



Rafael José Marques Monteiro

Sistemas transdérmicos de base ácido láctico para administração de princípios ativos

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, orientada pela Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Gaudêncio Baptista e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Rafael José Marques Monteiro

Sistemas transdérmicos de base ácido láctico para administração de princípios ativos

Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Supervisores:

Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Gaudêncio Baptista

Instituições:

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra, 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“ Impossível é apenas uma palavra usada pelos fracos que acham mais fácil viver no mundo que lhes foi determinado do que explorar o poder que possuem para mudá-lo. O impossível não é um facto consumado. É uma opinião. Impossível não é uma afirmação. É um desafio. O impossível é algo potencial. O impossível é algo temporário. Nada é impossível.”

Muhammad Ali

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Professora Doutora Cristina Gaudêncio, por me ter dado esta oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, pela sua orientação, simpatia e disponibilidade com que sempre me recebeu. O meu agradecimento por todo o apoio, ajuda e otimismo demonstrado ao longo destes meses, não esquecendo todos os conselhos e palavras de incentivo que me fizeram crescer a nível laboratorial e pessoal. Obrigado também, por toda a paciência e compreensão demonstrada na escrita. Quero também deixar o meu apreço à Doutora Dina Marques que, mesmo estando longe, se mostrou sempre disponível para ajudar e aconselhar na medida do possível.

Quero fazer um agradecimento especial à Engenheira Diana Travassos, amiga e colega de laboratório, pelos conhecimentos partilhados e por toda a formação e ensinamentos a nível laboratorial. Muito obrigado por toda a disponibilidade na ajuda e esclarecimento de dúvidas, pelo auxílio prestado na síntese dos materiais e por todos os devidos esclarecimentos relativos à sua caracterização. Ao longo de todo o trabalho foi uma fonte de força, otimismo e boa disposição que contribuíram para o meu sucesso.

Queria agradecer também ao Dr. Filipe Aguiar e ao Dr. Fernando Cruz por possibilitarem o desenvolvimento desta ideia e tornarem o projeto possível, por toda a disponibilidade e conhecimentos transmitidos na fase inicial do projeto. Agradecer também ao Professor Doutor Jorge Rocha pela simpatia, disponibilidade e paciência sempre demonstradas, mas acima de tudo, pela sabedoria e conhecimentos transmitidos, ajudando também no desenvolvimento do meu espírito crítico na análise dos resultados. Agradeço ainda à Engenheira Cátia Mendes pela sua simpatia, disponibilização dos protocolos e pelos seus conselhos e sugestões. Um agradecimento especial, também às Engenheiras Ana Borba e Maria João pela paciência, disponibilidade e rapidez na realização das análises ATR-FTIR, TGA e DSC.

Gostaria de agradecer ainda aos colegas que partilharam o laboratório comigo por toda a ajuda e conhecimentos compartilhados, pela boa disposição e amizade criada. Um agradecimento especial à Engenheira Paula Egas, Ana Leonor, Catarina Peralta, Diana Godinho, Joana Santos, Luís Rodrigues, Maria Pilar, Marta Santos, Patrícia Almeida e à Rafaela Rodrigues. Agradeço também ao Sr. José, Sr. Manuel, D.Dulce, D.Fernanda e D.Elsa

pela disponibilidade e apoio prestado, não esquecendo a Sandra Silva por todos os conselhos, apoio e amizade.

Agradecer a todos os meus amigos que me acompanharam ao longo deste meu percurso de vida e, sem os quais não era possível alcançar os objetivos. O meu muito obrigado ao André Simões, Henrique Marto, Inês Alegre, João Miguel Santos, Marcelo Oliveira, Marco Ferreira, Maria João Vieira, Mauro Silva, Nelson Silva, Rui Lopes, Vanessa Leal, Virginie Xavier e Vítor Barreto, por todo o apoio e palavras de incentivo ao longo destes anos e por acreditarem sempre muito em mim. Obrigado também por me desencaminharem de vez em quando, permitindo-me desanuviar a cabeça. A vocês, agradeço-vos muito por estes maravilhosos anos e por toda a vossa amizade. Sei que poderei sempre contar com vocês.

Aos meus pais que fizeram de mim o que sou hoje, obrigado pelos valores e ensinamentos transmitidos, por todo o amor e carinho, e por estarem sempre presentes a apoiarem-me, mesmo com as minhas ausências. Sem vocês, nada disto era possível. Estou eternamente grato por esta oportunidade, e vocês sabem que a agarrei com unhas e dentes desde o início, por ter noção dos sacrifícios que fizeram e fazem por mim. Ao meu irmão, agradeço todo o apoio e palavras de incentivo dados ao longo destes anos. Espero continuar a ser um exemplo para ti.

Aos meus avós, tios e primos, agradeço toda a preocupação, apoio, incentivo e força transmitida. Sei que quiseram e querem sempre o melhor para mim. Agradeço muito aos meus avós, em especial à minha avó Sílvia. Foste uma das razões para eu nunca ter desistido de nada e pensar sempre que o céu é o limite, mesmo nos momentos mais difíceis. Sei que terias muito orgulho em me ver alcançar este objetivo. Um agradecimento especial ao meu tio, padrinho e irmão mais velho, Jorge Azevedo, que é desde pequeno um exemplo para mim, e à namorada Solange Marques, por toda a preocupação, incentivos e conselhos.

Despeço-me (um até breve) da Universidade de Coimbra, já com o sentimento de saudade. Coimbra foi e sempre será a minha cidade. Daqui guardo grandes recordações que jamais serão esquecidas.

Rafael José Marques Monteiro

RESUMO

Ao longo dos últimos anos a administração por via transdérmica tem sido foco de estudo intensivo das áreas farmacêutica e biomédica, procurando resolver limitações de outras vias de administração. Os sistemas transdérmicos permitem a libertação de quantidades terapêuticas de forma localizada e prolongada, com vantagens no controlo dos níveis do princípio ativo no plasma sanguíneo. Contudo neste processo há que ultrapassar a barreira imposta pela pele, o que pode exigir a utilização de promotores de permeação.

O ácido láctico (AL) e os seus copolímeros têm vindo a ser considerados como materiais muito atrativos para as áreas biomédica e farmacêutica, por serem biodegradáveis, biocompatíveis e estáveis. Recentemente tem-se investigado a produção de adesivos cirúrgicos fotopolimerizáveis e de filmes para sistemas transdérmicos. Às redes poliméricas destes filmes podem ser adicionados princípios ativos controlando-se os perfis de libertação em função da estrutura dos materiais, do teor de gel e hidrofiliçidade, bem como da concentração inicial de fármaco. Apesar de já existirem no mercado sistemas de administração transdérmica de fármacos, não se conhecem produtos, nem estudos, que envolvam a libertação de proteínas. A investigação da produção de filmes de base ácido láctico com vista a administração de albumina de soro bovino (BSA) constituiu o objetivo deste estudo.

Com base nos protocolos experimentais disponíveis para a produção de filmes de base ácido láctico para a administração de ibuprofeno, selecionaram-se novos co-monomeros: PEG 400, pentaeritritol (mPET), dipentaeritritol (diPET) e tripentaeritritol (triPET), e sintetizaram-se oligómeros por policondensação. A funcionalização dos oligómeros por reação com o Laromer[®] LR 9000 (LAR), em diferentes proporções estequiométricas, assegurou a reticulação. Após adição de Irgacure[®] 2959 e exposição a irradiação UV, entre 60 e 90 segundos, obtiveram-se filmes flexíveis e resistentes entre outras propriedades requeridas, reunindo condições para avaliar o seu desempenho como sistemas de libertação. A proporção de LAR utilizada teve influência nas propriedades.

A incorporação de proteína nos filmes decorreu durante o processo de produção, por adição de uma solução aquosa de BSA aos géis funcionalizados. As outras etapas de produção não foram alteradas. A concentração teórica de BSA nos filmes foi de 1, 3 e 6 % (m/m). Em geral, as propriedades físicas dos filmes com BSA foram semelhantes às dos filmes base com tempos de reticulação de 90 e 120 segundos.

Os materiais produzidos foram caracterizados para validação das propriedades para administração de princípios ativos. Os filmes eram ligeiramente hidrofílicos, dependendo do co-monomero utilizado e da quantidade de LAR, sendo o filme AL-PEG 400 (1:1) o mais hidrofílico e o AL-triPET (1:3) o mais hidrofóbico. A análise da estabilidade térmica de todos os materiais revelou que, de modo geral, o aprisionamento de BSA diminuiu a estabilidade térmica dos filmes. A temperatura de transição vítrea é negativa antecipando que as condições de utilização previstas não alterem o comportamento dos materiais. Após incubação em solução de PBS, os filmes mostraram alguma instabilidade hidrolítica, 40 % em média, em consonância com o co-monomero, quantidade de LAR utilizada e o grau de reticulação, relacionado com a capacidade de absorção de água. Esta capacidade de degradação não afeta a aplicação desejada, tendo em conta a duração prevista para a administração da proteína, 8 horas. Os valores da energia de superfície dos filmes base são inferiores à da pele permitindo uma boa adesão e um bom desempenho mecânico dos materiais.

Os estudos da cinética de libertação de BSA *in vitro*, decorreram por duas técnicas: incubação e em célula de difusão de Franz, à temperatura de 37 °C. O meio coletor foi uma solução de PBS. Todos os filmes apresentaram velocidades de libertação elevadas nas primeiras horas, superiores nos testes por incubação em virtude de maior área de transferência. O filme AL-PEG 400 (1:1) confirmou o melhor desempenho, antecipado na análise das suas propriedades. De entre os materiais com 3 % (m/m) de BSA, o AL-diPET (1:2) mostrou ser o mais promissor. Para o mesmo material verificou-se que maiores carregamentos originaram melhores libertações. No entanto, apesar de a evolução de massa da BSA libertada seguir o perfil esperado, os valores atingidos foram superiores à BSA aprisionada, evidenciando que outros compostos poderão estar a interferir na análise das soluções coletoras. Estudos preliminares da influência de parâmetros do processo sobre a atividade da BSA em solução aquosa permitiram prever que o aquecimento até 50 °C e a exposição a radiação UV até 5 minutos não degradem a proteína. Já a adição de acetona ou a diminuição do pH, comprometeram a sua atividade por desnaturação.

Palavras-chave: Ácido láctico, adesivos transdérmicos, copolímeros, libertação controlada, BSA – Albumina de soro bovino.

ABSTRACT

Over the last few years transdermal administration has been the focus of intensive study by the pharmaceutical and biomedical fields, in order to overcome limitations of other administration routes. Transdermal systems enable the release of therapeutic amounts in a localized and prolonged form with advantages in controlling levels of the active principles in the blood plasma. However in this process the barrier imposed by the skin must be overcome which may require the use of permeation promoters.

Lactic acid (AL) and its copolymers are ranked as very attractive materials for the biomedical industry as they are biodegradable, biocompatible and stable. Recently, the production of photocrosslinkable surgical adhesives and films to be used in transdermal patches has been under study. Active principles may be added to these polymer networks and the drug release profiles will depend on the structure of the materials, the gel content and hydrophilicity, as well as on the initial drug concentration. Although there are many transdermal drug delivery systems already available, these do not include systems for protein administration. The aim of this study was to investigate the production of lactic acid base films for the administration of bovine serum albumin (BSA).

Based on the experimental protocols already available for the production of lactic acid based films for the delivery of ibuprofen, new co-monomers were selected: PEG 400, pentaerythritol (mPET), dipentaerythritol (diPET) and tripentaerythritol (triPET) and new oligomers were synthesized by polycondensation. Functionalization of the oligomers, which ensured crosslinking, occurred by reaction with Laromer[®] LR 9000 (LAR), in different stoichiometric ratios. Irgacure[®] 2959, a photoinitiator, allowed crosslinking after UV irradiation between 60 and 90 seconds. The films obtained were flexible and resistant, among other properties, supporting their assessment as drug delivery system. The amount of LAR used influenced the final properties.

Protein entrapment in the films occurred during the production process by addition of an aqueous solution of BSA to the functionalized gels. All other production steps remained unchanged. The target concentration of BSA in the films was 1, 3 and 6% (w/w). In general, the properties of the films with BSA were similar to those of the original films and the time of crosslinking was 90 to 120 seconds.

The materials produced were characterized and assessed for the administration of active principles. The films showed a mild hydrophilicity, depending on the co-monomer used and the amount of LAR, with AL-PEG 400 (1:1) film being the most hydrophilic and the AL-triPET (1:3) the most hydrophobic. Analysis of the thermal stability of all materials revealed that the entrapment of BSA decreased the thermal stability of the films. The glass transition temperature is negative anticipating that the intended use will not change materials properties. Upon incubation in PBS solution the films revealed some hydrolytic instability, 40 % on average, consistent with the degree of crosslinking, co-monomer and amount of LAR used, properties related to the swelling capacity. This will not endanger the delivery of the protein, expected to last for 8 hours. The surface energy of films were lower than that of skin, allowing anticipating a good adhesion and a good mechanical performance of the materials.

In vitro BSA release studies were performed by incubation and in a Franz diffusion cell, at 37 ° C. All films showed fast initial release rates, which were higher in the incubation tests, due to the larger mass transfer area. The best release rates were obtained with AL-PEG 400 (1:1) film. Among the films with the same target BSA concentration, the AL-diPET film (1:2) was the most promising. When, for the same material, different active loads were assessed, larger active principle loads led to higher delivery rates. However, although the BSA concentration followed the expected profile, the release values achieved are much higher than the entrapped BSA, evidencing that other compounds may be interfering in the release analysis. Studies of degradation of BSA when subjected to various conditions allowed to check that heating BSA solutions to 50 ° C and exposing to UV radiation for up to 5 minutes did not cause protein degradation. Nevertheless, already, the addition of acetone, or the decrease in pH, compromised its activity, denaturing the protein.

Key-words: Lactic acid, transdermal systems, copolymers, controlled delivery, BSA – bovine serum albumin.

ÍNDICE

	Pág
OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE	1
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Estado da arte	5
1.2 Proteínas	16
1.3 Albumina de soro bovino (BSA)	19
1.3.1 Conformações da BSA	19
1.4 Sistemas de administração de proteínas	22
1.4.1 Sistemas transdérmicos	25
CAPÍTULO 2	
2. MATERIAIS e MÉTODOS	27
2.1 Apresentação e descrição detalhada do processo	27
2.2 Materiais	29
2.3 Síntese	30
2.3.1 Síntese dos oligómeros de base ácido láctico	30
2.3.1.1 Síntese do oligómero de AL e PEG	30
2.3.1.2 Síntese do oligómero de AL com mPET, diPET e triPET	31
2.3.2 Funcionalização dos oligómeros com Laromer [®] LR 9000	32
2.3.3 Reticulação fotoquímica dos géis funcionalizados	33
2.4 Caracterização	34
2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com reflexão atenuada (ATR-FTIR)	34
2.4.2 Teor de gel (<i>gel content</i>)	35
2.4.3 Avaliação da capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>)	36
2.4.4 Degradação hidrolítica em PBS	37
2.4.5 Análise das propriedades térmicas dos materiais finais – TGA e DSC	37
2.4.6 Determinação das energias de superfície através da medição de ângulos de contacto	39
2.5 Metodologia de desenvolvimento da solução de proteína e aprisionamento	39

2.6 Estudos de libertação do princípio ativo <i>in vitro</i>	40
2.6.1 Libertação por incubação	41
2.6.2 Libertação em célula de difusão de Franz	43
2.7 Estudo da avaliação da degradação da proteína	43
CAPÍTULO 3	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Síntese dos oligómeros e produção dos filmes fotoreticuláveis	45
3.1.1 Acompanhamento das reações de síntese dos oligómeros, funcionalização e fotoreticulação por ATR-FTIR	47
3.1.2 Avaliação do teor de gel (<i>gel content</i>)	50
3.1.3 Capacidade de absorção de água e degradação hidrolítica em PBS	51
3.1.4 Avaliação das propriedades térmicas	55
3.1.4.1 Análise termogravimétrica (TGA)	55
3.1.4.2 Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	59
3.1.5 Determinação das energias de superfície por medição dos ângulos de contacto	60
3.2 Preparação dos filmes com BSA	61
3.2.1 Caracterização por ATR-FTIR dos filmes com BSA	63
3.2.2 Propriedades térmicas dos filmes com BSA – TGA e DSC	64
3.2.3 Estudos de libertação da BSA <i>in vitro</i>	66
3.3 Estudos de avaliação da degradação da proteína	70
CAPÍTULO 4	
4. CONCLUSÕES	73
4.1 Conclusão geral	73
4.2 Principais contribuições	76
4.3 Perspectivas futuras	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ANEXOS

Anexo A – Estrutura química e propriedades dos reagentes usados	91
Anexo B – Montagem experimental da produção dos oligómeros e funcionalização	93
Anexo C – Processo de produção dos filmes e respectivas condições operacionais	94
Anexo D – Análise ATR-FTIR das matérias-primas	95
Anexo E – Quantificação da proteína BSA por espectrofotometria	97
Anexo F – Estudos de libertação da BSA por incubação e em célula de difusão de Franz	101
Anexo G – Degradação hidrolítica em PBS	102
Anexo H – Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) dos filmes produzidos	105

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático.	8
Tabela 1.2 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático com aprisionamento e libertação de princípios ativos.	13
Tabela 1.3 Percentagem de agregação e diâmetro médio da BSA em água destilada e solução salina de NaCl para cada estado conformacional [49].	21
Tabela 1.4 Massa molar (kDa) da BSA em água destilada e solução salina em função do pH [49].	22
Tabela 1.5 Exemplos de proteínas aprisionadas em materiais poliméricos diferentes.	23
Tabela 3.1 Resumo das condições de reação e peso molecular dos oligómeros sintetizados.	46
Tabela 3.2 Resumo das condições de produção dos filmes poliméricos de base AL e suas características.	46
Tabela 3.3 Valores de <i>gel content</i> para os filmes produzidos.	50
Tabela 3.4 Resumo das percentagens de <i>gel content</i> , <i>swelling</i> e degradação ao fim de 24h dos filmes produzidos.	55
Tabela 3.5 Temperaturas de degradação (T_d) e temperaturas de transição vítrea (T_g) para os oligómeros sintetizados, géis funcionalizados e filmes base reticulados.	58
Tabela 3.6 Valores de energia de superfície e respectivas componentes dispersivas e polares para a pele, Strat-M [®] Membrane, e filmes base reticulados	61
Tabela 3.7 Características dos filmes com BSA: carregamentos ativos e tempos de reticulação.	62
Tabela 3.8 Frequências características e modos vibracionais dos grupos amida de proteínas em análise por ATR-FTIR [101-104].	63
Tabela 3.9 Temperaturas de degradação (T_d) e temperaturas de transição vítrea (T_g) para os filmes, base e com BSA.	65
Tabela 3.10 Equação do perfil de libertação e coeficiente de determinação, para as libertações por célula de difusão de Franz e por incubação, dos filmes com BSA reticulados.	69
Tabela 3.11 Avaliação da degradação da solução de BSA sujeita a vários fatores.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Estrutura geral de um aminoácido.	17
Figura 1.2 Esquema reacional da ligação peptídica.	17
Figura 1.3 Evolução das estruturas das proteínas (Adaptado de [23,27]).	18
Figura 1.4 Conformações da BSA em função do pH (Adaptado de [46]).	21
Figura 2.1 Reação do ácido láctico com o poli (etilenoglicol) 400.	30
Figura 2.2 Reação do ácido láctico com o pentaeritritol.	31
Figura 2.3 Reação do ácido láctico com o dipentaeritritol.	31
Figura 2.4 Reação do ácido láctico com o tripentaeritritol.	31
Figura 2.5 Esquema reacional da funcionalização dos diferentes oligómeros.	33
Figura 3.1 Filmes base produzidos através de fotoreticulação dos géis funcionalizados: a) AL-PEG 400 (1:1); b) AL-mPET (1:2); c) AL-diPET (1:2); d) AL-triPET (1:2); e) AL-triPET (1:3).	47
Figura 3.2 Espectro ATR-FTIR dos oligómeros base e do ácido láctico.	48
Figura 3.3 Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados com LAR.	49
Figura 3.4 Espectros ATR-FTIR dos filmes base após adição de 6% de IRG e reticulação por radiação UV.	49
Figura 3.5 Valores de swelling (%) para os filmes produzidos: testes por incubação em água destilada e de saturação, à temperatura ambiente.	52
Figura 3.6 Perda de massa (%) dos filmes imersos em solução de PBS ao longo de 6 semanas a 37°C.	53
Figura 3.7 Perfil de degradação térmica dos oligómeros, obtido por análise termogravimétrica (TGA).	56
Figura 3.8 Perfis de degradação térmica: a) géis funcionalizados (estado líquido) e b) filmes reticulados.	57

- Figura 3.9** Filmes produzidos com aprisionamento de BSA: a) AL-PEG 400 (1:1) (1% BSA); b) AL-mPET (1:2) (6 % BSA) e c) AL-diPET (1:2) (3 % BSA). 62
- Figura 3.10** Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados e filmes com BSA: materiais AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2) e AL-diPET (1:2). 63
- Figura 3.11** Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados e filmes com BSA: materiais AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3). 64
- Figura 3.12** Perfis de degradação térmica dos filmes com BSA - TGA. 65
- Figura 3.13** Perfis de libertação da BSA *in vitro*: testes por incubação e em célula de Franz, a) filme AL-PEG 400 (1:1) com 1% BSA e AL-mPET (1:2) com 6 % BSA; b) em célula de difusão de Franz e c) por incubação, dos filmes AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:3), com 3% de BSA. Temperatura de 37°C; meio coletor de solução PBS 0,01 M, pH 7,4; Absorvâncias medidas a 278 nm. 67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Símbolos / Abreviatura	Definição
ΔH_m	Entalpia de fusão (kJ.kmol^{-1})
Abs_A	Absorvância da amostra de filme com proteína
Abs_B	Absorvância da amostra de filme branco
Abs_{BSA}	Absorvância da BSA
Carregamento _{teórico}	Porcentagem de proteína no filme
C_{BSA}	Concentração da BSA (mg.mL^{-1})
f_{dil}	Factor de diluição
$m_{BSA,0}$	Massa teórica de proteína a libertar (g)
$m_{BSA \text{ libertada},t}$	Massa total de BSA libertada no instante t
m_f	Massa final (g)
$m_{\text{filme Branco}}$	Massa inicial seca do filme sem proteína (g)
$m_{\text{filme},i}$	Massa inicial seca do filme com proteína (g)
m_h	Massa do filme húmido (g)
m_i	Massa inicial (g)
m_{max}	Massa máxima do filme húmido (g)
$m_{s,i}$	Massa seca inicial (g)
$m_{s,t}$	Massa seca ao fim do tempo t (g)
T_{amb}	Temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$)
T_c	Temperatura de cristalização ($^{\circ}\text{C}$)
T_d	Temperatura de degradação ($^{\circ}\text{C}$)
T_f	Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)
T_g	Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)
Vol	Volume de solução de PBS (mL)
θ	Ângulo de contacto ($^{\circ}$)
γ	Energia de superfície (mN.m^{-1})
γ_s^D	Componente dispersiva da energia de superfície (mN.m^{-1})
γ_s^P	Componente polar da energia de superfície (mN.m^{-1})
AG	Ácido glicólico
AL	Ácido láctico L (+)

AL-diPET	Oligómero ramificado de ácido láctico e dipentaeritritol
AL-mPET	Oligómero ramificado de ácido láctico e pentaeritritol
AL-PEG	Oligómero linear de ácido láctico e poli (etilenoglicol)
AL-triPET	Oligómero ramificado de ácido láctico e tripentaeritritol
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada por transformada de Fourier
BDO	1,4-Butanodiol
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Carboximetilcelulose
CQ	Camphorquinone
DCC	Diciclohexil carbodimida
DCU	Diciclo-hexil ureia
diPET	Dipentaeritritol
DMAP	N-dimetil aminopiridina
DMPA	2,2-dimethyl-2-phenylacetophenone
DMPT	N,N-dimethyl-p-toluidine
DSC	Análise por calorimetria diferencial de varrimento
ELISA	Ensaio da imunoabsorção enzimática
FDA	Food and Drugs Administration
GPC	Cromatografia de permeação gel
HA	Ácido hialurónico
HEC	Hidroxietilcelulose
HIV	Virus da imunodeficiencia humana
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSA	Albumina de soro humano
IEMA	Metacrilato de 2-isocianoetilo
IPD	Diisocianato de isoforona
IRG	Irgacure®2959
IV	Radiação Infravermelha
LAR	Laromer®LR 9000
MAA	Anidrido metacrílico
MCA	Cloreto de Metacriloflo

mPET	Pentaeritritol
NaCl	Cloreto de sódio
OWRK	Método de Owens-Wendt-Rabel e Kaelble
PBS	Phosphate Buffer Solution (solução tampão fosfato)
PCL	Poli (caprolactona)
PDLLA-PPG	Poli (D,L-ácido láctico-propilenoglicol)
PEG	Poli (etilenoglicol)
PEO	Poli (oxietileno)
PGL	Poli (glicerina)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PLLA	Poli (L-ácido láctico)
PPG	Poli (propilenoglicol)
PSA	Ácido polissilícico
PVA	Acetato de polivinilo
PVL	Poli (valerolactona)
SEM	Ressonância magnética nuclear
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
TA	Thermal analysis
TEA	Trietilamina
TGA	Análise termogravimétrica
triPET	Triptaeritritol
UV	Radiação ultravioleta

OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

Ao longo dos últimos anos, a produção de copolímeros tem recebido muita atenção devido à importância e potencial das suas aplicações [1]. Na área da Medicina e da Farmacêutica podem ser usados em suturas ou na libertação de princípios ativos através da utilização de formulações tópicas ou sistemas transdérmicos para administração [2].

A administração transdérmica pode ser uma excelente alternativa a outras vias de administração de princípios ativos permitindo maximizar a libertação no local pretendido e controlar o perfil temporal de concentração [3], contribuindo assim para uma melhoria contínua das práticas de saúde e da vida das populações [4].

Face a estas aplicações, tanto os polímeros biodegradáveis como os não biodegradáveis, têm sido muito estudados e investigados nas áreas de Engenharia de Tecidos e em sistemas de libertação controlada [5]. No entanto para a utilização destes polímeros, em organismos vivos devem-se conhecer as propriedades físicas, químicas e mecânicas, biocompatibilidade, técnicas de fabrico e ter em consideração o local de aplicação [4].

Os polímeros biodegradáveis, apresentam vantagens [5], nomeadamente quando da utilização interna com o objetivo de não remoção, se da sua degradação resultarem produtos não tóxicos para o organismo [4]. Quando usados em sistemas transdérmicos a degradação controlada destes polímeros pode apresentar vantagens visto permitir à matriz polimérica ajudar na libertação do princípio ativo aquando da sua degradação [6]. Torna-se importante realçar que o sistema transdérmico pode ser retirado e substituído por outro ao fim de um certo período de atuação, não havendo necessidade de remover resíduos do polímero que se tenham degradado [6].

Poliésteres, poliortoésteres e polianidridos são exemplos de polímeros biodegradáveis mais usados na libertação de proteínas [6]. Porém, devido à biocompatibilidade e controlo da biodegradabilidade, assim como segurança dos produtos de degradação, os poliésteres, em especial o ácido lático (AL) e os seus copolímeros são vistos como materiais mais atrativos e melhores candidatos para a libertação controlada de proteínas [5-6]. Os copolímeros de AL têm vindo a ser utilizados para sistemas de libertação controlada, do tipo nanopartículas, micropartículas, entre outros, não existindo, no entanto, grande exploração na formação de

filmes para aplicação como sistemas transdérmicos [3]. Na literatura não se encontram sistemas de administração transdérmica de proteínas.

Os copolímeros de AL e ácido glicólico (AG) permitem que o tempo de degradação do polímero e período de libertação do princípio ativo possa variar de dias a meses dependendo do peso molecular e composição química do polímero [7]. Os péptidos e as proteínas têm um elevado peso molecular [6], o que torna difícil obter um perfil de libertação contínua *in vitro* e *in vivo*. Este estudo torna-se assim um grande desafio devido às interações das proteínas e dos materiais da matriz polimérica [6-7]. Para além disto, deve-se ter em conta que as proteínas são mais suscetíveis a degradação física e química, podendo perder parte ou total da sua atividade biológica durante o fabrico do sistema transdérmico e seu armazenamento [6].

Este trabalho pretende explorar a produção de filmes de base AL conjugados com outros monómeros que conduzam a um copolímero de maior massa molecular e avaliação das propriedades finais. O principal objetivo passa pelo desenvolvimento de filmes poliméricos de base AL para aplicação em sistemas transdérmicos com administração de BSA. Os resultados obtidos poderão ajudar no estudo e comparação com uma outra proteína ou fator de crescimento para uma aplicação concreta, por exemplo para o tratamento de úlceras diabéticas. Com este projeto pretende-se o estudo, preparação e desenvolvimento de géis poliméricos por fotoreticulação, com aprisionamento de BSA antes da fotoreticulação, para posterior caracterização da libertação desta proteína.

Os métodos de produção utilizados tiveram como inspiração os trabalhos de Marques [8], de Santos [4] e de Travassos [3]. Com base em metodologias já estudadas pelos autores mencionados, procedeu-se à produção de oligómeros de base AL, lineares e ramificados, por policondensação direta. Para o efeito utilizou-se um solvente de baixa toxicidade, a acetona, sem recorrer a catalisador. Como co-monómeros foram testados PEG 400, m-PET, di-PET e tri-PET, que por reação com o AL conduziram aos oligómeros base.

A dissertação está organizada em 4 capítulos principais. O primeiro capítulo apresenta uma revisão da literatura científica onde se pretende fazer um enquadramento teórico sobre o tema. Assim, começou-se por se fazer referência a estudos desenvolvidos com o AL no laboratório (estado da arte) seguida da informação compilada sobre estudos de desenvolvimento de copolímeros de AL. Um dos focos deste estudo são as proteínas: é feita uma breve descrição do que são as proteínas, como ocorre a sua formação, os níveis estruturais e funções que estas

desempenham. Introduzido o tema das proteínas, aborda-se em específico a proteína utilizada, a BSA, fazendo-se uma breve introdução às suas propriedades, principais aplicações e alterações que podem ocorrer em função do meio. Após a apresentação da BSA abordam-se os sistemas de administração de proteínas sendo apresentados estudos com proteínas aprisionadas e libertadas em diferentes materiais poliméricos. Por último é apresentado uma revisão dos sistemas transdérmicos apresentando-se as suas vantagens e desvantagens, constituição do adesivo transdérmico, assim como requisitos que deve respeitar.

No capítulo 2 é descrita a metodologia experimental utilizada ao longo de todo o trabalho desenvolvido. Este capítulo começa pela listagem dos materiais utilizados e respetivos fornecedores seguindo-se os métodos de síntese dos oligómeros com os diferentes comónomos utilizados e a funcionalização com o Laromer[®] LR 9000 (LAR). Por último refere-se como se aprisionou a proteína nos géis funcionalizados, sendo fotoreticulados após adição do fotoiniciador Irgacure[®] 2959 (IRG), produzindo-se os adesivos transdérmicos para administração de BSA. Encontram-se ainda descritos neste capítulo os procedimentos experimentais usados, para a caracterização dos materiais: ATR-FTIR, capacidade de absorção de água, degradação hidrolítica em PBS, estudo de degradação da proteína sujeita a vários fatores, quantificação da libertação da proteína, entre outros. Todos estes estudos foram realizados para se conhecerem os materiais produzidos e avaliar a sua potencialidade de aplicação. No capítulo 3 são apresentados os resultados obtidos e sua discussão em função dos estudos realizados.

No capítulo 4 encontram-se as conclusões gerais do trabalho desenvolvido, debatendo-se sobre as suas limitações e procurando-se soluções/estratégias para o trabalho futuro.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estado da arte

Ao longo dos últimos anos foram vários os trabalhos realizados no DEQ para desenvolver e testar filmes poliméricos de base ácido lático (AL) produzidos por fotopolimerização, com vista à utilização em aplicações de valor acrescentado. Na área da saúde, estes materiais podem ser aplicados em suturas biodegradáveis, bioadesivos [4,8] e sistemas transdérmicos onde podem ser incorporados fármacos para administração e tratamentos terapêuticos eficazes, como o tratamento muscular ou hormonal [3], a título de exemplos. Numa fase inicial desta linha de investigação Marques [8] e Santos [4] avaliaram os processos de síntese de oligómeros de base ácido lático com diferentes co-monomeros, por policondensação direta, e as propriedades dos filmes.

Os filmes com finalidade principal de utilização nas cirurgias em bloco operatório têm como vantagens a redução do trauma sobre os tecidos, maior rapidez de cicatrização e conforto de aplicação, e de após o tratamento poderem ser absorvidos pelo organismo ou biodegradados [4]. A *Food and Drugs Administration* (FDA) já aprovou alguns filmes de origem natural ou sintética existentes no mercado [4,8]. No entanto, a toxicidade de alguns subprodutos, aquando da degradação, envolve preocupações ao nível da segurança do material usado para o seu fabrico, nomeadamente a utilização de colas cirúrgicas à base de fibrina e/ou cianoacrilatos, que ao se degradarem formam formaldeído [9-10]. Assim, como desvantagens ou fatores que podem levar à não aprovação dos filmes pelas entidades competentes, está a possível toxicidade dos materiais utilizados assim como o possível fraco desempenho mecânico, tornando-se importante investigar e desenvolver-se novos filmes biocompatíveis e bioabsorvíveis [4,8].

São vários os autores [9-11] que têm desenvolvido filmes que satisfaçam as exigências mencionadas, sendo os materiais poliméricos aqueles que mostram melhores resultados de fotoreticulação rápida e adesão, à temperatura fisiológica, que permite serem utilizados em aplicações cirúrgicas [9-11].

Neste estudo volta a recorrer-se a um dos monómeros mais usados na área biomédica, o AL, para produzir polímeros de baixo peso molecular. Este tem grupos terminais biodegradáveis e,

ao ser funcionalizado com monómeros com ligações de carbono duplas, assim como um fotoiniciador biocompatível, permite a fotoreticulação e produção de filmes com boas propriedades físicas e potencialidade na área biomédica [3-4,8]. No entanto, para estes filmes serem selecionados como adesivos cirúrgicos devem ter uma viscosidade apropriada antes da aplicação e fotoreticulação, devendo aderir à pele facilmente, atuar de forma rápida e eficaz, ajudando na cicatrização do tecido lesado [8].

Ao longo dos últimos anos houve uma crescente evolução na produção de filmes de base AL, tendo-se começado pelo fabrico de oligómeros de AL com os co-monómeros 1,4-butanodiol (BDO) e pentaeritritol (mPET), que conduzem a estruturas lineares ou ramificados. Foi possível produzir filmes com estes oligómeros, depois de funcionalizados com anidrido metacrílico (MAA) ou metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA) recorrendo à adição de fotoiniciador [8]. À *posteriori* foi testado um novo agente de funcionalização, o Laromer® LR 9000 (LAR) que conduziu a muito bons resultados [4].

A utilização do LAR, produzido e comercializado pela BASF, resulta de uma pesquisa de monómeros da família dos isocianatos para a funcionalização dos oligómeros de AL. O LAR, associado à indústria de revestimentos de superfícies, é um isocianato funcional utilizado em produtos para aplicações de cura, nomeadamente reticulação fotoquímica e térmica [4]. Este pode ser combinado com poliésteres que são muito reativos na presença do LAR devido aos grupos terminais hidroxilo [4]. O LAR permite melhorar as propriedades dos filmes, nomeadamente a adesão às superfícies, dando também mais flexibilidade ao material [4].

De entre os vários métodos de reticulação existentes optou-se pela fotopolimerização por radiação ultravioleta (UV), pois permite taxas de reticulação rápidas em condições de temperatura moderadas e nomeadamente em salas de cirurgia [8]. A produção de adesivos cirúrgicos foi o primeiro objetivo destes trabalhos e a otimização da produção dos filmes e suas propriedades recorrendo aos vários funcionalizadores, foi desenvolvido nessa linha [4].

Mais tarde perspectivou-se uma outra aplicação dos filmes produzidos, pretendendo-se utilizá-los como adesivos transdérmicos, com aprisionamento e libertação de fármaco. Estes são muito frequentemente utilizados como sistemas de entrega de fármacos (antibióticos e anti-inflamatórios, entre outros), libertando os princípios ativos de forma controlada e aumentando a eficiência de cicatrização e tratamento [3].

A administração do fármaco por via transdérmica permite a libertação de forma localizada, controlada e prolongada, garantindo-se um melhor controlo dos níveis de fármaco no plasma sanguíneo assim como maior conforto e aceitação pelo paciente, ao contrário de outras vias de administração possíveis [3].

Utilizando os mesmos métodos até à data usados, Travassos [3] produziu filmes para sistemas de administração transdérmica tendo ensaiado ainda um novo oligómero e recorrido à reação do AL com poli (etilenoglicol) 300 (PEG 300), para além de BDO e mPET. Estes oligómeros foram funcionalizados com LAR, e o fármaco selecionado, o Ibuprofeno (IBU), assim como agentes permeadores, solubilizantes, plastificantes e tensioativos em diferentes proporções, para se garantir a permeação do fármaco através da pele, foram adicionados ao gel do polímero funcionalizado [3]. As propriedades dos filmes obtidos após fotoreticulação foram estudadas e a sua formulação otimizada [3]. Foi possível obter materiais transparentes, resistentes e flexíveis com tempos de fotoreticulação variáveis dependendo das quantidades e funcionalizadores utilizados [3-4,8].

No estudo aqui apresentado, a pesquisa na literatura centrou-se em trabalhos que identificassem copolímeros possíveis de serem funcionalizados e fotoreticulados, e que permitissem o aprisionamento de princípios ativos. De entre os vários estudos em curso, os copolímeros de AL atualmente mais usados são: poli (etilenoglicol) (PEG), ácido glicólico (AG), poli (oxietileno) (PEO), poli (valerolactona) (PVL), poli (caprolactona) (PCL), pentaeritritol (mPET), entre outros e os princípios ativos para posterior libertação são: albumina de soro bovino (BSA), indometacina e o ácido hialurónico (HA). Nas Tabelas 1.1 e 1.2 encontra-se a compilação de informação sobre resultados destes trabalhos.

Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido láctico.

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
PEG – PLLA	<ul style="list-style-type: none"> - PLLA dicarboxilado por reação de condensação do L-AL com ácido succínico, em atmosfera de azoto, num banho de óleo a 190-200°C, durante 24h; - Copolímero de PEG-PLLA por reação de policondensação; - PEG e PLLA em quantidades equimolares, dissolvidos em cloreto de metileno anidro, uso de catalisadores DCC (diciclohexil carbodimida) e DMAP (N-dimetil aminopiridina). Reação em atmosfera de azoto à temperatura ambiente. Ao fim de 10 min forma-se DCU (diciclo-hexil ureia) que precipita e é filtrada. Produto final seco sob vácuo durante 24h. 	<ul style="list-style-type: none"> - Composições químicas dos copolímeros verificadas por RMN e FTIR; - $15 < T_g < 35^\circ\text{C}$ e $60 < T_f < 120^\circ\text{C}$ para o PLLA dicarboxilado; - $T_f = 40^\circ\text{C}$ e $-45 < T_g < -28^\circ\text{C}$ para os copolímeros de PEG-PLLA; - Índice relativo de aumento do peso dos diferentes copolímeros (PEG:PLLA) em PBS a 37°C foi: 2,6 (2000:1130); 1,8 (2000:1480); 1,4 (2000:1690); 1,7 (2000:2170) e 1,0 (2000:3150). 	Huh et al. [5]
PEG-IPD	<ul style="list-style-type: none"> - Fabrico do polímero por reação de PEG 400 com diisocianato de isoforona (IPD); - Reação a 60°C, em atmosfera de azoto, agitação magnética durante 24h, formando-se grupos uretano. 	<ul style="list-style-type: none"> - Swelling 19,7%; - Início da degradação hidrolítica dos grupos isocianato ao fim de 7 dias; - Testes de adesão em folhas de gelatina com muito bons resultados; - Energia de superfície $14,87 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, inferior à da pele e sangue, permitindo aderir bem a uma destas superfícies. 	Ferreira et al. [12]
PCL - AL	<ul style="list-style-type: none"> - Formação do oligómero de AL por aquecimento num evaporador rotativo; - Continuação da policondensação a 180°C para formação do oligómero AL de peso molecular pretendido; - Adição de PCL em forma de estrela e continuação da policondensação durante 4h a 185°C. 	<ul style="list-style-type: none"> - Termicamente estáveis, com perda de massa máxima de 60% durante 30h a 170°C; - Mostraram elevadas forças de adesão a 23°C e 50% de humidade. 	Stolt et al. [13]

Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
AL-PEG-AL	<p>- Copolimerização por abertura de anel em tolueno;</p> <p>- AL e PEG (de diferentes pesos moleculares, 4000, 6000, 10000 e 20000 g.mol⁻¹) com catalisador C₁₆H₃₀O₄Sn (octoato de estanho). A mistura reacional em refluxo reage a 120°C durante 10h em atmosfera de azoto, com agitação. O produto frio é precipitado em éter dietílico, filtrado e seco sob vácuo a 40°C;</p> <p>- Formação do macrómero fotopolimerizável por reação do copolímero com MAA em refluxo a 120°C durante 8h, em atmosfera de azoto. Produto precipitado à temperatura ambiente em éter dietílico e n-hexano, filtrado e seco sob vácuo a 40°C;</p>	<p>- Cromatografia de permeação gel (GPC) mostra que macrómeros têm polidespersividade inferior a 1,10;</p> <p>- Tempos de gelificação de 2 a 540 min dependendo das razões molares usadas;</p> <p>- Melhor sequência de fotopolimerização: misturar o macrómero, fotoiniciador e a água formando-se o gel, submetido a UV por 2-10 min obtendo o hidrogel;</p> <p>- Fotopolimerização do gel por UV durante 2 min.</p> <p>- Swelling: amostras absorvem água rapidamente e o equilíbrio é atingido após 2h;</p> <p>- Rápida perda de massa dos hidrogéis nas 3 semanas iniciais.</p>	<p>Wei et al. [14]</p>
AL-PEG-AL	<p>- Seguindo o procedimento de Wei et al. [14] com diferentes pesos moleculares de PEG (1000 e 6000 g.mol⁻¹).</p>	<p>- Fabrico de hidrogéis com diferentes composições de polímero e grupos metacrílicos;</p> <p>- Estudo de swelling em água a 22°C;</p> <p>- Hidrogel de macrómero puro evidenciou swelling mais elevado;</p> <p>- Aplicação com potencial biomédico ainda em investigação, para engenharia de scaffolds, biossensores ou para sistemas de libertação controlada de drogas.</p>	<p>Wei et al. [15]</p>

Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
PDLLA - PPG	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de oligómeros de poli (D,L – AL – propilenoglicol); Propilenoglicol (PPG) com diferentes massas molares reagiu com lactídeo sob vácuo a 150°C, 6h, atmosfera de azoto, catalisador: octoato de estanho; - Compostos intermediários dissolvidos em 2-propanol, filtrados, secos e dissolvidos em diclorometano; Adição de trietilamina (TEA) e cloreto de metacrilóilo (MCA) à solução a 0°C para funcionalização; - Agitação durante 24h à temperatura ambiente, lavagem e filtração com acetona e secagem antes da extração do dimetacrilato usando hexano; - Na extração, duas camadas com o lactídeo e o PPG na camada superior. Camada superior recolhida sujeita a evaporação rotativa e seca sob vácuo durante a noite; - Fotoreticulação na presença de <i>camphorquinone</i> (CQ) e <i>N,N-dimethyl-p-toluidine</i> (DMPT). 	<ul style="list-style-type: none"> - Várias concentrações de fotoiniciador testadas, 0,5% (m/m) preferencial a 2% (m/m); - Material P7L2 completamente fotoreticulado em 60 e 240 s para 0,5% e 2% (m/m) de fotoiniciador respectivamente; - Materiais estáveis com 19% de perda de massa em 14 semanas; - Swelling máximo 10% para o material P7L2; - Materiais promissores para aplicação como adesivos biomédicos degradáveis a longo prazo. 	Ho et al. [16]
PCL	<ul style="list-style-type: none"> - Macrómeros de PCL com grupos uretano sintetizados por funcionalização com IEMA (solvente éter dietílico); - Reação a 40°C com agitação em atmosfera de azoto e com refluxo de solvente durante 24h; - Adição de fotoiniciador IRG à solução de macrómero a 60°C; - Mistura mantida em refluxo e em agitação até completa dissolução do fotoiniciador; - Solução submetida a UV durante 60 s obtendo-se filme. 	<ul style="list-style-type: none"> - Swelling 3,22%, muito baixo; - Boa adesão do filme a folhas de gelatina; - Tensão de superfície de 33,51 mN.m⁻¹; - Degradação em plasma humano: 10,4% em 6 semanas; - Capacidade de formação de fibrina, confirmada por estudos de hemocompatibilidade. 	Ferreira et al. [9]

Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
PDLLA – BDO	- Síntese de oligómeros de base AL através de polimerização de D,L lactídeo a 160°C, 3h com co-monomeros: BDO ou mPET ou poliglicerina (PGL), catalisador: octoato de estanho;	- Matrizes com elevada percentagem de reticulação; - Oligómeros mais ramificados e menor percentagem de lactídeo, melhor densidade de reticulação e maior resistência mecânica;	
PDLLA – mPET	- Funcionalização com MAA a 120°C, 3h, produto purificado por destilação a pressão reduzida e a 140°C;	- Degradação hidrolítica retardada pelo uso de monómeros reativos.	Helminen et al. [11]
PDLLA – PGL	- Reticulação térmica dos oligómeros a 90, 60 e 37°C misturando-se peróxido dibenzoil, naftaleno de cobalto e peróxido de 2-butanona respectivamente ao oligómero funcionalizado; - Fotoreticulação adicionando <i>camphorquinone</i> como iniciador.		
PLA	- Síntese de oligómero PLA e StarPLA através de reação de AL com os co-monomeros BDO ou mPET; Reação a 150°C durante 9h, em atmosfera de azoto e agitação magnética;	- Tempo de fotoreticulação de 2 minutos para os polímeros lineares e de 3 minutos para os polímeros estrela; - Swelling de 10 e 4% para os filmes de oligómero linear, e de 29 e 6% para os filmes com oligómero ramificado, usando MAA e IEMA respectivamente;	Marques [8]
StarPLA	- Funcionalização com IEMA adicionando éter dietílico, reação a 60°C durante 24h em atmosfera de azoto, com refluxo e agitação magnética; - Adicionou-se o fotoiniciador IRG a 60°C, com agitação magnética continua e refluxo; - Irradiação UV para formar filmes; - Filmes secos numa estufa a 40°C para remoção do éter dietílico e posterior caracterização.	- Degradação dos filmes em PBS a 37°C: PLA-MAA com perda de massa de aproximadamente 58% e o StarPLA-IEMA apenas 18%, ao fim de 6 semanas; - Filmes funcionalizados com MAA mais biocompatíveis na presença de fibroblastos humanos do que os funcionalizados com IEMA.	

Tabela 1.1 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
	<p>- Síntese do oligômero por polimerização de abertura de anel, com D,L-Lactídeo (DLAL) e mPET, a 130°C, atmosfera de azoto, agitação magnética, catalisador: octoato de estanho, reação durante 24h;</p> <p>- Oligômero dissolvido em clorofórmio e precipitado numa mistura de hexano/metanol, e seco sob vácuo a 60°C durante 24h;</p>	<p>- T_g do polímero aumentou de -29 °C ate 27°C com aumento da massa molar de 1500 para 9500 g/mol;</p> <p>- FTIR e RMN para garantir que a funcionalização ocorreu;</p> <p>- Elevados valores de teor de gel (94-99%);</p> <p>- Material de menor massa molar apresenta maior Tg.</p>	
Star PDLLA	<p>- Funcionalização do oligômero a 70°C com MAA ou IEMA, em atmosfera de azoto, durante 5h e 1h respectivamente, com agitação magnética e um condensador;</p> <p>Produto precipitado em hexano e seco sob vácuo à temperatura ambiente durante 24h;</p> <p>- Polímeros fotoreticulados após adição de 2,2-dimethyl-2-phenylacetophenone (DMPA). A mistura colocada em moldes durante a noite à temperatura ambiente para evaporação do clorofórmio.</p>		Karikari <i>et al.</i> [17]

Tabela 1.2 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático com aprisionamento e liberação de princípios ativos.

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
AL-PEG-AL	<p>- PEG 6000 e AL numa razão molar de 1:5 em atmosfera de azoto. Adição de catalisador $C_{16}H_{30}O_4Sn$ (octoato de estanho);</p> <p>- Reação sob vácuo, com agitação, a 200°C durante 4h e a 160°C durante 2h;</p> <p>- Polímero resultante dissolvido em diclorometano e precipitado em éter, filtrado e seco. Polímero funcionalizado com grupos acrilato para formar um macrómero polimerizável;</p> <p>- Adição de 200 µl de solução de BSA (20 mg.mL⁻¹ em PBS) numa grama de polímero.</p>	<p>- Vários polímeros com diferentes pesos moleculares;</p> <p>- Polímeros com maior peso molecular absorvem maior quantidade de água;</p> <p>- Polímeros com menor peso molecular degradam-se mais lentamente;</p> <p>- Liberação de 90% de BSA aprisionada no polímero ao fim de 45 dias.</p>	Sawhney et al. [2]
AL-PEG-AL	<p>- Seguindo o procedimento de Sawhney et al. [2]: copolímero funcionalizado com metacrilatos para criar um macrómero estável PEG-Dimetacrilato e um macrómero degradável hidroliticamente PEG-LA-Dimetacrilato;</p> <p>- Introdução de ácido hialurónico (HA) nos hidrogéis (0,5 e 5 mg.g⁻¹ de hidrogel).</p>	<p>- Rápida liberação do HA, seguida de uma liberação estável até 1 mês;</p> <p>- Polímero tem uma rápida perda de massa nos 15 dias iniciais, seguida de perda de massa aproximadamente constante;</p> <p>- Conclusão: a incorporação de HA em scaffolds sintéticos é uma estratégia promissora para regeneração de tecidos da cartilagem.</p>	Skaalure et al. [18]

Tabela 1.2 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático com aprisionamento e liberação de princípios ativos (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
PLLA -PEO- PLLA	- AL e PEO ou AL e AG em quantidades equimolares. Catalisador ($C_9H_{21}O_3$) ₃ Al (alumínio triisopropóxido); - Reação a 110°C durante 12-72h; - Mistura reacional arrefecida, dissolvida em diclorometano e polímero extraído com HCl. Polímero lavado com água e precipitado em etanol, sendo seco sob vácuo a 50°C durante 48h;	- Evidência estrutural do copolímero analisada por RMN combinada com cromatografia exclusão de tamanho; - Copolímeros com microfases hidrofílicas; - Massa de água aumenta rapidamente com a percentagem de PEO; - Homopolímeros de PLLA ou PLGA absorvem 6-7% (m/m) água em 100 min. O copolímero absorve 70-100% (m/m) água no mesmo período;	Youxin <i>et al.</i> [6,7]
PLGA-PEO- PLGA	- Dissolução de BSA numa pequena quantidade de água. Solução homogeneizada na solução do copolímero com o ultra-turrax. Carregamento teórico da proteína de 10% (m/m); - Emulsão misturada com solução de PVA (acetato de polivinilo), agitação moderada 3-4h formando-se microesferas. Filtração, lavagem com água e secagem a frio.	- Diâmetro médio microesferas ~ 35 µm; - Estudo de liberação das microesferas em PBS a 37°C; - Absorvância da BSA libertada medida no espectrofotômetro a 278 nm; - Copolímero PLGA-PEO-PLGA libertou 90% da BSA em 25 dias. Copolímero PLLA – PEO - PLLA libertou apenas 60% em de 25 dias e 80% em 40 dias; - Característica de interesse para sistema de administração parenteral com proteína com tempo de vida útil de 2 semanas.	

Tabela 1.2 Estudos no âmbito da síntese de copolímeros de ácido lático com aprisionamento e libertação de princípios ativos (continuação).

Material	Estratégia	Resultados / Observações	Referências
AL-PEG-AL	-Copolimerização por abertura de anel para a síntese de 6 tipos de copolímeros com PEG 400 e 10000, sem catalisador nem iniciador; - Mistura dos monómeros e co-monómeros submetida a vácuo 5 minutos, seguido da reação a 185°C durante 30-80h;	- Composição dos copolímeros avaliada por RMN; - Distribuição dos pesos moleculares por cromatografia de permeação gel; - Eficiência do carregamento aumenta com o aumento da cadeia hidrofóbica;	Lin et al. [19]
PVL-PEG-PVL	- Produto final dissolvido em diclorometano e extraído 5 vezes com 1-pentano. Solvente removido por evaporação e copolímero seco a 40-45°C;	- Estudo de libertação de micelas com fármaco nos copolímeros, apresentando maior valor de libertação e mais rápida para o AL-PEG-AL com menor quantidade de AL, ao fim de 14 dias;	
PCL-PEG-PCL	- Testaram-se várias razões molares de AL, PEG, PVL e PCL; - Carregamento da Indometacina (fármaco) nas micelas.	- Swelling em água destilada a 4°C durante 8 semanas, com copolímeros de diferentes rácios de monómeros.	

As Tabelas 1.1 e 1.2 resumem a síntese de vários copolímeros que têm vindo a ser testados na área da biomédica para produção de filmes ou hidrogéis utilizados para libertação de princípios ativos assim como regeneração de tecidos. Alguns destes copolímeros foram funcionalizados com MAA, IEMA, e grupos acrilato, entre outros, sendo de seguida fotoreticulados por irradiação UV. As propriedades descritas nas Tabelas 1.1 e 1.2, teor de gel, *swelling* e capacidade de adesão à pele evidenciam o seu potencial para avaliação adicional no âmbito deste estudo. Em alguns destes materiais foram aprisionados princípios ativos que mostraram bons perfis de libertação ao longo do tempo. Face à informação compilada nas Tabelas 1.1 e 1.2, decidiu-se prosseguir o trabalho de investigação utilizando o AL como matéria-prima conjugado com outros co-monómeros na produção de sistemas transdérmicos, neste caso para administração da proteína de albumina de soro bovino (BSA).

1.2 Proteínas

Desde os finais do século XX que os péptidos e as proteínas terapêuticas têm recebido muita atenção dos investigadores, o que levou a que constituam um mercado movimentado e muito lucrativo, tendo em conta o capital gerado em torno delas [20-21].

As proteínas são complexos estruturais altamente organizados, de elevado peso molecular, que resultam da ligação de pequenas unidades semelhantes, os aminoácidos. Quando administradas através de sistemas de libertação controlada, as proteínas têm sido amplamente utilizadas nas áreas ligadas à medicina, mais concretamente para o tratamento de doenças e regeneração de tecidos [22-24].

As proteínas consideram-se como ingredientes fundamentais no que aos cuidados de saúde diz respeito, sendo usadas em formulações farmacêuticas para terapêutica e diagnósticos e em aplicações na biotecnologia. Estas desempenham imensas funções, como a defesa do corpo contra organismos invasores ou prejudiciais, a regulação da atividade metabólica, sinalização celular, resposta imunitária e ciclo celular [25]. Estão também presentes na catálise enzimática de reações no organismo [25], assim como na adsorção na superfície [23] ou transporte de substâncias, iões ou moléculas específicas através da membrana celular ou de órgão para órgão [26]. Para além disto, podem ainda ser usadas como nutriente [26] para o desenvolvimento de células ou microrganismos, e crescimento e manutenção do corpo humano na reparação e produção de tecido muscular melhorando o desempenho dos atletas.

Do ponto de vista terapêutico, as proteínas têm a vantagem de possuir mecanismos de ação específicos e potentes. Aliados à medicina molecular, permitem identificar e caracterizar causas de doenças ou feridas patológicas. Exemplo disso é a utilização de eritropoietina para o tratamento da anemia e o uso da insulina no tratamento da diabetes [20-21].

As proteínas terapêuticas apesar das inegáveis vantagens, apresentam também limitações na administração transdérmica. Para ultrapassar têm-se feito esforços em volta de duas abordagens: alteração da estrutura da proteína por mutação ou alteração na formulação a utilizar [20]. Assim, é possível administrar e libertar as proteínas em PEG ou PSA (ácido polissialico), ou ainda utilizar sistemas de formulação como lipossomas, microesferas poliméricas ou nanopartículas poliméricas [20].

o nível estrutural mais simples caracterizado pela sequência linear de aminoácidos constituinte da cadeia polipeptídica. É desta que deriva o arranjo espacial da molécula e o desempenho da função. A estrutura secundária surge devido à possibilidade de rotação entre os carbonos dos aminoácidos, grupos amina e carboxilo originando dois tipos principais de arranjo: α -hélice e folha- β . A α -hélice é a forma mais comum e consiste num enrolamento em hélice da cadeia polipeptídica com os grupos R projetados para fora do esqueleto helicoidal na direção perpendicular ao eixo. Esta estrutura mantém-se estável devido às pontes de hidrogénio existentes entre os grupos NH e CO do monofilamento. A folha- β tem uma forma em zig-zag, sendo constituída por dois ou mais segmentos iguais ou diferentes, dispostas em paralelo (cadeias estendidas na mesma direção) ou não (cadeias estendidas em direções opostas). A estabilidade desta estrutura é também assegurada por pontes de hidrogénio, neste caso entre cadeias de filamentos diferentes e os grupos laterais R. A estrutura terciária é o arranjo tridimensional resultado do desdobraimento da cadeia polipeptídica, um enrolamento das estruturas secundárias. Este tipo de estrutura é estabilizado por interações fracas (pontes de hidrogénio e interações electrostáticas) e em casos raros por interações fortes (ligações covalentes). A estrutura quaternária só surge quando cadeias polipeptídicas se juntam para exercer determinada função, agrupando-se e ajustando-se para a estrutura total da proteína. É caracterizada pela interação de cadeias laterais de aminoácidos de cadeias polipeptídicas diferentes [22-23]. Na Figura 1.3 é apresentado o desenvolvimento das estruturas das proteínas e as formas existentes para a estrutura secundária.

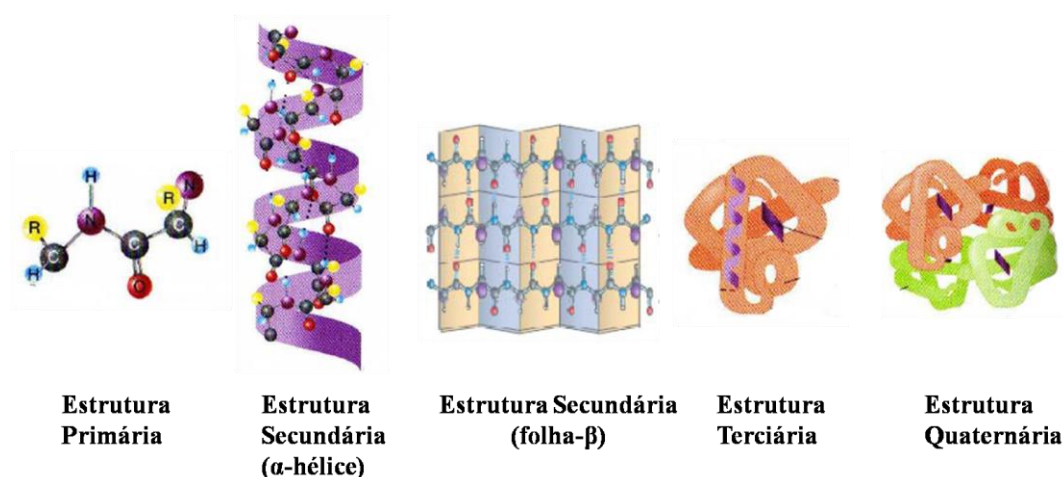


Figura 1.3 Evolução das estruturas das proteínas (Adaptado de [23,27]).

É de extrema importância salientar que a estabilidade das proteínas é fortemente influenciada pelo tipo de solvente usado, força iónica e concentração da proteína. Num sistema de libertação controlada as proteínas são sujeitas a várias tensões ao longo do processo, desde a sua formulação, armazenamento até à libertação *in vivo* [28-30].

1.3 Albumina de soro bovino (BSA)

A albumina de soro bovino, BSA, é uma proteína modelo usada em sistemas biomiméticos e a mais utilizada em investigação, devido ao seu baixo preço e elevada disponibilidade. É uma proteína natural, biocompatível, biodegradável, não tóxica e imunogénica [31-33].

A BSA, também conhecida como Fração V por ser obtida da quinta fração da metodologia de fracionamento de Cohn, é uma proteína globular, isolada do sangue bovino, estável e com poucas interferências nas reações biológicas, devendo ser armazenada a -20°C [34-36]. Trata-se da proteína mais abundante no sangue bovino com uma concentração de 50 mg.mL^{-1} , apresentando uma estrutura semelhante à HSA (Albumina de soro Humano) [32]. É solúvel em água e tem facilidade em cristalizar devido ao elevado número de aminoácidos ácidos presentes na sua estrutura. Apresenta uma grande capacidade de se ligar à água, a sais, ácidos gordos, hormonas e fármacos [37].

A estrutura primária da BSA é uma cadeia simples polipeptídica composta por 585 unidades de aminoácidos. A estrutura secundária é composta por 67% de α -hélice, 10% de folha- β e 23% de cadeia linear. A estrutura terciária da proteína no estado sólido apresenta uma forma semelhante a um coração/*heart-shape* ou triângulo equilátero, comprovado por estudos cristalográficos raios-x [33,38-39].

A BSA tem como principais aplicações: a utilização em biomateriais implantáveis e adesivos cirúrgicos devido à capacidade de coagulação e a administração e transporte de fármacos, antibióticos, anti-inflamatórios e excipientes [40]; a utilização do ensaio da imunoabsorção enzimática (ELISA) na deteção de anticorpos [35] ajudando no diagnóstico de doenças como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), malária e tuberculose [41]; o uso como nutriente em culturas celulares e microbianas, ou seja, como suplemento para aumentar o crescimento e produtividade das células [40,42]; e a regulação da pressão osmótica do sangue e pH [42].

1.3.1 Conformações da BSA

O desempenho das proteínas está dependente da sua conformação, hidratação e solubilidade. São vários os métodos que podem ser usados para revelar as transições conformacionais, tais como dynamic light scattering (DLS), dicroísmo circular e espectroscopia infravermelha [30]. Mudanças no ambiente envolvente da proteína (pH, temperatura, força iónica e solventes) podem alterar a sua conformação ou mesmo levar à desnaturação [43].

A função biológica da proteína está associada à forma tridimensional, enrolada e dobrada. O processo de desnaturação ocorre quando há perda da estrutura terciária (estado nativo) atingindo-se a estrutura secundária (estrutura desenrolada) tendo-se assim uma cadeia de aminoácidos amorfa e não funcional [44]. De salientar que a desnaturação pode ser reversível ou irreversível. A BSA, quando sujeita a temperaturas elevadas, pode passar por duas fases estruturais distintas sendo a primeira reversível e a segunda irreversível, apesar de este processo não resultar necessariamente na destruição da forma ordenada da proteína [29]. Shanmugan *et al.* [45] mostraram através de estudos por dicroísmo circular vibracional que a BSA ao ser aquecida forma grandes quantidades de folha- β e que o processo de desnaturação desta é irreversível.

A BSA também pode sofrer mudanças conformacionais quando o pH do meio varia passando a várias formas: E, F, N, B e A. A Figura 1.4 ilustra as conformações predominantes em diferentes gamas de pH e indica a percentagem da estrutura secundária α -hélice em cada uma das conformações. A forma N, normal, na qual a molécula se encontra mais compacta, é predominante a pH 4,3-8, tendo um conteúdo helicoidal de α -hélice de 62% que diminui consoante existam alterações conformacionais. A pH 4,3 ocorre a transição para F, rápida/*fast*, envolvendo um desdobramento e a proteína passa a uma forma alongada com perda do conteúdo helicoidal (52% de α -hélice), aumento da viscosidade e diminuição da solubilidade. A pH 2,7 aumenta a linearidade da BSA, forma E, expandida, caracterizada novamente por perda de parte do conteúdo helicoidal (44% de α -hélice) e maior viscosidade. Não existem apenas isómeros conformacionais para pH ácidos. A $8 < \text{pH} < 10$ surge a forma básica, B também com 44 % de α -hélice, e na gama $10 < \text{pH} < 12$ surge outra isomerização, isómero A, envelhecida/*aged*, a pH 12, com redução da estrutura secundária, conforme visível na Figura 1.4 [32-33,38,46-49].

A força iónica das soluções também tem forte influência na percentagem de agregação, tamanho e massa molar da BSA, pelo que as conformações desta proteína têm vindo a ser estudadas a $2 < \text{pH} < 12$ em soluções salinas (150 mM em NaCl) e em água destilada. O pH da BSA em água destilada e na solução salina é ajustado adicionando HCl 0.1M ou NaOH 0,1 M. [49].

	E ←→ F		F ←→ N		N ←→ B		B ←→ A	
pH de transição	2,7		4,3		8		10	
Forma	Expandida	Rápida	Normal	Básica	Envelhecida			
% α-hélice	44	52	62	44	42			

Figura 1.4 Conformações da BSA em função do pH (Adaptado de [46]).

Os dados presentes na Tabela 1.3 mostram que a conformação mais estável da BSA (conformação N) é a que apresenta mais baixo nível de agregação seja em meio salino ou não. Afere-se ainda pela Tabela 1.3 que para pH ácido há maior agregação da proteína quando comparado com pH básico, e sendo a elevada percentagem de agregação um fator para a baixa estabilidade da proteína, é possível confirmar-se que esta é mais estável a pH neutro. A Tabela 1.3 permite ainda concluir que o diâmetro médio da BSA é menor em água destilada em comparação com a solução salina. Verifica-se ainda pela Tabela 1.3 que para pH ácido, e visto que a percentagem de agregação é maior, o diâmetro médio das partículas seria maior comparado com pH básico, apesar de para pH muito básico o diâmetro poder chegar aos 8 nm [49].

Tabela 1.3 Percentagem de agregação e diâmetro médio da BSA em água destilada e solução salina de NaCl para cada estado conformacional [49].

pH	Estados Conformacionais	Agregação (%)		Diâmetro médio (nm)	
		Água destilada	Solução Salina	Água destilada	Solução Salina
2,7	E	15-17	9-11	5,3	6,6-6,8
	E-F	15	11	5,3	6,8
4,3	F	5-15	7-11	5,0-5,3	6,2-6,8
	F-N	5	7	5,0	6,2
8	N	3-6	2-7	3,5-6,0	5,6-6,2
	N-B	6	2	3,5	5,6
10	B	6-8	2-8	3,5-5,0	5,0-5,6
	B-A	8	8	5	5,6
	A	7-8	8-12	4,6-5,0	5,6-8

A BSA apresenta uma massa molar de 66,5 kDa na forma pura, e a força iônica e o pH do meio podem alterar esse valor como ilustrado na Tabela 1.4. A massa molar da BSA é superior quando dissolvida numa solução salina em comparação com a dissolução em água destilada para o mesmo pH. Quando em água destilada, à medida que o pH aumenta a massa molar da BSA também aumenta. O comportamento da BSA é o inverso quando dissolvida em NaCl, sofrendo um ligeiro aumento na passagem de pH neutro para pH básico. Os valores de

massa molar da BSA mais elevados em solução salina podem-se dever às interações intermoleculares, mais fortes do que as interações proteína-solvente [49].

Tabela 1.4 Massa molar (kDa) da BSA em água destilada e solução salina em função do pH [49].

pH	Massa Molar (kDa)	
	Água destilada	Solução Salina
3	54,6	114,0
7	65,3	78,0
11	68,6	83,1

Como já foi referido anteriormente, a BSA quando aquecida passa por duas fases estruturais, ou seja, dois estágios. Na literatura [46], o primeiro estágio ocorre até aos 65°C e o segundo acima dessa temperatura. Todavia, a conformação da proteína começa a alterar-se aos 58,1°C, desnaturando a partir dos 62°C [46].

Tendo em consideração esta informação, um outro estudo, Takeda *et al.* [50], analisaram a BSA a pH 7, na gama de temperaturas entre 2 e 65°C. Verificaram que com o aumento da temperatura, as proporções de α -hélice, folha- β e estrutura desordenada sofriam alterações respectivamente de 67; 3; e 30 % a 2°C para 44; 13; e 43 % à temperatura final de 65°C, o que evidencia que com o aumento da temperatura, há uma diminuição da α -hélice e um aumento da folha- β e estrutura desordenada. Uma vez atingidos os 65°C, deixou-se a BSA arrefecer até à temperatura de 2°C, e registou-se que a proporção helicoidal aumentou gradualmente, indicando assim que as mudanças estruturais são parcialmente reversíveis. Nestes estudos, a proporção relativa das diferentes estruturas foi determinada pelo método de dicroísmo circular [50].

1.4 Sistemas de administração de proteínas

São muitos os péptidos e proteínas usadas em ações terapêuticas variadas considerando-se como fármacos ideais pois estão presentes nos processos biológicos, são muito eficazes e potentes e são capazes de atuar especificamente a baixas concentrações. São várias as proteínas comercializadas e as que se encontram ainda em ensaios clínicos para uso terapêutico tais como anticorpos, enzimas, inibidores enzimáticos, agentes microbianos, fatores de crescimento e hormonas [51-53].

O aprisionamento e posterior libertação de algumas proteínas tem recorrido a micropartículas, nanopartículas e hidrogéis poliméricos de diferentes materiais. As micropartículas poliméricas, com um diâmetro de 1-1000 μm , podem ser divididas em duas categorias:

microesferas (sistemas matriciais) e microcápsulas (sistemas poliméricos do tipo reservatório). As nanopartículas são sistemas coloidais (10-1000 nm) onde o princípio ativo é dissolvido, aprisionado ou disperso. As nanopartículas podem também dividir-se em duas categorias: nanocápsulas, onde o princípio ativo se encontra num meio oleoso ou aquoso envolvido por uma membrana polimérica que atua como proteção e as nanoesferas funcionando como sistemas matriciais com o princípio ativo disperso uniformemente na matriz. Quanto aos hidrogéis, estes podem adquirir várias formas físicas e possuem uma estrutura tridimensional altamente porosa, podendo incluir formulações no seu interior [54]. Na Tabela 1.5 é apresentado o resumo de alguns exemplos de proteínas aprisionadas em materiais poliméricos de PCL, HPMC, quitosano, PLGA entre outros.

Tabela 1.5 Exemplos de proteínas aprisionadas em materiais poliméricos diferentes.

Tipo de Material	Material	Proteína	Observações	Referências
Micropartículas	PCL	Interferon- α	<ul style="list-style-type: none"> - Aprisionamento pelo método de emulsão múltipla seguido de evaporação de solvente; - Sistema com 83,93% (m/m) da proteína; - Integridade estrutural da proteína não foi comprometida com a técnica de preparação; - 81% do Interferon-α aprisionado é libertado em 28 dias; - Formulação estável após 90 dias a 20°C; - Administração parenteral. 	Melo et al. [55]
	HPMC e quitosano	Lisozima	<ul style="list-style-type: none"> - Aprisionamento pelo método de liofilização; - Libertação da proteína aprisionada mais lenta <i>in vitro</i> em comparação com a proteína não tratada; - Aumento da permeação <i>in vitro</i>; - Baixa citotoxicidade; - O processo de preparação não afetou a bioatividade da proteína; - Administração intranasal. 	Cho et al. [56]
Nanopartículas	PCL	Amilina	<ul style="list-style-type: none"> - Aprisionamento pelo método de emulsão simples seguido de evaporação de solvente; - Eficiência de aprisionamento de 80%; - Formação de esferas; - Libertação controlada <i>in vitro</i> de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 240h; - Redução da glicémia em 36h em ratos; - Administração parenteral subcutânea. 	Guerreiro et al. [57]

Tabela 1.5 Exemplos de proteínas aprisionadas em materiais poliméricos diferentes (continuação).

Tipo de Material	Material	Proteína	Observações	Referências
Nanopartículas	PLGA	Insulina	<ul style="list-style-type: none"> - Aprisionamento pelo método de emulsão múltipla seguido de evaporação de solvente; - Aumento da bioadesão no trato gastrointestinal; - Ausência de citotoxicidade; - Administração oral. 	Zhang et al. [58]
Hidrogéis	HEC e PVA	Albumina	<ul style="list-style-type: none"> -Aprisionamento por polimerização química; - Liberação inicial rápida antes da liberação constante durante 160 dias; - Mantém 80% da atividade inicial após liberação durante 50 dias; - Administração parenteral subcutânea. 	Appel et al. [59]
	CMC - acrilato de sódio- alginato de sódio	Albumina	<ul style="list-style-type: none"> -Aprisionamento por polimerização química; - Hidrogel formado sensível ao pH; -Libertação durante 2h numa solução de PBS (pH = 2,1) passando de seguida a uma solução de PBS (pH 7,4); - 18,1 e 68 % de albumina libertada ao fim de 2h e 8h respectivamente; - Administração oral. 	El-Sherbiny et al. [60]
	Quitosano	Insulina	<ul style="list-style-type: none"> - Aprisionamento por polimerização química; - Sistema capaz de libertar insulina em resposta a concentrações elevadas de glicemia; - Sistema gel biosensível tem potencial para entrega da insulina. 	Kashyap et al. [61]

Estes sistemas de aprisionamento, presentes na Tabela 1.5, foram produzidos recorrendo-se a vários métodos como emulsão simples/múltipla com evaporação de solvente, liofilização e polimerização química. De um modo geral, verificou-se que o processo de preparação dos sistemas não afetou a proteína e que se obtiveram boas eficiências de aprisionamento assim como uma liberação controlada da proteína. Estes sistemas de aprisionamento podem ter várias aplicações, como administração das proteínas por diferentes vias de administração consoante o local de aplicação: via ocular, nasal, oral, pulmonar, rectal, parenteral e transdérmica.

A decisão do local de aplicação deve ter em conta as características fisiológicas, biofísicas e bioquímicas das proteínas, tamanho, tempo de meia vida, imunogenicidade, estabilidade conformacional, dose necessária, taxa de administração, farmacocinética e farmacodinâmica. Antes da escolha da via de administração deve ainda atender-se a fatores como a capacidade

de aprisionamento da proteína, possibilidade de libertação no local específico, taxa de degradação do polímero e possibilidade de produção à larga escala. [51-53].

Estas vias de administração apresentam como vantagens principais o facto de na maioria não ocorrer o efeito de primeira passagem e serem de rápida atuação. No entanto, apresentam inúmeras desvantagens, sendo as mais relevantes, a pouca biodisponibilidade, a possibilidade de degradação do princípio ativo antes da atuação, a hidrofilicidade e a baixa capacidade de absorção e transporte [51-53,62-65].

A via transdérmica surge como uma ótima opção por evitar o efeito de primeira passagem e a degradação no trato gastrointestinal. Para além disso, permite a libertação do princípio ativo de forma controlada por ação sistémica ou local, durante um período de tempo prolongado de modo indolor. A sua maior limitação prende-se com a barreira imposta pela epiderme e a dificuldade de passagem de moléculas para a corrente sanguínea devido ao elevado peso molecular, dificuldade essa que pode ser ultrapassada utilizando-se agentes de permeação química [53,62,66].

1.4.1 Sistemas transdérmicos

Os sistemas de adesivos transdérmicos são definidos pela Farmacopeia Portuguesa como “preparações farmacêuticas maleáveis, com dimensões variadas, que servem de suporte a uma ou mais substâncias ativas. Quando aplicadas na pele, destinam-se a libertar e difundir uma ou mais substâncias ativas para a circulação geral após a passagem da barreira cutânea” [67]. Os sistemas transdérmicos foram lançados pela primeira vez no mercado em 1979. Inicialmente consistiam num pequeno reservatório com uma dispersão líquida selada com uma camada protetora impermeável e uma membrana em contacto com a pele que controlava a velocidade de libertação. Ainda hoje não é fácil desenvolver este tipo de produto, que envolve um sistema adequado às propriedades físico-químicas do princípio ativo, estudos de permeação *in vitro* e *in vivo*, estudo da estabilidade do princípio ativo e o aspeto final do adesivo [68-69].

Os sistemas adesivos transdérmicos apresentam vantagens e desvantagens. Como vantagens têm o facto de esta via de administração evitar que o princípio ativo seja degradado no trato gastrointestinal pelo pH do meio e enzimas degradantes (efeito de primeira passagem) e a possibilidade de libertação contínua do princípio ativo. A grande adesão dos pacientes a estes sistemas advém da diminuição de tomas, da comodidade e ser indolor e não invasiva, para além da probabilidade reduzida de efeitos adversos. O seu elevado custo de produção, bem

como, a limitação de utilização a certos fármacos/proteínas face a limitações de permeabilidade da pele, são as principais desvantagens. Há ainda a considerar limitação a certas dosagens, a extensão do tempo necessário para o transporte de ativos através da pele e a possibilidade de irritação da pele no local de aplicação [68-69].

Um sistema transdérmico é constituído por várias camadas, aproximadamente cinco, cada uma com uma função específica [68]. No entanto neste trabalho estamos apenas interessados na produção do filme, ou seja, numa das camadas do sistema transdérmico. O filme, ou camada com proteína, pode ser uma matriz ou reservatório, dependendo do sistema transdérmico utilizado, formulado em solução ou suspensão com as substâncias ativas e possíveis excipientes para uma libertação controlada [68-69]. Assim, através deste estudo, vamos aprisionar um ativo numa membrana polimérica à semelhança de Travassos [3], mas agora com uma proteína.

Um sistema transdérmico deve respeitar certos requisitos como apresentar um perfil farmacocinético e farmacodinâmico que permita a libertação da proteína por um período de tempo prolongado e controlado, ter um prazo de validade até 2 anos, dimensão não superior a 40 cm², possibilidade de ser administrado uma vez por dia, ter um ótimo aspeto visual de cor branca ou transparente de preferência, ser de fácil remoção e acima de tudo não ser irritante. Para além disto é necessário ter ainda em conta que a velocidade de fluxo da proteína através do filme para a pele depende da sua concentração, da solubilidade na fase aquosa, do coeficiente de partição, do peso molecular e fundamentalmente das condições da pele [70].

A biodisponibilidade das proteínas aquando do uso em sistemas adesivos transdérmicos pode ser afetada por fatores fisiológicos ou fatores de formulação. Dentro dos fatores fisiológicos tem-se a integridade da pele, local de aplicação, condição da pele, idade e o fluxo sanguíneo. No que diz respeito aos fatores de formulação é importante conhecer a proteína, veículos de libertação, os promotores de permeação, o design e o método de aplicação [70].

É de salientar que não foram encontrados filmes produzidos à base de materiais poliméricos com proteínas aprisionadas, tornando-se desafiante o seu aprisionamento como fármacos, justificando o objetivo de estudo deste trabalho.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Apresentação e descrição detalhada do processo

Este trabalho, como já foi mencionado, surge na continuação dos estudos já realizados por Marques [8], Santos [4], e Travassos [3]. Estes autores sintetizaram oligómeros de base ácido láctico (AL), procedendo à sua funcionalização com MAA, IEMA ou Laromer[®] LR 9000, seguido de adição do fotoiniciador Irgacure[®] 2959 (IRG) para produzir filmes. A fotoreticulação foi conseguida submetendo-se o gel funcionalizado a radiação ultravioleta. Travassos [3] aprisionou nos filmes produzidos um fármaco, o Ibuprofeno (IBU), para estudos da libertação em PBS. O processo que será descrito partiu do conhecimento pré-existente e de novas pesquisas de produção de oligómeros, otimizando-se o processo agora para a libertação de uma proteína.

Este trabalho centrou-se essencialmente na produção de oligómeros de AL testando-se novos co-monómeros para estudos de libertação de uma proteína. O teste de novos co-monómeros deveu-se às diferenças de dimensões entre as moléculas de IBU e da proteína. O agente funcionalizador utilizado foi o LAR e o fotoiniciador o IRG, face aos excelentes resultados obtidos na síntese de filmes por Santos [4] e Travassos [3]. À semelhança de Travassos [3], aprisionou-se nos géis funcionalizados, desta vez, uma proteína, a BSA, para estudos de libertação em PBS.

A produção dos filmes para utilização em sistemas transdérmicos para libertação controlada envolve 5 etapas fundamentais: a síntese de oligómeros de base AL, a funcionalização dos oligómeros produzidos com LAR, o aprisionamento da BSA nos géis funcionalizados, fotoreticulação por radiação UV, e a libertação da proteína num meio de PBS.

A primeira etapa do processo baseou-se na produção do polímero base, ou oligómero base, a partir do AL L (+), através de policondensação direta do AL. Obtiveram-se oligómeros lineares e ramificados de baixo peso molecular, no estado líquido, apresentando alguma viscosidade. Não foram usados quaisquer iniciadores, catalisadores ou solventes tóxicos, o que obrigaria a que numa das etapas de produção dos filmes se fizesse uma purificação, na medida em que os catalisadores e solventes poderiam ser tóxicos aquando do contacto dos

filmes com a pele. A não utilização de catalisadores obrigou, claramente, a que a reação de produção do oligómero fosse mais demorada, e se tivesse de usar temperatura mais elevada.

A estrutura molecular do oligómero formado é dependente do co-monómero utilizado na reação com o AL, que influencia a sua estrutura e propriedades físicas. Para a escolha do co-monómero para a reação com o AL, teve-se em consideração que deveria ter no mínimo dois grupos funcionais, reagindo com o AL. Assim obtêm-se um oligómero com grupos carboxilo e hidroxilo, sem utilização de catalisadores ou libertação de produtos tóxicos na mistura.

Marques [8], Santos [4] e Travassos [3] optaram, de entre uma grande variedade de co-monómeros existentes, pela utilização do 1,4-butanodiol (BDO) e poli (etilenoglicol) PEG 300, ambos com 2 grupos hidroxilo, e pelo pentaeritritol (mPET) com 4 grupos hidroxilo. Obtiveram oligómeros lineares (BDO, PEG 300) e ramificados (mPET), de baixo peso molecular. Neste trabalho, à semelhança do anterior desenvolvido por Travassos [3], foi usado novamente o PEG, porém de peso molecular superior ($400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), e o mPET. Como novos co-monómeros foram utilizados o dipentaeritritol (diPET) e o tripentaeritritol (triPET) apresentando respectivamente 6 e 8 grupos hidroxilo, com o objetivo de se sintetizarem oligómeros com maior peso molecular para aprisionamento de uma proteína.

As reações de policondensação para os quatro co-monómeros em estudo são muito demoradas, cerca de 18h para o oligómero linear utilizando o PEG 400 e 8h para os restantes oligómeros ramificados: mPET, diPET ou triPET. A elevada duração das reações deve-se à pureza do AL ser de apenas 80 % (20% da solução de AL é água) e à produção de água nas reações de policondensação na síntese dos oligómeros.

Finalizada a produção dos oligómeros, estes foram funcionalizados com ligações de carbono duplas, recorrendo-se ao LAR. Conforme referido no estado da arte, a utilização do LAR deve-se ao facto, de ser necessário um monómero com grupos funcionais reativos com os grupos hidroxilo. Pretende-se ainda que os materiais tenham alguma flexibilidade, assim como a melhoria das propriedades físicas e mecânicas, tendo para tal sido testada a adição de LAR em diferentes proporções.

O passo seguinte é a fotopolimerização, o que exige a adição do fotoiniciador IRG ao gel funcionalizado. A quantidade de fotoiniciador a utilizar teve em conta a abundância de ligações duplas no gel. Após a adição do IRG, os géis foram sujeitos a radiação UV,

reticulando por fotopolimerização radicalar livre, obtendo-se filmes sólidos em poucos minutos.

A segunda parte do trabalho prosseguiu com a preparação de uma solução de proteína para aprisionamento no gel funcionalizado. A proteína selecionada foi a albumina de soro bovino (BSA), tendo como objetivo o desenvolvimento de um filme para libertação de BSA. Assim, tendo por base estudos de Cohen [71] dissolveu-se a proteína em água destilada, misturando-se de seguida no gel funcionalizado, seguido de fotopolimerização.

Para finalizar, estudou-se a viabilidade dos materiais produzidos recorrendo não só a estudos de capacidade de absorção de água, teor de gel e degradação hidrolítica, como também à libertação da BSA (etapa fulcral do trabalho). Estudou-se a cinética de libertação *in vitro* da BSA nos materiais produzidos, verificando-se qual o melhor material para uma libertação controlada e prolongada da proteína.

2.2 Materiais

A solução aquosa de AL L (+) (80%) e os co-monómeros PEG 400 (99%), mPET (98%) e triPET (99%) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal) e o diPET (90%) foi adquirido à *ACROS Organics*. Todos os co-monómeros foram utilizados conforme fornecidos. O monómero LAR e o fotoiniciador IRG (97-99%) foram adquiridos e fornecidos respectivamente, pela *BASF* (Alemanha) sendo utilizados também conforme recebidos. Os solventes etanol (96%) e acetona foram adquiridos à José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Odivelas, Portugal) e o éter dietílico (99%) adquirido à *VWR Chemicals* (BDH-Prolabo).

A albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida à *ACROS Organics* e as pastilhas de PBS para preparação da solução do meio coletor da BSA usada em estudos de libertação, foram adquiridas à *Sigma-Aldrich*.

Para ensaios de caracterização, mais concretamente a medição de ângulos de contacto foram utilizados os reagentes formamida (99%), etilenoglicol (99,8%) e propilenoglicol (99,5%), adquiridos à *Sigma-Aldrich* e a *Strat-M[®] Membrane Transdermal Diffusion Testing* adquirida à *Merck* (Alemanha).

No Anexo A são apresentadas as estruturas químicas e moleculares e as principais propriedades dos reagentes utilizados de acordo com as fichas de especificação dos fornecedores.

2.3 Síntese

2.3.1 Síntese dos oligômeros de base ácido láctico

Na primeira etapa sintetizaram-se os oligômeros de base ácido láctico através de reação de policondensação direta do AL, tendo-se utilizado diferentes monômeros: PEG 400, mPET, diPET e o triPET. Não foram utilizados quaisquer solventes nem catalisadores para esta reação.

2.3.1.1 Síntese do oligômero de AL e PEG

Este oligômero, de estrutura linear, foi sintetizado num balão de 250 mL de fundo redondo com três tubuladuras, adicionando-se 100 mL de solução aquosa de AL L (+) (80%). De acordo com a estequiometria da reação (12 AL:1 PEG 400), massas molares e purezas dos reagentes, adicionou-se aproximadamente 32 mL de PEG 400. Após a introdução dos reagentes, a tubuladura principal foi fechada. Numa das tubuladuras laterais, colocou-se um adaptador através do qual se removeu a água do sistema. A terceira tubuladura foi usada como passagem contínua de uma corrente de azoto, garantindo uma atmosfera inerte. O balão foi imerso num banho de óleo, à temperatura de 150°C. A reação de síntese de oligômero de AL-PEG, representada na Figura 2.1, decorreu durante 18h sob agitação magnética. O oligômero obtido foi armazenado num *erlenmeyer* dentro do exsiccador, de maneira a manter-se fresco e seco para posterior funcionalização.

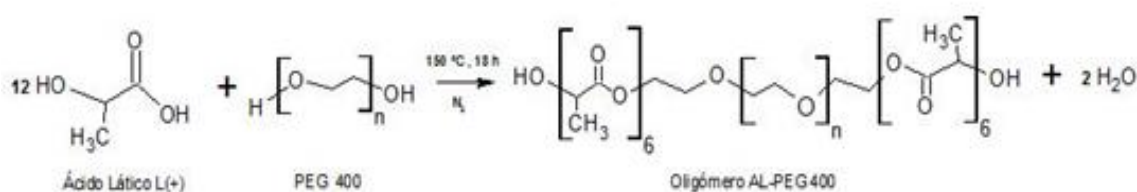


Figura 2.1 Reação do ácido láctico com o poli (etilenoglicol) 400.

2.3.1.2 Síntese do oligômero de AL com mPET, diPET e triPET

Para a produção destes oligômeros utilizou-se o procedimento atrás descrito, substituindo o PEG 400, por outros co-monomeros: mPET, diPET e triPET. Adicionou-se, em 3 balões distintos, 18 g de mPET, 23 g de diPET e 25 g de triPET a 100 mL da solução aquosa de AL. Todas as reações decorreram durante 9h à temperatura de 175°C e encontram-se representadas nas Figuras 2.2 a 2.4.

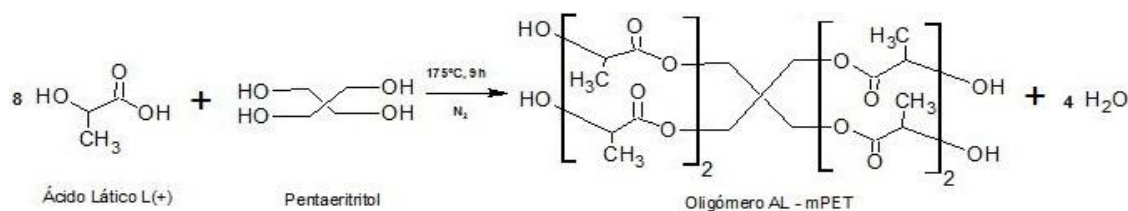


Figura 2.2 Reação do ácido láctico com o pentaeritritol.

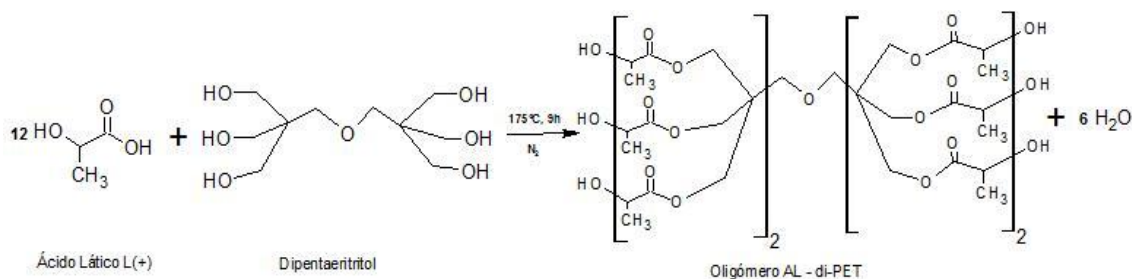


Figura 2.3 Reação do ácido láctico com o dipentaeritritol.

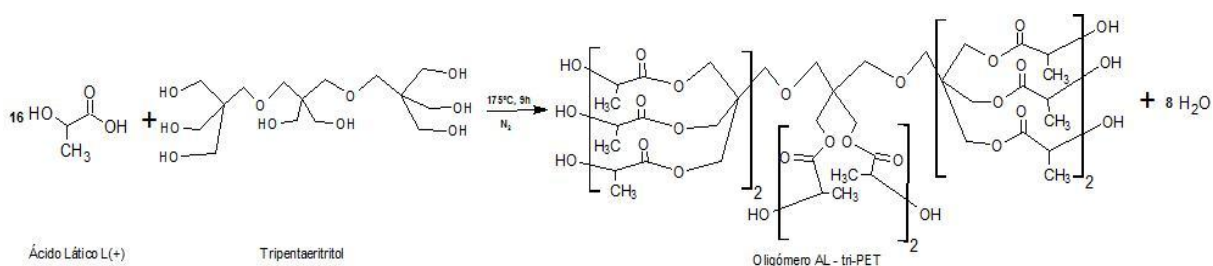


Figura 2.4 Reação do ácido láctico com o tripentaeritritol.

Os tempos de reação para a síntese de todos os oligômeros foram otimizados, pesando-se os balões de hora a hora, até atingirem um peso constante, a que corresponde a remoção total da água do sistema. Ao longo da reação foram recolhidas amostras que se analisaram por ATR-FTIR, de modo a acompanhar o processo reacional. Após a produção dos oligômeros, estes foram armazenados em *erlenmeyers*, num exsiccador com peneiros moleculares. O esquema

geral da montagem feita para a produção dos oligómeros encontra-se representada no Anexo B.

2.3.2 Funcionalização dos oligómeros com Laromer® LR 9000

Após a síntese dos diferentes oligómeros, seguiu-se a funcionalização destes utilizando o monómero LAR. O LAR foi utilizado em diferentes razões molares dependendo do oligómero em uso. Assim, com o objetivo de melhorar as propriedades físicas dos materiais finais foram utilizadas as seguintes razões molares (oligómero: LAR): (1:1) para o AL-PEG 400, (1:2) para os AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET, e (1:3) para o AL-triPET. Em todas as reações a acetona foi utilizada como solvente e um fluxo de azoto garantiu uma atmosfera inerte.

A funcionalização do oligómero AL-PEG 400 (1480 g.mol^{-1}) foi na razão molar 1:1. Para tal, num balão com três tubuladuras e uma capacidade de 100 mL, introduziram-se 5g de oligómero e adicionaram-se 10 mL de acetona. A utilização da acetona como solvente justifica-se pelo ponto ebulição, 56°C , reduzida toxicidade e por ser um solvente que permite solubilização do oligómero e do LAR, visível a olho nu, reduzindo a viscosidade e facilitando a agitação da mistura. O balão foi imerso no banho de óleo a 60°C , com as tubuladuras laterais tapadas. Na tubuladura central, colocou-se um condensador para a reação decorrer com refluxo do solvente. No topo do condensador foi colocado uma torre de secagem, com algodão, de maneira a evitar a entrada de humidade no sistema. A entrada de humidade por mínima que fosse, provocaria reação com o LAR, levando à perda de grupos isocianatos necessários, e a reticulação indesejada. Uma vez homogénea, a mistura, adicionou-se 1,69 mL de LAR, o correspondente a 1 mol. A adição do LAR ao sistema foi realizada da maneira mais rápida possível, de modo a evitar a entrada de humidade. Nas tubuladuras laterais foram adicionados dois balões cheios de azoto para manter a atmosfera inerte. A reação prosseguiu ao longo de 4 horas, protegendo-se o sistema da luz com uma folha de papel de alumínio, de modo a evitar a reticulação.

As reações de funcionalização dos restantes oligómeros, seguiram o mesmo procedimento variando a quantidade de LAR, em função do peso molecular do oligómero em causa. Para o oligómero AL-mPET (857 g.mol^{-1}) utilizou-se a razão molar 1:2 e às 5g de oligómero adicionaram-se 5,85 mL de LAR. Na funcionalização do oligómero AL-diPET (1335 g.mol^{-1}) adicionou-se 3,75 mL de LAR, numa razão molar 1:2. Para a funcionalização do oligómero AL-triPET (1813 g.mol^{-1}), com as razões molares 1:2 ou 1:3, o procedimento descrito foi o mesmo, utilizando-se, no entanto, 2,76 e 4,14 mL de LAR respectivamente, tendo em

consideração a estequiometria. Estas reações decorreram a 75°C durante 4 horas, protegendo-se o sistema da luz, com uma folha de papel de alumínio. Na Figura 2.5 é apresentado o esquema das reações de funcionalização dos oligómero.

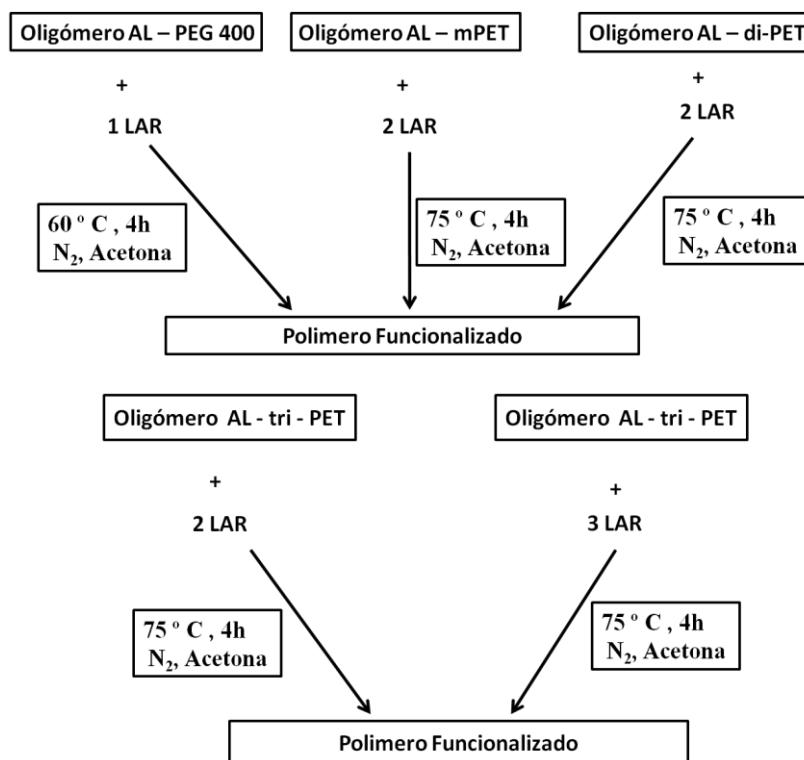


Figura 2.5 Esquema reacional da funcionalização dos diferentes oligômeros.

Com a adição do LAR ao oligômero para a sua funcionalização, ocorre uma reação entre os grupos isocianato do LAR e os grupos hidroxilo dos oligômeros possibilitando a produção dos géis funcionalizados. As estruturas moleculares dos géis são todas diferentes em função dos oligômeros e da razão estequiométrica de agente de funcionalização utilizada. Os tempos de reação foram otimizados recorrendo-se a análises ATR-FTIR.

2.3.3 Reticulação fotoquímica dos géis funcionalizados

Após a produção dos géis funcionalizados foi necessário proceder-se à reticulação fotoquímica para obter os filmes pretendidos. Ao fim das 4 horas da reação de funcionalização adicionou-se o fotoiniciador IRG a cada um dos géis, deixando-se em agitação no mesmo banho à temperatura da reação de funcionalização, durante 30 minutos para solubilização total. A percentagem de fotoiniciador adicionada diretamente a cada um dos géis produzidos foi de 6%, relativamente ao número de moles de ligações de carbono

duplas existentes em cada molécula modificada, quantidade esta que permite reticular o material no menor tempo sem lhe conferir toxicidade [3-4]. O facto de a percentagem de fotoiniciador utilizado ser a mesma para todos os materiais permite comparar as propriedades dos filmes produzidos assim como dos tempos de reticulação.

Após a adição do fotoiniciador, todos os géis estavam transparentes mas com diferentes viscosidades dependentes dos oligómeros utilizados e da proporção de LAR. Estes géis finais foram uma vez mais protegidos da luz, e armazenados para posterior incorporação da proteína e reticulação. Para a proteína ser incorporada, é dissolvida em água destilada e de seguida adicionada aos géis funcionalizados.

Preparados os géis finais, seguiu-se a fotoreticulação com recurso a uma lâmpada de UV (modelo UVGL-48, *Multiband UV, da Mineral light® Lamp*), numa gama de comprimentos de onda em que o IRG é mais sensível, 280-100 nm [3-4,8]. Para a reticulação foram utilizadas como base, placas de vidro limpas com acetona e devidamente secas. Com o auxílio de uma espátula, colocaram-se os géis nas placas de vidro e com um espalhador de inox, espalharam-se os géis, obtendo-se filmes com uma espessura de 1 mm. Seguiu-se a irradiação dos filmes com luz UV testando-se diferentes tempos de irradiação, por tentativa e erro, para cada um dos materiais até se conhecer o tempo ótimo para a sua reticulação.

Após a irradiação UV, todos os filmes base eram transparentes, flexíveis e resistentes, à exceção dos filmes produzidos com o oligómero AL-PEG 400 e LAR na razão 1:1. Este apresentou-se gelatinoso e muito pouco resistente. Os filmes foram então armazenados num local seco à temperatura ambiente, num exsiccador, removendo-se por secagem eventuais resíduos de acetona presentes nos filmes. Por fim procedeu-se à sua caracterização. No Anexo C é apresentado o resumo de todo o processo de síntese dos filmes produzidos.

2.4 Caracterização

Produzidos os diferentes filmes com e sem proteína foram avaliadas as propriedades recorrendo a várias técnicas de caracterização. Para cada uma das técnicas utilizadas é apresentado um enquadramento teórico assim como os procedimentos adotados.

2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)

A ATR-FTIR é uma técnica de espectroscopia que permite analisar de forma qualitativa e quantitativa uma dada amostra (sólida ou líquida), para caracterização química e identificação

dos vários grupos funcionais presentes [72-74]. Assim é possível identificar materiais desconhecidos, avaliar a qualidade e determinar a quantidade de componentes da amostra [75].

Esta técnica permite uma análise bastante rápida das amostras sem ser necessário grande preparação, tendo como desvantagem principal, o desvio existente na intensidade das bandas características de cada frequência relativamente à mesma amostra [72]. Os grupos químicos a identificar no decorrer deste trabalho, assim como as respectivas bandas de frequência, encontram-se no Anexo D.

Nesta técnica analítica a amostra é sujeita a um feixe de radiação infravermelha (IV), podendo essa radiação ser absorvida, transmitida ou refletida de forma total, internamente. A amostra ao absorver/ transmitir energia num certo comprimento de onda irá promover movimentos vibratórios do tipo alongação ou deformação angular, obtendo-se um espectro da amostra definido por absorvância / transmitância em função do número ou comprimento de onda [74-76]. Os picos no espectro correspondem às frequências vibracionais entre as ligações dos átomos da amostra permitindo a análise qualitativa e quantitativa, esta última diretamente relacionada com o tamanho dos picos [74-75].

As análises foram realizadas no equipamento *Frontier FT-NIR/MIR Spectrometer* da *PerkinElmer*, equipado com um *ATR Diamond crystal 45°* e um detetor *Temperature-stabilized FR-DTGS* com divisor de feixe de KBr. Os espectros foram obtidos a 128 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Esta técnica permitiu analisar os reagentes utilizados assim como acompanhar as reações de síntese dos oligómeros e funcionalização dos polímeros, avaliando-se o tempo ótimo para as reações. Analisou-se ainda os filmes produzidos com e sem proteína, de maneira a verificar se o aprisionamento desta, nos filmes, teria sido eficiente.

2.4.2 Teor de gel (gel content)

A técnica utilizada para medir o grau de reticulação dos filmes obtidos, foi o teor de gel. Uma amostra de cada um dos diferentes filmes foi previamente pesada, registando-se a massa inicial (m_i). De seguida, cada amostra foi colocada em frasco fechado com 20 mL de éter dietílico, vedado com parafilme, durante 24h com agitação magnética. Utilizou-se éter dietílico para a extração de qualquer líquido residual ou componentes não reticulados presentes nas amostras de filme, ficando apenas a matriz reticulada. Após 24h o material foi seco a 37°C numa estufa até atingir massa constante (m_f). Este teste foi efetuado em triplicado

para cada um dos filmes sem proteína, e o teor de gel foi determinado recorrendo à Equação 2.1.

$$\text{gel content (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.1)$$

2.4.3 Avaliação da capacidade de absorção de água (Swelling)

A capacidade de absorção de água ou *swelling* é um fator que se deve ter em conta para a produção de um sistema transdérmico, na medida em que influencia o seu desempenho de libertação [3]. Para valores de capacidade de absorção de água elevados, a degradação do mesmo material também será elevada, o que facilitará uma maior libertação do princípio ativo. Esta propriedade foi avaliada em triplicado, para os filmes base sem proteína aprisionada.

Recorreu-se a duas vias para avaliação desta propriedade: incubação e saturação. Em ambos os testes prepararam-se amostras de filmes dos materiais base, secos e previamente pesados, m_i .

No teste por incubação, os filmes de massa m_i conhecidas, foram colocados em frascos fechados, tendo sido adicionado a cada um, um volume de 10 mL de água destilada. Este teste ocorreu à temperatura ambiente, e em intervalos de tempo estipulados registou-se a massa dos filmes húmidos de acordo com o seguinte procedimento: com o auxílio de uma pinça retirou-se o filme imerso na água destilada e utilizou-se uma folha de papel absorvente para remover a água em excesso à superfície do filme, seguindo-se a sua pesagem, m_h , até se atingir um peso máximo, $m_{máx}$. Os ensaios de incubação não demoraram mais de 2h comprovando-se que aquele seria o peso máximo do filme hidratado.

No teste por saturação, foi utilizada uma solução de cobre pentahidratado, com 96% de concentração, na base de um exsiccador, à temperatura ambiente. Os filmes de massa m_i conhecida foram colocados, no exsiccador, e em intervalos de tempo estipulados pesaram-se os filmes, m_h , até atingir o peso máximo, $m_{máx}$. Uma vez mais para comprovar o peso máximo o teste foi prolongado durante mais algum tempo, não excedendo os 23 dias.

A Equação 2.2 permite calcular a capacidade de absorção de água de cada um dos filmes.

$$\text{Capacidade de absorção de água (\%)} = \left(\frac{m_h - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (2.2)$$

2.4.4 Degradação hidrolítica em PBS

Tendo como objetivo a utilização destes filmes produzidos em sistemas transdérmicos é fundamental avaliar a sua capacidade de degradação em ambiente fisiológico. A degradação pode facilitar a libertação do princípio ativo de forma controlada.

Avaliou-se a degradação para todos os filmes produzidos, em duplicado, por imersão numa solução de PBS (pH 7,4) com uma concentração de 0,005 M. Todos os filmes foram secos, cortados e pesados, registando-se a massa inicial de cada um dos filmes, $m_{s,i}$. Cada amostra pesada foi colocada num frasco de plástico, adicionando-se 10 mL de solução PBS, devidamente fechado. No total foram preparados 16 frascos por material para avaliação da degradação dos filmes ao longo de 6 semanas, a 37°C numa estufa, para simular a temperatura fisiológica do corpo humano. Em tempos previamente estipulados (1, 4, 8, 14, 21, 28, 35 e 42 dias), com o auxílio de uma pinça retiraram-se as amostras dos frascos, e colocaram-se numa placa de vidro, devidamente identificada, a secar a 37°C. Na estufa colocaram-se peneiros moleculares para absorver a humidade, e a massa dos filmes foi sendo pesada até atingir uma massa constante $m_{s,t}$.

Através da Equação 2.3 calculou-se a degradação de cada material, por perda de massa (%), num determinado período de tempo.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_{s,i} - m_{s,t}}{m_{s,i}} \times 100 \quad (2.3)$$

Em que $m_{s,i}$ e $m_{s,t}$ são respectivamente as massas seca inicial e final ao fim de um determinado período de degradação. A fim de se obter um melhor perfil de degradação nos primeiros 8 dias, repetiu-se o teste de degradação para todos os materiais pesando as amostras ao fim de 1, 4 e 8 dias de teste.

2.4.5 Análise das propriedades térmicas dos materiais finais - TGA e DSC

Os materiais produzidos foram submetidos a técnicas de caracterização térmica, mais concretamente análise termogravimétrica (TGA) e análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

A análise termogravimétrica é uma técnica de medição da perda de massa de um polímero em função da temperatura numa atmosfera controlada, que pode ser inerte, oxidante ou redutora (raramente usada em polímeros), de modo a avaliar a estabilidade térmica dos materiais [77].

A gama de temperaturas usada para análises TGA vai desde a temperatura ambiente até aos 1000°C, um valor limite muito elevado quando se consideram aplicações poliméricas. Quando submetidos a um aumento de temperatura, os polímeros normalmente sofrem perda de massa [77]. No entanto, antes da degradação e a velocidades de aquecimento baixas, em atmosferas oxidantes, também se pode registar um pequeno ganho de massa [77].

A perda de massa dos polímeros pode ser devida a produtos de reação, por exemplo a água (100°C), componentes voláteis, como solventes ou oligómeros com temperaturas de ebulição entre a temperatura ambiente e os 300°C, ou mesmo devido formação de produtos voláteis resultantes da cisão de cadeias (200-800°C) [77].

Para avaliar até que ponto os materiais seriam termicamente estáveis, realizaram-se TGA às amostras líquidas e reticuladas (após irradiação UV), assim como aos reagentes. Na análise, os materiais foram sujeitos a um aumento de temperatura controlado e igual para todos, obtendo-se no final um gráfico de perda de massa em função da temperatura, que auxiliará na avaliação da estabilidade térmica dos materiais. Através da análise do gráfico é possível determinar a temperatura de degradação, T_d , do material, ou seja, a temperatura para a qual o material irá sofrer uma perda de massa significativa ou degradar.

Utilizando o equipamento SDT Q500, da *Thermal Analysis (TA) Instruments*, procedeu-se à análise das amostras, com massa de 5 a 10 mg. As amostras foram submetidas até uma temperatura máxima de 600°C, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, numa atmosfera inerte com um fluxo de azoto de 100 mL.min⁻¹. O tratamento dos resultados foi realizado com o *software* TRIOS da *TA Instruments*.

A análise por calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica bastante utilizada em aplicações nas áreas poliméricas e farmacêuticas. Esta técnica permite traçar uma curva do fluxo de calor numa substância, medida em função da temperatura. Através da análise da curva obtida é possível determinar rápida e facilmente várias propriedades: temperatura de transição vítrea T_g , temperatura de cristalização T_c , temperatura de fusão (T_f) e a entalpia de fusão (ΔH_m) [4, 78].

A análise por DSC foi realizada para os filmes produzidos, com e sem proteína, para determinação da temperatura de transição vítrea. Utilizou-se o equipamento de calorimetria diferencial de varrimento, modelo Q1000 da *TA Instruments*, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, numa atmosfera inerte com um fluxo de 100 mL.min⁻¹ de azoto

para análise das amostras de massas conhecidas, entre 5 a 10 mg, na gama de temperaturas entre -80°C e a temperatura de degradação de cada um dos materiais, previamente determinada por TGA.

2.4.6 Determinação das energias de superfície através da medição de ângulos de contacto

A capacidade de adesão dos filmes produzidos à pele pode ser avaliada através da determinação da energia de superfície dos filmes com base na medição de ângulos de contacto [12].

Em lamelas de vidro colocou-se fita-cola de dupla face, e por cima de cada uma, filmes base reticulados, lisos e uniformes. Numa outra lamela colocou-se uma membrana que simula a pele, a Strat-M[®] *Membrane Transdermal Diffusion Testing*.

Utilizando o equipamento OCA 20 [79], da *Dataphysics*, foram medidos os ângulos de contacto (θ), tendo-se utilizado quatro líquidos: água, etilenoglicol, propilenoglicol e formamida. No entanto, para efeitos de cálculo foram considerados apenas 3 líquidos (água, propilenoglicol e etilenoglicol), por conduzirem a menores desvios padrão. Para cada um dos líquidos e em cada lamela com um filme diferente, foram efetuadas oito medições em diversos pontos da sua superfície, para determinação dos ângulos de contacto médios. Há medida que a gota caiu no filme, tirou-se uma foto com auxílio de uma funcionalidade do equipamento e através do uso de tangentes mediu-se se o ângulo de contacto, excluindo-se valores de ângulos com desvio superior a 2.

Os ângulos de contacto medidos permitiram calcular as componentes polares (γ_s^P) e dispersivas (γ_s^D) para cada um dos filmes e membrana, e a energia de superfície (γ) que corresponde à soma das outras componentes calculadas [80-81]. Para este cálculo recorreu-se ao método de Owens-Wendt-Rabel e Kaelble (método OWRK) [82] de aplicação universal podendo ser aplicada a sistemas polares ou apolares, necessitando de no mínimo dois líquidos para cálculo das componentes [79].

2.5 Metodologia de desenvolvimento da solução de proteína e aprisionamento

Ao longo do trabalho desenvolvido optou-se por aprisionar BSA em concentração de 3 % (m/m) do produto final. No entanto estudaram-se ainda o material de AL-PEG (1:1) com 1 % (m/m) e o material de AL-mPET (1:2) com 6 % (m/m).

A BSA é muito solúvel em água [37] e a presença desta no filme é indispensável para melhorar a administração transdérmica [3]. Assim, e à semelhança do procedimento que Cohen [71] testou para microesferas, prepararam-se soluções de BSA em água destilada, com uma concentração de $0,2 \text{ g.mL}^{-1}$, adicionadas ao gel funcionalizado.

O procedimento consistiu em pesar o gel funcionalizado produzido e de acordo com essa quantidade adicionar a % (m/m) de BSA (carregamento ativo). A título de exemplo, para cada grama de gel formado dissolviam-se 0,03 g de BSA em 0,15 mL de água, para um carregamento ativo de 3 % (m/m). Para a adição deste carregamento de BSA ao gel pesava-se a quantidade necessária de BSA num frasco de vidro, com um magnete, e adicionava-se a quantidade correspondente de água destilada com uma pipeta automática. Obtinha-se uma mistura homogénea após 10 minutos em agitação sobre uma placa. A solução de BSA foi adicionada ao gel funcionalizado no balão, protegido com uma folha de papel de alumínio, com o auxílio de uma pipeta. A mistura foi colocada uma vez mais em agitação durante 10 minutos para homogeneização. Todas estas etapas foram realizadas à temperatura ambiente com uma agitação de 200 rpm. A mistura, gel funcionalizado e proteína, foi espalhada sobre a placa de vidro e reticulada por irradiação UV, obtendo-se filmes com a espessura de 1 mm.

Produziram-se filmes de PEG (1%) com tempo de reticulação de 120 segundos e de mPET (3 e 6%), diPET (3%), e triPET (3%) com tempos de reticulação de 90 segundos. Após a produção dos filmes, estes foram secos na estufa e guardados em exsiccadores para posterior estudo de libertação.

2.6 Estudos de libertação do princípio ativo *in vitro*

A cinética da libertação da BSA dos filmes produzidos foi estudada *in vitro*, mais concretamente por incubação ou em célula de difusão de Franz [83]. Apesar de não simularem a membrana e o metabolismo da pele, são muito utilizados em ambiente laboratorial por serem de fácil execução, terem um baixo custo e haver maior controlo da temperatura [84]. De entre os dois métodos escolhidos para estudo de libertação da proteína, o que melhor mimetiza a difusão é o que recorre a células de difusão de Franz [83].

Assim, tornou-se fundamental estudar e avaliar o desempenho da libertação da BSA nos filmes produzidos ao longo do tempo, procurando-se também, à semelhança de Travassos [3]

quantificar a quantidade de proteína presente no filme no final do estudo, sem sucesso pois a BSA não solubilizou em etanol.

Todos os filmes produzidos com incorporação de BSA, assim como os filmes brancos (sem BSA) foram submetidos a libertação *in vitro*, por incubação e numa célula de difusão de Franz (12 mL *Jacketed Franz Cell*, da *Soham Scientific*), à temperatura de 37°C. O meio coletor foi uma solução salina de PBS (pH 7,4), mimetizando-se a composição do plasma sanguíneo.

A quantificação da proteína libertada para o meio coletor de PBS foi realizada recorrendo-se ao espectrofotómetro *Beckmans DU*[®] 650, através da medição das absorvâncias num dado comprimento de onda. O comprimento de onda indicado para a leitura de absorvâncias de proteínas, de acordo com Li [6] e confirmado no espetro obtido da BSA em PBS, Anexo E, é de 278 nm. No entanto pode-se utilizar também o comprimento de onda de 595 nm para a quantificação de proteínas, caso se utilize o método colorimétrico de *Bradford* descrito no Anexo E. No Anexo E são também apresentados os procedimentos para a preparação da solução tampão de PBS assim como a construção das curvas de calibração para soluções desta proteína no espectrofotómetro a 278 e a 595 nm.

2.6.1 Libertação por incubação

Antes do estudo de libertação, garantiu-se que os filmes com proteína estavam secos e cortaram-se amostras com área conhecida. De seguida pesaram-se as amostras para cálculo da massa teórica de proteína. Conhecida a massa da amostra, esta foi colocada num frasco fechado, adicionando-se 10 mL de solução salina de PBS (0,01 M e pH 7,4), ver Anexo F. Os frascos foram colocados numa estufa a 37°C e em intervalos de tempo estipulados (1/2 h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8h) recolheram-se amostras de solução (2mL) do meio coletor para *ependorfs*, para posterior quantificação da concentração de BSA por medição da absorvância, Abs_A . É importante salientar que após a recolha de cada amostra da solução coletora, repôs-se o volume inicial com uma solução fresca de PBS, com as amostras nos *ependorfs* armazenadas no frigorífico a 2°C para que não ocorresse grande alteração nas absorvâncias medidas da proteína.

Foi também estudada a libertação de compostos de filmes sem proteína (brancos), para avaliar se a imersão em PBS degrada o filme libertando compostos que afetam o valor da absorvância

da solução coletora, Abs_B . O processo experimental foi em tudo semelhante ao descrito no parágrafo anterior.

Conhecido o carregamento teórico (1, 3 ou 6 % (m/m)) em cada um dos filmes, assim como a massa inicial da amostra de filme com e sem proteína sujeitos a libertação, calculou-se a massa teórica de proteína na amostra e a razão entre as massas das amostras de filme com e sem proteína, através da Equações 2.4 e 2.5 respectivamente.

$$m_{BSA,0} = m_{filme,i} * Carregamento_{teórico} \quad (2.4)$$

Em que $m_{filme,i}$ é a massa inicial seca da amostra do filme com proteína e o $Carregamento_{teórico}$ é a percentagem de proteína no filme.

$$Razão = \frac{m_{filme,i}}{m_{filme Branco}} \quad (2.5)$$

Onde $m_{filme Branco}$ é a massa inicial seca da amostra de filme sem proteína do mesmo material.

De maneira a assegurar-se apenas a quantificação da BSA na libertação dos filmes utilizou-se a Equação 2.6:

$$Abs_{BSA} = Abs_A - Abs_B * \frac{m_{filme,i} - m_{BSA,0}}{m_{filme Branco}} \quad (2.6)$$

Sendo Abs_A , a absorvância da amostra de filme com proteína e Abs_B , a absorvância da amostra do filme branco.

Conhecida a absorvância para a quantificação apenas da BSA libertada, Abs_{BSA} , recorreu-se à curva de calibração da BSA em PBS (Anexo E), para calcular a concentração de BSA, libertada ao longo do tempo, através da Equação 2.7:

$$C_{BSA} (mg.mL^{-1}) = 1,756 * Abs_{BSA} \quad (2.7)$$

Onde 1,756 é o declive da curva de calibração, Equação E.1 no Anexo E.

Através das equações 2.8 a 2.10 foi calculada a massa de BSA libertada, em cada intervalo de amostragem, $m_{BSA,j}$ e a taxa cumulativa de libertação da BSA respectivamente.

$$m_{BSA,j} (mg) = C_{BSA} * Vol \quad (2.8)$$

$$Sendo, m_{BSA libertada,t} = \sum_{j=1}^t m_{BSA,j} \quad (2.9)$$

$$\text{Taxa cumulativa de libertação (\%)} = \frac{m_{BSA \text{ libertada},t}}{m_{BSA,0}} * 100 \quad (2.10)$$

Sendo, m_{BSA} a massa de BSA libertada, Vol o volume de solução de PBS utilizado na libertação por incubação ou célula de difusão de Franz, $m_{BSA \text{ libertada},t}$ a massa total de BSA libertada até ao instante t e $m_{BSA,0}$ a massa teórica de BSA na amostra de filme.

Ao avaliar a libertação de proteína por incubação, ambas as faces do filme estão em contacto com a solução de PBS, não mimetizando da melhor maneira a libertação transdérmica quando em contacto com a pele (apenas uma face em contacto) [3].

2.6.2 Libertação em célula de difusão de Franz

A avaliação da difusão em células de Franz é um método aprovado pela FDA para testes de preparações tópicas ou transdérmicas [84]. Foram utilizadas células de Franz de vidro verticais, com uma área de difusão de $0,20 \text{ cm}^2$, compostas por um compartimento recetor, com um volume de 12 mL, preenchido pela solução salina de PBS (meio coletor) [3,83], Anexo F. Este compartimento tem uma camisa de aquecimento onde circula água a 37°C [3]. A célula de Franz, onde se introduziu um agitador magnético, está colocada sobre uma placa de agitação, 100 rpm, para a homogeneização [3]. As amostras são recolhidas com uma seringa através de um capilar na zona lateral. O volume da amostra é repostado com solução fresca de PBS [3,83].

No topo da célula de Franz é colocado a amostra de filme, de massa e dimensões conhecidas, em contacto com a solução de PBS, colocando-se por cima deste uma campânula que, evita a formação de bolhas [3,83]

As amostras da solução recetora foram recolhidas nos mesmos intervalos de tempo da libertação por incubação, guardadas em *ependorfs* e armazenadas no frigorífico, para posterior análise e determinação do perfil de libertação em função do tempo seguindo-se o procedimento descrito em 2.6.1.

2.7 Estudo de avaliação da degradação da proteína

No Capítulo 1 referiu-se que a BSA é sensível às condições do meio envolvente. Assim foi avaliada de forma qualitativa as implicações das condições a que é sujeita neste processo. Preparou-se uma solução de BSA em PBS (solução mãe), com uma concentração de 2 mg.mL^{-1} . Esta solução foi submetida à adição de solventes orgânicos, a radiação UV, ao

aquecimento até 50 °C e a uma mudança de pH. Uma vez sujeitos a estes tratamentos, a concentração de BSA nas soluções remanescentes foi avaliada por espectrofotometria usando termo de comparação a absorvância e concentração da amostra da solução mãe.

O solvente orgânico utilizado para avaliação da degradação da BSA foi a acetona, adicionada na razão (50:50) V/V à solução de BSA preparada. A acetona usada na produção dos géis está ainda presente aquando da adição da solução de BSA ao gel funcionalizado antes da fotoreticulação. A absorvância da amostra foi medida no espectrofotómetro utilizando-se como branco uma solução de PBS e acetona.

O efeito da temperatura sobre a solução de BSA foi avaliado depois de submeter 5 mL da solução mãe de BSA à temperatura de 50 °C durante 1, 3 e 5 minutos. O branco utilizado na análise do espectrofotómetro foi a solução de PBS. A temperatura escolhida foi de 50°C por estar próxima da temperatura de desnaturação da proteína (62°C) e próxima da temperatura de reação (60-75°C).

Submeteu-se ainda a solução de BSA a radiação UV por tempos superiores aos que o gel é sujeito na formação do filme, averiguando-se, se o tempo de irradiação aplicado seria suficiente para degradar a proteína. Amostras de 5 mL da solução mãe de BSA foram submetidas a radiação UV, durante 150 e 300 segundos. Após irradiação a concentração de BSA foi medida no espectrofotómetro, utilizando-se como branco a solução de PBS.

Por ultimo e havendo informação da alteração da conformação da BSA a diferente pH (Capítulo 1, secção 1.3.1), foi testada essa variável do processo. Foram preparadas em duplicado soluções com 5 mL de solução mãe a que foram adicionados 2,5 e 5 mL de HCl de concentração 0,5 M. O pH inicial e final foi medido assim como a absorvância das soluções, utilizando-se como branco a solução de PBS.

A solução de referência para comparação e comprovação das alterações das absorvâncias em função das condições sujeitas, foi preparada em duplicado, a partir da solução mãe, em frascos de 5 mL. As absorvâncias foram medidas, utilizando-se como branco a solução de PBS.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos oligómeros e produção dos filmes fotoreticuláveis

O trabalho desenvolvido a nível laboratorial permitiu a produção e estudo de diferentes filmes poliméricos de base AL, com recurso a quatro co-monomeros, um linear e os outros ramificados. A seleção dos co-monomeros teve como critério obter polímeros de peso molecular superior aos sintetizados nos estudos anteriores. A nova aplicação pretendida consiste na construção de um sistema transdérmico para o tratamento de úlceras diabéticas utilizando um *epidermal growth factor*, libertado a partir de matrizes poliméricas. Tendo em consideração o custo do *epidermal growth factor* decidiu-se numa primeira etapa substituir esse princípio ativo por uma proteína. A proteína selecionada foi a BSA.

A parte inicial do trabalho teve como objetivo a síntese dos novos oligómeros de base AL, por reação de policondensação direta, utilizando os co-monomeros PEG 400, mPET, diPET e triPET. A reação entre o AL e o PEG 400 ocorreu a 150 °C durante 18 h e as restantes reações entre o AL e o mPET, o diPET e o triPET exigiram temperaturas mais elevadas, 175 °C, com redução do tempo de reação a 9h. Obtiveram-se oligómeros lineares (AL-PEG 400) e ramificados (AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET) transparentes. Os oligómeros apresentaram viscosidade moderada, sendo o AL-PEG 400 o menos viscoso. A viscosidade aumentou com o grau de ramificação, apresentando-se sólidos à temperatura ambiente.

Antes da adição do agente de funcionalização, o LAR, adicionou-se acetona para reduzir a viscosidade do oligómero e promover a mistura do LAR. A quantidade de LAR adicionada ao oligómero dependeu do seu peso molecular e da resistência pretendida para os materiais finais. As reações de funcionalização decorreram durante 4h, à temperatura de 60°C para o oligómero de AL-PEG 400 e à temperatura de 75°C para os restantes oligómeros, obtendo-se polímeros com ligações de carbono duplas terminais. A estes foi adicionado o fotoiniciador IRG, com uma quantidade fixa de 6% do número de moles de ligações duplas, permitindo obter géis homogéneos e viscosos para reticulação por radiação UV.

Na sequência dos resultados dos trabalhos anteriores, a espessura dos filmes foi de 1 mm. Produziram-se os filmes: AL-PEG (1:1) com tempo de reticulação de 90 segundos, reduzida a 60 segundos nos filmes AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2), AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3).

A designação de cada material partiu do nome dos reagentes usados: AL do ácido láctico e PEG 400, mPET, diPET e triPET dos co-monomeros utilizados. As designações (1:1), (1:2) e (1:3) provém das diferentes razões estequiométricas utilizadas entre oligómero e agente de funcionalização. Na Tabela 3.1 é apresentado um resumo destas informações, assim como a estequiometria e peso molecular previsto para o oligómero sintetizado.

Tabela 3.1 Resumo das condições de reação e peso molecular dos oligómeros sintetizados.

Oligómeros	Duração (h)	Temperatura (°C)	Estequiometria (AL: co-monomero)	Peso molecular (g.mol ⁻¹)
AL-PEG 400	18	150	(12:1)	1480
AL-mPET	9	175	(8:1)	857
AL-diPET	9	175	(12:1)	1335
AL-triPET	9	175	(16:1)	1813

A Tabela 3.2 resume informação relativa à produção dos filmes e suas características. Foi possível obter matrizes reticuladas, com tempos de reticulação baixos, de 60 e 90 segundos, sem vestígios de líquido residual, condição necessária para confirmar reticulação.

Tabela 3.2 Resumo das condições de produção dos filmes poliméricos de base AL e suas características.

Material	Funcionalização (h)	Temperatura (°C)	% IRG	Tempo reticulação (s)	Características
AL-PEG 400 (1:1)	4	60	6	90	Gelatinoso, frágil e transparente.
AL-mPET (1:2)	4	75	6	60	Resistente, flexível e transparente.
AL-diPET (1:2)	4	75	6	60	Res., flex. e trans.
AL-triPET (1:2)	4	75	6	60	Res., flex. e trans.
AL-triPET (1:3)	4	75	6	60	Res., flex. e trans.

Uma primeira avaliação dos filmes foi efetuada com base nas suas características. Os filmes AL-PEG 400 (1:1) mostraram-se gelatinosos e frágeis. Testou-se ainda a produção do filme AL-PEG 400 (1:2), sem sucesso, uma vez que ocorreu repetidamente reticulação no balão durante a reação de funcionalização. Assim conclui-se que o PEG 400 não é um bom co-

monómero para esta aplicação. O filme AL-mPET (1:2) reproduziu os resultados de Travassos [3], revelando-se resistente, flexível e transparente. Com o objetivo de aumentar o peso molecular dos polímeros foram ainda produzidos filmes de AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:2) e (1:3) apresentando as mesmas propriedades que o material de AL-mPET (1:2): resistentes, flexíveis e transparentes.

Os tempos das reações de síntese do oligômero e funcionalização foram otimizados acompanhando-se as reações por ATR-FTIR. Os tempos de reticulação dos géis funcionalizados em filmes também foram otimizados, por tentativa e erro, até se obter uma matriz sólida sem vestígios de líquido residual.

De entre os filmes produzidos, o de AL-triPET (1:3) foi o que se revelou mais resistente, mas também menos flexível. A resistência e a flexibilidade dos filmes produzidos estão relacionadas com matrizes poliméricas mais ou menos reticuladas e consoante o número de ligações de carbono duplas adicionadas [4]. Nas Figura 3.1 são apresentadas imagens dos filmes base produzidos. Apesar de nem todos os filmes serem promissores para utilização enquanto sistemas transdérmicos, mais tarde foi aprisionada a proteína BSA e estudada a sua libertação.

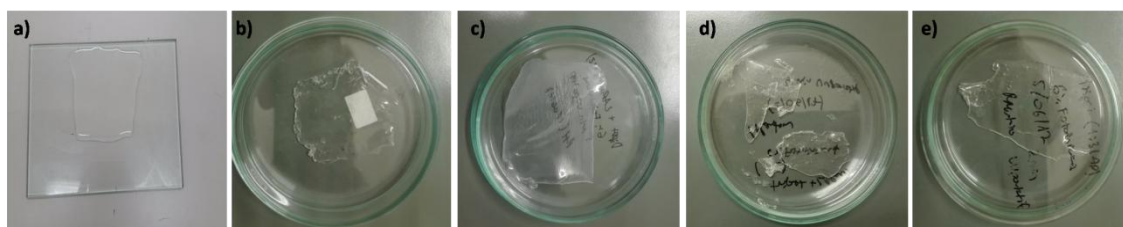


Figura 3.1 Filmes base produzidos através de fotoreticulação dos géis funcionalizados: a) AL-PEG 400 (1:1); b) AL-mPET (1:2); c) AL-diPET (1:2); d) AL-triPET (1:2); e) AL-triPET (1:3).

3.1.1 Acompanhamento das reações de síntese de oligómeros, funcionalização e fotoreticulação por ATR-FTIR

A técnica utilizada para acompanhar e otimizar o tempo das reações de síntese dos oligómeros, funcionalização e sua fotoreticulação foi a ATR-FTIR (secção 2.4.1). Através desta técnica é possível identificarem-se os grupos químicos presentes em cada amostra, e com essa informação concluir sobre o sucesso das reações. No Anexo D são apresentados os espectros dos co-monómeros utilizados identificando os grupos funcionais e as respectivas bandas características. A Figura 3.2 inclui os espectros resultantes da análise ATR-FTIR dos oligómeros sintetizados e do material base, AL.

No espectro do AL observa-se uma banda alongada a 3396 cm^{-1} que corresponde aos grupos OH, também detetável nos espectros dos oligómeros. Esta banda é, no entanto, mais suave em comparação com a do AL, situada a 3486 , 3456 , 3449 e 3483 cm^{-1} para os oligómeros de AL-PEG 400, AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET, respectivamente, em virtude da libertação de água na reação de policondensação a temperatura elevada. Apesar de a banda característica dos grupos OH dos oligómeros ramificados ser mais suave, Figura 3.2, esta ainda é significativa, o que poderá indicar que as reações de síntese destes oligómeros poder-se-iam prolongar além das 9 horas. Em todos os espectros dos oligómeros as bandas correspondentes à ligação C=O, acentuam-se relativamente ao registado no AL em virtude da formação de poliésteres. Esta banda é detetada na gama de frequências 1750 - 1700 cm^{-1} .

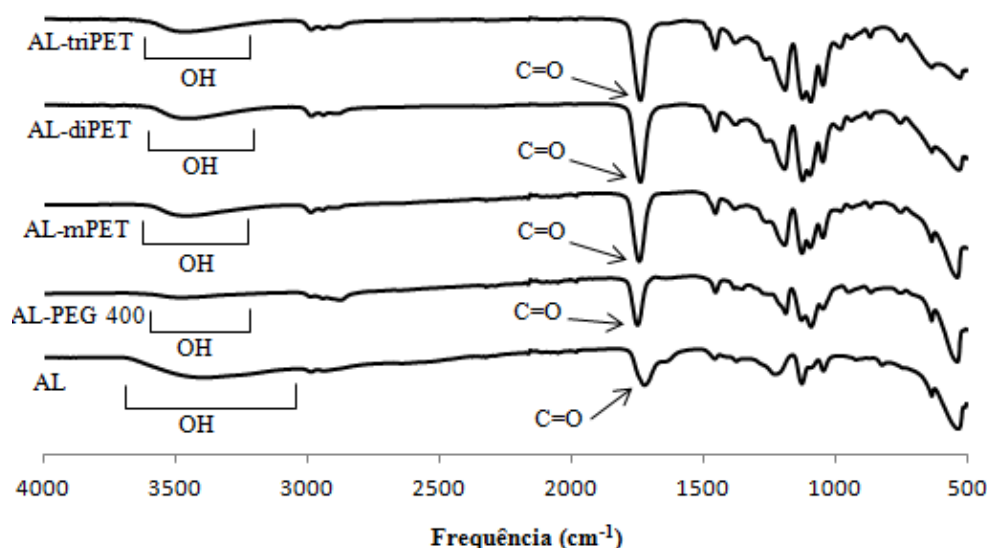


Figura 3.2 Espectros ATR-FTIR dos oligómeros base e do ácido láctico.

Os géis poliméricos resultantes da reação de funcionalização também foram analisados por ATR-FTIR, Figura 3.3, para conhecer o tempo de reação ótimo e garantir o sucesso das reações. Este é comprovado pelo aparecimento de ligações duplas C=C e ligações N-H em todos os espectros na Figura 3.3 e por uma dissipação da banda dos grupos OH por reação com os grupos isocianato do LAR. Os espectros do agente de funcionalização, LAR, e do fotoiniciador IRG encontram-se no Anexo D.

Pela análise da Figura 3.3 verifica-se que ocorreu a dissipação da banda correspondente aos grupos OH dos oligómeros e que, de modo geral, também ocorreu o desaparecimento da banda característica dos grupos isocianato a 2276 cm^{-1} . O desaparecimento completo destas bandas indica que a reação entre os grupos OH e isocianato é completa, apresentando um

rendimento elevado nos géis AL-PEG 400 (1:1) e AL-triPET (1:3). Nos restantes géis espera-se um rendimento mais baixo, dado que os grupos isocianato foram consumidos parcialmente, conforme é possível analisar pela Figura 3.3, sugerindo-se de futuro aumentar o tempo da reação de funcionalização. Na Figura 3.3, o aparecimento de duas bandas correspondentes às ligações C=C e N-H, na zona dos 1635 cm^{-1} e 1534 cm^{-1} respectivamente, comprova que a reação de funcionalização foi bem-sucedida.

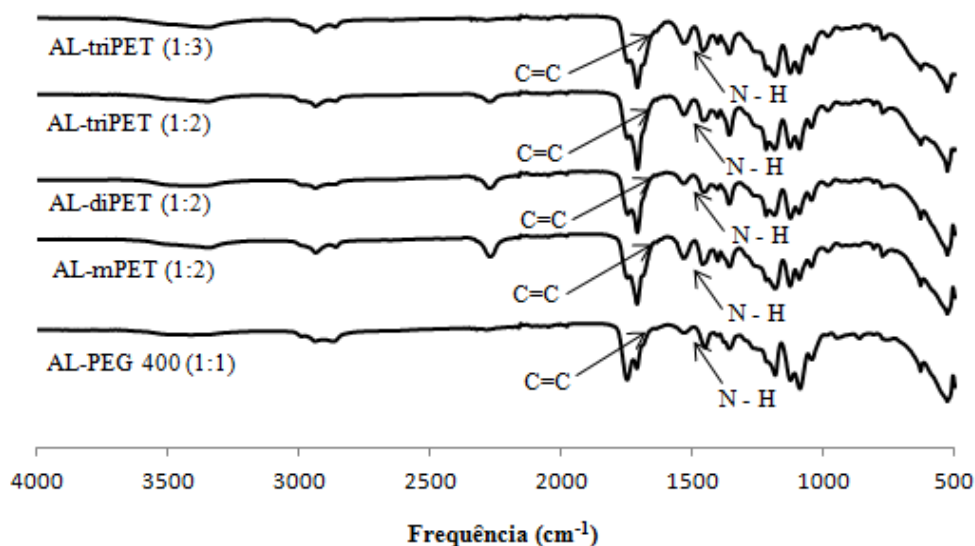


Figura 3.3 Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados com LAR.

Após a formação dos géis funcionalizados, adicionou-se o fotoiniciador IRG, seguindo-se a reticulação por ação de radiação UV. Na Figura 3.4 são representados os espectros dos filmes reticulados resultantes da sua análise por ATR-FTIR.

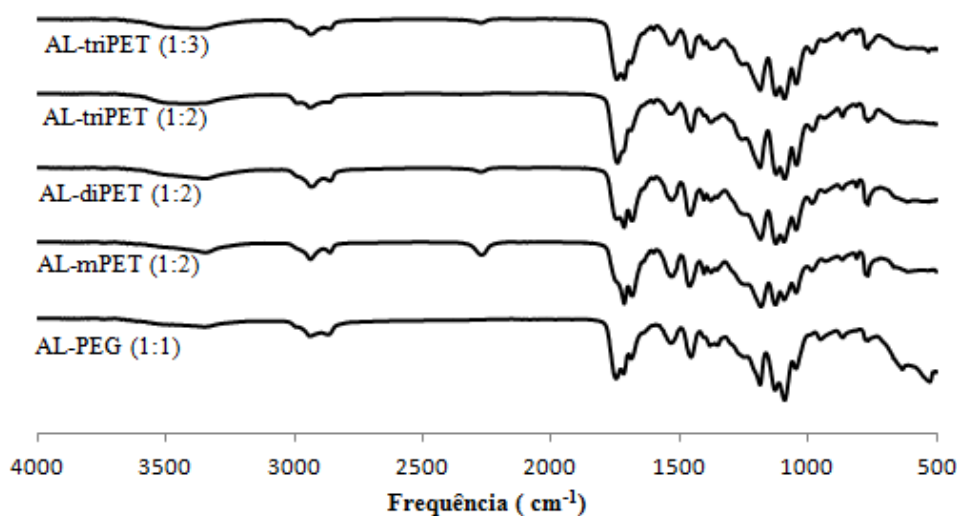


Figura 3.4 Espectros ATR-FTIR dos filmes base após adição de 6% de IRG e reticulação por radiação UV.

O desaparecimento das bandas características das ligações duplas C=C, 1635 cm^{-1} , em virtude da reticulação permite confirmar que as matrizes estavam reticuladas. A análise comparativa das Figuras 3.3 e 3.4 evidencia que os espectros dos materiais reticulados são praticamente coincidentes (à exceção de $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) com os espectros dos géis funcionalizados, concluindo-se que o IRG não alterou os materiais, promovendo apenas a reticulação da estrutura química tornando-a mais coesa [4,73].

3.1.2 Avaliação do teor de gel (*gel content*)

Após a produção dos filmes base, determinou-se o teor de gel de cada um para se concluir sobre o seu estado de reticulação, que influenciará outras propriedades, nomeadamente, a capacidade de absorção de água, a degradação hidrolítica e a libertação do princípio ativo a aprisionar. Um teor de gel de 100 % significa que houve uma conversão total das ligações de carbono [3-4] e que o filme está completamente reticulado.

Fatores como a quantidade de fotoiniciador utilizado e tempos de fotoreticulação influenciam os valores de teor de gel [4]. A quantidade de fotoiniciador utilizada foi 6% do número de moles de ligações duplas dos géis funcionalizados. Este valor, otimizado por Santos [4], garante uma reticulação rápida dos materiais. É de esperar que elevadas percentagens de fotoiniciador e/ou elevados tempos a radiação UV, aumentem a restrição de mobilidade das cadeias do polímero conduzindo a matrizes com estrutura mais densa e, portanto, mais compacta e menos porosa [4,85-86], apresentando, menores valores de *swelling* e de degradação hidrolítica, o que condicionará a libertação dos compostos aprisionados.

Os filmes produzidos apresentaram rendimentos de reticulação diferentes, resumidos na Tabela 3.3, podendo-se concluir que a formação de redes poliméricas foi muito eficiente [87].

Tabela 3.3 Valores de *gel content* para os filmes produzidos.

Material	AL-PEG 400 (1:1)	AL-mPET (1:2)	AL-diPET (1:2)	AL-triPET (1:2)	AL-triPET (1:3)
% <i>Gel content</i>	40,4	93,7	84,2	92,2	95,2

O filme AL-triPET (1:3) apresenta um teor de gel mais elevado que os restantes materiais, indo de encontro ao esperado, dado que na funcionalização foi adicionada maior proporção de agente funcional LAR, logo maior quantidade de ligações duplas. Já o filme AL-PEG 400 (1:1) apresenta um teor de gel muito baixo, Tabela 3.3, que afeta diretamente as propriedades

mecânicas [88] do material. Este resultado era espectável pois apesar de se utilizar a mesma quantidade de fotoiniciador, 6% IRG, e o gel funcionalizado ser exposto a radiação UV por mais 30 segundos que os restantes, neste filme foi utilizada menor quantidade de agente funcional, (1:1). Este baixo valor de teor de gel poder-se-á dever ainda à estrutura do polímero, com uma cadeia linear mais comprida [3] e menor abundância de ligações duplas [89], logo menos compacta que os restantes.

3.1.3 Capacidade de absorção de água e degradação hidrolítica em PBS

A absorção de água conduz a um aumento do volume do material que pode condicionar o seu desempenho sendo importante avaliar a capacidade de absorver. O aumento de volume depende de fatores como: a estrutura do polímero, a hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade dos grupos terminais da cadeia polimérica [90], e do estado de reticulação do material [4].

A capacidade de absorção de cada um dos filmes base foi avaliada por dois métodos: incubação em água destilada e por saturação numa solução de cobre pentahidratado. Estes testes, realizados em triplicado à temperatura ambiente até se atingir o peso máximo, forneceram valores para aplicação da Equação 2.2. Os resultados obtidos para o swelling máximo por incubação e saturação são apresentados na Figura 3.5. Uma primeira análise da Figura 3.5 revela que o teste por incubação conduziu a valores superiores para o *swelling* dos materiais, com exceção do filme AL-PEG 400 (1:1). Travassos [3] também obteve uma expressiva diferença de resultados, quando utilizou o PEG 300 como co-monomero.

Os filmes base sujeitos a avaliação, atingiram a capacidade máxima de absorção de água em tempos distintos, como era de esperar, dadas as diferentes composições e estruturas. Nos testes por incubação, os materiais foram pesados em intervalos de 10 minutos. Os filmes AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2) e AL-diPET (1:2) atingiram o swelling máximo aos 40, 50 e 90 minutos respectivamente e os filmes de AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3) atingiram o swelling máximo aos 100 minutos. Os testes por saturação, mais prolongados que os de incubação, como esperado, o swelling máximo foi atingido ao fim de 2 dias pelos filmes de AL-mPET (1:2) e AL-triPET (1:3), ao fim de 7 dias para os filmes AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:2), e ao fim de 23 dias para o filme AL-PEG 400 (1:1).

Nos testes de incubação, verificou-se que o material de AL-PEG 400 (1:1) é o mais hidrofílico e o material de AL-triPET (1:3) o mais hidrofóbico, com valores de swelling de

aproximadamente 18 e 4 % respectivamente, o que encontra justificação na hidrofiliidade da molécula de PEG [3].

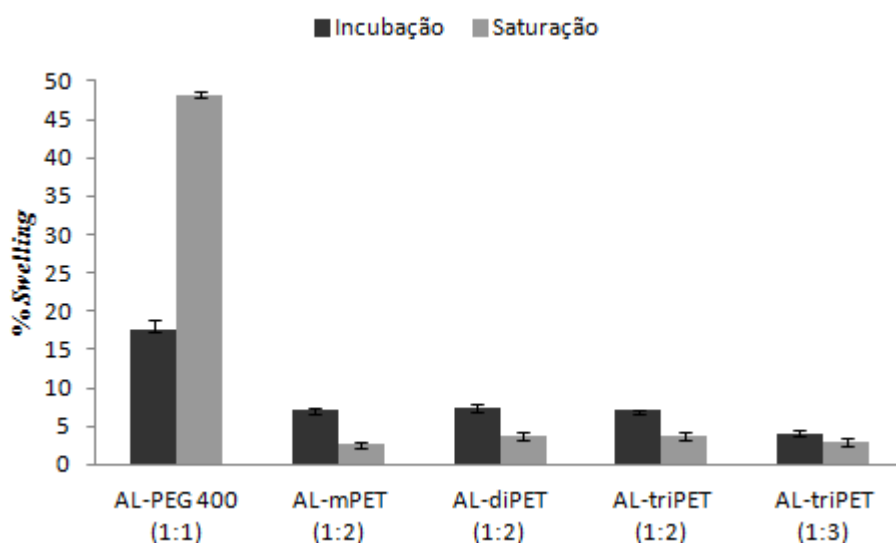


Figura 3.5 Valores de swelling (%) para os filmes produzidos: testes por incubação em água destilada e de saturação, à temperatura ambiente.

Em três dos filmes sintetizados, a proporção molar de agente de funcionalização foi a mesma (1:2) e esperava-se que o swelling dos materiais aumentasse com o peso molecular e o número de grupos hidroxilo [91] por apresentarem maior afinidade com o meio. Na Figura 3.5, observa-se um ligeiro aumento do *swelling* do filme AL-mPET (1.2) para o AL-diPET (1:2) mas há uma ligeira diminuição no filme AL-triPET (1:2), contra o esperado, ver Tabela 3.4.

Nos filmes com o co-monomero triPET foram ensaiadas diferentes proporções de agente funcionalizador e verificou-se que o aumento do LAR originou uma diminuição do *swelling*, indo de encontro ao esperado, dado uma maior reticulação, logo menor espaço livre na matriz polimérica para absorção de água [8,87].

Na avaliação da capacidade de absorção por saturação, uma vez mais, o filme AL-PEG 400 (1:1) registou uma capacidade de absorção de água muito superior aos restantes materiais, 48% em 23 dias, comprovando ser o mais hidrofílico. A estrutura da molécula também explica o resultado uma vez que o AL-PEG 400 (1:1) possui uma cadeia linear comprida em comparação com a cadeia mais curta e ramificada dos restantes materiais [3,89]. Nos testes por saturação verificou-se o comportamento reportado na literatura [91], para os filmes com a mesma proporção de LAR, o mais hidrofóbico é o AL-mPET (1:2) e o mais hidrofílico o AL-triPET (1:2), de acordo com o peso molecular e os grupos hidroxilo. Considerando ainda os

testes por saturação, tendo em atenção o aumento da proporção de LAR, observa-se uma diminuição do *swelling*, concluindo que a sua interação com os grupos OH influencia o *swelling* dos materiais [8,87].

A degradação dos materiais poliméricos é uma característica com uma grande relevância para aplicações biomédicas como sistemas de libertação controlada, permitindo condicionar as cinéticas de libertação dos agentes terapêuticos utilizados [87,89,92]. Assim, e tendo em vista o trabalho da produção de filmes para libertação de BSA, procedeu-se à avaliação da degradação dos filmes produzidos durante 6 semanas, através de incubação numa solução de PBS a 37°C. Recorrendo à Equação 2.3, calculou-se a perda de massa (%) dos filmes em intervalos de tempo estipulados, apresentando-se os resultados na Figura 3.6. No Anexo G estão também apresentados os resultados de perda de massa para cada um dos filmes, incluindo as representações logarítmicas nas linhas de tendência.

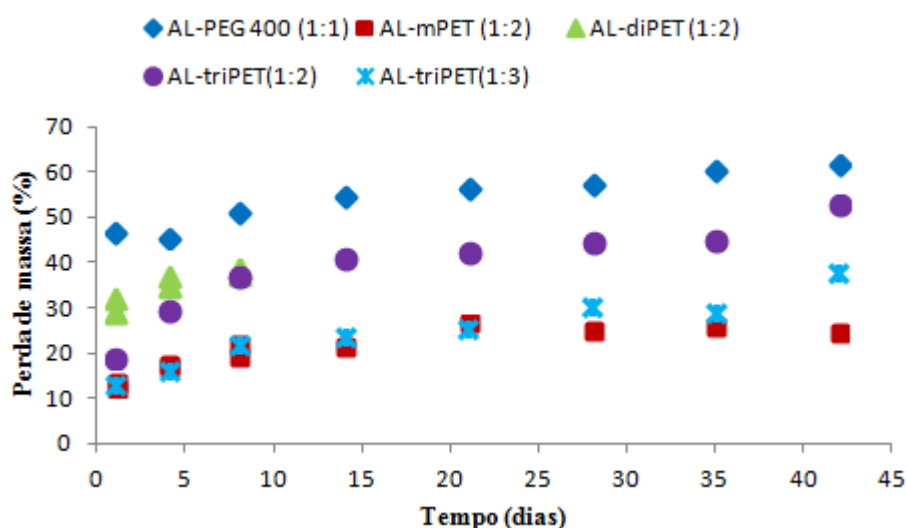


Figura 3.6 Perda de massa (%) dos filmes imersos em solução de PBS ao longo de 6 semanas a 37°C.

A degradação dos filmes, estudada ao longo de 6 semanas, ocorreu por destruição das ligações éster suscetíveis a hidrólise [9,93]. Na Figura 3.6 verifica-se que a perda de massa ocorre essencialmente nos primeiros dias e corresponde à quebra de cadeias originais do polímero em pequenos segmentos [94]. A velocidade de degradação decresce numa fase tardia devido à existência de menos ligações éster.

A perda de massa inicial, que é mais acentuada, pode dever-se à libertação para o meio, de componentes de baixo peso molecular, como monómero ou fotoiniciador, aprisionados na matriz do polímero [8,93]. Verifica-se por análise da Figura 3.6 que todos os materiais

perdem massa ao longo do tempo. No entanto conclui-se que o filme AL-PEG 400 (1:1) é o que sofre degradação mais rápida, o que está de acordo com os valores de swelling também superiores aos restantes, confirmando a relação entre estas propriedades [89]. O filme AL-mPET (1:2) exhibe a degradação mais lenta.

Relativamente aos filmes produzidos com a mesma proporção de LAR, verifica-se que o filme AL-diPET (1:2) mostra tendência para se degradar mais rápido e o AL-mPET (1:2) para se degradar mais lentamente. No entanto, seria de esperar que o AL-triPET (1:2) se degradasse mais rapidamente, dado o *swelling* mais elevado (comprovado por saturação). No Anexo G, Tabela G.1, confirma-se um maior declive para a degradação do AL-triPET (1:2) face aos outros filmes. O AL-diPET (1:2) teve uma degradação inicial muito rápida que influencia o perfil na Figura 3.6.

No que diz respeito à degradação dos filmes com o mesmo co-monomero, mas proporções diferentes de agente funcionalizador, os resultados vão de encontro ao esperado. Através da análise da Figura 3.6 e Tabela G.1, verifica-se que o filme com maior razão de LAR, AL-triPET (1:3) apresenta menor degradação que o AL-triPET (1:2), de acordo com a relação direta entre degradação e *swelling*.

Na Tabela 3.4 são resumidos os resultados de *gel content*, *swelling* e degradação nas primeiras 24h de todos os materiais produzidos verificando-se que filmes mais reticulados (maior *gel content*) apresentam menores percentagens de *swelling* e consequentemente de degradação.

A perda de massa do filme AL-PEG 400 (1:1) antecipada logo na análise visual do filme é substancialmente superior aos restantes filmes. Este material de cadeia linear longa, quando comparada com os restantes materiais (ramificados), é mais susceptível ao *swelling* e para além disso apresenta um baixo valor de teor de gel sendo degradado mais rapidamente [3]. O filme AL-triPET (1:3) apresenta maior percentagem de gel content e menor swelling, consequentemente menor degradação. Conclui-se assim, que tanto o co-monomero como a razão de agente funcional influenciam a extensão de degradação dos filmes [3].

A massa molecular dos oligómeros de estrutura ramificada, AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET, na Tabela 3.1, permite antecipar estruturas ramificadas mais compactas para os géis respectivos, todos obtidos por adição do agente de funcionalização na razão 1:2. Analisando os resultados na Tabela 3.4 correspondentes a estes filmes verifica-se que as propriedades do

filme AL-diPET não são totalmente coerentes quando comparadas com as do AL-mPET e do AL-triPET, embora o *gel content* e a capacidade de absorção de água antecipem uma maior percentagem de degradação em 24h. Por comparação dos resultados da Tabela 3.4 com os resultados obtidos por Travassos [3], respeitante ao filme AL-mPET (1:2), verifica-se que não são coincidentes no que diz respeito o *swelling*, mas o *gel content* e a degradação às 24h apresentam resultados mais próximos. Em trabalho futuro estes resultados para o filme AL-diPET (1:2) devem ser confirmados.

Tabela 3.4 Resumo das percentagens de *gel content*, *swelling* e degradação ao fim de 24h dos filmes produzidos.

Filme	% <i>Gel content</i>	% <i>Swelling</i> incubação	% <i>Swelling</i> saturação	% Degradação (24h)
AL-PEG 400 (1:1)	40,4	17,6	48,2	46,6
AL-mPET (1:2)	93,7	7,2	2,6	13,9
AL-diPET (1:2)	84,2	7,3	3,7	32,2
AL-triPET (1:2)	92,2	7,0	3,8	19,1
AL-triPET (1:3)	95,2	4,1	3,0	13,1

Na Tabela 3.4 são apenas apresentados as percentagens de degradação dos filmes ao fim de 24h porque se pretende que a administração do princípio ativo por via transdérmica não se prolongue além das 24h. Os valores de *swelling* e degradação resumidos na Tabela 3.4, permitem concluir que, à exceção do AL-PEG 400, os filmes são ligeiramente hidrofílicos e a perda de massa não é muito elevada. Assim a utilização destes filmes não deverá comprometer a aplicação eficiente como sistema transdérmico.

3.1.4 Avaliação das propriedades térmicas

Os resultados que permitem a caracterização térmica dos filmes são apresentados nesta secção. Todos os oligómeros, géis funcionalizados e respetivos filmes foram avaliados por análise termogravimétrica. A análise por calorimetria diferencial e varrimento foi efetuada apenas para os filmes reticulados.

3.1.4.1 Análise termogravimétrica (TGA)

Conforme descrito no Capítulo 2, o objetivo desta análise prende-se com o estudo e avaliação da estabilidade térmica dos materiais sintetizados: líquidos e sólidos, sujeitos a um aumento de temperatura até 600°C, através da análise dos perfis de degradação. Na Figura 3.7 são apresentados os perfis de degradação térmica dos oligómeros sintetizados.

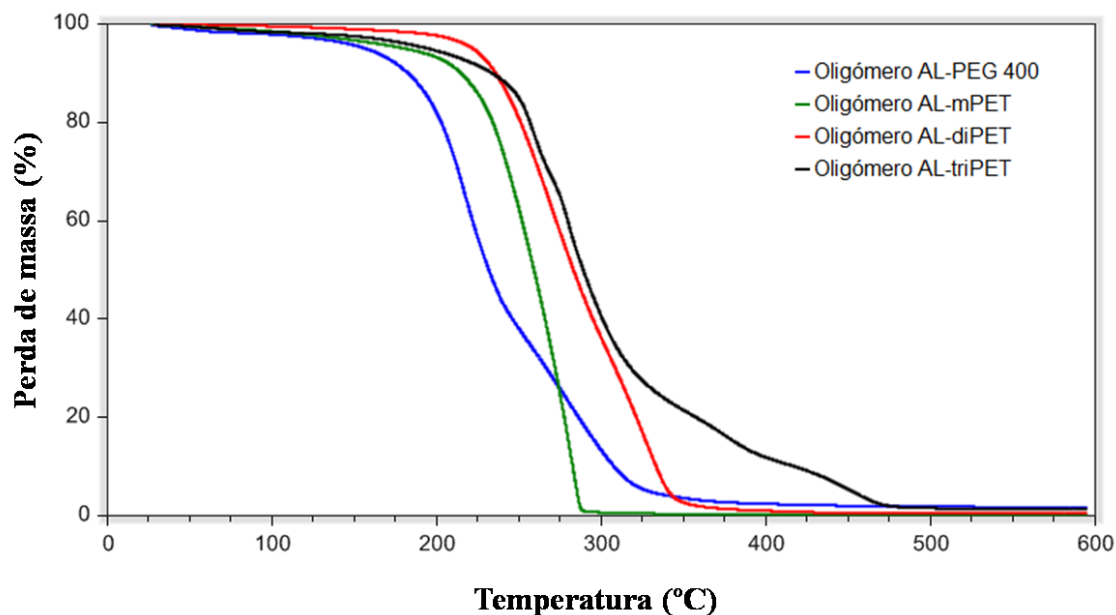


Figura 3.7 Perfil de degradação térmica dos oligómeros, obtido por análise termogravimétrica (TGA).

Até se atingir os 100°C regista-se apenas uma ligeira perda de massa que se deve à volatilização de água [93] ainda presente nos oligómeros. Este resultado sugere que a reação de síntese dos oligómeros poderá ser prolongada, garantindo a remoção total da água. Uma segunda perda de massa acentuada, começa a ocorrer às temperaturas de 178, 210, 220 e 240°C para os oligómeros de AL-PEG 400, AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET respectivamente. Estas são as temperaturas de degradação, T_d , dos materiais.

Através da análise das temperaturas de degradação podemos concluir que o oligómero de AL-PEG 400 é também o termicamente menos estável e o oligómero de AL-triPET o mais estável. Quando comparadas com a temperatura de degradação do PLA puro, 324°C [95], verifica-se que a T_d de todos os oligómeros é inferior. No entanto, e apesar de os oligómeros se apresentarem menos estáveis comparativamente ao PLA puro, este facto não foi um entrave às reações de funcionalização que decorreram a temperatura na gama 60-75°C, nem à reticulação por UV.

Com a modificação dos oligómeros sintetizados, utilizando o agente funcional LAR, esperava-se obter produtos finais termicamente mais estáveis, ou seja, com temperaturas de degradação superiores [96-97]. Contudo e pela análise dos perfis de perda de massa dos géis funcionalizados e filmes reticulados, Figura 3.8, constata-se que apenas os géis funcionalizados AL-PEG 400 (1:1) e AL-mPET (1:2) são mais estáveis que os oligómeros, e

de entre os filmes reticulados, os de AL-triPET apresentam temperaturas de degradação inferiores às do gel.

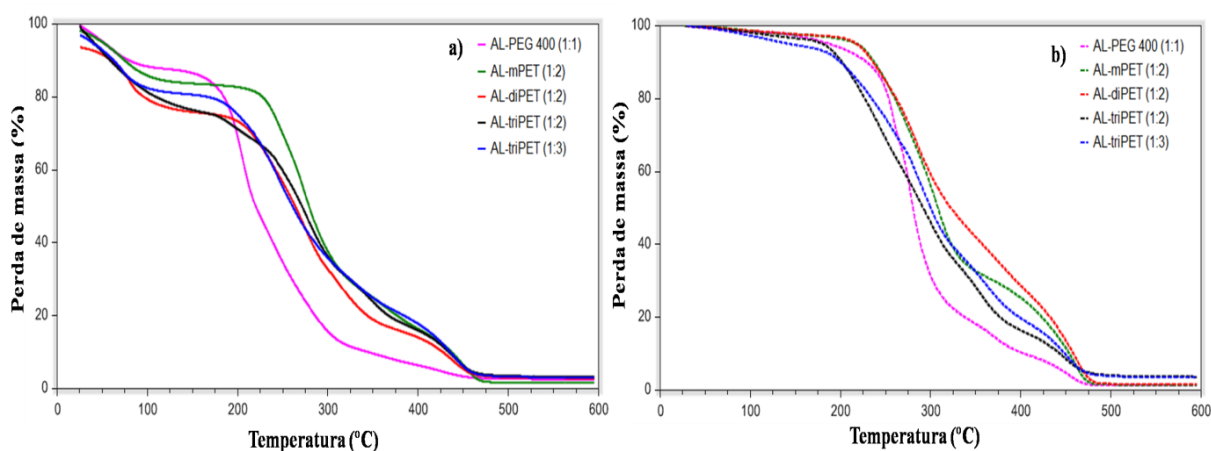


Figura 3.8 Perfis de degradação térmica: a) géis funcionalizados (estado líquido) e b) filmes reticulados.

Através do resumo das temperaturas na Tabela 3.5, e por análise da Figura 3.8 é possível detetar uma perda de massa de aproximadamente 10% nos géis funcionalizados, entre 60°C e 75°C, que pode estar relacionada com a volatilização da acetona usada como solvente [90,93], ainda presente nas amostras (temperatura de ebulição= 56°C). Nos géis funcionalizados verifica-se que a perda de massa significativa, que identifica a temperatura de degradação, corresponde às temperaturas de 181, 230, 213, 230 e 189°C, para AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2), AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3) respectivamente.

Por comparação entre os géis funcionalizados, verifica-se que o menos estável é o AL-PEG 400 (1:1) como previsto, face às propriedades já avaliadas. Relativamente aos géis com a mesma razão de LAR, o AL-diPET (1:2) exibiu temperatura de degradação mais baixa, o que vem de encontro a alguma dissonância das propriedades deste material face aos outros géis com estrutura ramificada já assinalada antes, eventualmente devido ao menor teor de gel. Verifica-se que a estabilidade aumentou com a diminuição da proporção de agente funcionalizador para o mesmo material, resultado que não era esperado.

Tabela 3.5 Temperaturas de degradação (T_d) e temperaturas de transição vítrea (T_g) para os oligómeros sintetizados, géis funcionalizados e filmes base reticulados.

Material	T_d (°C)	$T^{90\%}$ (°C)	$T^{50\%}$ (°C)	$T^{10\%}$ (°C)	T_g (°C)
Oligómeros					
AL-PEG 400	178	183	231	307	-
AL-mPET	210	213	259	282	-
AL-diPET	220	233	283	332	-
AL-triPET	240	228	289	417	-
Géis Funcionalizados					
AL-PEG 400 (1:1)	181	68	219	344	-
AL-mPET (1:2)	230	72	278	440	-
AL-diPET (1:2)	213	61	263	422	-
AL-triPET (1:2)	230	60	273	430	-
AL-triPET (1:3)	189	62	260	433	-
Filmes Base Reticulados					
AL-PEG 400 (1:1)	237	228	280	401	-33
AL-mPET (1:2)	242	234	307	451	-17
AL-diPET (1:2)	223	235	319	456	-21
AL-triPET (1:2)	193	202	292	441	-19
AL-triPET (1:3)	190	201	299	446	-22

Observando os perfis de degradação (Figura 3.8) e as $T^{90\%}$ (correspondentes a uma perda de massa de 10%) dos filmes base reticulados é possível concluir que se produziram filmes completamente secos, dadas as temperaturas elevadas a que se atingiu perda de massa de 10%. Os resultados compilados na Tabela 3.5 constataam que após a reticulação por UV os filmes AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2) e AL-diPET (1:2) se mostraram termicamente mais estáveis em comparação com o gel funcionalizado e o oligómero correspondente. Através da análise da Tabela 3.5 verifica-se ainda que o aumento da temperatura evidenciou uma maior estabilidade térmica dos materiais reticulados comparativamente aos oligómeros e géis funcionalizados.

O filme reticulado que se mostrou termicamente mais estável foi o AL-mPET (1:2) contra todas as expectativas, dado que o oligómero AL-triPET e o gel funcionalizado AL-triPET (1:2), se tinham revelado termicamente mais estáveis. Esperar-se-ia também que o material reticulado com T_d mais elevada fosse o AL-triPET (1:3), dado o seu *gel content*, antecipando as redes de ligações mais compactas. Há semelhança do que se tinha observado na análise T_d dos géis funcionalizados, nos filmes reticulados, maior razão de LAR também conduziu a menor estabilidade térmica.

Face aos resultados apresentados dos perfis de degradação térmica pode-se concluir que todos os filmes são estáveis à temperatura de 37°C, podendo ser utilizados para a aplicação pretendida.

3.1.4.2 Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Na linha de continuação de avaliação das propriedades térmicas, recorreu-se ainda à técnica de DSC com o objetivo de determinar a temperatura de transição vítrea, T_g , dos filmes base reticulados. Cada filme foi submetido a esta análise de calorimetria diferencial de varrimento no intervalo de temperatura -80°C até à respectiva T_d , de acordo com a descrição no Capítulo 2, secção 2.4.5. No Anexo H encontram-se representadas as curvas DSC de cada um dos materiais, a partir das quais foram calculadas as temperaturas de transição vítrea, T_g , compiladas na Tabela 3.5.

À temperatura de transição vítrea, T_g , ocorre a transição do material amorfo, de um estado vítreo e duro para o estado mole tipo borracha, e é uma propriedade de caracterização dos polímeros. Quanto mais elevada for a T_g de um material mais fácil será a deformação das cadeias moleculares que o constituem [98].

Apesar de não ter sido avaliada a T_g dos oligómeros, segundo Hakala [89], esta pode ser controlada através da estrutura dos co-monomeros utilizados assim como do peso molecular do oligómero final. Assim para a mesma massa molecular, os oligómeros de AL ramificados devem apresentar T_g mais baixa que os oligómeros lineares. A explicação reside na estrutura dos oligómeros ramificados, onde as cadeias em estrela reduzem a mobilidade, tornando-os mais compactos. De acordo com Hakala [89] e Marques [8], também o aumento do peso molecular dos polímeros vai conduzir a maiores valores de T_g , aumentando a cristalinidade.

A técnica DSC, foi aplicada apenas aos filmes base após reticulação, de maneira a perceber a influência do agente funcionalizador, LAR, nas propriedades dos materiais. De acordo com Silverajah [95], a adição de agente funcionalizador, que funciona como um plastificante, irá conferir maior mobilidade às cadeias do polímero, diminuindo a sua T_g . O aumento sucessivo de LAR para o mesmo material provocará também uma diminuição da T_g , reduzindo a cristalinidade [95]. Os materiais AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:2) têm as temperaturas de transição vítrea de -33, -17, -21 e -19 °C, não sendo possível comprovar-se o esperado. No que diz respeito ao oligómero AL-triPET,

funcionalizado com razões de LAR diferentes, confirma-se que o aumento de LAR conduziu à esperada diminuição da T_g .

O grau de reticulação e a degradação dos filmes podem também ser relacionados com as temperaturas de transição vítrea. Quanto maior for o grau de reticulação do filme, menor será o volume livre e mais lenta será a degradação, resultando num aumento da cristalinidade [17,87,89,98]. Isto pode ser comprovado por análise das matrizes dos filmes reticulados de AL-PEG 400 (1:1) e AL-triPET (1:3). O filme de AL-PEG 400 (1:1) apresentou um teor de gel mais baixo (40,4 %), uma velocidade de degradação mais elevada (46,6 % às 24h) e uma T_g mais baixa (-33°C), enquanto que o filme de AL-triPET (1:3) apresentou o teor de gel mais elevado (95,2 %), uma velocidade de degradação baixa (13,1 %) e uma T_g de -22 °C, indo de encontro à informação na literatura. Todos os materiais ramificados apresentam T_g muito próximas, não sendo verificadas grandes variações na utilização de diferentes co-monomeros ramificados. A T_g do AL-PEG 400 (1:1) é a mais baixa de todas, apesar de a utilização de um comonomero linear, geralmente conferir maior cristalinidade [3].

Dado que todos os filmes base reticulados produzidos apresentam T_g negativas e inferiores à temperatura do corpo humano, conclui-se que a sua utilização é possível, sem se registarem quaisquer alterações no comportamento mecânico do material.

3.1.5 Determinação das energias de superfície por medição dos ângulos de contacto

O efeito terapêutico dos princípios ativos aprisionados em sistemas transdérmicos está diretamente relacionado com a adesão dos filmes. A ineficácia na adesão do filme à pele, pode diminuir a área de contacto e afetar a absorção do princípio ativo, o que resultará em dosagens insuficientes para o paciente [99-100].

Ainda antes de aprisionar o princípio ativo nos filmes foi avaliada a energia de superfície para antecipar a eficácia de adesão. Para que os filmes produzidos adiram, a sua energia de superfície não poderá ser superior à da pele [9, 93, 99, 101]. A energia de superfície da pele não apresenta um valor fixo, podendo variar consoante as condições em que é medida, sendo a gama de valores 38-56 mN.m⁻¹ [9,91,93,99]. Na Tabela 3.6 apresentam-se os valores das energias de superfície da pele, de uma membrana simuladora da pele, Strat-M[®] Membrane, e dos filmes base reticulados, assim como as respectivas componentes dispersivas e polares.

Tabela 3.6 Valores de energia de superfície e respectivas componentes dispersivas e polares para a pele, Strat-M[®] Membrane, e filmes base reticulados.

Substrato	γ (mN.m ⁻¹)	γ_s^D (mN.m ⁻¹)	γ_s^P (mN.m ⁻¹)
Pele	38-56	-	-
Strat-M[®] Membrane	77,81 ± 19,4	53,41 ± 15,5	24,40 ± 11,5
AL-mPET (1:2)	21,86 ± 10,2	15,96 ± 8,01	5,91 ± 6,43
AL-diPET (1:2)	24,06 ± 7,59	15,12 ± 5,52	8,93 ± 5,21
AL-triPET (1:2)	25,03 ± 15,0	24,80 ± 14,9	0,23 ± 1,75
AL-triPET (1:3)	21,44 ± 10,5	16,64 ± 8,5	4,80 ± 6,24

Analisando a energia de superfície referente à Strat-M[®] Membrane, na Tabela 3.6, confirma-se que a energia de superfície é semelhante à da pele, tendo em consideração o elevado desvio padrão. As energias de superfície dos filmes produzidos apresentam valores muito próximos entre si. Face aos resultados alcançados, observa-se ainda que quando utilizada a mesma quantidade de LAR, a energia de superfície dos filmes aumentou com a massa molecular. Relativamente ao mesmo material em estudo, o aumento de LAR conduziu à diminuição da energia de superfície.

Para além das energias de superfície foram também calculadas as componentes polares e dispersivas, verificando-se para todos os filmes que a componente dispersiva é sempre superior à componente polar. O facto de as componentes dispersivas serem superiores às polares, significa que as forças de coesão são superiores às de adesão, resultando em forças intermoleculares dos filmes fortes, apresentando assim um bom desempenho mecânico [4]. No entanto, e apesar de as forças de coesão serem superiores às de adesão, os valores de energia de superfície para os filmes, também são inferiores aos das superfícies (pele e Strat-M[®] Membrane), pelo que se garante a adesão dos filmes.

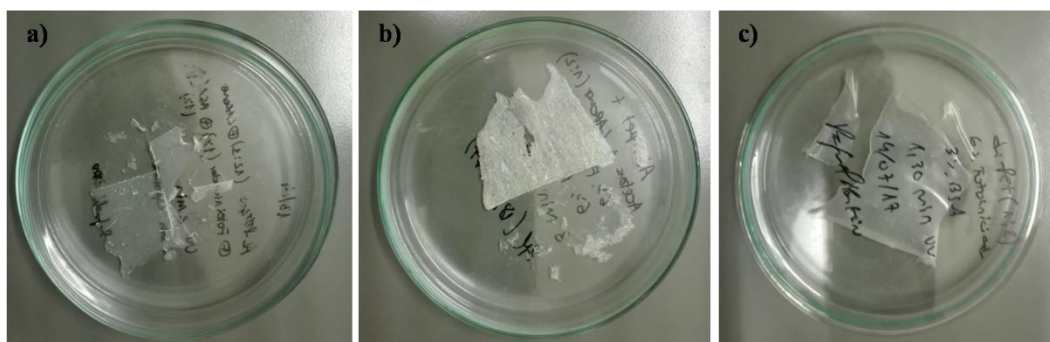
3.2 Preparação dos filmes com BSA

Na secção 2.5 do Capítulo 2, foi descrita a metodologia adotada para o desenvolvimento da solução de proteína, BSA, e o seu aprisionamento nas matrizes dos filmes produzidos. A solução de proteína, constituída apenas por água e BSA, com concentração de 0,2 g.mL⁻¹, foi produzida no momento da adição ao gel funcionalizado, evitando a sua degradação. Após a fotoreticulação, obteve-se um total de cinco filmes diferentes com BSA aprisionada, com carregamentos ativos de 1, 3 ou 6 % (m/m). Na Tabela 3.7 é apresentado o resumo das características dos novos filmes produzidos, com BSA.

Tabela 3.7 Características dos filmes com BSA: carregamentos ativos e tempos de reticulação.

Material	% IRG	% BSA	Tempo reticulação (s)	Características
AL-PEG 400 (1:1)	6	1	120	Flexível, frágil, homogêneo, transparente
AL-mPET (1:2)	6	6	90	Pouco flexível, quebradiço, heterogêneo e opaco
AL-mPET (1:2)	6	3	90	Flexível, resistente, homogêneo, transparente
AL-diPET (1:2)	6	3	90	Flexível, resistente, homogêneo, transparente
AL-triPET (1:2)	6	3	90	Flexível, resistente, homogêneo, transparente
AL-triPET (1:3)	6	3	90	Flexível, resistente, homogêneo, transparente

As matrizes com BSA, apresentaram novamente tempos de reticulação baixos, de 90 e 120 segundos. Os filmes AL-PEG 400 (1:1) com carregamento ativo de BSA de 1% apresentaram uma flexibilidade superior aos filmes base. Contudo continuam frágeis para a aplicação pretendida. Relativamente aos filmes de AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:2) e (1:3), com carregamento ativo de 3% mostraram-se uma vez mais resistentes, flexíveis e transparentes, o que simboliza uma boa homogeneidade do filme. Por último, o filme AL-mPET (1:2), com carregamento ativo de 6% revelou-se pouco flexível, quebradiço, heterogêneo e opaco, verificando-se ainda a formação de ligações na matriz, “riscos” no filme. Assim, em virtude do elevado carregamento ativo, no processo de reticulação a proteína poderá ter contribuído para este, através da eventual reação dos aminoácidos com os radicais e materiais poliméricos [87], tornando o material quebradiço e opaco. Na Figura 3.9 são apresentados alguns dos filmes com BSA produzidos.

**Figura 3.9** Filmes produzidos com aprisionamento de BSA: a) AL-PEG 400 (1:1) (1% BSA); b) AL-mPET (1:2) (6 % BSA) e c) AL-diPET (1:2) (3 % BSA).

3.2.1 Caracterização por ATR-FTIR dos filmes com BSA

Os novos filmes, com incorporação da proteína, foram submetidos a um processo de caracterização em tudo idêntico ao descrito nas secções 3.1, de modo a avaliar o sucesso da reticulação e do aprisionamento da proteína BSA. Sendo uma proteína, a BSA é composta por aminoácidos ligados por ligações amida. Este tipo de ligação apresenta até um total de 9 bandas características (A,B, e I a VII) nos espectros FTIR [102-105], caracterizando-se no entanto, essencialmente por apenas 4 bandas, conforme apresentado na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 Frequências características e modos vibracionais dos grupos amida de proteínas em análise por ATR-FTIR [102-105].

Amida	Vibração	Frequência (cm ⁻¹)
A	Elongação N-H	3500 – 3300
B	Elongação N-H	3100 – 3000
I	Elongação C=O	1700 – 1600
II	Deformação N-H e elongação C-N	1580 – 1510

Com o auxílio da Tabela 3.8, analisaram-se as Figuras 3.10 e 3.11 relativas aos espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados e dos filmes com BSA reticulados.

A análise das Figuras 3.10 e 3.11, permite confirmar nos filmes reticulados a presença das ligações da BSA consideradas. Em ambos os espectros dos filmes são identificáveis as bandas Amida A e B, características das ligações N-H (3500-3300 e 3100-3000 cm⁻¹), Amida I, característica da ligação C=O (1700–1600 cm⁻¹) e Amida II, característica das ligações N-H e C-N (1580 – 1510 cm⁻¹).

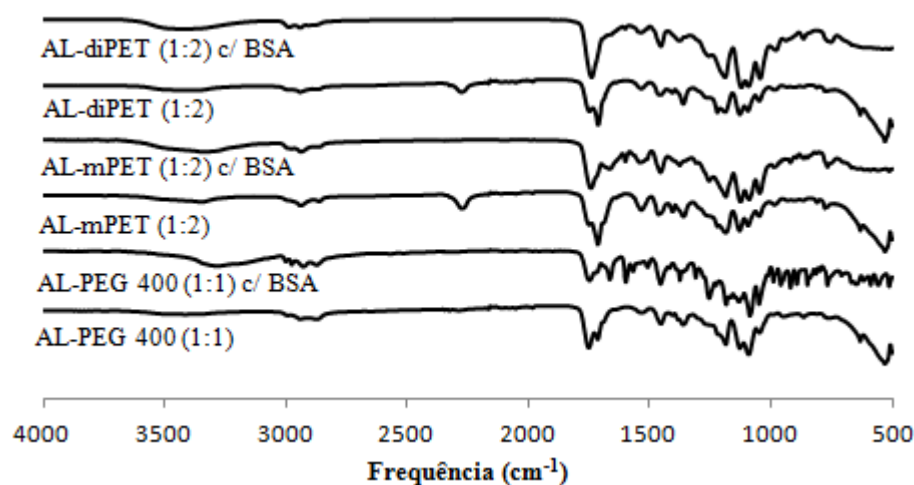


Figura 3.10 Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados e filmes com BSA: materiais AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2) e AL-diPET (1:2).

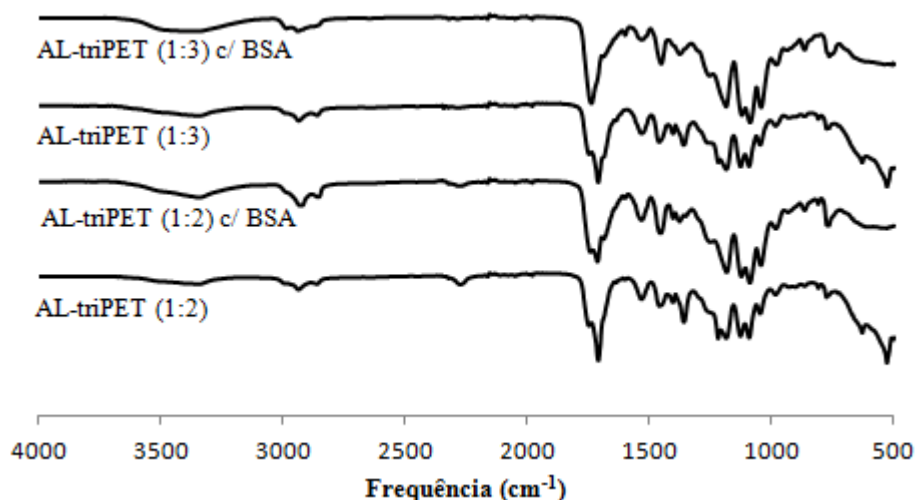


Figura 3.11 Espectros ATR-FTIR dos géis funcionalizados e filmes com BSA: materiais AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3).

O outro objetivo desta caracterização era a confirmação do processo de reticulação dos géis pelo desaparecimento da banda dos grupos isocianato e da banda de ligação C=C. No entanto, apesar de a banda característica dos grupos isocianato ter desaparecido ou ser muito suave, não é possível confirmar que o rendimento da reticulação seja elevado, uma vez que as ligações C=C são sobrepostas pela banda Amida I.

3.2.2 Propriedades térmicas dos filmes com BSA - TGA e DSC

Nesta secção pretendeu-se avaliar a influência das soluções de BSA na estabilidade térmica dos materiais produzidos. Assim, recorreu-se novamente a técnicas de análise termogravimétrica e a calorimetria diferencial de varrimento para caracterizar agora os filmes com BSA. Os perfis de degradação térmica dos filmes com BSA, obtidos por análise termogravimétrica, encontram-se representados na Figura 3.12.

Na Figura 3.12, é visível uma ligeira perda de massa, cerca de 5% até 140 °C. Esta ligeira perda de massa deverá corresponder à degradação da BSA (62°C) ou eventualmente a solvente, água e acetona, presente na matriz do filme, devido a secagem incompleta. Atendendo ainda à análise da Figura 3.12, verifica-se que ocorre perda de massa significativa dos filmes a partir de 180°C, indicativa da sua degradação a partir dos 180 °C. Esta perda de massa ocorre às temperaturas de 180, 212, 215, 212 e 196 °C para os filmes AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2), AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3), respectivamente. Os filmes analisados têm 3% (m/m) de BSA na sua composição, à exceção do AL-PEG 400 (1:1) que tem apenas 1%.

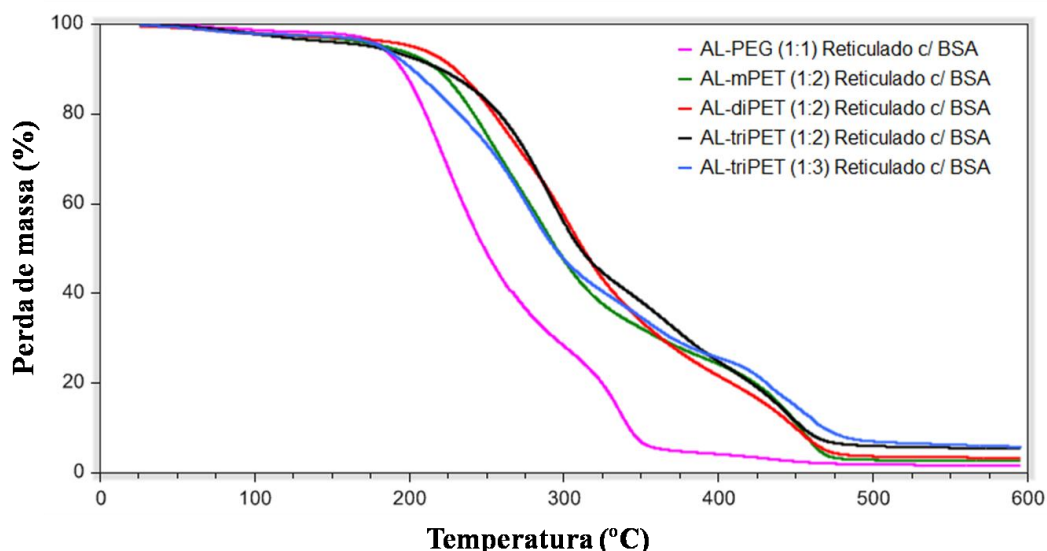


Figura 3.12 Perfis de degradação térmica dos filmes com BSA - TGA.

Na Tabela 3.9 são apresentadas as temperaturas de degradação e as temperaturas de transição vítrea dos filmes base e dos filmes com BSA, facilitando a comparação da evolução das propriedades face à presença de proteína.

Os resultados na Tabela 3.9 permitem concluir que, de modo geral, os filmes com BSA apresentam menor estabilidade térmica em comparação com os filmes base, com a exceção dos filmes AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3) que apresentaram maior estabilidade térmica. Esta diminuição das temperaturas de degradação relativamente aos filmes base já era esperada na sequência da adição da solução de BSA que é termicamente pouco estável. Os resultados confirmam a estabilidade térmica dos filmes com BSA, a 37°C.

Tabela 3.9 Temperaturas de degradação (T_d) e temperaturas de transição vítrea (T_g) para os filmes, base e com BSA.

Material	T_d (°C)	$T^{90\%}$ (°C)	$T^{50\%}$ (°C)	$T^{10\%}$ (°C)	T_g (°C)
Filmes Base					
AL-PEG 400 (1:1)	237	228	280	401	-33
AL-mPET (1:2)	242	234	307	451	-17
AL-diPET (1:2)	223	235	319	456	-21
AL-triPET (1:2)	193	202	292	441	-19
AL-triPET (1:3)	190	201	299	446	-22
Filmes com BSA					
AL-PEG 400 (1:1)	180	195	248	342	-37
AL-mPET (1:2)	212	215	294	451	-19
AL-diPET (1:2)	215	227	311	449	-14
AL-triPET (1:2)	212	210	309	452	-15
AL-triPET (1:3)	196	200	292	463	-15

Para se aferir sobre a influência da solução de proteína na cristalinidade dos materiais, todos os filmes com proteína foram analisados por DSC. No Anexo H encontram-se representadas as curvas DSC para cada um dos filmes, assim como as temperaturas T_g , compiladas na Tabela 3.9.

Por comparação dos valores das temperaturas de transição vítrea dos filmes com BSA relativamente aos filmes base, verifica-se que para os filmes AL-PEG 400 (1:1) e AL-mPET (1:2), a temperatura diminui, embora não de modo significativo, o que corresponderá a uma redução da cristalinidade, enquanto que nos restantes filmes a cristalinidade aumenta. Dadas as alterações mínimas na T_g , pode-se considerar que os filmes com proteína apresentam características semelhantes às dos filmes sem proteína.

3.2.3 Estudos de libertação da BSA *in vitro*

Após a produção dos filmes com BSA foi necessário avaliar a potencialidade enquanto sistemas de libertação controlada, através do estudo da libertação da proteína *in vitro* por incubação e em célula de difusão de Franz, ao longo de 8h. O procedimento experimental adotado foi descrito nas secções 2.6.1 e 2.6.2, e foi realizado para os filmes que continham BSA mas também para os filmes sem proteína. O objetivo dos ensaios *in vitro* dos filmes base foi a medição da absorvância da solução de PBS resultante ao longo do ensaio que será designado por “branco”. Pretende-se assim conhecer a contribuição de outros compostos participantes na composição da matriz que possam ser libertados e deduzir esta parcela na avaliação da proteína libertada dos filmes com BSA. As amostras do meio coletor, em contacto com os filmes nos ensaios de libertação, com e sem BSA, recolhidas ao longo de 8 horas foram analisadas por espectrofotometria para quantificação da BSA. Recorrendo às Equações 2.4 a 2.10, calcularam-se os perfis de libertação cumulativa de BSA ao longo do tempo, representados na Figura 3.13.

Pela análise dos perfis de libertação de todos os filmes, verifica-se, de modo geral, que ocorreu uma libertação acentuada nas primeiras horas, *initial burst release*, e que ao fim de 8 horas a libertação continuava a ocorrer.

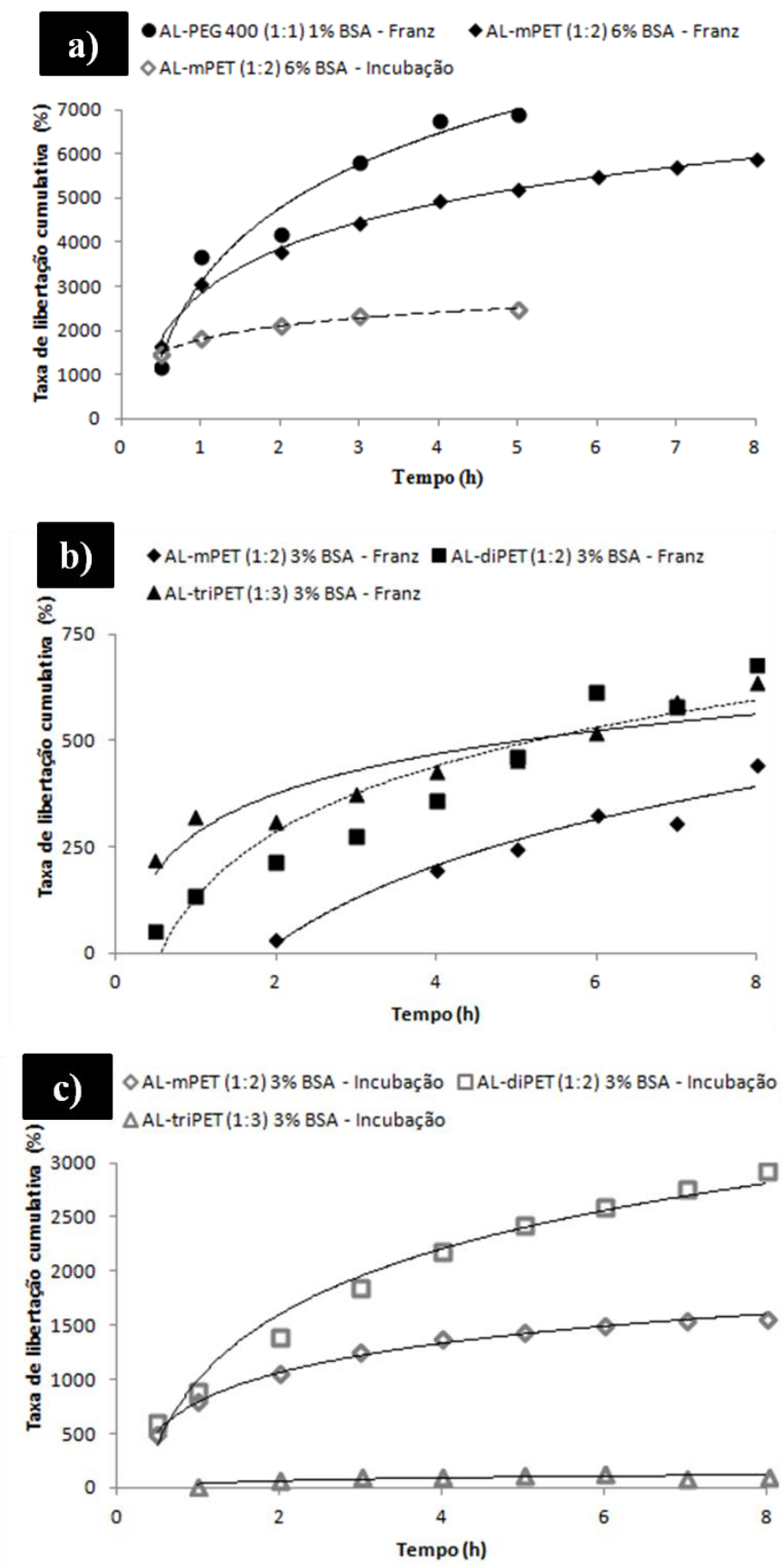


Figura 3.13 Perfis de libertação da BSA *in vitro*: testes por incubação e em célula de Franz, a) filme AL-PEG 400 (1:1) com 1% BSA e AL-mPET (1:2) com 6 % BSA; b) em célula de difusão de Franz e c) por incubação, dos filmes AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2) e AL-triPET (1:3), com 3% de BSA. Temperatura de 37°C; meio coletor de solução PBS 0,01 M, pH 7,4; Absorvâncias medidas a 278 nm.

Na Figura 3.13 a) agregaram-se os resultados de libertação de filmes em que se empregou os valores limite da concentração de BSA – 1 e 6% (m/m). Embora a evolução da concentração de BSA no meio coletor siga o perfil esperado em todos os ensaios, não é possível explicar os valores de libertação atingidos, superiores a 100%, e nem sempre todas as posições relativas das curvas. O filme AL-PEG 400 (1:1), com uma concentração teórica de BSA de 1% (m/m) libertou uma percentagem de BSA superior ao filme AL-mPET (1:2). Este resultado vai de encontro às propriedades físicas do filme AL-PEG 400 que antecipavam uma degradação mais rápida que contribuirá para uma velocidade de libertação superior à do filme AL-mPET (1:2). A comparação dos perfis de libertação da proteína do filme AL-mPET (1:2) pelas técnicas de incubação e na célula de Franz mostra resultados não esperados face à superfície de contacto dos filmes com a solução de PBS que levará a uma maior libertação nos ensaios *in vitro*, por incubação. Foram testadas duas técnicas de quantificação da BSA em solução de PBS, Anexo E, com boas curvas de calibração, confirmadas também em dois espectrofotómetros diferentes. No entanto a quantificação da libertação da proteína excedeu sempre a quantidade aprisionada em todos os ensaios e suas réplicas.

Nos testes de libertação de BSA dos filmes em que se utilizou um carregamento de 3%, observa-se que os testes em célula de difusão de Franz, Figura 3.13 b), conduziram a valores de libertação de BSA inferiores aos medidos por incubação, Figura 3.13 c), como antecipado devido à menor área de contacto com a solução PBS [3]. O filme AL-triPET (1:3) foi uma exceção, apresentando valores de libertação em célula de difusão de Franz superiores aos valores de incubação.

Comparando apenas os resultados relativos às células de difusão de Franz, Figuras 3.13 a) e b), verifica-se que a maior libertação de proteína ocorreu no filme AL-PEG 400 (1:1). De acordo com a Tabela 3.4 e dado que o filme AL-PEG 400 (1:1) apresenta maior capacidade de absorção de água e uma taxa de degradação mais rápida, irá permitir uma libertação mais rápida de proteína. De entre os filmes com carregamento teórico de 3% de BSA, ao fim de 8 horas, o filme AL-diPET (1:2) foi o que apresentou maior libertação, em virtude da maior hidrofiliabilidade do material e maior taxa de degradação, já referidas e registadas na Tabela 3.4. No entanto é de salientar que os testes de libertação em célula de Franz do filme AL-triPET (1:3) conduzem a resultados muito semelhantes ao filme AL-diPET (1:2), que não são confirmados na Figura 3.13 c) (testes de incubação).

Ainda através de comparação dos diferentes carregamentos ativos, porém para o mesmo filme, AL-mPET (1:2), Figuras 3.13 a) e b), verifica-se que a liberação aumenta com a quantidade de proteína carregada no filme.

Os resultados dos testes de liberação por incubação, Figura 3.13 c), conduziram a valores superiores de liberação de proteína que podem ser parcialmente explicados por maiores áreas de transferência de massa. O filme AL-diPET (1:2) confirmou a maior liberação para o mesmo carregamento ativo, sendo surpreendente o resultado obtido com o AL-triPET (1:3). Por outro lado, analisando-se os perfis de liberação para o filme AL-mPET (1:2) com carregamentos ativos de 3 e 6%, confirma-se nos ensaios por incubação, que a liberação foi superior no filme com maior quantidade de proteína.

As curvas de ajuste dos perfis de liberação de BSA, Tabela 3.10, permitem comparar a cinética de liberação de casa material, a que corresponde a tendência esperada.

Tabela 3.10 Equação do perfil de liberação e coeficiente de determinação, para as liberações por célula de difusão de Franz e por incubação, dos filmes com BSA reticulados.

Material	Célula de Franz		Incubação	
	Equação perfil	R ²	Equação perfil	R ²
AL-PEG 400 (1:1) 1% BSA	$Y = 2438 \ln(x) + 3077$	0,964	-	-
AL-mPET (1:2) 6% BSA	$Y = 1481 \ln(x) + 2821$	0,994	$Y = 442,3 \ln(x) + 1792$	0,992
AL-mPET (1:2) 3% BSA	$Y = 267,2 \ln(x) - 164,5$	0,938	$Y = 392 \ln(x) + 788,7$	0,993
AL-diPET (1:2) 3 % BSA	$Y = 223,3 \ln(x) + 129,8$	0,892	$Y = 874,2 \ln(x) + 991,9$	0,977
AL-triPET (1:3) 3% BSA	$Y = 134,9 \ln(x) + 280,5$	0,862	$Y = 40,32 \ln(x) + 34,04$	0,726

No entanto os valores de liberação são muito elevados evidenciando que outros compostos poderão estar a interferir na análise da liberação, obtendo-se percentagens de liberação superiores à BSA aprisionada. Apesar de os ensaios já terem sido repetidos espera-se que venha a ser encontrada uma solução.

No estudo de liberação por célula de difusão de Franz pode vir a ser utilizada a Strat-M[®] Membrane, mimetizando a pele, que conduzirá a resultados comparáveis aos de liberação transdérmica.

3.3 Estudos de avaliação da degradação da proteína

A BSA, sendo uma proteína, é muito sensível pelo que pode sofrer degradação quando sujeita a vários fatores, conforme referido no Capítulo 1, secção 1.3.1. Para confirmar esta informação no caso da BSA, e conhecendo as condições e os meios a que será sujeita durante o processo realizou-se uma avaliação preliminar. Preparou-se uma solução de BSA em PBS, com concentração $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, que foi sujeita a diferentes tratamentos: adição de acetona (solvente no processo de produção), aquecimento até 50°C , radiação UV durante um máximo de 5 minutos e alteração do pH. A concentração de BSA nas soluções após estes tratamentos foi confirmada por medição das absorvâncias no espectrofotómetro. Na Tabela 3.11 são apresentados os valores das absorvâncias medidas a 278 nm, para a solução de referência e para as soluções de BSA sujeitas as várias condicionantes.

Tabela 3.11 Avaliação da degradação da solução de BSA sujeita a vários fatores.

Referência: solução “mãe” de BSA em PBS (2 mg.mL^{-1})			
Absorvância	$1,34 \pm 0,02$		
Concentração (mg.mL^{-1})	$2,35 \pm 0,03$		
Solvente orgânico: acetona			
Absorvância	$1,01 \pm 0,01$		
Concentração (mg.mL^{-1})	$1,78 \pm 0,01$		
Aquecimento a 50°C			
Tempo (min)	1	3	5
Absorvância	1,36	1,39	1,38
Concentração (mg.mL^{-1})	2,39	2,44	2,42
Radiação UV			
Tempo (min)	2,5	5	
Absorvância	1,36	1,38	
Concentração (mg.mL^{-1})	2,39	2,42	
Mudança de pH ($\text{pH}_{\text{inicial}} 6,9$)			
pH_{final}	0,94	0,53	
Absorvância	$0,85 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,01$	
Concentração (mg.mL^{-1})	$1,50 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,01$	

Analisando as absorvâncias e concentrações da solução resultante da adição do solvente orgânico, acetona, à solução de BSA (branco PBS: acetona), presentes na Tabela 3.11, verifica-se que são inferiores às da solução mãe. A diminuição verificada poderá ser sinónimo da desnaturação, dado que, de acordo com Jansen [87] os solventes orgânicos podem levar a desnaturação das proteínas.

O aumento da temperatura das soluções de proteína acima dos 30°C pode causar a sua desnaturação [106]. No entanto, dado que a temperatura crítica para a BSA é cerca de 50°C

[107], avaliaram-se as absorvâncias da solução de BSA depois de sujeita a esta temperatura por períodos de 1, 3 e 5 minutos. Prevê-se que não tenha ocorrido desnaturação, uma vez que as alterações registadas no valor das absorvâncias e concentrações não foram muito significativas. Contudo, de acordo com Moriyama [107], a BSA a 25°C tem cerca de 66% de conteúdo helicoidal, e quando submetida à temperatura de 45-50 °C, diminui para 62%. Esta diminuição do conteúdo helicoidal deve-se à quebra de α -hélices, formando-se folhas- β com a mudança estrutural na proteína [106].

Segundo Jansen [87], os radicais livres presentes na formação de redes poliméricas fotoreticulados, podem sofrer reações secundárias com as proteínas, provocando a desnaturação destas. Para evitar a reação entre os radicais livres e as proteínas deve-se minimizar o tempo de exposição da proteína a radiação UV ou aumentar a concentração de ligações duplas para que ocorra reação com os radicais [87]. Com base nesta informação, e apesar de os filmes produzidos serem submetidos à radiação UV num máximo de 2 minutos, submetem-se soluções de BSA a radiação UV durante 2,5 e 5 minutos. Com base nas absorvâncias finais registadas e por comparação com as de referência, verifica-se uma ligeira subida de absorvância não sendo, no entanto, significativo. Assim, é possível concluir que a BSA não se degrada quando sujeita a radiação UV até pelo menos 5 minutos, no entanto, não é possível aferir se a exposição dos filmes com BSA a UV afeta o seu desempenho, uma vez que a solução de BSA submetida a UV não está na presença de radicais livres.

Estudos conduzidos por Li [108] afirmam que a diminuição no pH da solução de BSA de 7 para 3 provoca o desdobramento da molécula, diminuindo o conteúdo helicoidal (α -hélice), aumentando conseqüentemente o conteúdo de folhas- β . Esta mudança no pH provoca um aumento do peso molecular da BSA em virtude da agregação da proteína, podendo mesmo formar agregados insolúveis que confirmem a estabilidade da BSA [87,108-109]. Deste modo, analisaram-se as soluções de BSA após a adição de 2,5 e 5 mL de HCl, com concentração 0,5 M, registando-se as absorvâncias e pH inicial e final das soluções. Através dos resultados na Tabela 3.11, verifica-se que o decréscimo do pH foi acompanhado pela diminuição da absorvância e concentração das soluções, tanto mais acentuado quanto mais baixo o pH. Quando ocorre a agregação ou desnaturação da proteína BSA, os aminoácidos acídicos escondem-se no seu interior enquanto os aminoácidos básicos ficam expostos à solução [108], originando a diminuição das absorvâncias e concentrações.

CAPÍTULO 4

Conclusões

4. CONCLUSÕES

4.1 Conclusão geral

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes poliméricos com vista à sua utilização em sistemas transdérmicos para libertação controlada da proteína BSA. A produção dos filmes iniciou-se com a síntese de oligómeros de ácido lático por policondensação direta, sem utilização de solventes ou catalisadores. Através de metodologias já estabelecidas sintetizaram-se oligómeros lineares (AL-PEG 400) e ramificados (AL-mPET, AL-diPET e AL-triPET) com grupos hidroxilo terminais. Os oligómeros foram funcionalizados com Laromer[®] LR 9000 que introduziu ligações de carbono duplas fundamentais para a reticulação. A proteína selecionada, a BSA, foi adicionada aos géis funcionalizados, após diluição em água. Após adição de um iniciador os géis foram fotopolimerizados por ação da radiação UV, produzindo-se filmes flexíveis, resistentes e transparentes.

A parte inicial do trabalho centrou-se na verificação da síntese de adesivos de base ácido lático, já testada por Travassos [3], utilizando como co-monómeros o PEG 400 e o mPET. Alargando o leque de co-monómeros ao diPET e triPET pretendeu-se aumentar a massa molecular dos oligómeros. Na etapa de funcionalização dos oligómeros com LAR foram testadas várias razões estequiométricas oligómero: LAR tendo por objetivo produzir filmes flexíveis e resistentes e trabalhar as suas propriedades em função desta proporção. A adição do LAR permitiu a produção de géis funcionalizados AL-PEG 400 (1:1), AL-mPET (1:2), AL-diPET (1:2), AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3), aos quais foi adicionado o fotoiniciador biocompatível IRG, seguindo-se a reticulação por irradiação UV durante 90 segundos para o material de AL-PEG 400 (1:1) e 60 segundos para os restantes. A análise ATR-FTIR permitiu acompanhar o progresso e verificar qual o tempo ótimo, das reações de síntese dos oligómeros e funcionalização, bem como da reticulação dos filmes.

Os materiais produzidos foram caracterizados, com a finalidade de se avaliarem o seu potencial enquanto sistemas transdérmicos para administração de BSA. O *gel content* que é indicativo do grau de reticulação do filme e por isso influencia diretamente as restantes propriedades foi 40 % para o AL-PEG 400 (1:1) e na gama de 84-95 % para os filmes correspondentes aos outros co-monómeros.

A capacidade de absorção de água destes filmes base foi avaliada por duas técnicas que conduziram a resultados bem distintos. Contudo, todos revelaram comportamentos ligeiramente hidrofílicos. Nos testes de incubação obtiveram-se valores de *swelling* de 4-18 %, enquanto com a técnica de saturação se registou *swelling* de 3 a 48%. A diferença foi registada em todos os filmes, sendo no entanto mais acentuada para o filme AL-PEG 400 (1:1). Estes filmes apresentam maior hidrofiliçidade em virtude da estrutura linear do oligómero utilizado que se refletiu no teor de gel determinado e também numa maior capacidade de absorção de água. Este estudo permitiu ainda verificar a influência da proporção de LAR utilizado concluindo-se que, quanto maior a quantidade de agente funcionalizador maior o *gel content* e menor o *swelling*.

A degradação dos filmes base produzidos foi avaliada por incubação em PBS ao longo de 6 semanas. Os filmes apresentaram perdas de massa de 13-62 %, de acordo com o comonomero e quantidade de LAR utilizada, revelando ser hidroliticamente instáveis sobretudo nos primeiros oito dias. Verificou-se que a velocidade de degradação dos filmes, aumenta com o aumento da hidrofiliçidade e diminuição do *gel content*. Relativamente à influência da quantidade de LAR utilizada na produção dos filmes AL-triPET (1:2) e AL-triPET (1:3), confirmou-se que uma maior quantidade de agente funcionalizador origina filmes com menor perda de massa. Apesar de os valores de degradação obtidos ao fim de 24h serem relativamente elevados, 13-42 %, a aplicação destes filmes enquanto sistemas transdérmicos não será comprometida, uma vez que permitem a libertação do princípio ativo sem comprometer o seu desempenho e a remoção do sistema transdérmico após a libertação.

A análise termogravimétrica permitiu a avaliação da estabilidade térmica de todos os materiais produzidos, quando sujeitos a um aumento de temperatura. De entre os oligómeros, o AL-triPET foi o que se revelou termicamente mais estável. A adição do agente de funcionalização aumentou a estabilidade térmica apenas do AL-PEG 400 (1:1) e do AL-mPET (1:2) o que não estava previsto. Todavia, o processo de reticulação permitiu aumentar a estabilidade térmica dos materiais, com exceção dos filmes AL-triPET. A análise de DSC permitiu determinar as temperaturas de transição vítrea dos filmes verificando-se serem todas inferiores à temperatura fisiológica como necessário para a aplicação pretendida.

Para esta aplicação é também fundamental avaliar a adesão dos filmes à pele através da medição de energias de superfície, componentes dispersivas e polares. Uma vez que, as energias de superfície dos filmes base foram inferiores à energia de superfície da pele,

excetuando o filme AL-PEG 400 não avaliado, e as componentes dispersivas calculadas foram superiores às da componentes polares, o que permite antever a um bom desempenho mecânico e uma boa adesão à pele.

Uma vez os materiais base caracterizados e confirmado, o trabalho avançou para a produção de filmes com proteína e sua caracterização. As soluções de BSA, constituídas apenas por água e proteína, foram produzidas no momento da adição ao gel funcionalizado, de modo a evitar a possível degradação da proteína. Todas as outras etapas do processo, e a sua sequência, não sofreram alteração. A quantidade de solução de BSA adicionada foi calculada de modo a conduzir a carregamentos ativos de 1, 3 e 6% (m/m). De modo geral, a adição da solução de BSA não alterou as propriedades dos filmes produzidos, mantendo-se resistentes, flexíveis e transparentes, com a exceção dos filmes AL-PEG 400 (1:1) e AL-mPET (1:2) com 1 e 6 % de BSA, respetivamente. A adição da solução de BSA ao material de AL-PEG 400 (1:1) conferiu-lhe maior flexibilidade, continuando no entanto frágil para a aplicação pretendida. A adição de BSA com um carregamento ativo de 6% ao material de AL-mPET (1:2), tornou-o pouco flexível, quebradiço e opaco, sendo deste modo excluído para a aplicação como um sistema transdérmico. Relativamente aos tempos de cura, os filmes com BSA apresentaram uma vez mais tempos de reticulação baixos mas superiores aos filmes base: 120 segundos para o material de AL-PEG 400 (1:1) e 90 segundos para os restantes.

Estes novos filmes com aprisionamento de BSA, de modo geral, apresentaram T_d inferiores às dos filmes base, o que se justifica face à adição de água e BSA, com temperaturas de degradação inferiores. De acordo com a temperatura de degradação, conclui-se que os filmes com BSA são termicamente estáveis à temperatura fisiológica.

Para avaliar a capacidade dos filmes produzidos enquanto sistemas transdérmicos para administração de BSA, estudou-se a libertação *in vitro* pelo método de incubação e recorrendo a uma célula de difusão de Franz durante 8 horas. Embora a evolução da concentração de BSA siga o perfil esperado para todos os materiais, não é possível explicar os valores de libertação atingidos (superiores a 100%). Os perfis de libertação revelaram para todos os filmes, uma libertação acentuada nas primeiras horas, *initial burst release*, com exceção do filme AL-triPET (1:2) no qual a libertação não foi bem-sucedida. A libertação de BSA testada em célula de difusão de Franz foi inferior à dos testes por incubação, o que pode encontrar justificação na menor área de contacto com a solução de PBS. Nos ensaios de libertação em célula de Franz, a percentagem de libertação cumulativa foi maior para o filme

AL-PEG 400 (1:1) e menor para o filme AL-mPET (1:2), referentes a carregamentos ativos diferentes de 1 e 3% respectivamente. Para o mesmo carregamento ativo, o filme AL-diPET (1:2) foi o que apresentou maior percentagem de libertação de acordo com uma superior capacidade de absorção de água e taxa de degradação. Para o mesmo filme com carregamentos ativos diferentes, de 3 e 6%, conclui-se que, quanto maior a quantidade de proteína aprisionada maior será a percentagem libertada. Apesar de os perfis de libertação seguirem uma tendência logarítmica, os valores de libertação são muito elevados, o que evidencia que outros compostos poderão estar a interferir na análise da libertação, obtendo-se percentagens de libertação superiores à BSA aprisionada.

Finalmente, a BSA foi submetida a diferentes meios para avaliar a possibilidade de degradação. A adição de acetona, como solvente orgânico à solução aquosa de proteína originou uma diminuição da absorvância medida podendo corresponder a desnaturação. O aquecimento da solução até 50°C e a exposição a radiação UV durante 5 minutos não produziu variações muito significativas. O resultado foi muito diferente quando a solução de BSA foi sujeita a diminuição do pH: a absorvância da solução reduziu para cerca de metade, comparativamente à solução de BSA de referência, comprovando que a BSA desnaturou.

Os resultados obtidos na caracterização dos filmes produzidos de base ácido lático para administração de BSA são encorajadores embora haja um longo caminho a percorrer. No entanto, é fundamental realizar mais testes aos materiais produzidos, nomeadamente confirmando os perfis e percentagens de libertação acumulada de BSA. A avaliação da atividade antibacteriana, da biocompatibilidade assim como o estudo mais aprofundado do comportamento da proteína nos materiais poliméricos devem ser levadas a cabo. Fazendo um balanço dos resultados obtidos o filme que apresentou o melhor desempenho, sendo o mais promissor para a administração transdérmica da BSA, foi o filme AL-diPET (1:2).

4.2 Principais contribuições

Este trabalho pretendeu dar um importante contributo para a síntese e caracterização de filmes que possam ganhar lugar de destaque no mercado dos sistemas transdérmicos para administração controlada de proteínas.

1. Revisão bibliográfica: com base no levantamento de estudos de desenvolvimento de copolímeros e novos materiais com ácido lático, centrou-se no aprisionamento e libertação de proteínas a partir desses materiais e a sua aplicação a sistemas

transdérmicos. A compilação das estratégias de produção adotadas e resultados alcançados permitiu direcionar o leitor para a consulta mais detalhada de alguns trabalhos.

2. Síntese e caracterização de filmes de base ácido lático: a reprodução de estudos anteriores permitiu consolidar os resultados obtidos. As estratégias de produção de oligómeros desenvolvidas levaram à síntese de novos oligómeros e conseqüentemente a produção de novos filmes promissores nas áreas da medicina, farmacêutica e biomédica.
3. Avaliação da degradação da BSA: a proteína de BSA tem sido alvo de estudo intenso, uma vez que é muito instável e que pode ser muito facilmente degradada quando sujeita a alterações do meio. No trabalho de base desenvolvida adquiriu-se informação preliminar sobre o comportamento da BSA face à adição de um solvente orgânico, à exposição a temperatura de 50°C e à radiação UV bem como à diminuição do pH. Os resultados obtidos permitiram confirmar os estudos realizados por outros autores.
4. Revolução do mercado: Até ao momento não há conhecimento de nenhuma proteína disponível para administração transdérmica. A utilização do AL e de outros comonomeros para a produção de filmes por fotopolimerização e libertação de BSA, pode vir a revolucionar o mercado dos sistemas transdérmicos. Este estudo foi uma primeira contribuição nesse domínio e poderá ser alargado a outras proteínas ou princípios ativos.

4.3 Perspectivas futuras

Face aos resultados obtidos neste estudo, recomendam-se estratégias de investigação a desenvolver no futuro, para solucionar alguns problemas identificados.

1. **Otimização dos protocolos de síntese dos oligómeros e sua funcionalização**: otimização da temperatura na síntese dos oligómeros e reações de funcionalização, aumentando o tempo da reação; testar novas proporções oligómero: LAR, em especial com o oligómero AL-PEG 400, procurando obter teores de gel próximos de 100% e melhores propriedades físicas, químicas e mecânicas.

2. **Caracterização por cromatografia permeação gel (GPC):** através desta técnica é possível a análise e caracterização da distribuição dos pesos moleculares dos polímeros.
3. **Caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN):** permite a verificação e confirmação dos resultados obtidos através de ATR-FTIR, por absorção e reemissão da radiação eletromagnética, nomeadamente a identificação das estruturas químicas através da análise dos picos característicos dos grupos químicos.
4. **Repetição dos testes de degradação hidrolítica dos filmes em PBS:** no caso dos filmes AL-diPET (1:2) os valores de degradação do primeiro teste não foram concordantes e não apresentavam um perfil logarítmico. De modo a garantir e assegurar a reprodutibilidade dos resultados, é fundamental repetir os testes de degradação para este filme, em duplicado, ao longo de 6 semanas.
5. **Avaliação das propriedades mecânicas:** através de testes de alongação dos filmes.
6. **Confirmação dos testes de adesão dos filmes:** repetição dos testes de medição energias de superfície para os filmes base e primeira medição das energias de superfície para os filmes com BSA. Testar também a adesão dos filmes, base e com proteína, em folhas de gelatina simulando a pele.
7. **Testes de biocompatibilidade *in vitro*:** através da interação dos filmes produzidos com os tecidos vivos (pele) verificar se é gerada resposta inflamatória ou imunológica. Os testes a realizar envolvem a avaliação da sensibilização e irritação dérmica (em orelhas de rato, pelo aumento do inchaço e no dorso de coelhos verificando formação de edema ou eritema, respectivamente). Avaliação da atividade antibacteriana (cultura de estirpes de microrganismos distintos). Avaliação da citotoxicidade (estudo da viabilidade celular de fibroblastos humanos).
8. **Estudos de degradação da BSA em PBS quantificados por espectrofotometria:** testar outros solventes orgânicos (éter por exemplo) compatíveis com o oligómero, LAR e fotoiniciador; testar a influência do aumento do pH do meio na degradação da BSA.
9. **Avaliação do grau de desnaturação da BSA:** estudos de dicroísmo circular (CD) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitem examinar e analisar a conformação das estruturas secundária e terciária das proteínas em solução, nomeadamente o desdobramento e a descrição da forma geral da proteína. O método ELISA também pode ser utilizado para avaliar a desnaturação da BSA e reversibilidade do processo, uma vez que permite a deteção das proteínas por ligação a anticorpos.

10. **Quantificação da BSA por HPLC:** elaboração da curva de calibração e medição das libertações de BSA dos filmes.
11. **Otimização dos estudos de libertação da BSA e exploração de outras aplicações:** realização de novos testes de libertação até se obterem perfis de libertação adequados com boas percentagens de libertação, com ou sem utilização da Strat-M[®] Membrane que mimetiza a pele na libertação em célula de difusão de Franz. Os filmes produzidos, enquanto sistemas transdérmicos, podem ser alargados às práticas desportivas de *endurance* muito exigentes e por vezes em condições ambientais extremas, como os casos do ciclismo ou dos ultra-trails. Nesta vertente, será fundamental que o sistema transdérmico seja capaz de libertar uma combinação de grandes quantidades de glícidos (frutose, maltose ou glucose), sais minerais (essencialmente sódio) e proteína de elevada absorção, garantindo a performance do atleta ao longo da prática desportiva.
12. **Quantificação do ativo remanescente presente na matriz:** uma vez terminado o período de libertação, o filme ou sistema transdérmico, deverá ser retirado e colocado em agitação num frasco com um solvente (água ou PBS, uma vez que em etanol a BSA precipitou) para quantificação da quantidade de BSA não libertada, por espectrofotometria, efetuando-se um balanço de massa global e cálculo do rendimento de libertação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Cerrai,P., Tricoli,M., Andruzzi,F., Paci,M., Paci,M., 1989. Polyether-polyester block copolymers by non-catalysed polymerization of E-caprolactone with poly(ethylene glycol). *Polymer* 30 (2), 338-343.
- [2] Sawhney, A.S., Pathak, C.P., Hubbell, J.A., 1993. Bioerodible Hydrogels Based on Photopolymerized Poly (ethyleneglycol)-co-poly(α -hydroxy acid) Diacrylate Macromers. *Macromolecules* 26 (4), 581-587.
- [3] Travassos, D.R.S., 2016. Produção de Sistemas Transdérmicos de Base Ácido Lático, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [4] Santos, J.M.C., 2014. Preparação de Bioadesivos a partir do Ácido Lático, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [5] Huh, K.M., Bae, Y.H., 1999. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)/poly (L-lactic acid) alternating multiblock copolymers. *Polymer* 40 (22), 6147-6155.
- [6] Youxin, L., Volland, C., Kissel, T., 1994. In-vitro degradation and bovine serum albumin release of the ABA triblock copolymers consisting of poly (L(+))lactic acid, or poly(L(+)) lactic acid-co-glycolic acid) A-blocks attached to central polyoxyethylene B-blocks. *Journal of Controlled Release* 32 (2), 121-128.
- [7] Youxin, L., Kissel, T., 1993. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly (L-lactic acid) or poly (L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks. *Journal of Controlled Release* 27 (3), 247-257.
- [8] Marques, D.A.S., 2012. Studies on high molecular weight poly (lactic acid) synthesis, Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra.
- [9] Ferreira, P., Coelho, J.F.J., Gil, M.H., 2008. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics* 352 (1), 172-181.
- [10] Karikari, A.S., 2006. Synthesis and Characterization of Functional Biodegradable Polyesters, Doctoral Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- [11] Helminen, A.O., Korhonen, H., Seppala, J.V., 2002. Structure modification and crosslinking of methacrylated polyactide oligomers. *Journal of Applied Polymer Science* 86 (14), 3616-3624.
- [12] Ferreira, P., Coelho, J.F.J., Pereira, R., Silva, A.F.M., Gil, M.H., 2007. Synthesis and Characterization of Poly (ethylene glycol) Prepolymer To Be Applied as a Bioadhesive. *Journal of Applied Polymer Science* 105 (2), 593-601.

- [13] Stolt M., Viljanmaa, M., Sodegard, A., Tormala, P., 2004. Blends of Poly (E-caprolactone-b-lactic acid) and poly(lactic acid) for hot-melt applications. *Journal of Applied Polymer Science* 91 (1), 196-204.
- [14] Wei, H., He, J., Sun, L.G., Zhu, K., Feng, Z.G., 2005. Gel formation and photopolymerization during supramolecular self-assemblies of α -CDs with LA-PEG-LA copolymer end-capped with methacryloyl groups. *European Polymer Journal* 41 (5), 948-957.
- [15] Wei, H., Yu, H., Zhang, A.Y., Sun, L.G., Hou, D., Feng, Z.G., 2005. Synthesis and Characterizations of Thermosensitive and Supramolecular Structured Hydrogels. *Macromolecules* 38 (21), 8833-8839.
- [16] Ho, S.M., Young, A.M., 2006. Synthesis, polymerisation and degradation of poly(lactide-co-propylene glycol) dimethacrylate adhesives. *European Polymer Journal* 42 (8), 1775-1785.
- [17] Karikari, A.S., Edwards, W.F., Mecham, J.B., Long, T.E., 2005. Influence of Peripheral Hydrogen Bonding on the Mechanical Properties of Photo-Cross-Linked Star-Shaped Poly (D,L- Lactide) Networks. *Biomacromolecules* 6 (5), 2866-2874.
- [18] Skaalure, S.C., Dimson, S.O., Pennington, A.M., Bryant, S.J., 2014. Semi-interpenetrating networks of hyaluronic acid in degradable PEG hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 10 (8), 3409-3420.
- [19] Lin, W., Juang, L.W., Lin, C.C., 2003. Stability and Release Performance of a Series of Pegylated Copolymeric Micelles. *Pharmaceutical Research* 20 (4), 668-673.
- [20] Pisal, D.S., Kosloski, M.P., Balu-Iyer, S.V., 2010. Delivery of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (6), 2557-2575.
- [21] Pakulska, M.M., Miersch, S., Shoichet, M.S., 2016. Designer protein delivery: From natural to engineered affinity-controlled release systems. *Science* 351 (6279).
- [22] Scapin, M.P., 2005. Um Algoritmo Genético Híbrido Aplicado À Predição Da Estrutura De Proteínas Utilizando o Modelo Hidrofóbico-Polar Bidimensional, Tese de Mestrado, Centro Federal De Educação Tecnológica Do Paraná, Brasil.
- [23] Ferreira, C.F.G., 2008. Adsorção da proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* sobre a superfície da mica analisada por microscopia de força atômica, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- [24] Salgado, R.A.F., 2015. Caracterização e recuperação de proteínas de subprodutos de pescado, Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa.
- [25] Berrondo, M., 2010. Predicting the structure and function of protein mutants, Tese de Doutorado, Universidade Johns Hopkins, Estados Unidos da América.

- [26] Funções das proteínas, Disponível em: <http://www.infoescola.com/bioquimica/funcoes-das-proteinas/>.
- [27] Russel, P., 2001. *iGenetics: A molecular approach*, third ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- [28] Fu, K., Kilbanov, A.M., Langer, R., 2000. Protein stability in controlled-release systems. *Nature Biotechnology* 18 (1), 24-26.
- [29] Adel, A., Nadia, M., Mohamed, O., Abdelhafidh, G., 2008. Study of thermally and chemically unfolded conformations of bovine serum albumin by means of dynamic light scattering. *Materials Science and Engineering* 28 (5), 594-600.
- [30] Taha, M., Quental, M.V., Correia, I., Freire, M.G., Coutinho, J.A., 2015. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. *Process Biochemistry* 50 (7), 1158-1166.
- [31] Yu, Z., Yu, M., Zhang, Z., Hong, G., Xiong, Q., 2014. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale research letters* 9 (1), 343.
- [32] Ferreira, E.S., 2009. *Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- [33] Tsai, D.H., DelRio, F.W., Keene, A.M., Tyner, K.M., MacCusprie, R.I., Cho, T.J., Zachariah, M.R., Hackley, V.A., 2011. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir* 27 (6), 2464-2477.
- [34] Sigma-Aldrich, Bovine Serum Albumins, Disponível: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=103994915>.
- [35] Sigma-Aldrich, Bovine Serum Albumin A8531, Disponível: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8531?lang=pt®ion=PT>.
- [36] Rockland antibodies & assays, Bovine Serum Albumin Overview, Disponível: <http://www.rockland-inc.com/bovine-serum-albumin.aspx>.
- [37] Sigma-Aldrich, Albumin from bovine serum, product information, Disponível: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4919pis.pdf
- [38] Completo, C.D.S., 2008. *Adsorção de albumina bovina e ácido hialurônico em cerâmicos de titânio*, Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa.

- [39] Bian, L., Wu, D., Hu, W., 2014. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous by reversed-phase liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 28 (2), 295-301.
- [40] Invitria, Serum Albumin - Functions and uses in molecular biology and cell culture, Disponível: <https://www.invitria.com/cell-culture-products-types/serum-albumin/>.
- [41] MooScience, Bovine Serum Albumin (BSA), Disponível: <http://mooscience.com/Bovine-Serum-Albumin.html>.
- [42] Francis, G.L., 2010. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* 62 (1), 1-16.
- [43] Masuelli, M.A., 2013. Study of bovine serum albumin solubility in aqueous solutions by intrinsic viscosity measurements. *Advances in Physical Chemistry*, Volume 2013, article ID: 360239.
- [44] Silva, W.C., Guterres, M.V., Ferreira, M.M.C., Volpe, P.L.O., 2005. Análise do mecanismo de desnaturação da albumina utilizando a resolução de curvas multivariadas (MCR). Ata da 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- [45] Shanmugam, G., Polavarapu, P.L., 2004. Vibrational circular dichroism spectra of protein films: thermal denaturation of bovine serum albumin. *Biophysical chemistry* 111 (1), 73-77.
- [46] Friedli, Interaction of SWP with bovine serum albumin (BSA), Disponível: <http://www.friedli.com/research/phd/chapter5a.html>.
- [47] Michnik, A., Michalik, K., Drzazga, Z., 2005. Stability of bovine serum albumin at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 80 (2), 399-406.
- [48] He, S., Huang, M., Ye, W., Chen, D., He, S., Ding, L., Yao, Y., Wan, L., Xu, J., Miao, S., 2014. Conformational change of bovine serum albumin molecules at neutral pH in ultra-diluted aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* 118 (42), 12207-12214.
- [49] Varga, N., Hornok, V., Sebok, D., Dekany, I., 2016. Comprehensive study on the structure of the BSA from extended-to aged form in wide (2-12) pH range. *International Journal of biological macromolecules* 88, 51-58.
- [50] Takeda, K., Wada, A., Yamamoto, K., Moriyama, Y., Aoki, K., 1989. Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *Journal of protein chemistry* 8 (5), 653-659.
- [51] Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F., 2002. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para um aumento da biodisponibilidade oral. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 38 (2), 125-140.

- [52] Zheng, C.H., Gao, J.Q., Zhang, Y.P., Liang, W.Q., 2004. A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly (lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. *Biochemical and biophysical research communications* 323 (4), 1321-1327.
- [53] Dias, J.A.C., 2013. Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas, Tese de Mestrado, Universidade do Algarve.
- [54] Melo, C.S., Silva-Cunha, A., Fialho, S.L., 2013. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 33 (4), 469-477.
- [55] Melo, C.D.S., Pereira, B.G., Silva-Cunha, A., Fialho, S.L., 2012. Poly-E-caprolactone microspheres containing interferon alpha as alternative formulations for the treatment of chronic hepatitis C. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 48 (1), 51-59.
- [56] Cho, H.J., Balakrishnan, P., Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D., 2011. Evaluation of protein stability and in vitro permeation of lyophilized polysaccharides-based microparticles for intranasal protein delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 416 (1), 77-84.
- [57] Guerreiro, L.H., Da Silva, D., Ricci-Junior, E., Girard-Dias, W., Mascarenhas, C.M., Sola-Penna, M., Miranda, K., Lima, L.M.T.R., 2012. Polymeric particles for the controlled release of human amylin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94, 101-106.
- [58] Zhang, X., Sun, M., Zheng, A., Cao, D., Bi, Y., Sun, J., 2012. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (5), 632-638.
- [59] Appel, E.A., Loh, X.J., Jones, S.T., Dreiss, C.A., Scherman, O.A., 2012. Sustained release of proteins from high water content supramolecular polymer hydrogels. *Biomaterials* 33 (18), 4646-4652.
- [60] El-Sherbiny, I.M., Salama, A., Sarhan, A.A., 2011. Ionotropically cross-linked pH-sensitive IPN hydrogel matrices as potencial carriers for intestine-specific oral delivery of protein drugs. *Drug development and industrial pharmacy* 37 (2), 121-130.
- [61] Kashyap, N., Viswanad, B., Sharma, G., Bhardwaj, V., Ramarao, P., Kumar, M.R., 2007. Design and evaluation of biodegradable, biosensitive in situ gelling system for pulsatile delivery of insulin. *Biomaterials* 28 (11), 2051-2060.
- [62] Silva, B.D.G., 2015. Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos biofarmacêuticos, Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa.
- [63] Bruno, B.J., Miller, G.D., Lim, C.S., 2013. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Future Science* 4, 1443-1467.

- [64] Fadista, A.F.S., 2011. Insulinoterapia: vias e sistemas de administração alternativos, Tese de Mestrado, Universidade do Algarve.
- [65] Morishita, M., Peppas, N.A., 2006. Is the oral route possible for peptide and proteins drug delivery?. *Drug discovery today* 11 (19), 905-910.
- [66] Rafeiro, D.F.B., 2013. Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica, Tese de Mestrado, Universidade Lusófona.
- [67] Farmacopeia Portuguesa 9.0, 2009, Edição oficial, Ministério da Saúde/Infarmed, Lisboa
- [68] Soares, C.S.M., 2013. Sistemas de libertação de fármacos ativados por estímulos físicos e químicos administrados por via transdérmica, Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa.
- [69] Soares, M.A.A., 2013. Sistemas transdérmicos Estratégias para aumentar a permeação de fármacos, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [70] Dias, A.R.P., 2013. Sistemas transdérmicos, Tese de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- [71] Cohen, S., Yoshioka, T., Lucarelli, M., Hwang, L.H., Langer, R., 1991. Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharmaceutical research* 8 (6), 713-720.
- [72] Durães, L., 2015. Espectrometria no infravermelho médio (IR/FTIR): Modos de absorção e de refletância total atenuada (ATR), Apontamentos das aulas de Instrumentação e Técnicas Analíticas, Universidade de Coimbra.
- [73] Tang, C.Y., Kwon, Y.N., Leckie, J.O., 2007. Probing the nano-and-microscales of reverse osmosis membranes - a comprehensive characterization of physiochemical properties of uncoated and coated membranes by XPS, TEM, ATR-FTIR, and streaming potential measurements. *Journal of Membrane Science* 287 (1), 146-156.
- [74] Cunha, A.L.C.P., 2008. Desenvolvimento de adesivos biológicos biodegradáveis, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [75] Nicolet, T., All, C., 2001. Introduction to fourier transform infrared spectrometry. Thermo Nicolet Corporation.
- [76] Bach, M., 2014. Near infrared laser sensor system for in-line detection of conversion in UV-cured polymer coatings. KIT Scientific Publishing.
- [77] Prime, R.B., Bair, H.E., Vyazovkin, S., Gallagher, P.K., Riga, A., 2009. Thermogravimetric analysis (TGA). *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*, 241-317.

- [78] Menczel, J.D., Judovits, L., Prime, R.B., Bair, H.E., Reading, M., Swier, S., 2009. Differential scanning calorimetry (DSC). Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications, 7-239.
- [79] Operating Manual DataPhysics OCA, 2002.
- [80] Cardoso, R.M., 2012. Modificação superficial de uma poliuretana para preparação de válvulas cardíacas, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [81] Hejda, F., Solar, P., Kousal, J., 2010. Surface free energy determination by contact angle measurements - A comparison of various approaches. WDS 10, 25-30.
- [82] Krawczyk, J., 2015. Surface free energy of the human skin and its critical surface tension of wetting in the skin/surfactant aqueous solutions/air system. Skin Research and Technology 21 (2), 214-223.
- [83] Ferreira, M.J.J.L., 2015. Estudo não invasivo da permeação de rodamina B em pele através do método de fluorescência, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [84] Silva, J.A., Apolinário, A.C., Souza, M.S.R., Damasceno, B.P.G.L., Medeiros, A.C.D., 2010. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada 31 (3), 125-131.
- [85] Hu, R., Chen, Y.Y., Zhang, L.M., 2010. Synthesis and characterization of on situ photogelable polysaccharide derivative for drug delivery. International journal of pharmaceutics 393 (1), 97-104.
- [86] Kampouris, E.M., Andreopoulos, A.G., 1989. The effect of the gel content of crosslinked polyethylene on its physical properties. European polymer journal 25 (3), 321-324.
- [87] Jansen, J., 2011. Photo-crosslinked biodegradable polymer networks for controlled intraocular drug delivery, Tese de Doutorado, Universidade de Twente, Holanda.
- [88] Ifkovits, J.L., Burdick, J.A., 2007. Photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. Tissue engineering 13 (10), 2369-2385.
- [89] Hakala, R., 2013. Crosslinked poly (éster anhydrides) for controlled drug delivery, Tese de Doutorado, Universidade de Aalto, Finlândia.
- [90] Morgado, S.P., 2015. Preparação de adesivos cirúrgicos com ação farmacológica, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [91] Almeida, J.F.S.L., 2010. Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas, Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra.

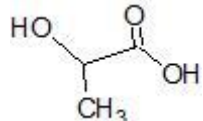
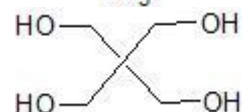
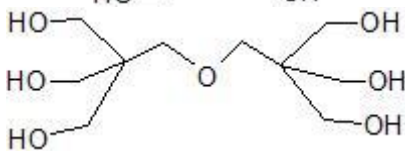
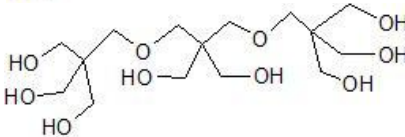
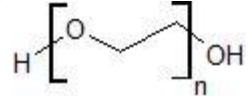
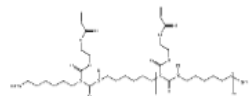
- [92] Engineer, C., Parikh, J., Raval, A., 2011. Review on hydrolytic degradation behaviour of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 25 (2), 79-85.
- [93] Marques, D.S., Santos, J.M.C., Ferreira, P., Correia, T.R., Correia, I.J., Gil, M.H., Baptista, C.M.S.G., 2016. Photocurable bioadhesive based on lactic acid. *Materials Science and Engineering: C* 58, 601-609.
- [94] Lyu, S., Untereker, D., 2009. Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *International journal of molecular sciences* 10 (9), 4033-4065.
- [95] Silverajah, V.S., Ibrahim, N.A., Zainuddin, N., Yunus, W.M.Z.W., Hassan, H.A., 2012. Mechanical thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/epoxidized palm olein blend. *Molecules* 17 (10), 11729-11747.
- [96] Rosu, D., Rosu, L., Varganici, C.D., 2013. The thermal stability of some semi-interpenetrated polymer networks based on epoxy resin and aromatic polyurethane. *Journal of Analytical and applied pyrolysis* 100, 103-110.
- [97] Al-Itry, R., Lamnawar, K., Maazouz, A., 2012. Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. *Polymer Degradation and Stability* 97 (10), 1898-1914.
- [98] Reis, A.C.M., 2012. Efeito da temperatura de cura na temperatura de transição vítrea de um adesivo estrutural, Tese de Mestrado, Universidade do Porto.
- [99] Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Datta, P., Veer, V., 2014. Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 50, 70-84.
- [100] Wokovich, A.M., Prodduturi, S., Doub, W.H., Hussain, A.S., Buhse, L.F., 2006. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety. efficacy and quality attribute. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64 (1), 1-8.
- [101] Venkatraman, S., Gale, R., 1998. Skin adhesives and skin adhesion: 1. Transdermal drug delivery systems. *Biomaterials* 19 (13), 1119-1136.
- [102] Jena Library of Biological Macromolecules, Determination of secondary structure in proteins by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Disponível: http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html.
- [103] Abrosimova, K.V., Shulenina, O.V., Paston, S.V., 2016. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. In *Journal of Physics: Conference Series*.
- [104] Gallagher, W., 2009. FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*, 455.

- [105] Vaz, R.I.L., 2016. Preparação de scaffolds por combinação das técnicas de fotoreticulação e electrospinning para engenharia de tecidos, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [106] Moriyama, Y., Kawasaki, Y., Takeda, K., 2003. Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. *Journal of colloid and interface science* 257 (1), 41-46.
- [107] Moriyama, Y., Watanabe, E., Kobayashi, K., Harano, H., Inui, E., Takeda, K., 2008. Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change. *The Journal of Physical Chemistry B* 112 (51), 16585-16589.
- [108] Li, R., Wu, Z., Wang, Y., Ding, L., Wang, Y., 2016. Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. *Biotechnology Reports* 9, 46-52.
- [109] Estey, T., Kang, J., Schwendeman, S.P., Carpenter, J.F., 2006. BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences* 95 (7), 1626-1639.
- [110] Kruger, N.J., 2009. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 17-24.
- [111] Zaia D.A., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J., 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova* 21 (6), 787-793.
- [112] Lucarini, A.C., Kilikian, B.V., 1999. Comparative study of lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology techniques* 13 (2), 149-154.

Anexos

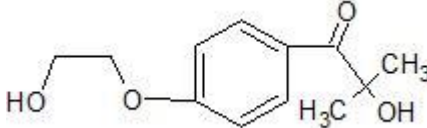
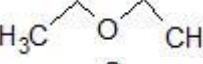
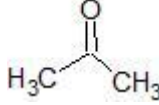
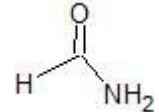

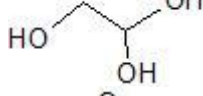
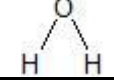
Anexo A – Estrutura química e propriedades dos reagentes usados

Tabela A.1 Principais propriedades dos reagentes usados e suas estruturas químicas e moleculares (de acordo com as fichas de especificação dos fornecedores).

Nome da Substância	Fórmula Química	Cas	Estrutura Química	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Massa volúmica (g.mL ⁻¹)
Ácido 2-hidroxiopropanóico ou Ácido láctico L (+)	C ₃ H ₆ O ₃	79-33-4		90,08	53 - 54	122 (12 mmHg)	1,206
Pentaeritritol	C(CH ₂ OH) ₄	115-77-5		136,15	253 - 258	276 (a 30 mmHg)	1,397 (15°C)
Dipentaeritritol	C ₁₀ H ₂₂ O ₇	126-58-9		254,28	215-218	356	1,33 (25°C)
Tripentaeritritol	C ₁₅ H ₃₂ O ₁₀	78-24-0		372,41	225	ND	ND
Poli (etilenoglicol) ou PEG400	H(OCH ₂ CH ₂) _n OH	25322-68-3		400	4-8	>200°C	1,128
Laromer® LR 9000	-	-		578	ND	ND	1,154

ND – Não disponível

Tabela A.1 Principais propriedades dos reagentes usados e suas estruturas químicas e moleculares (de acordo com as fichas de especificação dos fornecedores). (continuação)

Nome da Substância	Fórmula Química	Cas	Estrutura Química	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Massa volúmica (g.mL ⁻¹)
Irgacure®2959	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	106797-53-9		224,25	86,5 – 89,5	ND	ND
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	60-29-7		74,12	-116	35	0,710
Propanona ou acetona	C ₃ H ₆ O	67-64-1		58,08	-95	56	0,790
Albumina de soro bovino	-	9048-46-8	-	66000	ND	ND	ND
Formamida	CH ₃ NO	75-12-7		45,04	2 - 3	210	1,133
Etilenoglicol	C ₂ H ₆ O ₂	107-21-1		62,06	- 12,9	197	1,113
Propilenoglicol	C ₃ H ₈ O ₂	57-55-6		76,09	- 59	188	1,036
Água	H ₂ O	7732-18-5		18,02	0	100	1

ND – Não disponível

Anexo B - Montagem experimental da produção dos oligómeros e funcionalização.

- Produção dos oligómeros: AL-PEG400 (18h); AL-mPET (9h); AL-diPET (9h); AL-triPET (9h).

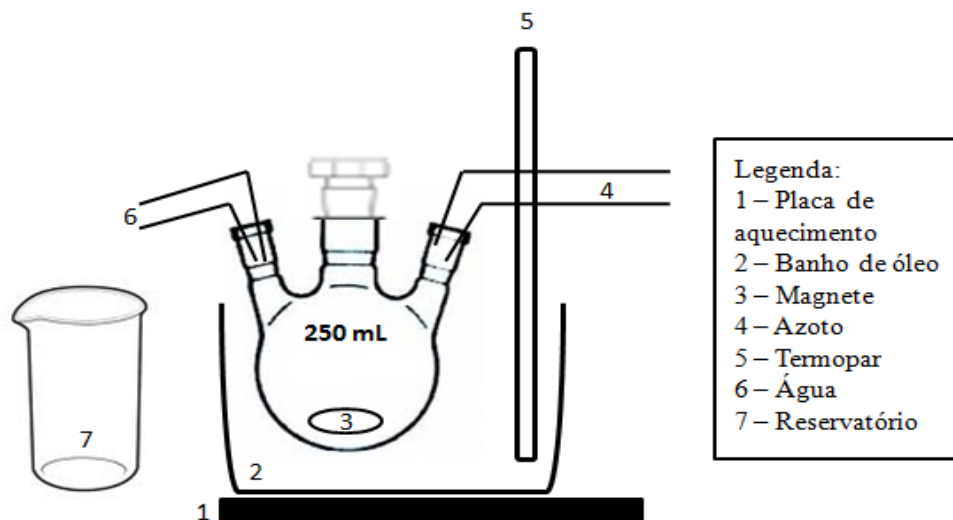


Figura B.1 Montagem experimental para produção dos oligómeros de base ácido lático.

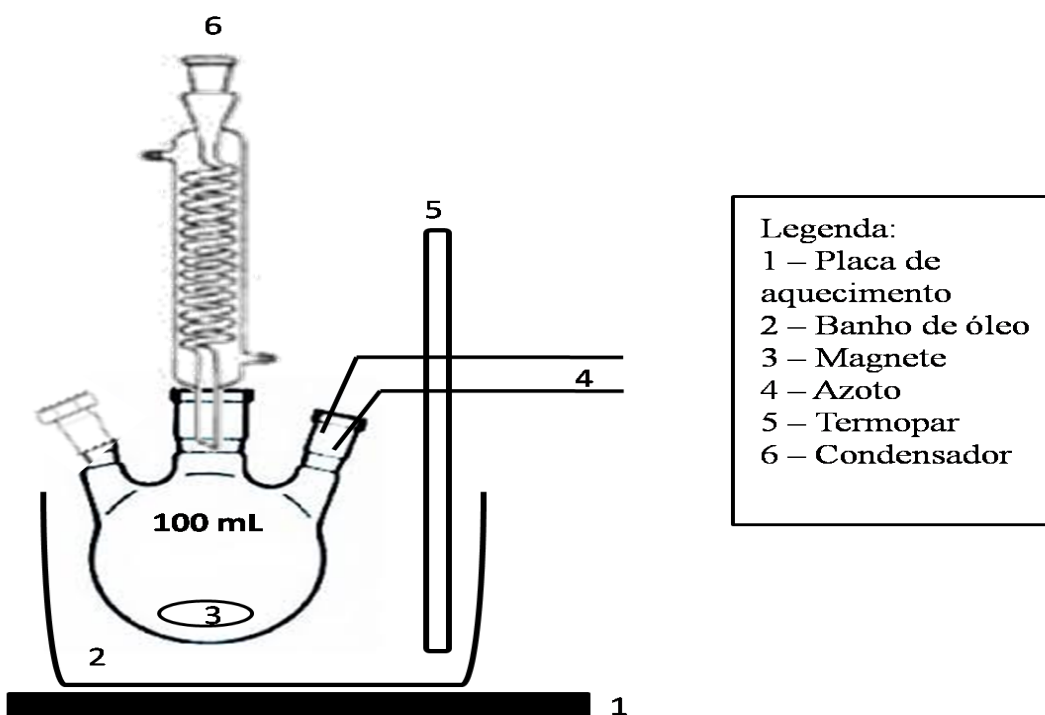


Figura B.2 Montagem experimental para funcionalização dos oligómeros com LAR.

Anexo C - Processo de produção dos filmes e respectivas condições operacionais.

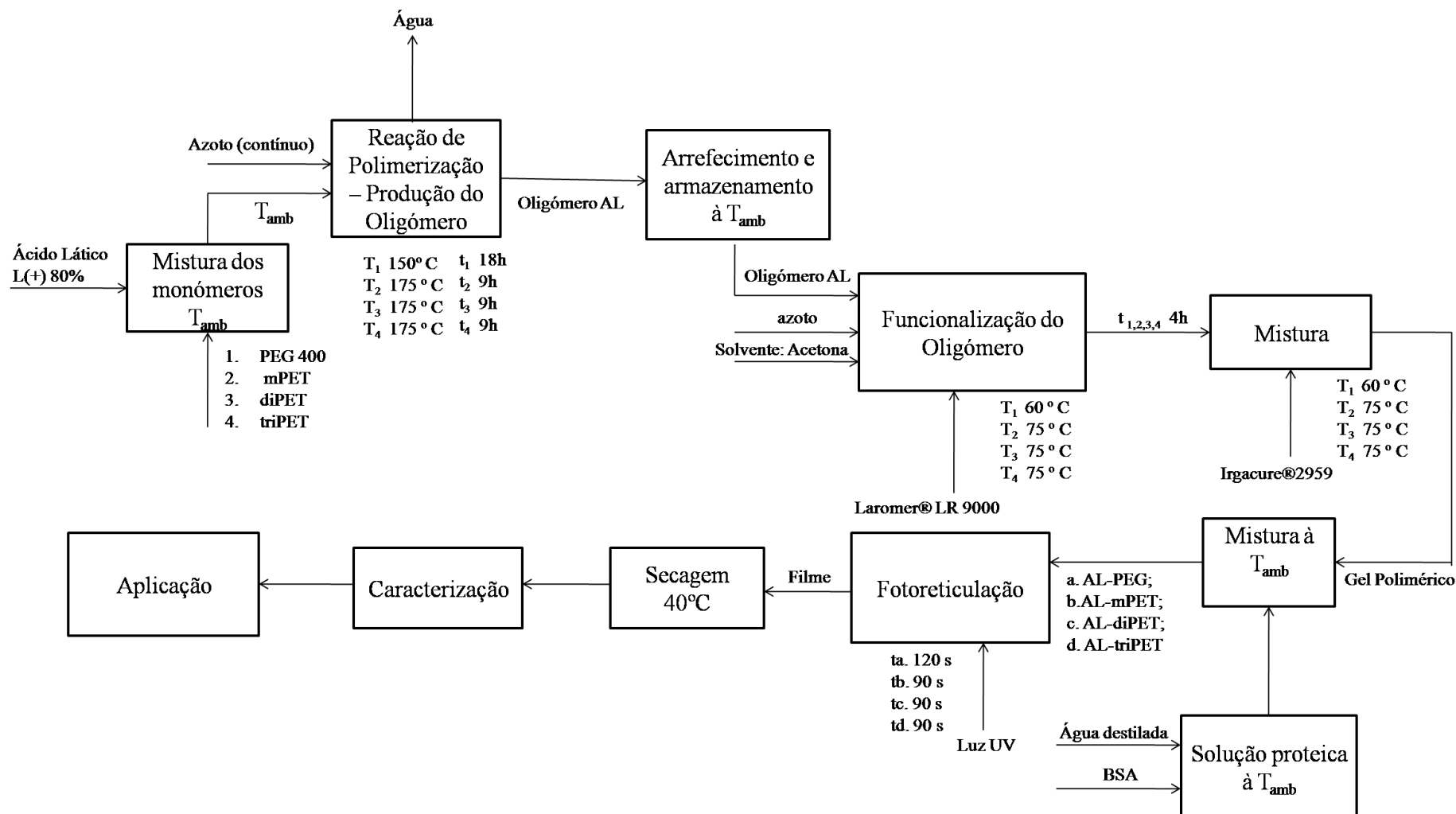


Figura C.1 Esquema das etapas de síntese dos filmes de base ácido láctico, realizadas em laboratório.

Anexo D – Análise ATR-FTIR das matérias-primas

Neste Anexo D apresentam-se os espectros ATR-FTIR dos co-monómeros utilizados para a produção de oligómeros, do agente de funcionalização Laromer[®] LR 9000, do fotoiniciador Irgacure[®] 2959 e da proteína, BSA. Na Tabela D.1 compilam-se as frequências características dos grupos funcionais objeto de estudo.

Tabela D.1 Frequências características e modos vibracionais de absorção IV para alguns grupos funcionais (Adaptado [3-4,72]).

Grupo Funcional	Frequência (cm ⁻¹)	Vibração
Alcenos (ligação C=C)	1640-1610	Elongação
Ésteres (ligação C=O)	1750-1735	Elongação
Isocianatos (ligação N-C=O)	~ 2270	Elongação
Ácidos carboxílicos (ligação OH)	3400-2400	Elongação
Álcoois (ligação OH)	3650 ou 3400-3300	Elongação
Uretana (ligação NH)	1640-1500	Deformação
Uretana (ligação NH)	3500-3300/3180	Elongação

Na Figura D.1 estão representados os espectros dos co-monómeros utilizados e identificados os grupos funcionais OH correspondentes à banda de frequências de 3400-3300 cm⁻¹.

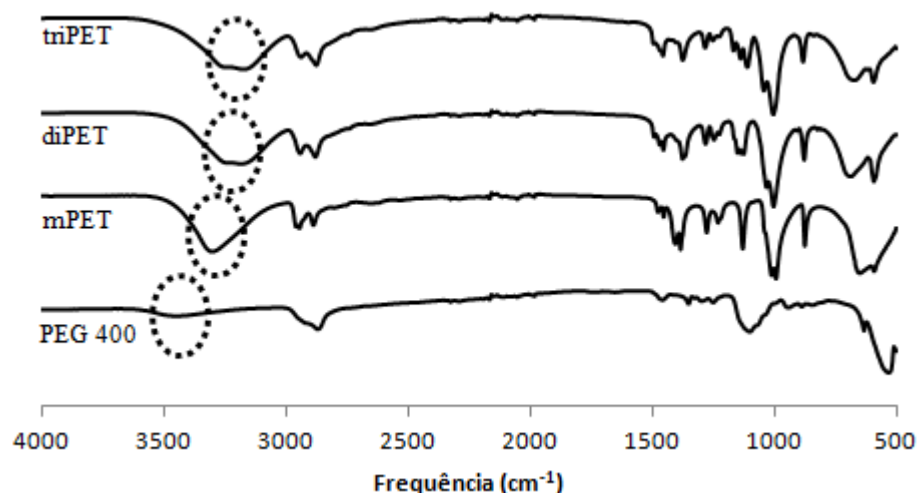


Figura D.1 Espectro ATR-FTIR dos co-monómeros utilizados na síntese dos oligómeros.

Na Figura D.2 estão representados os espectros do agente funcionalizador, LAR, do fotoiniciador, IRG, e da proteína em utilização, BSA. No espectro do LAR observam-se e identificam-se especialmente 3 bandas características correspondentes aos grupos químicos que os caracterizam. A banda dos grupos isocianato (2266 cm⁻¹) e de alongação da ligação

C=O (1716 cm^{-1}) e C=C (1683 cm^{-1}) apresentam valores de frequência próximos dos esperados. Na reação dos oligômeros com o agente funcionalizador vai ocorrer a reação dos grupos OH com os grupos isocianato, pelo que a banda de frequências correspondente aos grupos isocianato, aproximadamente 2270 cm^{-1} , deverá desaparecer nos polímeros funcionalizados, caso a reação seja completa.

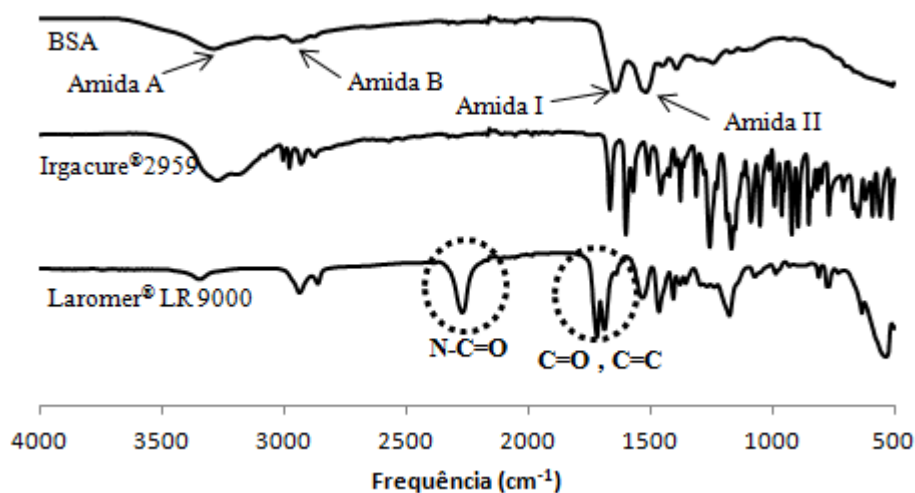


Figura D.2 Espectro do agente funcionalizador - Laromer[®]LR 9000, do iniciador -Irgacure[®]2959 e da proteína-BSA.

Anexo E – Quantificação da proteína BSA por espectrofotometria

- **Preparação da solução tampão de PBS**

Foram utilizadas pastilhas de PBS (*phosphate buffered saline*) adquiridas à Sigma Aldrich para preparar a solução tampão. De acordo com o fornecedor, uma pastilha dissolvida em 200 mL de água destilada conduz a uma concentração 0,01 M (0,0027 M em cloreto de potássio e 0,132 M em cloreto de sódio), com um pH de 7,4 à temperatura de 25°C.

O modo de preparação consiste em adicionar dez pastilhas de PBS a dois litros de água destilada num balão volumétrico. A solução pode e deve ser agitada algumas vezes até completa dissolução ou promover-se a dissolução com a introdução de um agitador magnético e uso de uma placa de agitação. Após completa dissolução, deixa-se a solução repousar, ficando pronta a usar.

Esta solução foi utilizada, nos estudos de libertação de BSA por incubação e em células de difusão de Franz, funcionando como branco na leitura de absorvâncias no espectrofotómetro, e em estudos de degradação hidrolítica dos filmes, neste caso com uma concentração de 0,005 M.

- **BSA dissolvida em PBS – Curva de calibração**

Preparou-se uma solução de BSA em PBS, com uma concentração de 2 mg.mL⁻¹. A solução foi sujeita a agitação magnética durante aproximadamente 1h, dado que a proteína se dissolve facilmente neste meio. Preparada a solução mãe, procedeu-se à sua diluição em diferentes frascos com fatores de diluição 1, 2, 4, 8, 10, 20 e 40. Para as diluições da solução de proteína em PBS, estipulou-se um volume total de 2 mL, sendo retirado respectivamente para cada frasco o volume correspondente de solução de BSA em PBS, perfazendo-se o volume total com solução de PBS. As diluições foram efetuadas com o auxílio de pipetas automáticas e com pesagens rigorosas numa balança, para um correto cálculo da concentração em cada frasco de diluição.

Antes de efetuar a leitura da absorvância, foi necessário fazer-se um varrimento no espectrofotómetro UV-VIS JASCO V-550, de maneira a avaliar qual o melhor comprimento de onda para quantificar a BSA em PBS. Através da análise do espectro de varrimento obtido presente na Figura E.1, concluiu-se que o melhor comprimento de onda seria 278nm, comprimento de onda esse utilizado também por Li [6] para leitura da concentração de BSA.

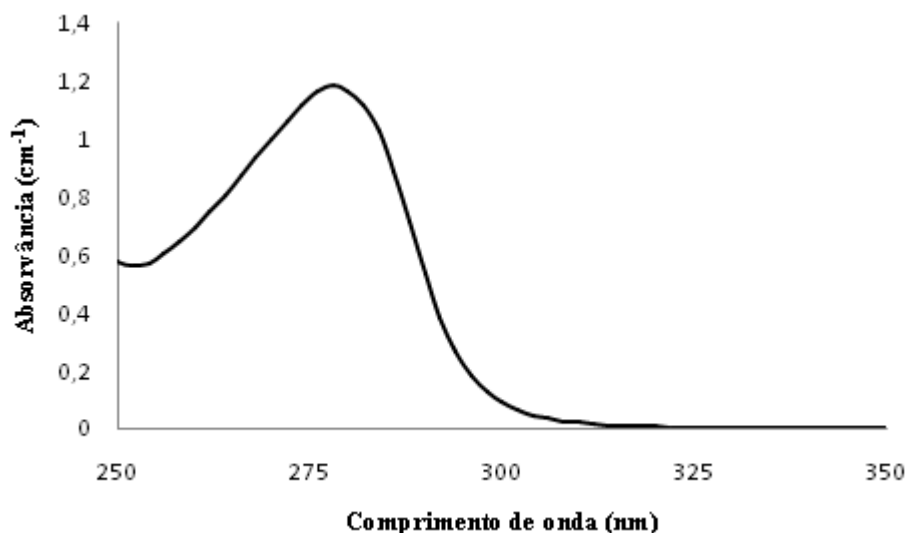


Figura E.1 Espectro de absorvância da BSA para aferição do comprimento de onda.

Definido o comprimento de onda passou-se à leitura das absorvâncias das várias soluções diluídas, utilizando-se como branco, a solução de PBS. As absorvâncias foram medidas logo após as diluições, pois tratando-se de uma proteína, a leitura deve ser efetuada a fresco e evitar a mínima exposição das soluções à luz. A curva de calibração, com Equação:

$$C_{BSA} (\text{mg.mL}^{-1}) = 1,756 \text{ Abs} \quad (\text{E.1})$$

Obtida é apresentada na Figura E.2, e tem por base um teste em duplicado. Na Figura são apresentados os desvios padrões, equação da reta e R^2 associado.

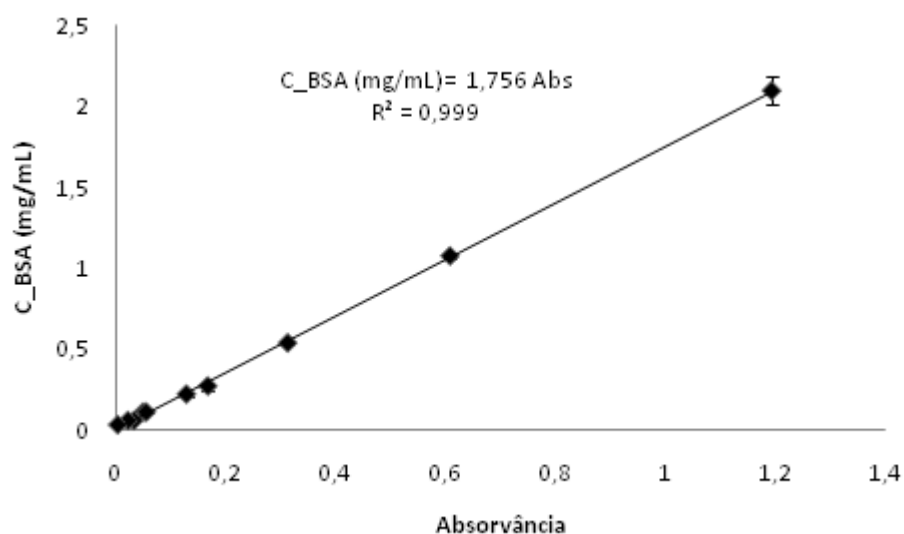


Figura E.2 Curva de calibração de concentração da BSA em PBS em função da absorvância a 278 nm (teste em duplicado).

Esta curva foi utilizada nos estudos de liberação de BSA dos filmes carregados com esta proteína, para a concentração de BSA na solução coletora ao longo do tempo.

- **Método de Bradford – curva de calibração**

O método de Bradford é uma técnica muito utilizada que permite determinar a quantidade total de proteínas presente em vários meios [110]. É mais utilizado para proteínas de elevado peso molecular, dado que o limite inferior de detecção de aproximadamente 3 a 5 kDa [111-112].

É um método de medição espectrofotométrica que se baseia na adição de um corante, *Coomassie brilliant blue*, BG-250, à solução e que irá permitir a quantificação das proteínas, devido à interação com os aminoácidos de grupos ácidos e básicos das proteínas, podendo formar precipitados coloridos [111-112]. Apesar de o corante poder interagir com grupos ácidos, este tem afinidade de ligação principalmente com aminoácidos básicos e aromáticos, como por exemplo a arginina [111-112]. Esta interação entre a proteína e o corante pode ser medida por leitura das absorvâncias num espectrofotómetro, a 595 nm [111].

Este método apresenta como vantagens o facto de ser muito rápido, preciso, sensível e simples para a quantificação de proteínas [110-111]. No entanto pode nem sempre funcionar corretamente. Uma vez que a absorvância específica de cada proteína pode variar devido à solubilidade ou baixo peso molecular da proteína e por vezes devido ao grau de pureza do corante BG-250 [111]. Assim, para o efeito, sempre que se utilize o método de Bradford e consequentemente o corante BG-250, devem-se realizar os ensaios e a curva de calibração utilizando o corante do mesmo lote [111].

Para a elaboração da curva de calibração utilizando o método colorimétrico de Bradford procedeu-se do modo anteriormente descrito, preparando-se a solução de BSA em PBS, com a concentração de 1 mg.mL^{-1} , efetuando-se as diluições. De seguida adicionaram-se 0,025 mL de amostra de cada uma das soluções diluídas a 1 mL de reagente de Bradford em tubos de ensaio. Agitou-se a mistura num *vórtex*, deixando-se em repouso durante 20 min. Efetuou-se a leitura da absorvância destas no comprimento de onda de 595 nm utilizando o espectrofotómetro *Beckmans DU*[®] 650, contra um branco de PBS que sofreu o mesmo tratamento (0,025 mL de PBS e 1 mL de reagente de Bradford).

As absorvâncias medidas permitiram traçar a curva de calibração, representada na Figura E.3.

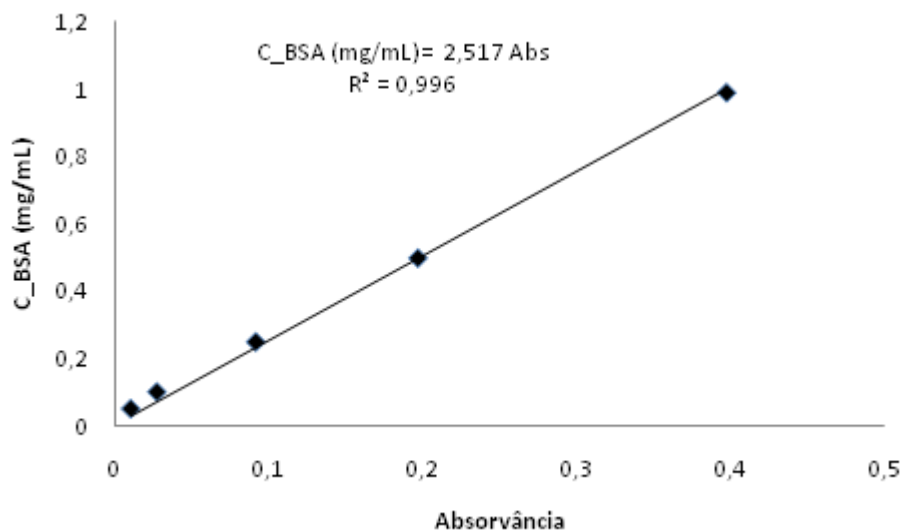


Figura E.3 Curva de calibração de concentração da BSA em PBS em função da absorvância utilizando o método de Bradford.

Esta curva tinha como finalidade ser utilizada nos estudos de liberação da BSA dos filmes produzidos, submetendo-se as amostras recolhidas ao mesmo tratamento e medição das absorvâncias a 595 nm para avaliação da concentração de BSA ao longo do tempo. Contudo, apesar de várias tentativas, não se conseguiu traduzir as absorvâncias em concentrações, por as amostras recolhidas nos ensaios de liberação apresentarem valores negativos de absorvância.

Anexo F – Estudos de libertação da BSA por incubação e em célula de difusão de Franz

- **Libertação por incubação.**

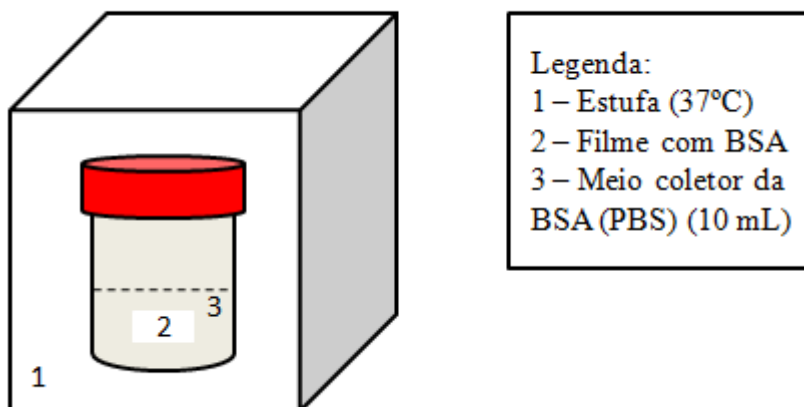


Figura F.1 Montagem experimental para o estudo de libertação da BSA dos filmes por incubação (Adaptado de [3]).

- **Libertação em célula de difusão de Franz.**

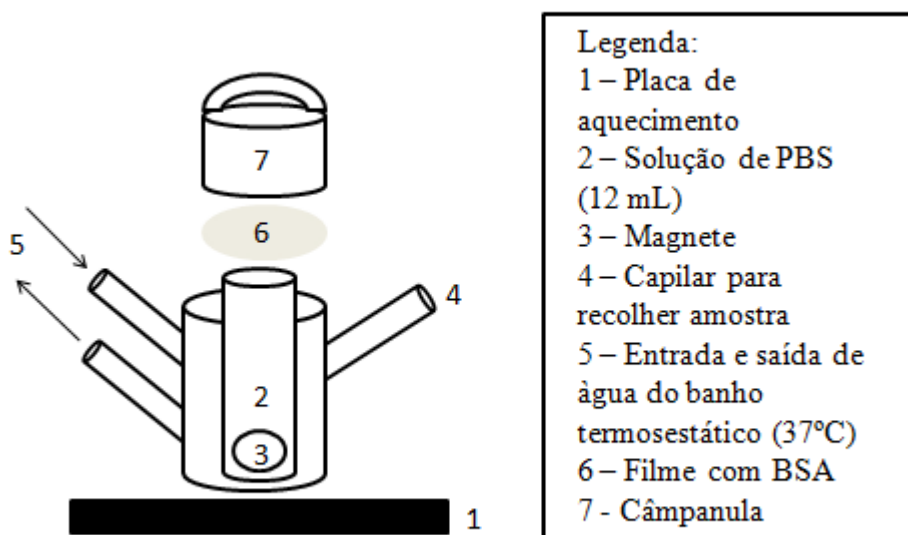


Figura F.2 Montagem experimental para o estudo de libertação da BSA dos filmes em célula de difusão de Franz (Adaptado de [3]).

Anexo G - Degradação hidrolítica em PBS

Nas Figuras G.1 a G.5 é representada a perda de massa, ao longo de 6 semanas, dos filmes base reticulados. A equação e coeficiente de determinação respectivo é apresentado na Tabela G.1.

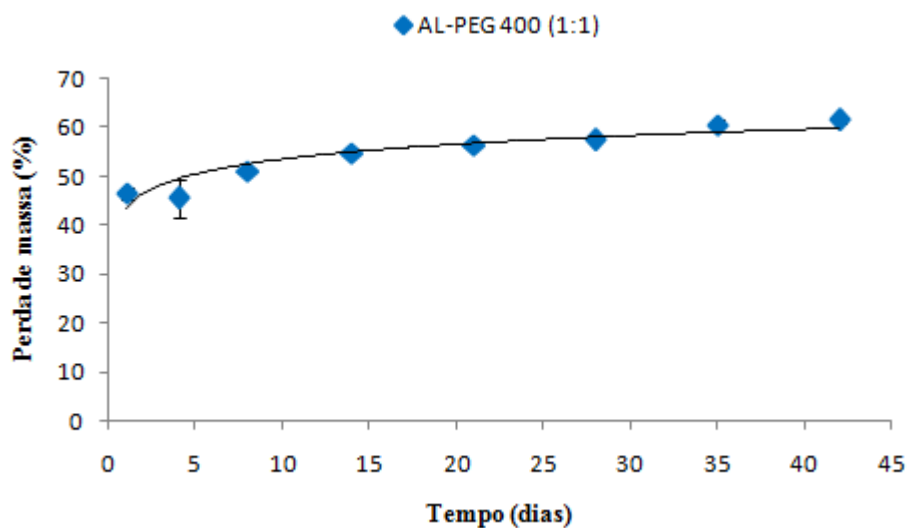


Figura G.1 Perda de massa do filme AL-PEG 400 (1:1) por hidrólise, em solução PBS a 37°C.

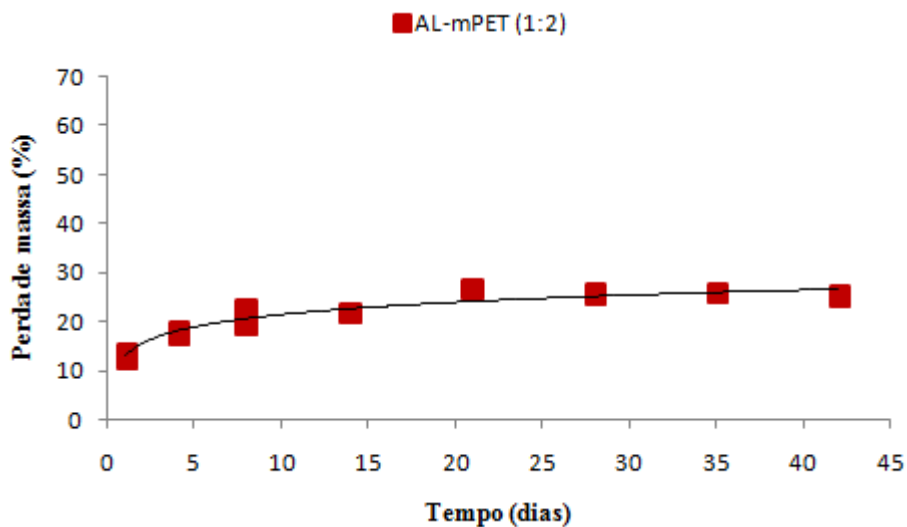


Figura G.2 Perda de massa do filme AL-mPET (1:2) por hidrólise, em solução PBS a 37°C.

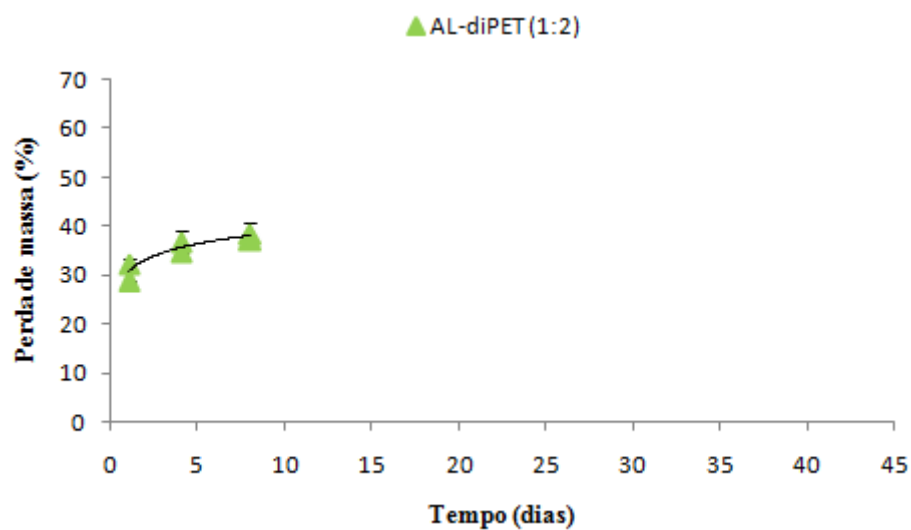


Figura G.3 Perda de massa do filme AL-diPET (1:2) por hidrólise, em solução PBS a 37°C.

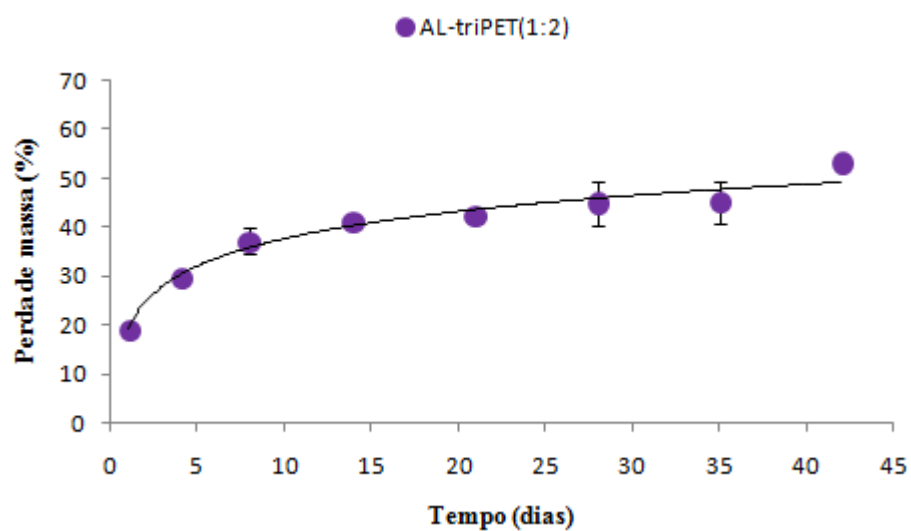


Figura G.4 Perda de massa do filme AL-triPET (1:2) por hidrólise, em solução PBS a 37°C.

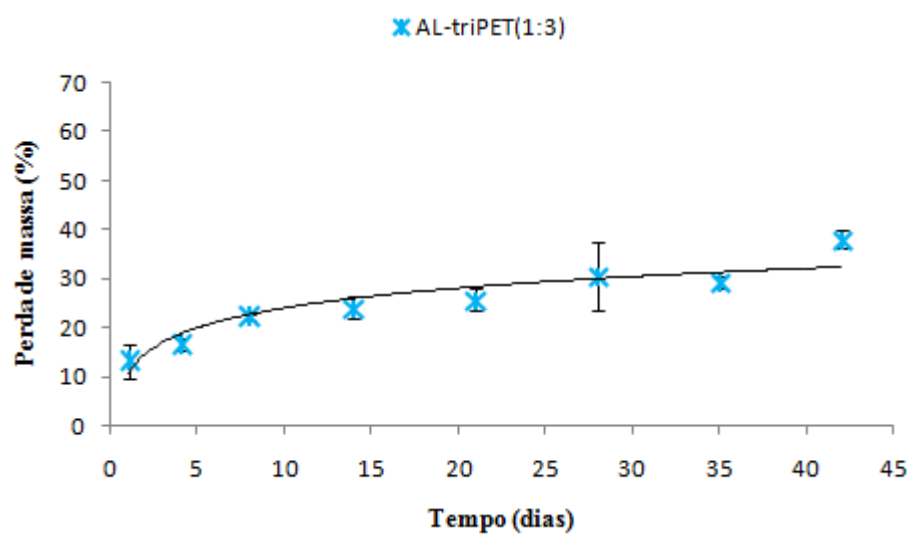


Figura G.5 Perda de massa do filme AL-triPET (1:3) por hidrólise, em solução PBS a 37°C

Tabela G.1 Equação da recta e coeficiente de determinação das representações de perda de massa dos filmes base reticulados.

Material	Equação da recta	R²
AL-PEG 400 (1:1)	$Y = 4,389\ln(x) + 43,43$	0,865
AL-mPET (1:2)	$Y = 3,630\ln(x) + 13,07$	0,932
AL-diPET (1:2)	$Y = 3,572\ln(x) + 30,59$	0,868
AL-triPET (1:2)	$Y = 8,100\ln(x) + 19,12$	0,966
AL-triPET (1:3)	$Y = 5,855\ln(x) + 10,48$	0,870

Anexo H – Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) dos filmes produzidos

Nas Figuras H.1 e H.2 estão representadas os traços de DSC dos filmes base e dos filmes com proteína, respectivamente. A partir destes traços e recorrendo ao *software* TRIOS da TA Instruments foi possível determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) dos filmes produzidos.

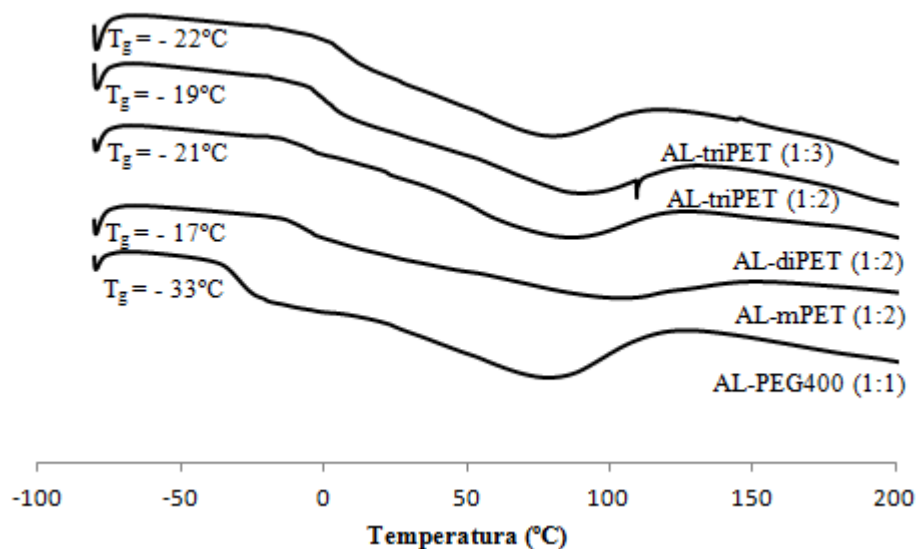


Figura H.1 Curvas DSC dos filmes base reticulados e respectivas T_g .

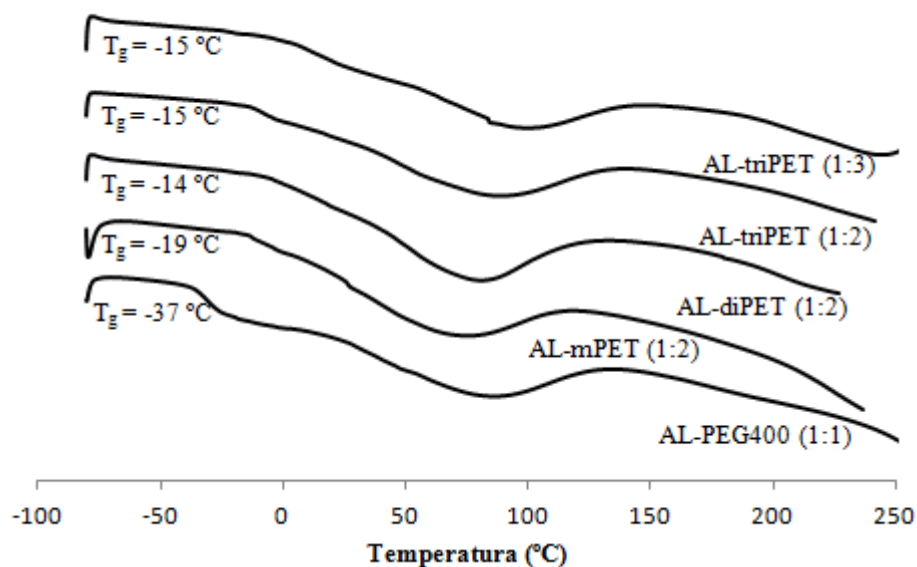


Figura H.2 Curvas DSC dos filmes com proteína reticulados e respectivas T_g .