2 mostra que as membranas com IBU também possuem condutividade planar superior à transversal. Adicionalmente, para cada tipo de membrana, a condutividade antes dos testes de libertação de fármaco é superior à após os testes o que segue a variação das membranas sem IBU.

Na condutividade planar o decréscimo é de  $10^{-2}$  S/cm para  $10^{-4}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU é de  $10^{-3}$  S/cm para  $10^{-5}$  S/cm. A diferença é de duas ordens de grandeza. Na condutividade transversal o decréscimo é de  $10^{-5}$  S/cm para  $10^{-8}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU é de  $10^{-6}$  S/cm para  $10^{-9}$  S/cm. A diferença é de três ordens de grandeza.

De forma geral, os decréscimos de condutividade nas duas configurações de medição foram mais acentuados para as membranas com IBU. O que pode ser devido à influência da carga elétrica do IBU na do revestimento.

## 5.4 Análise Eletroquímica

A análise eletroquímica dos sistemas de membranas foi realizada por voltametria cíclica. Esta técnica foi usada com o objetivo de prever a gama de tensões e em alguns casos o valor

de tensão específico que é necessário aplicar nos testes de liberação controlada de fármaco. Com esta técnica estudou-se o comportamento dos cinco sistemas de membranas produzidos com recurso a uma montagem experimental idêntica à utilizada durante os ensaios de liberação, ou seja, 20 mL de SBF como eletrólito e um sistema de dois elétrodos, um deles um eletrodo de prata (contra-elétrodo) e o outro o sistema de membranas (eletrodo de trabalho). Para cada sistema de membranas estudaram-se 4 velocidades de varrimento, com 5 ciclos para cada uma, e selecionou-se para fins comparativos 3º ciclo.

Nos voltamogramas das Figuras 5.16, 5.17, 5.18, 5.19 e 5.20 pode-se verificar que cada um dos picos anódicos se deslocou para potenciais mais positivos, comprovando a limitação cinética da reação eletroquímica. Além disso, as correntes de pico anódicas aumentam linearmente com o aumento da velocidade de varrimento, o que prova que é um processo eletroquímico controlado pela superfície do eletrodo [134]. Os processos eletroquímicos controlados pela superfície são consequência das reações redox a baixas velocidades de varrimento em elétrodos modificados, como é o caso dos sistemas de membranas. A velocidades de varrimento mais altas, as reações redox passam a ser controladas por processos de difusão [135]. Para além disto, uma vez que se observam inflexões e picos anódicos e catódicos pode-se afirmar que este se trata de um processo reversível, onde se prevê que exista uma transferência de cargas entre a membrana e os elétrodos [136].

Na análise do voltamograma do sistema rebordo PPI<sub>90</sub>, Figura 5.16, observa-se que a uma velocidade de 50 mV/s observam-se picos de oxidação e redução mais definidos, acompanhados de uma densidade de corrente (1,3 mA/cm<sup>2</sup>). É possível visualizar a existência de dois picos anódicos (+0,1 V e +0,5 V) e dois picos catódicos (-0,15 V e -0,4 V) que descrevem duas reações de oxidação e duas reações de redução, respetivamente.

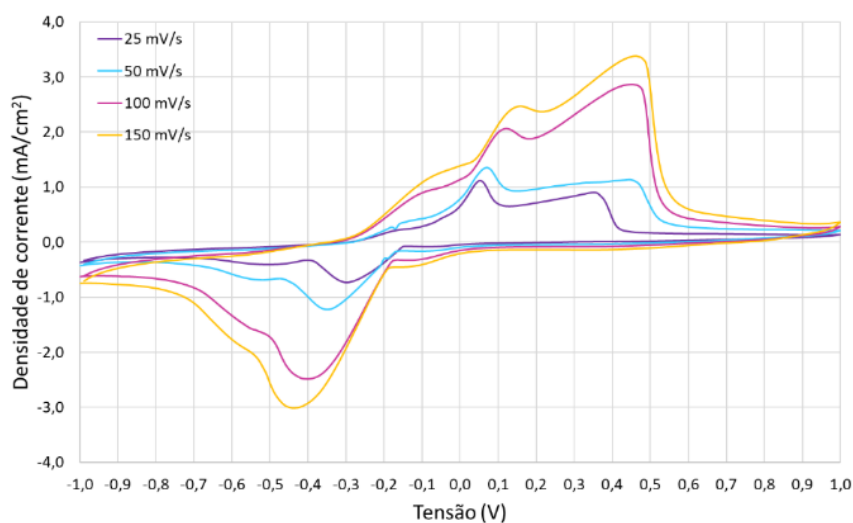


Figura 5.16 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, obtido para várias velocidades de varrimento (25, 50, 100 e 150 mV/s).

Sugere-se que o pico de oxidação a +0,1 V e de redução a -0,15 V seja provocado pela reação do AC da membrana de AC:IBU, que se encontra como separador entre as duas membranas funcionalizadas com PPI, com o SBF. Muito provavelmente associados à oxidação ou redução do oxigênio dos grupos hidroxilo ou carbonilo. Os outros dois picos a +0,5 V e -0,4 V são então devidos às reações redox do PPI. A reação de oxidação do PPI associada aos picos observados é:



Por outro lado, a reação de redução é:



Para todos os sistemas que apresentem como polímero condutor o PPI estas serão as reações redox que ocorrerão no cátodo (elétrodo de trabalho) do respetivo sistema.

No voltamograma da Figura 5.17, referente ao sistema único PPI<sub>90</sub>, observam-se a uma velocidade de varrimento de 25 mV/s os picos de oxidação e redução mais definidos, acompanhados de uma densidade de corrente bastante mais reduzida em comparação com o sistema de rebordo PPI<sub>90</sub> (0,13 mA/cm<sup>2</sup>). É possível visualizar a existência de um pico anódico (+0,9 V) e um pico catódico (-0,3 V), representativos de uma reação de oxidação e outra de redução, respetivamente.

Neste voltamograma, já não se observam os picos redox correspondentes ao acetato de celulose da membrana, uma vez que neste caso, o sistema é composto por uma única

membrana funcionalizada e por isso o efeito do acetato de celulose acaba por ser mascarado pelo PPI.

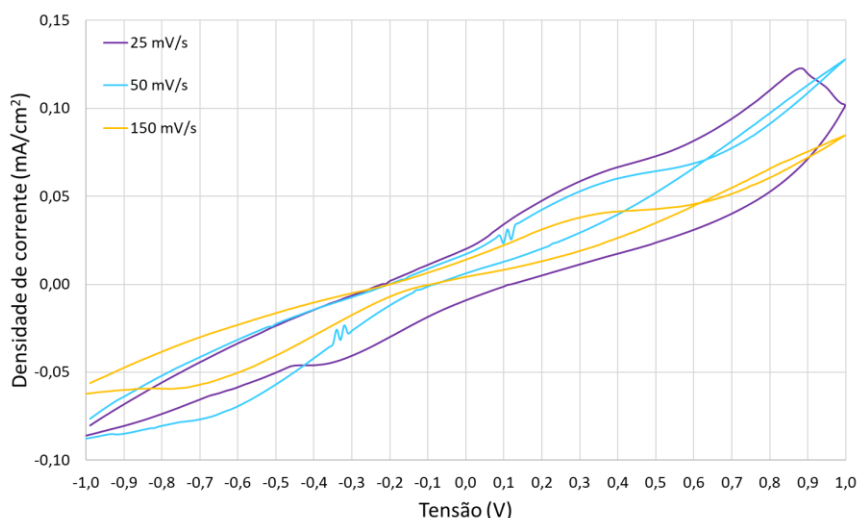
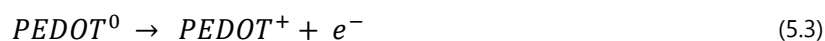


Figura 5.17 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Único PPI<sub>90</sub>, obtido para várias velocidades de varrimento (25, 50 e 150 mV/s).

No voltamograma da Figura 5.18 referente ao sistema rebordo PEDOT<sub>120</sub>, também se observou a uma velocidade de varrimento de 25 mV/s picos de oxidação e redução mais definidos, acompanhados de uma densidade de corrente bastante mais reduzida em comparação com o sistema de rebordo PPI<sub>90</sub> (0,23 mA/cm<sup>2</sup>). É possível visualizar a existência de dois picos anódicos (+0,3 V e +0,5 V) e dois picos catódicos (-0,2 V e -0,4 V) descritivos de duas reações de oxidação e duas reações de redução, respetivamente.

Sugere-se que um dos picos de redução seja provocado pelo AC que se encontra entre as duas membranas funcionalizadas com PEDOT, tal como acontece no sistema de rebordo PPI<sub>90</sub>. Os outros dois picos são então devidos às reações redox do PEDOT. A reação de oxidação do PEDOT que governa o pico observado é:



Por outro lado, a reação de redução é:



Para todos os sistemas com o polímero condutor PEDOT estas serão as reações redox que ocorrerão no cátodo do respetivo sistema.

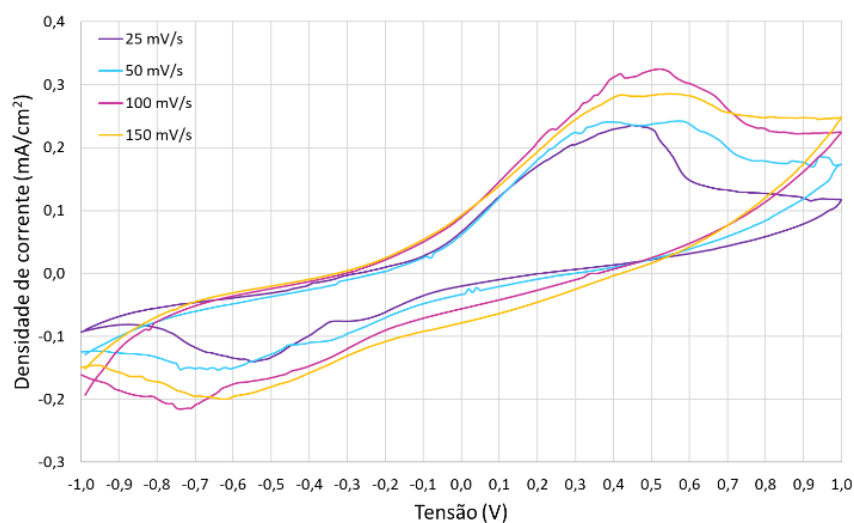


Figura 5.18 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, obtido para várias velocidades de varrimento (25, 50, 100 e 150 mV/s).

No voltamograma da Figura 5.19 referente ao sistema único PEDOT<sub>120</sub> observa-se a 25 mV/s picos de oxidação e redução mais definidos acompanhados de uma densidade de corrente reduzida e bastante semelhante à do sistema único PEDOT<sub>120</sub> (0,23 mA/cm<sup>2</sup>). É possível visualizar a existência de um pico anódico (+0,9 V) e um pico catódico (-0,3 V). Estas tensões de pico são idênticas às do voltamograma do sistema único de PPI<sub>90</sub> e também não se observam os picos redox correspondentes ao acetato de celulose da membrana.

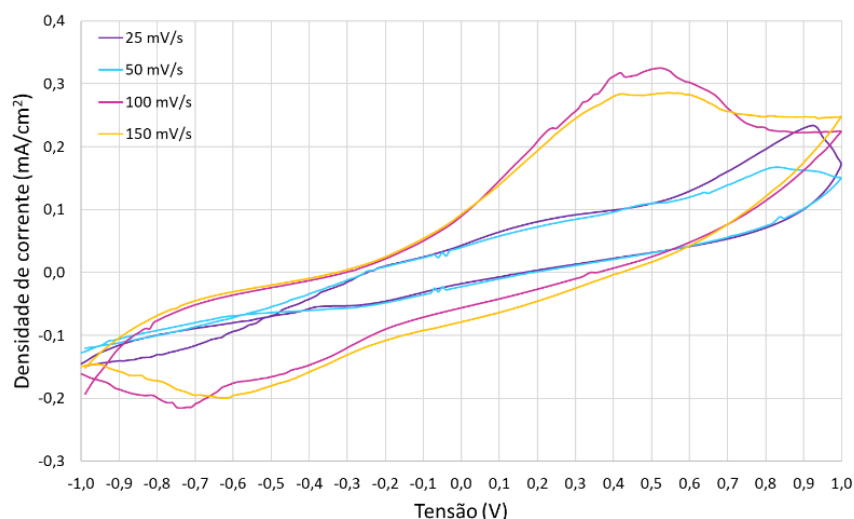


Figura 5.19 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>, obtido para várias velocidades de varrimento (25, 50, 100 e 150 mV/s).

No voltamograma referente ao sistema rebordo mix, Figura 5.20, a 25 mV/s os picos de oxidação e redução estão mais definidos com uma densidade de corrente bastante elevada em comparação com os sistemas anteriores ( $0,7 \text{ mA/cm}^2$ ). É possível observar dois picos anódicos (+0,3 V e +0,8 V) e dois picos catódicos (-0,5 V e -0,3 V).

No caso deste sistema, apesar de também conter uma membrana de AC:IBU no seu interior, à semelhança dos outros dois sistemas de rebordo estudados, como tem uma membrana funcionalizada com PPI e outra funcionalizada com PEDOT adjacentes, então os picos das reações redox do AC com o SBF não são visíveis, apenas as dos polímeros condutores.

Para uma velocidade de varrimento a 50 mV/s observam-se algumas interferências que à partida são um erro de equipamento devido ao ruído de rede a 50 Hz.

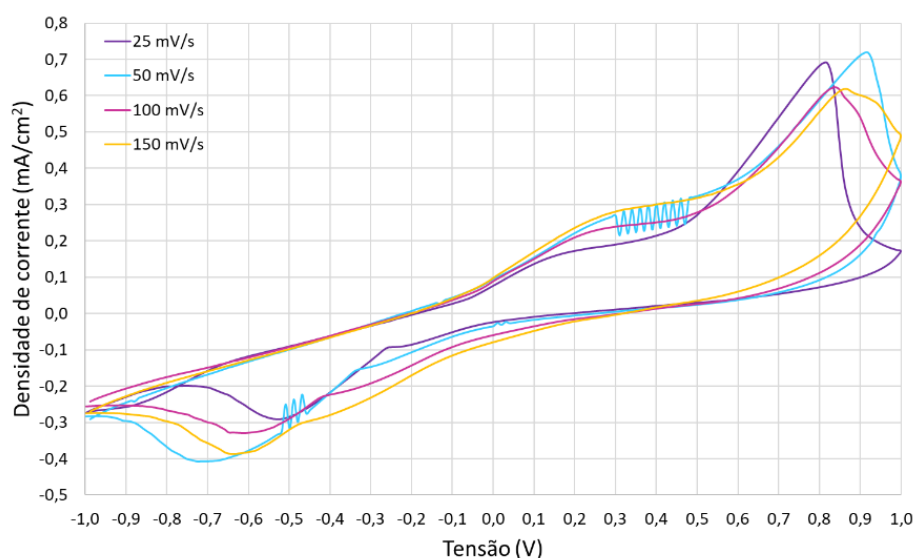


Figura 5.20 - Voltamograma referente ao 3º ciclo usando SBF como eletrólito do Sistema Rebordo Mix, obtido para várias velocidades de varrimento (25, 50, 100 e 150 mV/s).

A libertação do fármaco durante os testes de libertação implica que os polímeros condutores que revestem as membranas mudem de sinal para repelir o fármaco e não para o atrair, por isso é necessário conhecer o potencial das reações redox dos polímeros. Ou seja, se não fossem visualizados picos nos voltamogramas significava uma ausência de reações de oxidação e redução e por isso o mais provável era os polímeros condutores atraírem o IBU e impedirem a sua libertação do sistema para o meio. É espectável que as tensões de pico com os valores mais elevados de corrente libertem mais fármaco do que os as tensões de picos com uma densidade de corrente associada mais reduzida.

A Tabela 5.3 mostra as tensões referentes aos picos de oxidação e redução, que serão utilizadas na libertação controlada de fármaco. Apesar das tensões que estimulam a libertação ou retêm mais fármaco poderem ser diferentes, o objetivo da utilização da voltametria cíclica foi atingido, uma vez que, foi possível restringir uma gama de tensões a aplicar para cada sistema.

Também se verificou que em alguns casos, as tensões que melhor controlaram a libertação correspondiam às tensões de pico, tal como será verificado na secção seguinte (secção 5.5).

Tabela 5.3 - Tensões dos picos catódicos e anódicos de cada sistema.

Sistemas	Pico catódico (V)		Pico anódico (V)	
Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	-0,4		+0,5	
Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-0,3		+0,9	
Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub>	-0,2	-0,4	+0,3	+0,5
Sistema Único PEDOT <sub>120</sub>	-0,3		+0,9	
Sistema Rebordo Mix	-0,3	-0,5	+0,3	+0,8

## 5.5 Testes de Libertação de Fármaco

De forma a poder monitorizar a quantidade de fármaco libertada durante os ensaios de libertação controlada foi necessário quantificar o IBU em SBF e para isso mediu-se o espectro de absorvência por espectroscopia UV/vis. Após o desenvolvimento de cinco sistemas de libertação de fármaco, procedeu-se aos testes de libertação de fármaco de forma passiva e de forma ativa. A libertação de forma passiva consiste na libertação por difusão, ou seja, a favor do gradiente de concentração, para servir de comparação com os testes de forma ativa, ou seja, com tensão aplicada entre os eléctrodos.

As tensões a serem aplicadas foram selecionadas a partir dos resultados dos ensaios de voltametria cíclica. Com base nestes resultados, adaptaram-se alguns potenciais a aplicar. Após selecionadas as duas tensões que melhor estimulam ou retêm a libertação de fármaco,

realizaram-se os testes de libertação de fármaco nas mesmas condições experimentais, mas alternando os ensaios entre as duas tensões selecionadas. Este raciocínio foi aplicado para os cinco sistemas.

Depois de estudados os parâmetros de libertação, desenvolveu-se um protótipo de um possível sistema de libertação de fármaco por via tópica e procedeu-se aos testes de libertação de fármaco com as tensões previamente otimizadas de modo a validar os resultados.

### 5.5.1 Curva de Calibração do Fármaco

A Figura 5.21. apresenta o espectro de absorvência (u.a.) de 20 soluções de IBU em SBF com concentrações entre 0-20 mg/L na zona do UV (190 nm e 290 nm). O perfil dos espectros é semelhante para as várias concentrações, apresentando dois picos máximos de absorção, a 211 nm e 222 nm.

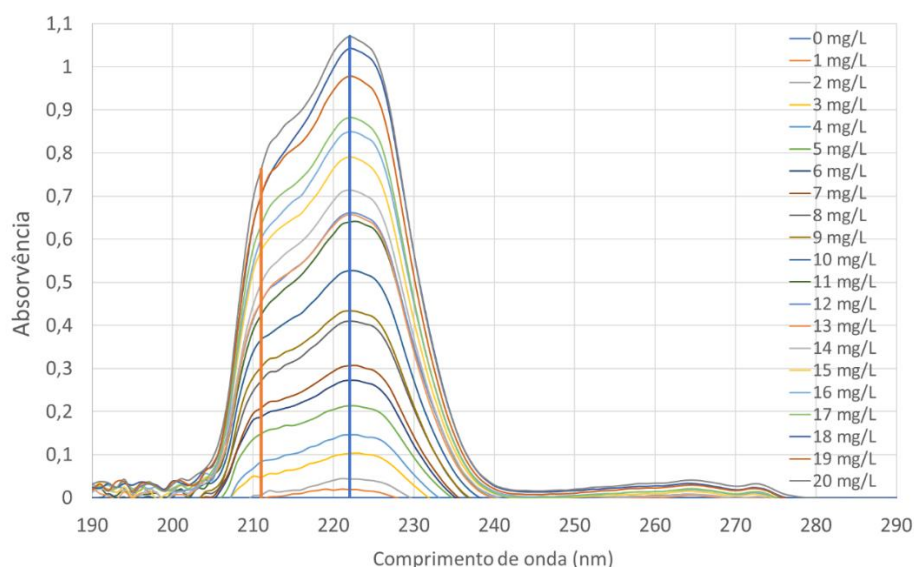


Figura 5.21 - Espectro de absorção para várias concentrações de IBU em SBF. Identificação dos picos característicos obtidos.

Na Figura 5.22 apresentam-se as retas de calibração a 211 nm e a 222 nm. Na estrutura do IBU existem dois grupos cromóforos, o anel benzénico e o ácido carboxílico, os quais justificam os dois máximos de absorção no espectro UV da Figura 5.21. Durante os testes de libertação controlada das membranas, verificou-se que apenas há aumento da absorção no comprimento de onda a 211 nm, indicando que um dos grupos cromóforos desapareceu. Logo, a molécula do IBU reage com algum componente do meio reacional, nomeadamente com

componentes da membrana que foram libertados para o meio. Por esse motivo, a quantificação realizou-se a 211 nm, ao invés da utilização do pico a 222 nm, tal como descrito por outros autores [137].

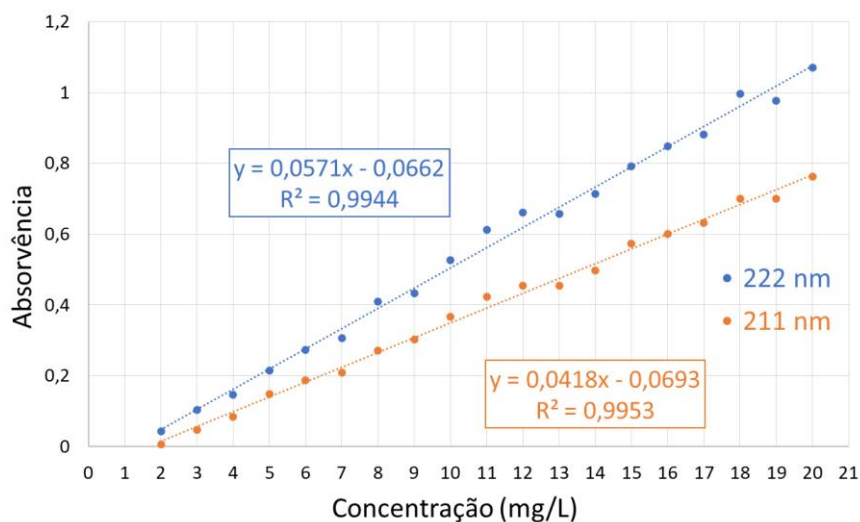


Figura 5.22 - Gráfico da curva de calibração, estimada para as absorções registadas no pico de 211 nm e 222 nm. Equação da regressão linear obtida, com a qual é possível estimar a concentração de fármaco libertado para o SBF.

A regressão linear dos pontos experimentais obtidos apresenta um bom coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9953$ ). Nos ensaios de libertação passiva e ativa de fármaco, a quantificação do IBU é realizada através da equação da reta, absorvência *versus* concentração obtida para o pico a 211 nm.

## 5.5.2 Ensaios de Libertação

As Tabelas 4.5 e 4.6 do capítulo 4 apresentam um resumo das condições de ensaio de libertação do fármaco, que permitiram a obtenção dos resultados a seguir apresentados.

Em todos os ensaios foi contabilizada a quantidade de fármaco libertada para o meio, a qual foi comparada com a quantidade de fármaco que existia na membrana antes de se realizar o ensaio de libertação.

### 5.5.2.1 Testes de Libertação Passiva e Ativa dos Sistemas

Tal como referido no capítulo 4, os ensaios de libertação de fármaco foram realizados para cinco configurações de sistema diferentes, Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, Sistema Único PPI<sub>90</sub>,

Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, Sistema Único PEDOT<sub>120</sub> e Sistema Rebordo Mix. Estudos prévios [41] demonstraram que o sistema com rebordo é um sistema que permite controlar a libertação de fármaco e por este motivo optou-se por reproduzi-lo, de modo a ter um sistema de comparação para o novo sistema desenvolvido neste trabalho, formado por uma única membrana funcionalizada que contém o fármaco.

De modo a haver um termo de comparação para os testes de libertação com estímulos elétricos, estudou-se o perfil de libertação do fármaco de forma passiva para cada sistema de membranas. Todos os ensaios seguiram o mesmo procedimento experimental para a libertação de fármaco através da aplicação de estímulos elétricos: 1 cm<sup>2</sup> do respetivo sistema foram colocados em contacto com 20 mL de SBF e após estimulação, foi analisada a concentração de fármaco libertado, neste caso por difusão, através do gradiente de concentração.

Para todos os testes de libertação, a distância entre elétrodos foi mantida a 1 cm, sendo que o eletrodo de trabalho correspondia sempre ao polo positivo da fonte de tensão e estava ligado ao sistema de membranas e o contra-elétrodo era de prata e por sua vez estava ligado ao polo negativo da fonte de tensão. Todos os ensaios foram realizados com 1 minuto inicial de difusão, seguido de uma estimulação fixa periódica de 1 minuto durante 10 minutos. Os testes foram realizados cumulativamente, ou seja, o estímulo elétrico foi aplicado por um período de 1 minuto, depois foi desligado, uma amostra do meio de libertação foi retirada e colocada numa célula de quartzo de 3 ml para realizar os espectros de absorvência. O meio retorna ao recipiente de libertação, a amostra foi novamente imersa e o potencial aplicado novamente.

De modo a ser possível comparar exclusivamente a ação da aplicação do estímulo elétrico, o minuto inicial correspondente à difusão foi descontado às libertações. Contudo, é sempre necessário que o sistema sofra inicialmente uma difusão, para que, aquando da aplicação do estímulo elétrico, o respetivo sistema já esteja em equilíbrio com o meio e a libertação do fármaco a partir daí seja exclusivamente dependente do estímulo e não da difusão que ocorre imediatamente após se colocar o sistema em contacto com o SBF.

Para iniciar o estudo da libertação de fármaco demonstrando um padrão de libertação "ON/OFF" em resposta a um estímulo elétrico específico, é necessário estudar um conjunto de estímulos elétricos diferentes para cada sistema e a partir da comparação de todos os estímulos concluir-se quais são as duas tensões que à partida permitem alcançar este padrão de libertação.

O primeiro sistema a ser estudado foi o Sistema Único PPI<sub>90</sub> (Figura 5.23). De acordo com os resultados de voltametria cíclica, este sistema apresenta um pico catódico a -0,3 V e um

pico anódico a +0,9 V. Deste modo, testaram-se estímulos negativos e positivos e a difusão sem polarização aplicada. Para os negativos foi aplicado um potencial de -1,5 V e -0,3 V e para os positivos um potencial de +0,3 V, +0,8 V e +1,2V.

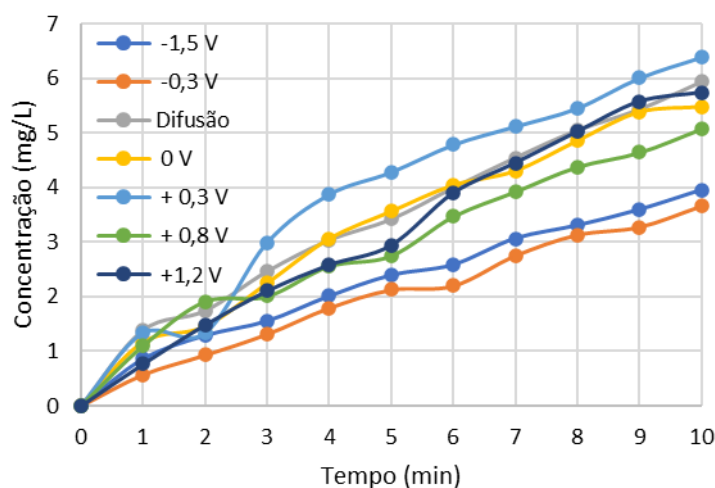


Figura 5.23 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Único PPI<sub>90</sub>. Ordem da legenda igual à ordem do gráfico.

A Figura 5.23 mostra os perfis de liberação de fármaco para os diferentes valores de polarização. O perfil obtido pela aplicação de -1,5 V, -0,3 V, 0 V, +0,8 V e +1,2 V apresenta valores de concentração inferiores aos obtidos pela difusão, o que significa que para estes valores de potencial aplicado a liberação de fármaco é retardada pelo PPI, especialmente para uma tensão de -0,3 V que corresponde à menor concentração libertada no período testado. Em oposição, aplicando um estímulo de +0,3 V, há um ligeiro aumento na concentração de fármaco libertado em comparação com a difusão.

Conforme relatado por Jin Qu *et al.* [47], polímeros condutores podem-se ligar e libertar diferentes fármacos devido à sua oxidação e redução parcial por estimulação elétrica. Ele verificou que a liberação de fármacos carregados negativamente – como dexametasona e indometacina – era consequência da redução parcial do trímero de anilina de carga positiva que induzia as moléculas do fármaco a se moverem para o eletrodo com carga oposta. Como o IBU é uma molécula carregada negativamente, espera-se que se ligue electrostaticamente ao esqueleto do PPI. A molécula terapêutica foi repelida da membrana de AC:IBU revestida de PPI e movida para o contra-eletródo de prata para potenciais específicos de acordo com a carga do esqueleto do PPI. Assim, confirmado pela ocorrência de reações redox do PPI através da

voltametria cíclica, essa oxidação e redução das membranas de PPI afeta a quantidade de IBU libertada pelas membranas o que por sua vez depende do valor do potencial.

Deste modo, verificou-se que para este sistema as tensões a testar para ser possível obter um padrão "ON/OFF" são -0,3 V e +0,3 V.

Para o Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub> obteve-se o gráfico da Figura 5.24 para os perfis de libertação estudados.

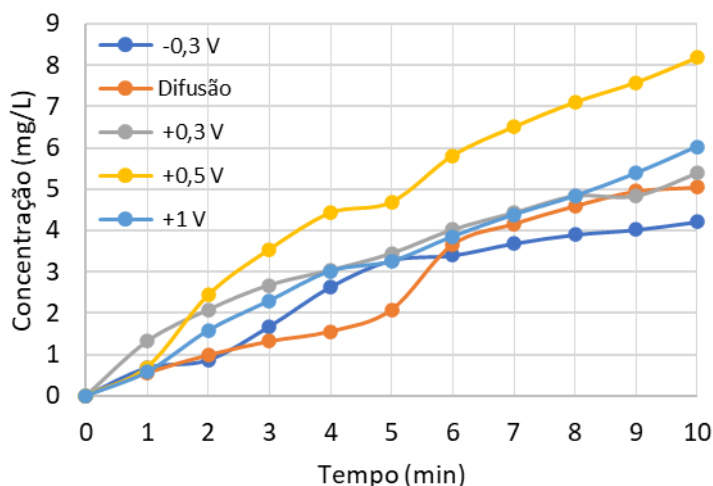


Figura 5.24 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>. Ordem da legenda igual à ordem do gráfico.

De acordo com os resultados de voltametria cíclica, este sistema apresenta um pico catódico a -0,4 V e um pico anódico a +0,5 V. Assim, foi aplicado um estímulo negativo e três estímulos positivos e ainda o resultado do ensaio de difusão. Para o negativo foi aplicado um potencial de -0,3 V, à semelhança do valor que mais retinha fármaco no sistema anterior e por ser um valor de tensão bastante perto da tensão de pico catódico. Para os positivos foi aplicado um potencial de +0,3 V, +0,5 V e +1V. No caso do potencial de +0,3 V por ser um potencial idêntico ao estímulo que mais libertava fármaco no sistema anterior estudado, a +0,5 V por corresponder à tensão do pico anódico do respectivo voltamograma e +1 V por ser um valor bastante mais elevado que esta tensão de pico.

Seguindo o mesmo raciocínio, verificou-se que para este sistema as tensões a testar para ser possível obter um padrão "ON/OFF" são -0,3 V e +0,5 V, que são praticamente coincidentes com as tensões de pico catódico e anódico, respetivamente.

A Figura 5.25 apresenta os perfis de libertação estudados para o Sistema Rebordo PE-DOT<sub>120</sub>.

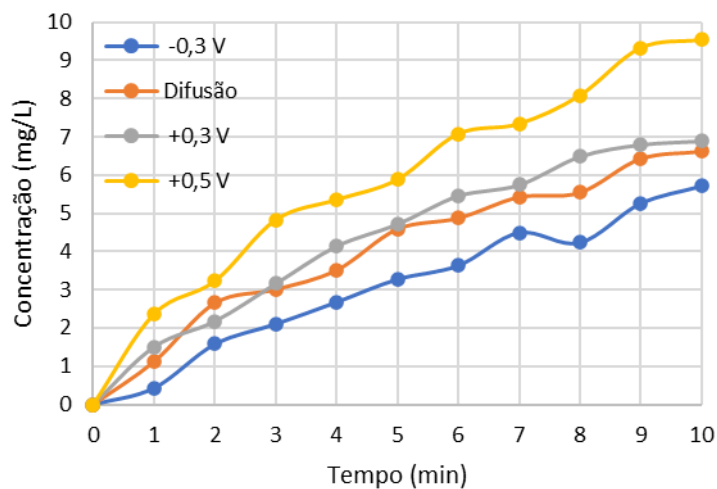


Figura 5.25 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>. Ordem da legenda igual à ordem do gráfico.

De acordo com os resultados de voltametria cíclica, este sistema apresenta dois picos catódicos a -0,2 V e -0,4 V e dois picos anódicos a +0,3 V e +0,5 V. Assim, foi aplicado o estímulo negativo, o qual já demonstrou nos dois sistemas anteriores, ser o que mais retém o fármaco. Este ensaio foi semelhante, ou seja a -0,3 V houve maior retenção de fármaco. Este é um potencial que se insere entre a tensão dos dois picos catódicos estudados. Face aos dois estímulos positivos foi aplicado um potencial de +0,3 V e +0,5 V. No caso do potencial de +0,3 V por ser uma tensão de pico anódico do respetivo voltamograma e o potencial que mais libertou fármaco no Sistema Único PPI<sub>90</sub> e a +0,5 V por também corresponder à tensão do pico anódico do respetivo voltamograma e por ser o potencial que mais libertou fármaco no Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>. Para este sistema as tensões a testar para ser possível obter um padrão "ON/OFF" são -0,3 V e +0,5 V, que são praticamente coincidentes com as tensões de pico catódico e anódico, respetivamente.

O penúltimo sistema a ser estudado foi o Sistema Único PEDOT<sub>120</sub>, ilustrado na Figura 5.26. De acordo com os resultados de voltametria cíclica, este sistema apresenta um pico catódico a -0,3 V e um pico anódico a +0,9 V. Pela mesma ordem de ideias dos sistemas anteriores foi aplicado um potencial negativo de -0,3 V e positivo de +0,3 V e +0,8 V. O potencial de +0,8 V aplicado deve-se ao facto de se apresentar perto da tensão do pico anódico do respetivo voltamograma. Valores mais elevados de tensão não foram estudados uma vez que através do Sistema Único PPI<sub>90</sub> foi possível concluir que a aplicação de tensões acima de +0,9

V não permitem controlar a libertação de fármaco. Para este sistema as tensões a testar para ser possível obter um padrão "ON/OFF" são -0,3 V e +0,8 V.

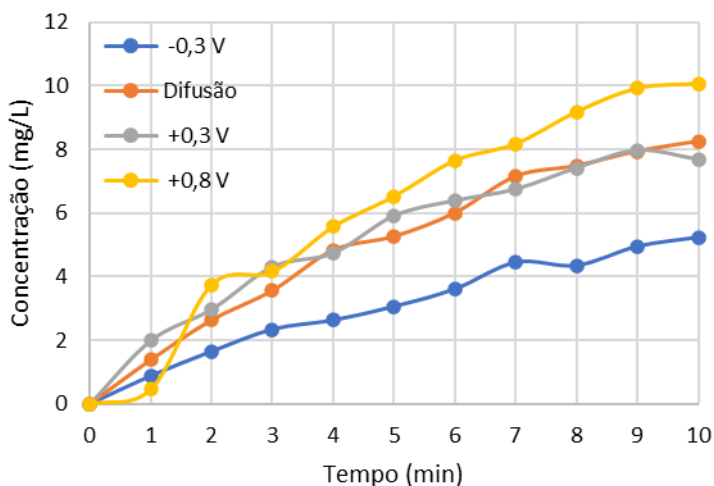


Figura 5.26 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Único PE-DOT<sub>120</sub>. Ordem da legenda igual à ordem do gráfico.

Por fim, de modo a estudar se a utilização de dois polímeros diferentes num único sistema leva à obtenção de resultados idênticos aos anteriores procedeu-se ao estudo do Sistema Rebordo Mix, cujo perfil de libertação está representado na Figura 5.27.

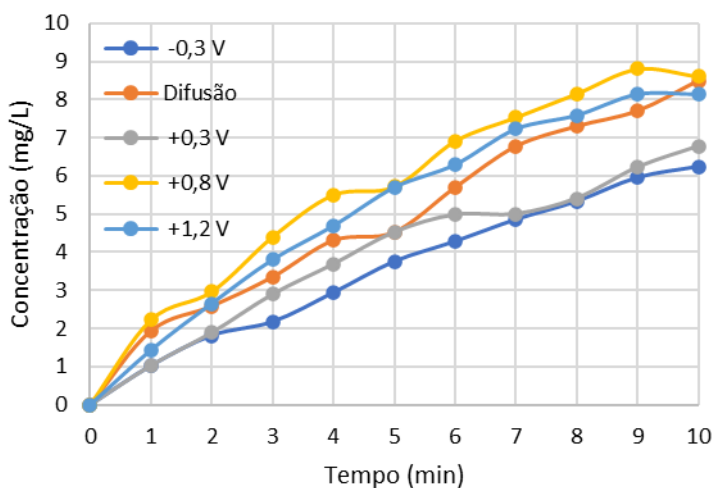


Figura 5.27 - Perfil de Libertação de ibuprofeno através da aplicação de vários estímulos para o Sistema Rebordo Mix. Ordem da legenda igual à ordem do gráfico.

De acordo com o respetivo voltamograma, este sistema apresenta dois picos catódicos a -0,3 V e -0,5 V e dois picos anódicos a +0,3 V e +0,8 V. Pela mesma ordem de ideias dos sistemas anteriores foi aplicado um potencial negativo de -0,3 V e positivo de +0,3 V, +0,8 V e +1,2 V. Para este sistema as tensões a testar para ser possível obter um padrão "ON/OFF"

são -0,3 V e +0,8 V, à semelhança do Sistema Único Pedot<sub>120</sub>. Ou seja, a utilização de dois polímeros condutores em nada impediu a obtenção de um perfil de libertação idêntico aos quatro sistemas anteriormente analisados.

Apesar de ter sido observado um comportamento semelhante em todos os sistemas para a tensão que leva à maior retenção de fármaco, a tensão que por sua vez levou à libertação máxima de IBU andou entre os +0,3 V, +0,5 V e +0,8 V para os vários sistemas (Tabela 5.4). Esta discrepância de valores pode ocorrer devido à possível flexão dos sistemas durante a imersão em SBF, o que pode afetar a distância entre os elétrodos e os próprios sistemas [41]. Para além disso, este potencial pode depender do número de cargas positivas, ou seja, da quantidade de moléculas de PPI ou PEDOT que cobrem as fibras de AC. Como as membranas revestidas com PEDOT apresentam um revestimento mais uniforme tal como visualizado por SEM, apresentam mais sítios ativos para interagir com as moléculas do fármaco [39]. Este facto pode explicar a necessidade de maiores potenciais para aumentar a libertação de IBU observada em membranas funcionalizadas com PEDOT, nos casos dos sistemas de Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, Único PEDOT<sub>120</sub> e Rebordo Mix.

Tabela 5.4 - Tensões a intercalar em cada sistema para ser possível obter um padrão "ON/OFF".

Sistemas	OFF (V)	ON (V)
Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	-0,3	+0,5
Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-0,3	+0,3
Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub>	-0,3	+0,5
Sistema Único PEDOT <sub>120</sub>	-0,3	+0,8
Sistema Rebordo Mix	-0,3	+0,8

Para todos os ensaios supramencionados foi contabilizada a quantidade de fármaco libertada para o meio, a qual foi comparada percentualmente com a quantidade de fármaco que existia na membrana antes de se realizar o ensaio de libertação. Assumindo que a massa de IBU (1 mg) se distribui uniformemente pela membrana, após a divisão da mesma em 16 triângulos idênticos, teríamos 62,5 µg de IBU/membrana inicialmente. Através das

concentrações de libertação alcançadas ao fim de 11 minutos de libertação, contabilizou-se a quantidade de IBU existente em 20 mL de SBF e calculou-se a proporção de fármaco libertada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Percentagem de ibuprofeno libertado para o meio consoante as respetivas tensões aplicadas ao fim de 11 minutos.

Designação do sistema	Tensão aplicada (V) / Difusão	IBU (%)
Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	-0,3	292
	+0,3	306
	+0,5	457
	+1,0	385
	Difusão	298
Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-1,5	298
	-0,3	311
	0 V	337
	+0,3	315
	+0,8	388
	+1,2	347
	Difusão	300
Sistema Rebordo PEDOT <sub>120</sub>	-0,3	372
	+0,3	443
	+0,5	505
	Difusão	545
Sistema Único PEDOT <sub>120</sub>	-0,3	488
	+0,3	665
	+0,8	724
	Difusão	492
Sistema Rebordo Mix	-0,3	378
	+0,3	342
	+0,8	459
	+1,2	475
	Difusão	527

Como a análise espectrofotométrica não é seletiva, qualquer substância libertada no meio e que absorva na mesma região do UV vai afetar os resultados, dando origem a percentagens de libertação superiores a 100%. Uma hipótese é a libertação de pequenos subprodutos e resíduos da reação de funcionalização com PPI e PEDOT durante os ensaios de libertação. Esta hipótese é confirmada pelos ensaios de difusão realizados com uma membrana de PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC, tal como ilustrado na Figura 5.28.

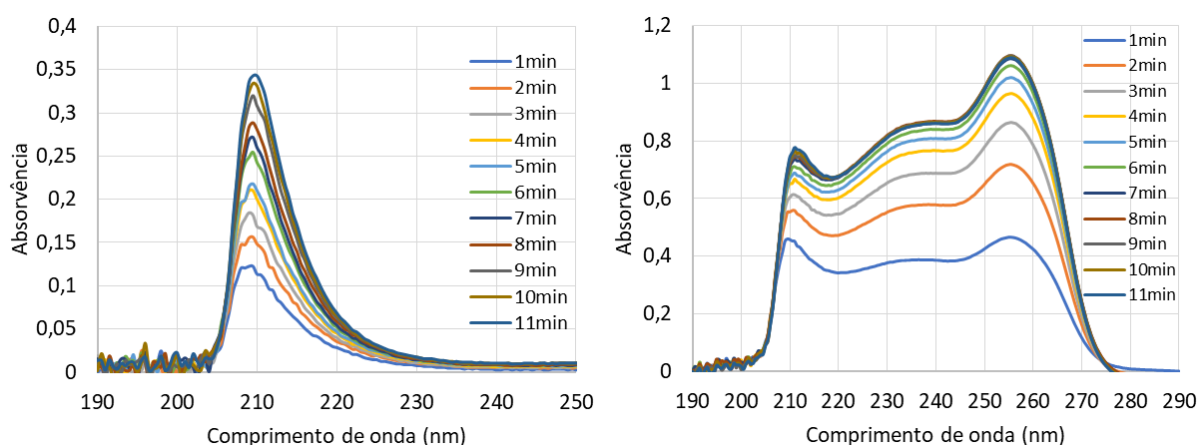


Figura 5.28 - Espectros de absorção da membrana de PPI<sub>90</sub>/AC e PEDOT<sub>120</sub>/AC em SBF, respetivamente.

Pela análise da Tabela 5.5 conclui-se que as maiores percentagens de libertação de fármaco estão associadas aos sistemas funcionalizados com PEDOT o que vai ao encontro dos espectros de absorção de cada polímero em SBF da Figura 5.28. Aos 211 nm e ao fim de 11 minutos, a membrana de PPI<sub>90</sub>/AC atingiu uma absorvência de 0,35 enquanto a membrana de PEDOT<sub>120</sub>/AC uma absorvência de 0,8. Verifica-se assim, que ao fim do mesmo intervalo de tempo e para o mesmo comprimento de onda da região do visível, é libertado mais PEDOT para o meio do que PPI, que por sua vez mascaram a quantidade real de IBU libertada para o meio.

### 5.5.2.2 Testes de Confirmação da Libertação de IBU

Face à falta de seletividade do método espectrofotométrico, realizaram-se alguns doseamentos de IBU por LC-MS/MS, os quais permitiram confirmar a libertação de ibuprofeno, em concentrações entre < LOD e 33 µg/L.

A Tabela 5.6 apresenta os resultados dos testes aplicados para a avaliação da linearidade e gama de trabalho do método de UPLC-MS/MS, para a gama de concentrações de 0 a 14,5 µg/L de ibuprofeno.

Tabela 5.6 - Avaliação da linearidade e gama de trabalho do método de UPLC-MS/MS para a análise do IBU.

Parâmetro	Intervalo linear	Gama trabalho
Número de pontos de calibração (N)	7	6
Intervalo de concentrações (µg/L)	0 – 14,5	1,5 – 14,5
Equação da reta	$y = 16535,14x - 79,522$	$y = 16539,96x - 126,368$
Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> ):	1,0000	0,9999
Coefficiente de variação do método (CVm, %)	0,51	0,57
Análise de resíduos (%)	[-3,7 – 0,0]	[-3,7 – 0,0]
Limite de detecção (LOD), µg/L	0,11	0,12
Limite de quantificação (LOQ), µg/L	0,36	0,40

Os resultados mostram que a reta de calibração entre 0-14,5 µg/L apresenta uma boa correlação ( $R^2 \geq 0,995$ ) e uma boa linearidade com CVm e análise de resíduos inferiores a 5,0%.

O limite de quantificação provisório ( $10 \times$  quociente entre o desvio padrão residual da curva e do declive) é inferior ao primeiro ponto da curva de calibração (1,5 µg/L), indicando que as concentrações dos vários pontos da reta de calibração estão bem ajustadas. O primeiro nível de concentração estudado, situado acima do limite de quantificação, é o padrão de 1,5 µg/L. Consequentemente, a gama de trabalho é de 1,5 -14,5 µg/L.

A Figura 5.29 apresenta a curva da gama de trabalho utilizada para quantificar o ibuprofeno nas amostras de membranas selecionadas para a confirmação da libertação do ibuprofeno.

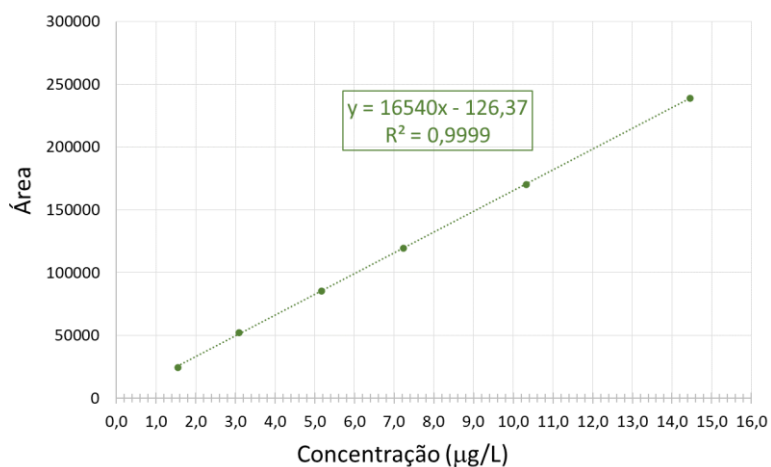


Figura 5.29 - Gama de trabalho da quantificação do ibuprofeno por UPLC-MS/MS.

Para minimizar os potenciais efeitos de matriz, supressão ou enriquecimento iônico, as amostras foram diluídas de 1:1 com água ultrapura. Consequentemente, as concentrações obtidas por leitura direta na curva de calibração, área versus concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) foram multiplicados por dois.

A Tabela 5.7 apresenta a concentração e a percentagem de ibuprofeno obtida nas amostras analisadas e respetiva percentagem de libertação.

Tabela 5.7 - Concentração e percentagem de ibuprofeno nas amostras analisadas por UPLC-MS/MS.

Sistemas	Tensão (V)	IBU ( $\mu\text{g/L}$ )	IBU (%)
Sistema Rebordo PPI <sub>90</sub>	+0,5	12	0,38
	+1,0	< LOD	-----
Sistema Único PPI <sub>90</sub>	-0,3	< LOD	-----
	Difusão	2,3	0,074
	0	24	0,77
	+0,3	33	1,0
	+0,8	19	0,61
	+1,2	14	0,45
Sistema Único PEDOT <sub>120</sub>	+0,3	12	0,38
	+0,8	24	0,77
Sistema Rebordo Mix	+0,8	25	0,80
	+1,2	16	0,51

As concentrações medidas correspondem a menos de 1% da massa de IBU inicial (62,5  $\mu\text{g}$  de IBU/membrana). Esta baixa taxa de libertação pode ser explicada por vários fatores: i) falta de homogeneização da solução de libertação; ii) libertação do fármaco durante a funcionalização das membranas, no caso dos sistemas únicos; e iii) nem toda a área da membrana é usada nos ensaios de libertação.

### 5.5.2.3 Perfil de Libertação com um padrão "ON/OFF"

Com base nos resultados obtidos anteriormente e dada a finalidade do trabalho, procurou-se o valor ideal de potencial elétrico que quando aplicado, permitisse uma maior libertação do fármaco pelos sistemas bem como o valor ideal de potencial elétrico que quando aplicado, impedisse a libertação do fármaco totalmente ou de forma significativa para o meio. Ou seja, o potencial estaria sempre aplicado ao sistema de libertação e a impedir a libertação do

fármaco e só quando ocorresse o corte desse potencial, a libertação ocorreria e por aplicação de um potencial que estimulasse a sua libertação. Por este motivo, para se alcançar um padrão de libertação "ON/OFF" começou-se sempre por aplicar em primeiro lugar o estímulo negativo e só depois o estímulo positivo, alternando entre os dois durante 10 minutos, 1 minuto cada.

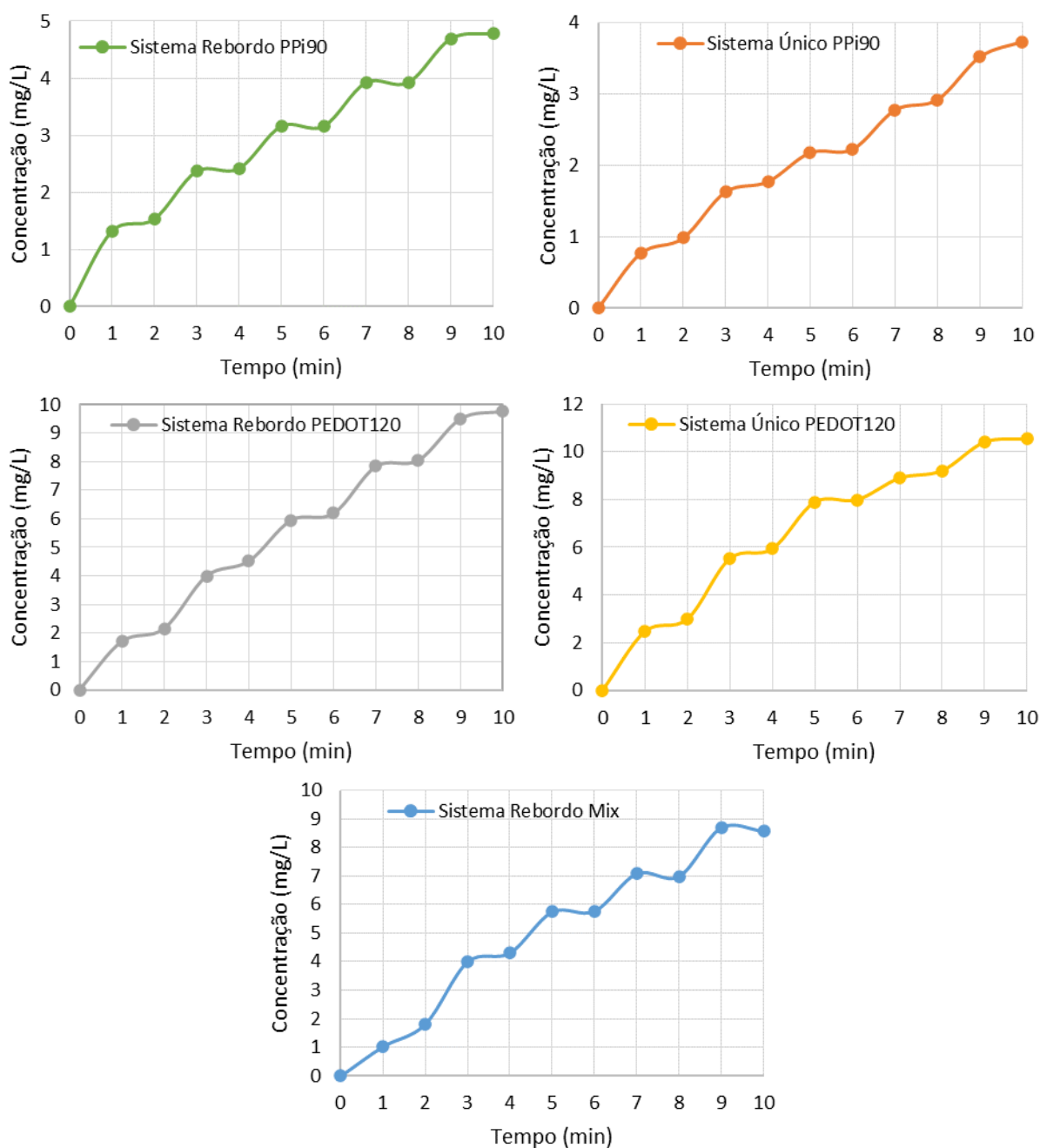


Figura 5.30 - Perfis de libertação dos cinco sistemas de membranas: Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub>, Sistema Único PPI<sub>90</sub>, Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub>, Sistema Único PEDOT<sub>120</sub> e Sistema Rebordo Mix.

A fim de verificar a possibilidade de construir um adesivo para controlar eletronicamente a libertação do fármaco na ferida testaram-se as tensões "ON/OFF" para cada sistema apresentadas na Tabela 5.4, e obtiveram-se os gráficos da Figura 5.30. Analisando os gráficos é possível detetar a existência de patamares que demonstram uma paragem na libertação de fármaco que ocorrem aos minutos de aplicação dos estímulos negativos, de retenção de IBU. Entre cada patamar existe mais fármaco a ser libertado para o meio e de forma linear, associados à aplicação dos estímulos positivos.

Mais uma vez, foi para os sistemas funcionalizados com PEDOT que se atingiram concentrações de IBU mais elevadas no meio face aos sistemas funcionalizados com PPI. O Sistema Rebordo Mix atingiu um valor máximo de concentração de IBU que se encontra entre os máximos de concentração alcançados pelos sistemas de PPI e PEDOT.

#### 5.5.2.4 Protótipo desenvolvido para aplicação via tópica

Uma vez demonstrados os perfis de libertação com um padrão "ON/OFF" para todos os sistemas procederam-se à implementação de dois protótipos montados num curativo comum, um do Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub> e o outro do Sistema Único PPI<sub>90</sub>. As tensões "ON/OFF" aplicadas para cada protótipo foram as mesmas testadas em cada sistema aquando da confirmação do perfil de libertação "ON/OFF". Devido a restrições de tempo não foi possível implementar protótipos para todos os sistemas e testá-los.

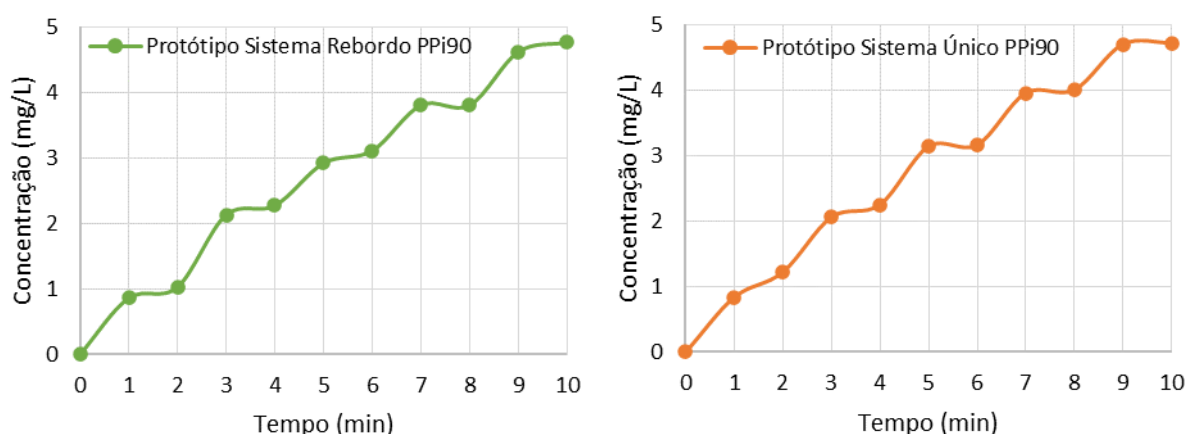


Figura 5.31 - Perfis de libertação dos protótipos do Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub> e Sistema Único PPI<sub>90</sub>, respetivamente.

Os resultados da Figura 5.31 mostram um claro aumento na libertação do fármaco quando a tensão positiva é aplicada enquanto a retenção é observada a  $-0,3$  V. Os testes reproduziram os resultados da Figura 5.30 e demonstraram que a libertação do fármaco pode ser controlada pela aplicação de uma tensão adequada para o sistema em questão.

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram testados diferentes sistemas para libertação controlada de fármaco. O fármaco testado foi o ibuprofeno um dos fármacos anti-inflamatórios mais comuns. Os sistemas construídos consistiram na inclusão do fármaco numa membrana de acetato de celulose produzida por eletrofiação. O fármaco foi incluído numa quantidade conhecida na solução de acetato de celulose a qual foi completamente utilizada na produção de uma membrana que foi depois recortada em pedaços triangulares iguais de modo a todos conterem um interior e exterior da membrana idênticos uma vez que a espessura varia radialmente. Com estas membranas foram construídos dois sistemas com cinco configurações diferentes usadas nos ensaios de libertação controlada de fármaco com estímulos elétricos. Um dos sistemas é constituído por uma membrana de acetato de celulose com ibuprofeno ensanduichada entre duas membranas funcionalizadas com PPI ou PEDOT (sistema rebordo). O outro sistema é formado por uma única membrana funcionalizada que contem o fármaco (sistema único).

A espectroscopia *Raman* permitiu confirmar a existência de IBU nas membranas de AC e a funcionalização das membranas de acetato de celulose com PPI e PEDOT.

A morfologia observada por SEM das fibras das membranas funcionalizadas com PPI ou com PEDOT, com ou sem IBU, mostra a existência dos respetivos revestimentos de uma forma geral bastante uniformes e após submissão aos testes de libertação de fármaco as membranas mantêm a sua integridade face aos testes de libertação.

Os valores de condutividade planar são superiores aos da condutividade transversal. Para ambas as configurações, ocorreu um decréscimo de condutividade ao longo dos três e depois cinco meses de exposição das membranas ao ar, para todas as membranas. Os valores mais elevados de condutividade, na ordem dos  $10^{-2}$  (S/cm) para a condutividade planar, foram obtidos para as membranas de PPI funcionalizadas com um tempo de 90 minutos que ao fim de

5 meses diminuíram numa ordem de grandeza para  $10^{-3}$  (S/cm), e uma condutividade transversal na ordem dos  $10^{-5}$  S/cm que decresceu duas ordens de grandeza. Para as membranas de PEDOT<sub>120</sub>/AC, o decréscimo de condutividade ao longo dos meses acompanhou o das membranas de PPI<sub>90</sub>/AC, apresentando sempre valores inferiores uma ordem de grandeza. Comparando os valores de condutividade planar e transversal antes e após um ensaio de libertação de fármaco, verificou-se a diminuição de condutividade em ambos os tipos de membranas, tanto com como sem IBU, de  $10^{-2}$  S/cm para  $10^{-3}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC de  $10^{-4}$  S/cm para  $10^{-5}$  S/cm. Na condutividade transversal o decréscimo é de  $10^{-5}$  S/cm para  $10^{-7}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC é de  $10^{-6}$  S/cm para  $10^{-8}$  S/cm. Face às membranas com IBU, na condutividade planar o decréscimo é de  $10^{-2}$  S/cm para  $10^{-4}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU é de  $10^{-3}$  S/cm para  $10^{-5}$  S/cm. Na condutividade transversal o decréscimo é de  $10^{-5}$  S/cm para  $10^{-8}$  S/cm para PPI<sub>90</sub>/AC:IBU, e para PEDOT<sub>120</sub>/AC:IBU é de  $10^{-6}$  S/cm para  $10^{-9}$  S/cm.

A voltametria cíclica permitiu verificar a existência de reações de oxidação redução, indicando a gama de tensões a aplicar para cada sistema e verificou-se através dos testes de libertação de fármaco que em alguns casos, as tensões que melhor controlaram a libertação correspondiam às tensões de picos de oxidação e redução.

O estudo do efeito da tensão aplicada entre os sistemas de membranas e o eléctrodo de prata levou à conclusão de que a libertação do fármaco foi retardada em relação à difusão, quando foi aplicado um potencial negativo, enquanto se comprovou uma libertação rápida com tensões positivas. Para os cinco sistemas foi com um potencial de -0,3 V a que se deu a maior retenção de fármaco e as tensões que estimularam a libertação foram a um potencial de +0,3 V para o Sistema Único PPI<sub>90</sub>, +0,5 V para o Sistema Rebordo PPI<sub>90</sub> e Sistema Rebordo PEDOT<sub>120</sub> e, por fim, +0,8 V para o Sistema Único PEDOT<sub>120</sub> e Sistema Rebordo Mix.

Também se quantificou a percentagem de ibuprofeno libertada para o meio, dando origem a percentagens de libertação superiores a 100% devido à libertação de pequenos subprodutos e resíduos da reação de funcionalização com PPI e PEDOT durante os ensaios de libertação. Face à falta de seletividade do método espectrofotométrico, realizaram-se alguns doseamentos de IBU por LC-MS/MS, os quais permitiram confirmar a libertação de ibuprofeno, em percentagens inferiores a 1%.

Com tensões alternadas numa libertação alcançou-se um perfil de libertação "ON/OFF" para todos os sistemas. Estas condições foram replicadas com sucesso num protótipo de penso transdérmico contendo as membranas, um fio de prata muito fino e coberto com um curativo limpo para simular um possível contato com a pele.

O protótipo proposto possibilitará uma libertação contínua de fármaco para pensos direcionados a doenças dermatológicas prolongadas após a implementação de um pequeno circuito eletrónico que altera o potencial de libertação de fármaco (padrão "ON/OFF") em função da severidade das feridas e criará um sistema de libertação, simples e económico para administração tópica de fármacos.

Em estudos futuros dever-se-á ter em conta a verificação dos resultados efetuando mais ensaios de modo a ter-se uma melhor estatística para cada ensaio. Para melhorar o rendimento dos sistemas criados será necessário otimizar a quantidade de fármaco encapsulada bem como averiguar qual a técnica que melhor permite quantificar a quantidade de fármaco libertada para o meio. Face ao tempo disponível para a realização deste estudo, não foi possível o aperfeiçoamento do protótipo nem o seu estudo para todos os sistemas o que permitiria obter informações mais conclusivas no que diz respeito às características do funcionamento do bio-dispositivo, à concentração de fármaco libertada e respetiva correlação com as quantidades de fármaco introduzidas nas membranas. No entanto, já foi definida uma ideia de um protótipo de um penso transdérmico, tal como ilustrado na Figura 4.11 do Capítulo 4.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Geetha, C. R. K. Rao, M. Vijayan, and D. C. Trivedi, "Biosensing and drug delivery by polypyrrole," *Anal. Chim. Acta*, vol. 568, no. 1–2, pp. 119–125, May 2006, doi: 10.1016/J.ACA.2005.10.011.
- [2] H. Lee, C. Song, S. Baik, D. Kim, T. Hyeon, and D. H. Kim, "Device-assisted transdermal drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 127, pp. 35–45, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.ADDR.2017.08.009.
- [3] S. Gao *et al.*, "Stimuli-responsive bio-based polymeric systems and their applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 5, pp. 709–729, Jan. 2019, doi: 10.1039/C8TB02491J.
- [4] W. Y. Jeong, M. Kwon, H. E. Choi, and K. S. Kim, "Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review," *Biomater. Res.*, vol. 25, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S40824-021-00226-6.
- [5] M. Amjadi *et al.*, "Recent Advances in Wearable Transdermal Delivery Systems," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 7, p. 1704530, Feb. 2018, doi: 10.1002/ADMA.201704530.
- [6] H. A. E. Benson, J. E. Grice, Y. Mohammed, S. Namjoshi, and M. S. Roberts, "Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 16, no. 5, pp. 444–460, Feb. 2019, doi: 10.2174/1567201816666190201143457.
- [7] D. Samanta, R. Mehrotra, K. Margulis, and R. N. Zare, "On-demand electrically controlled drug release from resorbable nanocomposite films," *R. Soc. Chem.*, vol. 9, p. 16429, 2017, doi: 10.1039/c7nr06443h.
- [8] A. Servant, C. Bussy, K. Al-Jamal, and K. Kostarelos, "Design, engineering and structural integrity of electro-responsive carbon nanotube- based hydrogels for pulsatile drug release," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 36, pp. 4593–4600, Aug. 2013, doi: 10.1039/C3TB20614A.
- [9] C. A. R. Chapman, E. A. Cuttaz, J. A. Goding, and R. A. Green, "Actively controlled local drug delivery using conductive polymer-based devices," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 116, no. 1, p. 010501, Jan. 2020, doi: 10.1063/1.5138587.
- [10] A. Tamayol *et al.*, "Biodegradable elastic nanofibrous platforms with integrated flexible heaters for on-demand drug delivery," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-04749-8.
- [11] R. Jain, S. Shetty, and K. S. Yadav, "Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 57, p.

- 101604, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.JDDST.2020.101604.
- [12] K. Park, "The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back," *J. Control. Release*, vol. 190, p. 8, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.JCONREL.2014.03.054.
- [13] K. Park, "Facing the truth about nanotechnology in drug delivery," *ACS Nano*, vol. 7, no. 9, pp. 7442–7447, Sep. 2013, doi: 10.1021/NN404501G.
- [14] E. J. Torres-Martinez, J. M. Cornejo Bravo, A. Serrano Medina, G. L. Pérez González, and L. J. Villarreal Gómez, "A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 15, no. 10, pp. 1360–1374, Jul. 2018, doi: 10.2174/1567201815666180723114326.
- [15] J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Electrospinning of Collagen Nanofibers," *Biomacromolecules*, vol. 3, no. 2, pp. 232–238, 2002, doi: 10.1021/BM015533U.
- [16] F. Anton, "Process and apparatus for preparing artificial threads," Oct. 02, 1934.
- [17] V. Pillay *et al.*, "A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications," *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/789289.
- [18] G. I. Taylor, "Electrically driven jets," *Proc. R. Soc. London. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 313, no. 1515, pp. 453–475, Dec. 1969, doi: 10.1098/RSPA.1969.0205.
- [19] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer (Guildf.)*, vol. 43, no. 16, pp. 4403–4412, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00275-6.
- [20] P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of acrylic microfibers," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–79, May 1971, doi: 10.1016/0021-9797(71)90241-4.
- [21] J. Zeng *et al.*, "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 92, no. 3, pp. 227–231, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0168-3659(03)00372-9.
- [22] N. Bölgen, I. Vargel, P. Korkusuz, Y. Z. Menciloğlu, and E. Pişkin, "In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 81B, no. 2, pp. 530–543, May 2007, doi: 10.1002/JBM.B.30694.
- [23] S. Tungprapa, I. Jangchud, and P. Supaphol, "Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats," *Polymer (Guildf.)*, vol. 48, no. 17, pp. 5030–5041, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.POLYMER.2007.06.061.
- [24] P. Taepaiboon, U. Rungsardthong, and P. Supaphol, "Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 2, pp. 387–397, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.EJPB.2007.03.018.
- [25] F. Solórzano-Santos and M. G. Miranda-Navales, "Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 2, pp. 136–141, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.COPBIO.2011.08.005.
- [26] I. Liakos *et al.*, "Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 8, pp. 1583–1589, Feb. 2015, doi: 10.1039/C4TB01974A.
- [27] E. R. Kenawy, F. I. Abdel-Hay, M. H. El-Newehy, and G. E. Wnek, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 1, pp. 296–302, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.MATCHEMPHYS.2008.07.081.

- [28] U. Abaci, H. Y. Guney, and U. Kadiroglu, "Morphological and electrochemical properties of PPy, PAni bilayer films and enhanced stability of their electrochromic devices (PPy/PAni–PEDOT, PAni/PPy–PEDOT)," *Electrochim. Acta*, vol. 96, pp. 214–224, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2013.02.120.
- [29] A. Laforgue and L. Robitaille, "Production of conductive PEDOT nanofibers by the combination of electrospinning and vapor-phase polymerization," *Macromolecules*, vol. 43, no. 9, pp. 4194–4200, May 2010, doi: 10.1021/MA9027678/SUPPL\_FILE/MA9027678\_SI\_001.PDF.
- [30] B. Cho, K. S. Park, J. Baek, H. S. Oh, Y. E. Koo Lee, and M. M. Sung, "Single-crystal poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanowires with ultrahigh conductivity," *Nano Lett.*, vol. 14, no. 6, pp. 3321–3327, Jun. 2014, doi: 10.1021/NL500748Y/SUPPL\_FILE/NL500748Y\_SI\_001.PDF.
- [31] D. Müller, C. R. Rambo, D.o.s.recouvreux, L. M. Porto, and G. M. O. Barra, "Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers," *Synth. Met.*, vol. 161, no. 1–2, pp. 106–111, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.SYNTHMET.2010.11.005.
- [32] L. Tang, J. Han, Z. Jiang, S. Chen, and H. Wang, "Flexible conductive polypyrrole nanocomposite membranes based on bacterial cellulose with amphiphobicity," *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 230–235, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2014.09.049.
- [33] A. C. Baptista *et al.*, "Cellulose-based electrospun fibers functionalized with polypyrrole and polyaniline for fully organic batteries," *J. Mater. Chem. A*, vol. 6, no. 1, pp. 256–265, Dec. 2017, doi: 10.1039/C7TA06457H.
- [34] S. Carli *et al.*, "A New Drug Delivery System Based on Tauroursodeoxycholic Acid and PEDOT," *Chemistry*, vol. 25, no. 9, pp. 2322–2329, Feb. 2019, doi: 10.1002/CHEM.201805285.
- [35] A. Catarina Bernardino Baptista, "Development of bio-batteries based on electrospun membranes," Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.
- [36] J. Dias, "Matrizes poliméricas eletrofiadas com PEDOT incorporado para estimulação elétrica de células neuronais," NOVA - SST, Lisboa, 2022.
- [37] A. Guiseppi-Elie, "Electroconductive hydrogels: synthesis, characterization and biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2701–2716, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.12.052.
- [38] R. Wadhwa, C. F. Lagenaur, and X. T. Cui, "Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode," *J. Control. Release*, vol. 110, no. 3, pp. 531–541, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.JCONREL.2005.10.027.
- [39] K. Krukiewicz and J. K. Zak, "Conjugated polymers as robust carriers for controlled delivery of anti-inflammatory drugs," *J. Mater. Sci.*, vol. 49, no. 16, pp. 5738–5745, May 2014, doi: 10.1007/S10853-014-8292-2/TABLES/1.
- [40] R. Feiner *et al.*, "A Stretchable and Flexible Cardiac Tissue–Electronics Hybrid Enabling Multiple Drug Release, Sensing, and Stimulation," *Small*, vol. 15, no. 14, p. 1805526, Apr. 2019, doi: 10.1002/SMLL.201805526.
- [41] A. C. Baptista, M. Brito, A. Marques, and I. Ferreira, "Electronic control of drug release from gauze or cellulose acetate fibres for dermal applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, no. 16, pp. 3515–3522, Apr. 2021, doi: 10.1039/d1tb00249j.

- [42] F. Y. Wang, Y. Chen, Y. Y. Huang, and C. M. Cheng, "Transdermal drug delivery systems for fighting common viral infectious diseases," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 1498–1508, Aug. 2021, doi: 10.1007/S13346-021-01004-6/TABLES/2.
- [43] Y. Zhang, J. Yu, H. N. Bomba, Y. Zhu, and Z. Gu, "Mechanical Force-Triggered Drug Delivery," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 19, pp. 12536–12563, Oct. 2016, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.6B00369.
- [44] Y. Ogawa *et al.*, "Organic Transdermal Iontophoresis Patch with Built-in Biofuel Cell," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 4, pp. 506–510, Mar. 2015, doi: 10.1002/ADHM.201400457.
- [45] S. Bagherifard *et al.*, "Dermal Patch with Integrated Flexible Heater for on Demand Drug Delivery," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 175–184, Jan. 2016, doi: 10.1002/ADHM.201500357.
- [46] M. Li, Y. Liang, J. He, H. Zhang, and B. Guo, "Two-Pronged Strategy of Biomechanically Active and Biochemically Multifunctional Hydrogel Wound Dressing to Accelerate Wound Closure and Wound Healing," *Chem. Mater.*, vol. 32, no. 23, pp. 9937–9953, Dec. 2020, doi: 10.1021/ACS.CHEMMATER.0C02823/SUPPL\_FILE/CM0C02823\_SI\_001.PDF.
- [47] J. Qu, X. Zhao, P. X. Ma, and B. Guo, "Injectable antibacterial conductive hydrogels with dual response to an electric field and pH for localized 'smart' drug release," *Acta Biomater.*, vol. 72, pp. 55–69, May 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.03.018.
- [48] J. Qu, Y. Liang, M. Shi, B. Guo, Y. Gao, and Z. Yin, "Biocompatible conductive hydrogels based on dextran and aniline trimer as electro-responsive drug delivery system for localized drug release," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 140, pp. 255–264, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.08.120.
- [49] Q. Ouyang *et al.*, "Self-powered, on-demand transdermal drug delivery system driven by triboelectric nanogenerator," *Nano Energy*, vol. 62, pp. 610–619, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.NANOEN.2019.05.056.
- [50] X. Zhao, B. Guo, H. Wu, Y. Liang, and P. X. Ma, "Injectable antibacterial conductive nanocomposite cryogels with rapid shape recovery for noncompressible hemorrhage and wound healing," *Nat. Commun. 2018 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04998-9.
- [51] R. Vadlapatla, E. Y. Wong, and S. G. Gayakwad, "Electronic drug delivery systems: An overview," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 41, pp. 359–366, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.JDDST.2017.08.008.
- [52] A. Fry, "Electronically enabled drug-delivery devices: are they part of the future?," <http://dx.doi.org/10.4155/tde.12.57>, vol. 3, no. 7, pp. 805–807, Jul. 2012, doi: 10.4155/TDE.12.57.
- [53] D. Feldman, "Polymer History," *Des. Monomers Polym.*, vol. 11, pp. 1–15, 2008, doi: 10.1163/156855508X292383.
- [54] C. M. Lopes, J. M. S. Lobo, and P. Costa, "Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 41, no. 2, pp. 143–154, 2005, doi: 10.1590/S1516-93322005000200003.
- [55] D. Trache, V. K. Thakur, and R. Boukherroub, "Cellulose nanocrystals/graphene hybrids—a promising new class of materials for advanced applications," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 8, pp. 1–34, Aug. 2020, doi: 10.3390/NANO10081523.
- [56] M. A. Wsoo, S. Shahir, S. P. Mohd Bohari, N. H. M. Nayan, and S. I. A. Razak, "A review on

- the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective," *Carbohydr. Res.*, vol. 491, p. 107978, May 2020, doi: 10.1016/J.CARRES.2020.107978.
- [57] R. J. Moon, G. T. Schueneman, and J. Simonsen, "Overview of Cellulose Nanomaterials, Their Capabilities and Applications," *JOM*, vol. 68, no. 9, pp. 2383–2394, Sep. 2016, doi: 10.1007/S11837-016-2018-7.
- [58] N. Ninan, M. Muthiah, I. K. Park, A. Elain, S. Thomas, and Y. Grohens, "Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering," *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 877–885, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2013.06.067.
- [59] D. R. Solway, W. A. Clark, and D. J. Levinson, "A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers," *Int. Wound J.*, vol. 8, no. 1, pp. 69–73, Feb. 2011, doi: 10.1111/J.1742-481X.2010.00750.X.
- [60] O. Gunduz, Z. Ahmad, E. Stride, and M. Edirisinghe, "Continuous generation of ethyl cellulose drug delivery nanocarriers from microbubbles.," *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 225–237, Sep. 2013, doi: 10.1007/S11095-012-0865-7/FIGURES/12.
- [61] K. Khoshnevisan *et al.*, "Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications and recent advances," *Carbohydr. Polym.*, vol. 198, pp. 131–141, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.06.072.
- [62] D. A. Cerqueira, G. Rodrigues Filho, and A. J. M Valente, "Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar por 1 H-RMN," *Polímeros*, vol. 20, no. 2, pp. 85–91, 2010.
- [63] H. Seddiqi *et al.*, "Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications," *Cellul. 2021 284*, vol. 28, no. 4, pp. 1893–1931, Jan. 2021, doi: 10.1007/S10570-020-03674-W.
- [64] C. Dumitriu *et al.*, "Production and characterization of cellulose acetate – titanium dioxide nanotubes membrane fraxiparinized through polydopamine for clinical applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 215–223, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.10.082.
- [65] E. Zussman, A. Yarin, and D. Weihs, "A micro-aerodynamic decelerator based on permeable surfaces of nanofiber mats," *Exp. Fluids*, vol. 33, no. 2, pp. 315–320, 2002, doi: 10.1007/S00348-002-0435-6.
- [66] C. Zuliani, V. F. Curto, G. Matzeu, K. J. Fraser, and D. Diamond, "Properties and Customization of Sensor Materials for Biomedical Applications," *Compr. Mater. Process.*, vol. 13, pp. 221–243, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-08-096532-1.01308-X.
- [67] K. Namsheer and C. S. Rout, "Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications," *RSC Adv.*, vol. 11, no. 10, pp. 5659–5697, Feb. 2021, doi: 10.1039/D0RA07800J.
- [68] Y. Shi, L. Peng, and G. Yu, "Nanostructured conducting polymer hydrogels for energy storage applications.," *Nanoscale*, vol. 7, no. 30, pp. 12796–12806, Aug. 2015, doi: 10.1039/C5NR03403E.
- [69] B. A. Kuzubaşoğlu, M. Tekçin, and S. K. Bahadır, "Electronic Textiles (E-Textiles): Fabric Sensors and Material-Integrated Wearable Intelligent Systems," *Ref. Modul. Biomed. Sci.*, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-822548-6.00085-6.
- [70] M. Parit, H. Du, X. Zhang, C. Prather, M. Adams, and Z. Jiang, "Polypyrrole and cellulose nanofiber based composite films with improved physical and electrical properties for

- electromagnetic shielding applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 240, p. 116304, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2020.116304.
- [71] Q. He *et al.*, "Enhancing electrical conductivity and electrical stability of polypyrrole-coated cotton fabrics via surface microdissolution," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 21, p. 47515, Jun. 2019, doi: 10.1002/APP.47515.
- [72] L. Bolaños Ch and L. X. Alvarez, "Polímeros Conductores: Aplicaciones En Celdas Fotovoltaicas Y Dispositivos Electrónicos," *Cienc. Y Tecnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 18–38, 2018.
- [73] T. V. Vernitskaya and O. N. Efimov, "Polypyrrole: A conducting polymer (synthesis, properties, and applications)," *Usp. Khim.*, vol. 66, no. 5, pp. 502–505, May 1997, doi: 10.1070/RC1997V066N05ABEH000261/XML.
- [74] D. D. Ateh, H. A. Navsaria, and P. Vadgama, "Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues," *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 11, pp. 741–752, Dec. 2006, doi: 10.1098/RSIF.2006.0141.
- [75] E. Zheng *et al.*, "Chemical Polymerization of Hydroxymethyl and Chloromethyl Functionalized PEDOT:PSS," *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 1, no. 11, pp. 3103–3114, Nov. 2019, doi: 10.1021/ACSAPM.9B00757/ASSET/IMAGES/LARGE/AP9B00757\_0006.JPEG.
- [76] M. Mueller, M. Fabretto, D. Evans, P. Hojati-Talemi, C. Gruber, and P. Murphy, "Vacuum vapour phase polymerization of high conductivity PEDOT: Role of PEG-PPG-PEG, the origin of water, and choice of oxidant," *Polymer (Guildf.)*, vol. 53, no. 11, pp. 2146–2151, May 2012, doi: 10.1016/J.POLYMER.2012.03.028.
- [77] S. Nie, Z. Li, Y. Yao, and Y. Jin, "Progress in Synthesis of Conductive Polymer Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)," *Front. Chem.*, vol. 9, p. 1137, Dec. 2021, doi: 10.3389/FCHEM.2021.803509/XML/NLM.
- [78] "PEDOT | Podcast | Chemistry World." <https://www.chemistryworld.com/podcasts/pedot/8229.article> (accessed Aug. 31, 2022).
- [79] G. M. Halford, M. Lordkipanidzé, and S. P. Watson, "50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams," *Platelets*, vol. 23, no. 6, pp. 415–422, Sep. 2012, doi: 10.3109/09537104.2011.632032.
- [80] K. D. Rainsford, "Ibuprofen: From invention to an OTC therapeutic mainstay," *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 67, no. SUPPL. 178, pp. 9–20, 2013, doi: 10.1111/ijcp.12055.
- [81] "Ibuprofen ((±)-Ibuprofen) | COX-1 Inhibitor | MedChemExpress." <https://www.medchemexpress.com/Ibuprofen.html> (accessed Sep. 13, 2022).
- [82] A. P. Mendes, "Centro de Informação do Medicamento - INFARMED. Ficha Técnica do Centro de Informação do Medicamento: Anti-inflamatórios Não Esteróides Não Sujeitos a Receita Médica," 2015. Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2257951/pdf/1750-4732-2-2.pdf>.
- [83] L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, and B. C. Knollmann, *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th ed. .
- [84] Infarmed, "Lista de DCI identificadas pelo Infarmed como MNSRM-EF e respetivos protocolos de dispensa." [https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes\\_transferencia\\_titular\\_aim/lista\\_dci](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim/lista_dci) (accessed Sep. 13, 2022).
- [85] I. Ghlichloo and V. Gerriets, "Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)," *Treat. Chronic Pain Cond. A Compr. Handb.*, pp. 77–79, May 2022, doi: 10.1007/978-1-4939-

- 6976-0\_21.
- [86] Infarmed, "Novo relatório sobre vendas de MNSRM fora das farmácias - Notícias - Ordem dos Farmacêuticos." <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/novo-relatorio-sobre-vendas-de-mnsrm-fora-das-farmacias/> (accessed Sep. 12, 2022).
- [87] M. Parolini, "Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review," *Sci. Total Environ.*, vol. 740, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.140043.
- [88] P. Verlicchi, A. Galletti, M. Petrovic, D. Barceló, M. Al Aukidy, and E. Zambello, "Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed - analysis of their respective contributions," *Sci. Total Environ.*, vol. 454–455, pp. 411–425, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2013.03.044.
- [89] S. C. Monteiro and A. B. A. Boxall, "Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 202, pp. 53–154, 2010, doi: 10.1007/978-1-4419-1157-5\_2.
- [90] "(R)-(-)-Ibuprofen | C13H18O2 | ChemSpider." <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.102822.html> (accessed Sep. 13, 2022).
- [91] "Ibuprofen: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online." <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050> (accessed Sep. 13, 2022).
- [92] U. Fernando, P. Faculdade, D. E. Ciências, and D. A. Saúde, "Lipossomas como modelos biomembranares: correlação entre coeficientes de partição (lipossoma/água e octanol) e actividade de compostos farmacologicamente activos," 2011, Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/2407>.
- [93] H. Cumming and C. Rücker, "Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple <sup>1</sup>H NMR Method," *ACS Omega*, vol. 2, no. 9, pp. 6244–6249, Sep. 2017, doi: 10.1021/ACSOMEGA.7B01102/ASSET/IMAGES/AO-2017-011026\_M009.GIF.
- [94] S. Ali Mohammadpoor, S. Akbari, M. Sadrajani, and P. Nourpanah, "Fabrication of electrospun ibuprofen-loaded poly(vinyl alcohol)/hyper-branched poly(ethylenimine) fibers and their release behaviors," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 31, no. 2, pp. 261–275, Jan. 2019, doi: 10.1080/09205063.2019.1685759.
- [95] J. Irvine, A. Afrose, and N. Islam, "Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities," <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1391838>, vol. 44, no. 2, pp. 173–183, Feb. 2017, doi: 10.1080/03639045.2017.1391838.
- [96] A. R. Ariane *et al.*, "Terapia fotodinâmica em eletrofição: revisão de técnicas e aplicações," *Quim. Nova*, vol. 43, no. 5, pp. 613–622, May 2020, doi: 10.21577/0100-4042.20170524.
- [97] G. C. Ingavle and J. K. Leach, "Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 277–293, Aug. 2014, doi: 10.1089/ten.teb.2013.0276.
- [98] L. A. Mercante, R. S. Andre, J. B. Macedo, A. Pavinatto, and D. S. Correa, "Nanofibras Eletrofiadas e Suas Aplicações: Avanços Na Última Década," *Quim. Nov.*, vol. 44, no. 6, pp. 717–736, 2021, doi: 10.21577/0100-4042.20170721.
- [99] V. Salles *et al.*, "Synthesis and Characterization of Advanced Carbon-Based Nanowires – Study of Composites Actuation Capabilities Containing These Nanowires as Fillers,"

- Nanowires - Recent Adv.*, Dec. 2012, doi: 10.5772/54384.
- [100] B. Pant, M. Park, and S. J. Park, "Drug Delivery Applications of Core-Sheath Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning: A Review," *Pharm. 2019*, Vol. 11, Page 305, vol. 11, no. 7, p. 305, Jul. 2019, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS11070305.
- [101] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 8, pp. 1165–1188, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.ARABJC.2015.11.015.
- [102] S. Maity and A. Chatterjee, "Textile/Polypyrrole Composites for Sensory Applications," *J. Compos.*, vol. 2015, pp. 1–6, Oct. 2015, doi: 10.1155/2015/120516.
- [103] R. Brooke, P. Cottis, P. Talemi, M. Fabretto, P. Murphy, and D. Evans, "Recent advances in the synthesis of conducting polymers from the vapour phase," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 86, pp. 127–146, May 2017, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2017.01.004.
- [104] M. J. Booth, "Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image," *Light Sci. Appl. 2014 34*, vol. 3, no. 4, pp. e165–e165, Apr. 2014, doi: 10.1038/lisa.2014.46.
- [105] M. Henini, "Scanning electron microscopy: an introduction," *III-Vs Rev.*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0961-1290(00)80006-X.
- [106] M. Abd Mutalib, M. A. Rahman, M. H. D. Othman, A. F. Ismail, and J. Jaafar, "Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy," *Membr. Charact.*, pp. 161–179, Feb. 2017, doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7.
- [107] A. Mohammed and A. Abdullah, "Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review," *Proc. 2018 Int. Conf. Hydraul. Pneum. - HERVEX*, pp. 77–85, 2018.
- [108] R. S. Das and Y. K. Agrawal, "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications," *Vib. Spectrosc.*, vol. 57, no. 2, pp. 163–176, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.VIBSPEC.2011.08.003.
- [109] K. J. I. Ember *et al.*, "Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review," *npj Regen. Med. 2017 21*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10, May 2017, doi: 10.1038/s41536-017-0014-3.
- [110] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, "Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers," *Nanoscale Res. Lett. 2019 141*, vol. 14, no. 1, pp. 1–34, Jul. 2019, doi: 10.1186/S11671-019-3039-2.
- [111] W. F. Pacheco, F. S. Semaan, V. G. K. De Almeida, A. G. S. L. Ritta, and R. Q. Aucélio, "Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos," *Rev. Virtual Química*, vol. 5, no. 4, pp. 516–537, Aug. 2013, doi: 10.5935/1984-6835.20130040.
- [112] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *J. Chem. Educ.*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, Feb. 2018, doi: 10.1021/ACS.JCHEMED.7B00361/SUPPL\_FILE/ED7B00361\_SI\_002.DOCX.
- [113] Y. S. Choudhary, L. Jothi, and G. Nageswaran, "Electrochemical Characterization," *Spectrosc. Methods Nanomater. Charact.*, vol. 2, pp. 19–54, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-46140-5.00002-9.
- [114] L. M. Aleixo, "Voltamétria: conceitos e técnicas," *Rev. Chemkeys*, no. 3, pp. 1–21, Sep. 2003, doi: 10.20396/CHEMKEYS.V0I3.9609.
- [115] L. Müller and F. A. Müller, "Preparation of SBF with different HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> content and its influence on the composition of biomimetic apatites," *Acta Biomater.*, vol. 2, no. 2, pp.

- 181–189, 2006, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2005.11.001.
- [116] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.017.
- [117] J. M. G. Martinho, "Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível," *Química*, vol. 52, pp. 44–48, 1994.
- [118] G. R. Santos, G. S. P. Paulino, G. P. I. Borges, A. F. Santiago, and G. A. da Silvac, "Avanços Analíticos Baseados em Modelos de Calibração de Primeira Ordem e Espectroscopia Vis para Avaliação da Qualidade da Água, Revisão - Parte 1," *Quim. Nova*, vol. 45, no. 3, pp. 314–323, May 2022, doi: 10.21577/0100-4042.20170830.
- [119] C. M. M. Almeida, "Overview of Sample Preparation and Chromatographic Methods to Analysis Pharmaceutical Active Compounds in Waters Matrices," *Sep. 2021, Vol. 8, Page 16*, vol. 8, no. 2, p. 16, Feb. 2021, doi: 10.3390/SEPARATIONS8020016.
- [120] C. S. Wong and S. L. MacLeod, "JEM spotlight: recent advances in analysis of pharmaceuticals in the aquatic environment," *J. Environ. Monit.*, vol. 11, no. 5, pp. 923–936, 2009, doi: 10.1039/B819464E.
- [121] S. O. Eraga, M. I. Arhewoh, R. N. Chibuogwu, and M. A. Iwuagwu, "A comparative UV–HPLC analysis of ten brands of ibuprofen tablets," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 5, no. 10, pp. 880–884, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.APJT.2015.06.005.
- [122] M. D. G. García *et al.*, "Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 29, pp. 5489–5496, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.CHROMA.2009.05.073.
- [123] S. D. Richardson, "Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 747–778, Jan. 2012, doi: 10.1021/AC202903D/ASSET/IMAGES/AC202903D.SOCIAL.JPEG\_V03.
- [124] R. López-Serna, M. Petrović, and D. Barceló, "Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS)," *Chemosphere*, vol. 85, no. 8, pp. 1390–1399, 2011, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.07.071.
- [125] M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1292, pp. 2–18, May 2013, doi: 10.1016/J.CHROMA.2012.09.061.
- [126] M. Pietruk, P. Jedziniak, and M. Olejnik, "LC-MS/MS Determination of 21 Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Residues in Animal Milk and Muscles," *Mol. 2021, Vol. 26, Page 5892*, vol. 26, no. 19, p. 5892, Sep. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26195892.
- [127] X. Fan, Z. Yang, and N. He, "Hierarchical nanostructured polypyrrole/graphene composites as supercapacitor electrode," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 20, pp. 15096–15102, Jan. 2015, doi: 10.1039/C4RA15258A.
- [128] S. H. Chang, C. H. Chiang, F. S. Kao, C. L. Tien, and C. G. Wu, "Unraveling the Enhanced Electrical Conductivity of PEDOT:PSS Thin Films for ITO-Free Organic Photovoltaics," *undefined*, vol. 6, no. 4, Aug. 2014, doi: 10.1109/JPHOT.2014.2331254.
- [129] B. Sütő *et al.*, "Development of ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier-based gels:

- characterization and investigation of in vitro and in vivo penetration through the skin," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 1201–1212, Mar. 2016, doi: 10.2147/IJN.S99198.
- [130] M. L. Vueba, M. E. Pina, L. A. E. Batista, and D. E. Carvalho, "Conformational Stability of Ibuprofen: Assessed by DFT Calculations and Optical Vibrational Spectroscopy," doi: 10.1002/jps.21007.
- [131] M. Brie, R. Turcu, and A. Mihut, "Stability study of conducting polypyrrole films and polyvinylchloride-polypyrrole composites doped with different counterions," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 49, no. 2, pp. 174–178, Jun. 1997, doi: 10.1016/S0254-0584(97)01885-3.
- [132] G. Dijk, A. L. Rutz, and G. G. Malliaras, "Stability of PEDOT:PSS-Coated Gold Electrodes in Cell Culture Conditions," *Adv. Mater. Technol.*, vol. 5, no. 3, p. 1900662, Mar. 2020, doi: 10.1002/ADMT.201900662.
- [133] Y. C. Liu and B. J. Hwang, "Mechanism of conductivity decay of polypyrrole exposed to water and enhancement of conductivity stability of copper(I)-modified polypyrrole," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 501, no. 1–2, pp. 100–106, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0022-0728(00)00510-6.
- [134] Y. Ding, Y. Wang, L. Su, H. Zhang, and Y. Lei, "Preparation and characterization of NiO–Ag nanofibers, NiO nanofibers, and porous Ag: towards the development of a highly sensitive and selective non-enzymatic glucose sensor," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 44, pp. 9918–9926, Nov. 2010, doi: 10.1039/C0JM01968B.
- [135] K. R. Prasad and N. Munichandraiah, "Electrocatalytic efficiency of polyaniline by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy studies," *Synth. Met.*, vol. 126, no. 1, pp. 61–68, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0379-6779(01)00496-9.
- [136] J. Wang, "Analytical Electrochemistry, Third Edition," *Anal. Electrochem. Third Ed.*, pp. 1–250, Apr. 2006, doi: 10.1002/0471790303.
- [137] J. Freire, "Anti-bacterial Surface Protection for Prostheses," Nova School of Science & Technology, Lisboa, 2022.





2022

BEATRIZ LAGO

DESENVOLVIMENTO DE UM PENSO DÉRMICO DE CONTROLO ELETRÓNICO PARA A LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO