

Encapsulação e Libertação Controlada de Fármacos

Sílvia Maria Alves Ribeiro

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Este trabalho foi efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor José Silva
Professor Doutor António Ribeiro

Outubro de 2014

Agradecimentos

Aos professores José Silva e António Ribeiro pela oportunidade que me deram de poder concretizar este projeto depois das dificuldades encontradas. Pela sua orientação, incentivo e disponibilidade, um muito obrigado.

Ao professor Rolando Dias pela ajuda disponibilizada e pelo apoio num período complicado.

À professora Paula Placência por ter disponibilizado algum do seu tempo e ajuda.

Aos meus pais por todo o tempo e paciência, além de toda a confiança que sempre depositaram em mim. Obrigado por permitirem que fosse possível.

Obrigado a todos os meus amigos pela paciência que sempre tiveram comigo, por toda a ajuda e amizade.

“Diz o que Pensas. Afirma o que sentes. Acredita em ti e muda a tua vida.”

(Gustavo Santos)

Resumo

A liberação controlada de fármacos tem sido alvo de estudo, uma vez que permite controlar a dosagem de fármacos administrada, sem que chegue a um nível tóxico para o organismo.

Os sistemas de liberação controlada possuem dois objetivos fulcrais: manter constante a concentração sanguínea de um determinado fármaco no corpo humano, assegurando uma maior biodisponibilidade, reduzir os efeitos, secundários, aumentando o efeito terapêutico desejado, utilizando uma quantidade de fármaco menor.

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia experimental, baseada num sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), tendo por objetivo estudar a adsorção e dessorção de cafeína no adsorvente nanoporoso MOF ZIF-8, através da realização de experiências de cromatografia frontal (etapas de saturação e de regeneração).

A partir dos resultados experimentais obtidos utilizando diferentes concentrações de cafeína e diferentes caudais, verifica-se que o adsorvente estudado MOF ZIF-8 possui boa capacidade de encapsulação. Para uma solução de cafeína com a concentração de 0.1 mg/L e a um caudal de 0.1 ml/min, o ponto de ruptura ocorre em cerca de 160 minutos.

Verifica-se também que à medida que se aumenta a concentração da solução de cafeína, o tempo de ruptura é superior o que mostra que o MOF tem uma boa capacidade de encapsulação.

Palavras-chave: Liberação Controlada de Fármacos, Dessorção, Cafeína, MOF-ZIF-8.

Abstract

The controlled release of drugs have been studied with the aim of controlling the dosage of administered drugs.

Controlled release systems have two key objectives: maintaining a constant blood concentration of a specific drug, providing greater bioavailability and reduce side effects, thus enhancing patient compliance to treatment with fewer doses ingested.

In this study was developed an experimental methodology, using a HPLC system, aiming to study the encapsulation and drug release of caffeine in MOF ZIF-8, by observing the saturation curves and regeneration of caffeine when passing through a column packed with the nanoporous material MOF ZIF-8.

In view of the obtained results, it is concluded that the adsorbate MOF ZIF-8 has a good capacity for encapsulation using a caffeine solution of 0.1 mg / L at a flow rate of 0.1 ml / min, since breakthrough time occurs 160 minutes after the test started.

As regards breakthrough curves, when the concentration of the caffeine solution is increased, the time to reach equilibrium also increases, so there is a better adsorption to a concentration of 0.5 mg / L of caffeine.

.Keywords: Drug Delivery, Desorption, Caffeine, MOF.

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	V
Abstract	VI
Nomenclatura	VIII
Índice de Figuras	IX
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1.Estrutura da dissertação	1
1.2.Libertação Controlada de Fármacos	4
1.3.Dessorção	7
1.4.Isotérmicas de Dessorção	9
1.5.MOFs (<i>Metal Organic Frameworks</i>).....	12
1.6.Cafeína	18
Capítulo 2	22
2. Parte Experimental	22
2.1.Reagentes e Materiais.....	22
2.2.Equipamento	24
2.3.Procedimento Experimental	27
Capítulo 3	31
3. Apresentação e Discussão de Resultados	31
Capítulo 4	40
4. Conclusão.....	40
Bibliografia	41

Nomenclatura

HPLC - *High performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance) ()

MOFs - *Metal Organic Frameworks*

ZIF - *Zeolitic Imidazolate Framework*

SLC - Sistemas de Liberação Controlada

UV – *Radiação eletromagnética ultra-violeta*

Índice de Figuras

Figura 1 - Variação da concentração do fármaco no organismo com o tempo. (a) Método convencional de multidosagem e (b) Método de libertação controlada. A letra A refere-se à administração do fármaco [Adaptado de 2].....	5
Figura 2 – Tipos de isotérmicas [Adaptado de 9].....	10
Figura 3 – Curva de Breakthrough para leito fixo [Adaptado de 15].	12
Figura 4- Blocos de construção dos MOFs [Adaptado de 18].	14
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura e função do MOF combinado com as suas propriedades toxicológicas e de biodegradação adequadas, as quais favorecem a sua bioaplicação [Adaptado de 22].....	15
Figura 6 - Estrutura molecular do Basolite Z1200 ZIF-8 [Adaptado de 23, 24].....	16
Figura 7 – Estrutura do adsorvente ZIF-8 [Adaptado de 25].	17
Figura 8 – Xantina e derivados – fórmulas estruturais [Adaptado de 12].....	19
Figura 9 - Solubilidade da cafeína em água [Adaptado de 12].	20
Figura 10 – Diagrama representativo de um sistema HPLC.	24
Figura 11 – Coluna final.....	26
Figura 12 – Sistema de degaseificação. A) Bomba de vácuo. B) Placa de agitação. ...	27
Figura 13 – Sistema utilizado no banho por ultrassons.	28
Figura 14 – Coluna empacotada com MOF. O MOF é vertido para o orifício representado pela letra A.	30
Figura 15-Efeito do caudal na curva de saturação da coluna preenchida com esferas...	32
Figura 16 – Efeito do caudal na curva de regeneração da coluna preenchida com esferas.	32
Figura 17 – Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de concentração 1 mg/L e caudal de 0.1 mL/min.	33

Figura 18 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.1 mL/min..	34
Figura 19 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.5 mL/min.	35
Figura 20 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.5 mL/min..	35

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Principais diferenças entre fisissorção e quimissorção [Adaptado de 10].....	8
Tabela 2 - Classificação dos poros segundo os seus diâmetros [Adaptado de 9].....	11
Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do adsorbato cafeína [11, 24, 28, 30].....	23
Tabela 4 - Propriedades físicas e químicas do adsorvente MOF - ZIF-8 [Adaptado de 22].....	23

Capítulo 1

Introdução

1.1. Estrutura da dissertação

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia experimental, utilizando um sistema de cromatografia líquida (HPLC), tendo por objetivo medir as isotérmicas de dessorção da cafeína, através da determinação experimental das curvas de saturação e regeneração da cafeína quando passa através de uma coluna preenchida com o material nanoporoso MOF ZIF-8.

O relatório encontra-se dividido em 4 capítulos. No primeiro capítulo é apresentada a introdução, onde é referenciada a importância do tema na atualidade e quais os objetivos propostos para o projeto. São também mencionados alguns conceitos teóricos necessários à compreensão do trabalho desenvolvido, nomeadamente acerca da libertação controlada de fármacos (*drug delivery*), descrevendo o que é e qual a sua finalidade. Neste tópico é dado um ênfase maior à cafeína e aos MOFs, pois são pontos essenciais deste estudo.

No segundo capítulo é apresentada a metodologia experimental utilizada para medição da capacidade de encapsulação e libertação controlada de fármacos, utilizando a cafeína como adsorvato e o MOF ZIF-8 como adsorvente.

No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados do trabalho experimental.

No capítulo final são expostas as conclusões relativas ao presente estudo, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros.

O desenvolvimento de materiais para a indústria farmacêutica sempre foi alvo de muita pesquisa e de muitos investimentos. Ao longo da história, muitas descobertas importantes foram feitas na área e muitas ainda estarão por vir.

Sabe-se, desde há muito tempo, que sempre que um fármaco é administrado, a um ser humano ou animal, apenas uma pequena parte da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação. Por essa razão ao longo dos últimos anos, tem sido aplicado um grande esforço relativo ao desenvolvimento de métodos para a libertação controlada de fármacos, com o objetivo de existir um maior controlo aquando da sua administração [1 - 4].

A terapêutica moderna é baseada numa estratégia racional de libertação controlada e alta especificidade das biomoléculas utilizadas. Os novos métodos para a administração de fármacos baseiam-se em diferentes tipos de encapsulamento (forma de transporte), como por exemplo as nanocápsulas, microcápsulas, microesferas poliméricas ou protéicas. Estas, por sua vez, libertam o fármaco, já no interior do organismo, em quantidades controladas e pré-definidas, de acordo com a forma que foi projetada, durante dias, semanas ou meses, passando por vários fatores (eliminação de primeira passagem, ligações a proteínas, ligações a outros tecidos, etc.), os quais podem interferir com a biodisponibilidade e conseqüente efeito terapêutico após reação no sítio ativo. [3, 4].

O controlo dos sistemas de libertação controlada em sítios ativos específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos. Os vetores incluem as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos investigadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e no armazenamento [5].

O estudo realizado por Figueiredo et al. [6], refere a utilização de um processo alternativo para controlar a libertação de fármacos o qual consiste na degradação progressiva da matriz. O processo referido pode ser induzido por condições extremas de pH ou pela presença de enzimas. Uma aplicação importante para os fármacos facilmente degradados pela acidez estomacal. Assim, a matriz mantém-se intacta durante a

passagem pelo estômago e degrada-se na parte inicial do intestino, por ação das enzimas, ou devido aos valores nessa parte do trato gastrointestinal [6].

Em 1997 foram sintetizados *polímeros impressos molecularmente* (Molecularly Imprinted Polymers – MIP), neste caso, um hidrogel que apresentava um grupo imidazol próximo da ligação do fármaco (ácido *p-aminobenzóico*) com o polímero. A síntese foi feita empregando-se os monómeros funcionais 2-hidroximetil metacrilato, N-vinilimidazol e metacrilóiletil-*p*-aminobenzoato, em diferentes proporções, na presença de íons Co^{2+} (Cobalto (II)). Os íons são importantes, pois aproximaram os monómeros funcionais N-vinilimidazol e metacrilóiletil-*p*-aminobenzoato formando um complexo coordenado mais estável. O ácido *p*-aminobenzóico foi liberto por hidrólise e este fenómeno foi estudado adicionando-se o polímero a uma solução tampão de etanol fosfato em pH 8. O teor de ácido *p*-aminobenzóico foi experimentalmente determinado periodicamente e os resultados mostraram que o polímero manteve a libertação do fármaco durante 14 dias [6].

Uma forma alternativa de promover a libertação controlada de fármacos consiste na utilização de materiais sujeitos à modificação de volume mediante alterações do ambiente em que se encontram. De forma geral, algumas alterações de natureza físico-química tais como temperatura, pH, força iónica, composição do solvente, campo eléctrico, presença de luz ou de algumas moléculas, são causas de mudanças estruturais significativas que resultam num aumento da matriz e no enfraquecimento das ligações com o fármaco. Quando se associa essa técnica com a impressão molecular, existe uma alta capacidade de armazenamento do fármaco, bem como a possibilidade de controlar a velocidade de libertação mediante uma alteração físico-química [6].

Os sistemas de libertação controlada possuem dois objetivos fulcrais: manter constante a concentração sanguínea de um determinado fármaco, assegurando uma maior biodisponibilidade e reduzir os efeitos secundários, realçando assim a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens ingeridas [7].

1.2.Libertação Controlada de Fármacos

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço das ciências. O sistema de liberação controlada de drogas vem revolucionando a indústria farmacêutica (produção de medicamentos), mas também a indústria química (derivados de petróleo, agroindústria, indústria civil na produção de tintas) [3].

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos, para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados. Assim, o termo fármaco engloba todos os compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético [1]. A liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou então conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar. Estes sistemas são designados por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos [1].

Alguns materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica, têm sido utilizados como suportes dos sistemas de liberação controlada. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais utilizados. Outros sistemas de administração convencionais, como spray, injeção e pílulas, apresentam um aumento na concentração do fármaco, logo após a administração do mesmo, atingem um pico máximo de dosagem no sangue e depois declinam, conforme o tempo de ação do medicamento. Com a liberação controlada consegue-se uma liberação moderada e constante do fármaco, o qual é administrado numa dose terapêutica durante um período prolongado [2, 3, 8].

A liberação controlada de fármacos permite controlar os níveis de toxicidade do princípio ativo provocados pela liberação de doses excessivas no organismo. Na Figura 1 são comparados os dois métodos de liberação, o convencional e o de liberação controlada, mostrando que o último mantém a concentração do medicamento no sangue de forma segura, tornando-se menos agressivo que o tratamento convencional [2].

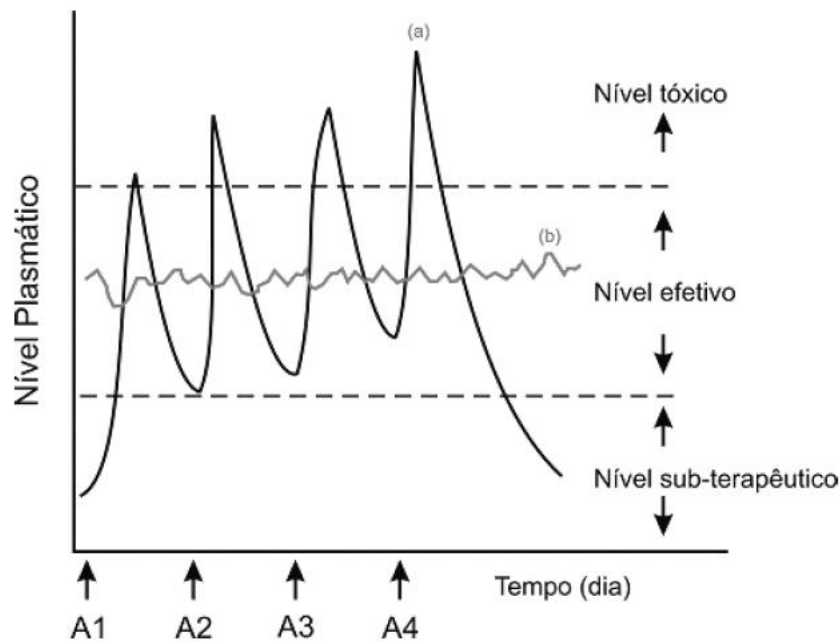


Figura 1 - Variação da concentração do fármaco no organismo com o tempo. (a) Método convencional de multidose e (b) Método de liberação controlada. A letra A refere-se à administração do fármaco [2].

Qualquer fármaco possui uma gama de ação terapêutica, acima do qual se torna tóxico e abaixo, ineficaz, sendo assim os níveis plasmáticos são dependentes das doses administradas, contudo é mais crítico se a dose efetiva estiver mais próxima do nível tóxico [2].

O interesse crescente em sistemas de liberação controlada de fármacos confirma-se pelo fato de que oferecem inúmeras vantagens quando comparados com os sistemas convencionais, tais como [2, 3, 8];

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;

- Natureza e composição dos encapsuladores variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco;
- Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas;

O sistema de liberação controlada necessita de uma barreira química ou física para que a liberação do fármaco seja proporcionada de forma lenta. Diversas técnicas têm sido estudadas de forma a obter uma barreira eficaz para a liberação controlada do fármaco: utilização de revestimentos, retenção do fármaco numa matriz polimérica ou compósita e microencapsulação [2].

Atualmente, existem dois processos distintos de encapsulação – método orgânico (utilizam-se macromoléculas dendríticas ou polímeros biocompatíveis) e método inorgânico (utilizam-se sólidos porosos inorgânicos, como zeolíticas). No método orgânico é possível encapsular uma grande variedade de fármacos, no entanto é difícil conseguir uma liberação controlada na ausência de porosidade bem definida. O segundo método é realizado pelo enxerto de moléculas orgânicas sobre as paredes dos poros, isto implica uma redução da capacidade de carga dos fármacos [9].

Para além destes processos, existem alguns pontos nesta nova tecnologia que necessitam ser amadurecidos e considerados com cuidado, por exemplo, é difícil interromper a ação farmacológica de um medicamento administrado por estes dispositivos, além do alto custo dos polímeros biodegradáveis. Há, também, o risco de nanopatologia, ou seja, a presença de nanopartículas de natureza inorgânica em tecidos humanos que não são metabolizados e têm excreção dificultada, resultando em efeitos secundários como febre, hepatomegalia (aumento do tamanho do fígado) e acidose metabólica (acidez excessiva do sangue provocada por uma anormal concentração baixa de bicarbonato), o que obriga os investigadores a rever os conceitos de biodisponibilidade nestes sistemas [8].

No sistema de libertação controlada também se observam alguns pontos negativos, pois apenas se utilizam fármacos que possuem baixo tempo de meia-vida com dificuldade de absorção no trato gastrointestinal, impossibilidade de interromper de imediato o efeito terapêutico em caso de intolerância ou intoxicação do paciente e risco de acumulação do fármaco no organismo com baixa velocidade de eliminação [2].

1.3.Dessorção

O estudo particular da física e química das superfícies é extremamente importante para o avanço e aplicação nas mais diversas áreas de investigação e tecnologia. O mecanismo designado por dessorção tem sido cada vez mais estudado com o objetivo de analisar as interações entre partículas e a superfície, principalmente no que se refere às ligações químicas [10].

A dessorção consiste num fenómeno físico-químico de transferência no qual um ou mais constituintes de uma fase gasosa ou líquida são transferidos para a superfície de uma fase sólida. Se o adsorvente utilizado tiver alta capacidade de dessorção, for seletivo e possuir longo tempo de vida, então o processo de dessorção é viável, subentendendo-se assim, que este processo depende da natureza e da estrutura do adsorvente, das propriedades físico-químicas do adsorvato e do próprio ambiente no qual a dessorção tem lugar. O local onde ocorre a dessorção é designado de interface. A fase que adsorve é designada adsorvente, a substância que é adsorvida é denominada adsorbato e existe ainda o adsorvito que corresponde ao ião ou molécula em solução que tem o potencial de ser adsorvido [9 - 11].

A dessorção pode ser vista como uma técnica atrativa para a eliminação de uma grande gama de contaminantes na água, especialmente, no controlo da poluição do meio ambiente, a grande escala [12].

Quando o processo de dessorção envolve apenas forças de Van der Waals, não há alteração química das moléculas adsorvidas, e a energia de dessorção é pequena (da mesma ordem de grandeza do calor de condensação) designando-se por dessorção física ou fisissorção. Eventualmente podem-se estabelecer ligações químicas, formando-se um composto químico de superfície, ou complexo de superfície, e a energia de dessorção é de mesma ordem de grandeza da energia envolvida numa reação, designando-se por

dessorção química ou quimissorção. Na tabela 1 são apresentadas as principais diferenças entre os dois tipos de dessorção [10].

Tabela 1 – Principais diferenças entre fisissorção e quimissorção [Adaptado de 10].

Dessorção Física	Dessorção Química
Causada por forças de Van der Waals	Causada por forças electrostáticas e ligações covalentes
Não há transferência de eletrões	Há transferências de eletrões
Calor de dessorção: 2 – 6 Kcal/mol	Calor de dessorção: 10 – 200 Kcal/mol
Fenómeno geral para qualquer espécie	Fenómeno específico e seletivo
A camada adsorvida pode ser removida por aplicação de vácuo à temperatura de adsorção	Camada adsorvida só é removida por aplicação de vácuo e aquecimento a temperatura acima da de dessorção
Formação de multicamadas abaixo da temperatura crítica	Somente há formação de monocamadas
Acontece somente abaixo da temperatura crítica	Acontece também a altas temperaturas
Adsorvente quase não é afetado	Adsorvente altamente modificado na superfície

O processo referido é influenciado por diversos fatores como a temperatura (a capacidade de dessorção diminui com o aumento da temperatura), a natureza do soluto e o pH [11].

Quando se aborda a dessorção numa interfase líquido-sólido, constata-se que as partículas presentes na fase líquida podem mover-se, com certa facilidade, através de distâncias mais ou menos longas, o mesmo não ocorre numa fase sólida. Além disso, ao contrário das superfícies líquidas, as superfícies sólidas não se contraem [10].

Para uma interfase sólido-líquido constituída por um líquido ocorre uma certa orientação das mesmas. Em consequência, a estrutura na interfase e no interior da fase líquida torna-se diferente. A concentração das moléculas de líquido na interfase é,

portanto, diferente da concentração no interior do líquido. A quantidade de soluto adsorvido varia com a concentração na solução e pode ser obtida através das isotérmicas de dessorção [10].

1.4. Isotérmicas de Dessorção

É importante ter uma descrição do estado de equilíbrio entre as duas fases que compõem o sistema de dessorção, de forma a representar adequadamente um processo de dessorção dinâmica. A dessorção pode ser avaliada quantitativamente através das isotérmicas. Estas mostram a relação de equilíbrio entre a concentração na fase líquida e a concentração nas partículas adsorventes (fase sólida) para uma determinada temperatura. Desta forma, as isotérmicas de dessorção podem ser representadas por expressões matemáticas que relacionam a quantidade adsorvida em função da pressão ou da concentração, a uma determinada temperatura [10].

A isotérmica de dessorção, propriedade de base termodinâmica dos processos de separação, é a relação entre a concentração de soluto na fase sólida e na fase móvel. Os parâmetros da isotérmica de dessorção podem ser determinados pelo ajuste de um modelo matemático aos dados experimentais. Por esta razão, é possível prever o perfil das bandas individuais dos componentes da amostra separadas sob várias condições, de forma a otimizar as condições de separação. O sucesso dos resultados experimentais e o respetivo modelo está diretamente relacionado com a exatidão das isotérmicas e dos parâmetros exigidos em cada modelo matemático [13].

Na dessorção, como já referido, o pH, a temperatura e, principalmente, os tipos de adsorventes são parâmetros que influenciam a forma da isotérmica. As isotérmicas podem, normalmente, ser representadas por equações que relacionam diretamente o volume adsorvido em função da pressão e/ou concentração do adsorvato e as mais utilizadas no estudo da dessorção são: Langmuir, Freundlich, Henry, Temkin, Giles e Brunauer - Emmett - Teller (BET) [10, 11].

1.4.1. Tipos de Isotérmicas

O formato da isotérmica é função do tipo de porosidade do sólido. São várias os tipos de isotérmicas, atualmente conhecidos, contudo, todas são variações de seis tipos principais. Os primeiros cinco tipos foram introduzidos por Brunauer em 1938, sendo o sexto tipo proposto mais tarde [9].

Na figura 2 são apresentados os seis tipos de isotérmicas referidas. A isotérmica do tipo I é característica de sólidos com microporosidade. As isotérmicas do tipo II e IV são típicas de sólidos não porosos e de sólidos com poros razoavelmente grandes, respetivamente. As isotérmicas do tipo III e V são características de sistemas onde as moléculas do adsorvato apresentam maior interação entre si do que com o sólido. Estes dois últimos tipos não são de interesse para a análise da estrutura porosa. A isotérmica do tipo VI é obtida através da dessorção de um gás por um sólido não poroso de superfície quase uniforme, o que representa um caso muito raro entre os materiais mais comuns [9].

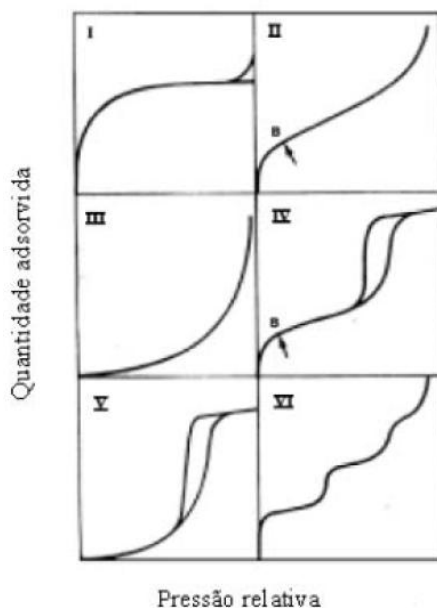


Figura 2 – Tipos de isotérmicas [9]

O tipo de isotérmica é função do efeito do tamanho do poro sobre o fenómeno de adsorção. De acordo com as curvas conhecidas, foi estabelecida uma classificação dos poros em função do seu diâmetro, como mostra a tabela 2, uma vez que este é o seu principal parâmetro dimensional [9].

Na figura 2 pode-se observar o fenómeno da histerese entre os processos de adsorção e dessorção. A isotérmica do tipo IV, nada mais é do que a isotérmica do tipo II com o fenómeno de histerese, que será mais pronunciado quanto maior for a dispersão de tamanhos do poro. A ausência de histerese não significa a ausência de porosidade, já que alguns formatos do poro podem levar a processos iguais de adsorção e dessorção [9].

Para sólidos microporosos, a isotérmica do tipo I mostra um ramo quase vertical na primeira região da curva. Isto deve-se à grande facilidade de adsorção em poros com diâmetros menores que 0.002 μm . Após o preenchimento dos microporos, que acontece em ordem crescente do tamanho, praticamente não há outras regiões onde a adsorção seja significativa [9].

Tabela 2 - Classificação dos poros segundo os seus diâmetros [Adaptado de 9].

Classificação	Diâmetro (μm)
Microporo	$\phi < 0.002$
Mesoporo	$0.002 \leq \phi < 0.05$
Macroporo	$\phi \geq 0.05$

A isotérmica do tipo II, resultado da dessorção num sólido não poroso, mostra um aumento rápido da quantidade de gás adsorvido para valores baixos de pressão relativa. Este comportamento deve-se à forte interação das primeiras moléculas de gás com os sítios mais ativos do sólido. Após o preenchimento desses locais, o gás passa a interagir com os de baixa energia. Isso pode ser visualizado pela menor inclinação da região central da isotérmica. Na região final da curva ocorre um aumento rápido da quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa, pois ocorre uma formação de camadas múltiplas e uma posterior condensação. Podem retirar-se informações sobre a área do sólido ao observar-se a primeira região da curva, isto é, a região onde se tem a formação da monocamada [9].

1.4.2. Curva de “Breakthrough” ou Curva de Rutura

O valor do tempo decorrido do início do processo de adsorção até à saturação completa da coluna depende de fatores como [14]:

Capacidade de adsorção do leito.

Caudal de alimentação da mistura.

Concentração de soluto na mistura.

Define-se então que a relação da modificação da concentração do efluente na saída da coluna pelo tempo é denominada curva histórica da concentração, ou ainda, curva de “breakthrough” (figura 3). A previsão e interpretação desta curva é uma etapa fundamental no projeto de engenharia dos leitos fixos [14].

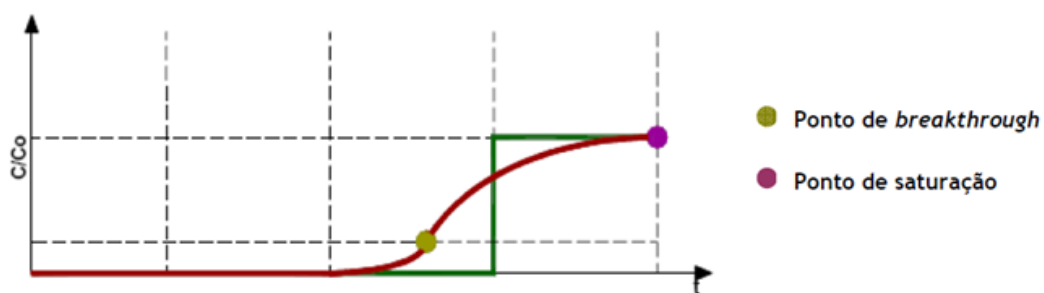


Figura 3 – Curva de Breakthrough para leito fixo [15].

Se o processo de adsorção fosse infinitamente rápido, a curva de “breakthrough”, em condições favoráveis, corresponderia a um degrau, porém parâmetros como a natureza do equilíbrio de adsorção, a velocidade do fluido, a concentração do soluto na mistura de alimentação e o comprimento do leito de adsorção, são fatores determinantes para a forma característica da curva [14].

1.5. MOFs (*Metal Organic Frameworks*)

Desde a primeira metade do século XIX, a partir dos estudos de Berzelius, os catalisadores são investigados pela comunidade científica e aplicados em diversos processos industriais. Ao longo da evolução dos estudos da Catálise, a introdução de técnicas de caracterização superficiais, a modelização molecular e o desenvolvimento

de métodos de síntese avançados transformaram a preparação de catalisadores de uma arte à base da tentativa e erro (a partir do conhecimento químico e experiência do pesquisador) numa ciência multidisciplinar que permite o projeto molecular de catalisadores sólidos específicos para determinada aplicação. Destacam-se o desenvolvimento na síntese de zeólitos, “*zeotypes*” e materiais mesoporosos, que permitiram a introdução, identificação e otimização de sítos ativos bem definidos (protões, ácidos de Lewis, redox) na estrutura destes materiais [16].

Desde o início do século XXI têm surgido inúmeras investigações acerca dos sólidos híbridos porosos, principalmente no que respeita às estruturas cristalinas formadas e à porosidade dos compostos. Assim, surgiram diversas estruturas diferentes que levaram alguns autores e cientistas a considerar esta nova família de compostos como uma evolução, pois estes novos sólidos porosos são detentores de uma grande versatilidade estrutural [17].

Numa abordagem simples, os MOFs são uma classe recente de sólidos híbridos porosos, que resultam da reação entre espécies orgânicas e inorgânicas ligadas entre si de forma a originar uma rede tridimensional cujo esqueleto contém ambas as espécies – orgânica e inorgânica – ligadas entre si por fortes ligações [17, 18].

Esta definição abrange contudo, uma grande variedade de metais e moléculas orgânicas com diferentes características, pois estes podem ser, sólidos porosos, não porosos ou cristalinos [17].

Com o grande desenvolvimento desta família de compostos, foi necessária a definição de um novo vocabulário. Nas primeiras redes híbridas abertas, a parte inorgânica continha, quer compostos poliédricos isolados, quer pequenos grupos. Por esta razão, estes sólidos foram numa primeira instância, denominados de polímeros de coordenação. No entanto, foi posteriormente demonstrado que estes sólidos híbridos poderiam conter partes inorgânicas com grande dimensionalidade, permitindo a formação de cadeias (1D), camadas (2D) e até redes inorgânicas (3D). Assim, esta nova família ficou denominada de MOFs – *Metal Organic Frameworks*. A parte inorgânica e a sua dimensionalidade, possui um papel decisivo na topologia e propriedade dos MOFs [17].

Nos MOFs, os solventes possuem interações mais fracas com a rede e, desta forma tornam mais acessível o desenvolvimento da estrutura a temperaturas mais baixas, bem

como uma porosidade mais facilmente acessível por moléculas vizinhas. Além disso, a existência de metades orgânicas e inorgânicas na estrutura permite a coexistência das partes hidrofílicas e hidrofóbicas entre os poros, o que pode desempenhar um papel crucial nas propriedades de dessorção do composto [17].

Os MOFs são essencialmente formados por blocos de construção que ligam iões metálicos com ligantes orgânicos como se observa na figura 4. Existem três atributos que permitem rotular um sólido como o MOF: a forte ligação que lhe confere robustez, vinculação nas unidades e a estrutura geometricamente bem definida o que implica que devem ser altamente cristalinos. Estes elementos normalmente possuem baixa densidade ($0.2 - 1 \text{ g/cm}^3$) e uma área de superfície elevada ($500 - 4500 \text{ m}^2/\text{g}$), são altamente porosos e são razoavelmente estáveis térmica e mecanicamente. A maior vantagem dos MOFs em comparação com outros materiais nanoporosos, como os zeólitos é a sua capacidade de ajustar a estrutura e funcionalidade durante a síntese [19].

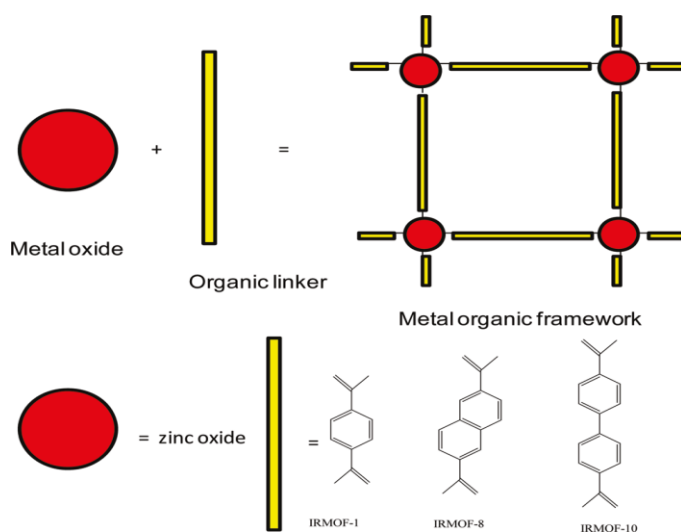


Figura 4- Blocos de construção dos MOFs [18].

Os MOFs possuem um elevado potencial para aplicações como o encapsulamento e libertação controlada de fármacos, armazenamento de gás, separação, catálise e química medicinal por diversas razões, além das mencionadas anteriormente, estes compostos podem ser construídos a partir de materiais não tóxicos (Fe, Zn, Ca, Mg, entre outros) e de baixa toxicidade como ácidos carboxílicos ou ácidos fosfóricos. Grande parte dos

MOFs são biodegradáveis, pelo menos até certo grau, por exposição a meio aquoso, o seu micro ambiente interno hidrófilo-hidrófobo é adequado para preparação de uma grande variedade de moléculas ativas. Estes compostos são versáteis, permitindo modular a entrega do fármaco, ajustando as interações hospedeiro-hóspede, através da introdução de vários grupos funcionais polares ou apolares dentro da parte orgânica do MOF e/ou alterando a estrutura do sólido (conetividade, tamanho dos poros e flexibilidade) para controlar a difusão através da estrutura porosa [20, 21].

Como qualquer nova classe de materiais, surgem preocupações que são inevitáveis em relação às propriedades toxicológicas, no entanto os MOFs já estão disponíveis como uma ampla gama de compostos químicos, toxicologicamente aceitáveis para utilização em aplicações na área da saúde [22].

Como está representado na figura 5 a função e a estrutura dos MOFs combinada com as suas aceitáveis propriedades toxicológicas, de biodegradação, de biocompatibilidade e a sua estabilidade adequada torna-os uma oferta promissora para posterior aplicação biológica [22].

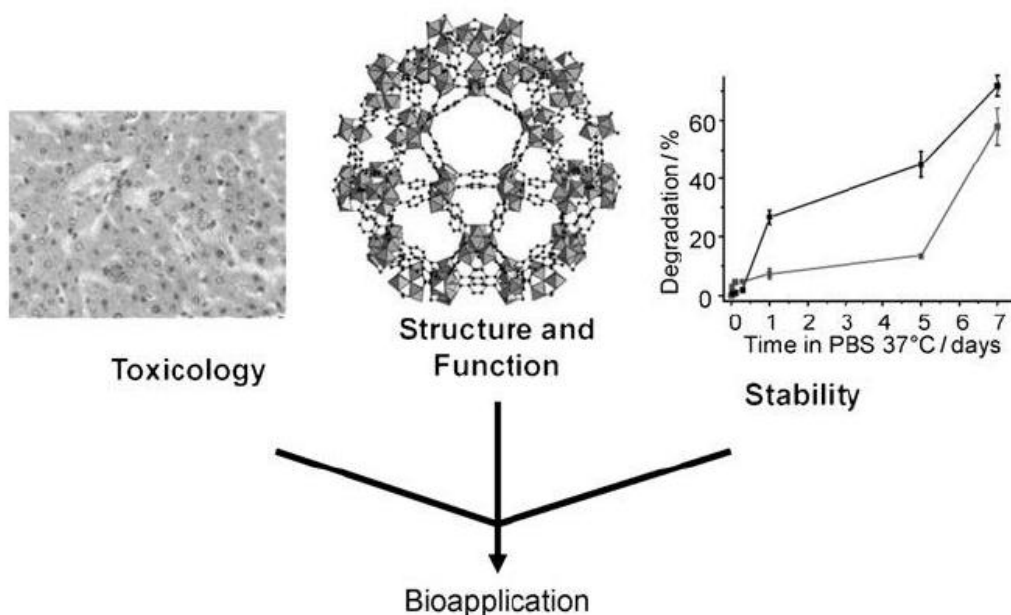


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura e função do MOF combinado com as suas propriedades toxicológicas e de biodegradação adequadas, as quais favorecem a sua bioaplicação [22].

A figura 5 mostra algumas propriedades dos MOFs (baixa toxicidade, estabilidade e boa estrutura), que associadas entre si permitem a sua aplicação biológica e uma das aplicações biológicas mais importantes dos MOFs é o facto de estes serem potenciais nanoencapsuladores [22].

Esta abordagem tem sido estudada com o uso de nanopartículas de MOF (nanoMOFs) compatíveis com a administração intravenosa. Estes nanoMOFs, constituídos por carboxilatos de ferro porosos não tóxicos e biodegradáveis, são adequados para o encapsulamento e libertação controlada de um amplo número de moléculas terapêuticas, incluindo antitumores e medicamentos antiretrovirais, bem como agentes cosméticos. As suas capacidades exceccionalmente elevadas de encapsulamento de drogas (até 42% do seu peso) bem como a libertação prolongada (de 3 a 14 dias), sem quaisquer efeitos de rutura, fazem dos nanoMOFs uma (r)evolução das nano-partículas [22].

Ao longo do presente trabalho foram realizados testes com o MOF ZIF-8, com o intuito de comprovar que estes são potenciais encapsuladores de fármacos e que podem ser utilizados como possíveis sistemas de libertação controlada de fármacos.

Na figura 6 é apresentada a estrutura molecular do Basolite Z1200 ZIF-8 com fórmula química $C_8H_{12}N_4Zn$.

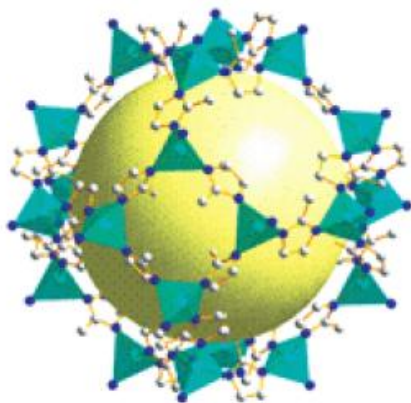


Figura 6 - Estrutura molecular do Basolite Z1200 ZIF-8 [23, 24].

Nos zeolitic *imidazolate frameworks* (ZIFs) os catiões Zn^{2+} são coordenados para quatro ligantes de 2-metilimidazolato, resultando num material híbrido com topologia de sodalite zeolítico, onde as cadeias de sodalite são ligadas umas às outras por janelas de

anel de seis membros. O diâmetro dos poros é de 1.16 nm e a abertura é de 0.34 nm [25].

Estudos recentes em dessorção de parafinas lineares e ramificadas em ZIF-8 por cromatografia gasosa de fase inversa (técnica de fase gasosa para a caracterização de superfícies e propriedades intensas de materiais sólidos, que funciona de forma inversa a uma cromatografia gasosa convencional) mostraram que alcanos lineares podem ser absorvidos por cadeias de ZIF-8 enquanto os alcanos ramificados são excluídos [25].

Os ZIFs são uma nova classe de cristais porosos com estruturas tridimensionais prolongadas construídas a partir de iões metálicos tetraédricos (por exemplo, Zn, Co, Fe, Cu) em ponte por imidazol (IM). Notavelmente, os ZIFs apresentam porosidade permanente e elevada estabilidade térmica (até 500°C) e química, o que os torna interessantes para muitas aplicações, tais como a separação e armazenamento de gases [26].

Os ZIFs possuem uma estrutura altamente porosa, como mostra a figura 7 e elevada capacidade de absorção de CO₂. Os pequenos poros de ZIF-8 permitem a separação de hidrogénio a partir de moléculas de gás maiores [22].

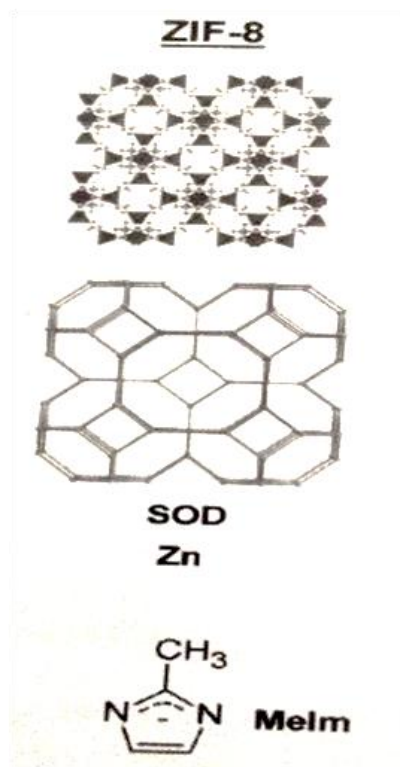


Figura 7 – Estrutura do adsorvente ZIF-8 [25].

1.6.Cafeína

Os produtos naturais utilizados para a obtenção da cafeína através de diferentes métodos, são em grande parte solventes orgânicos imiscíveis em água, geralmente prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, podendo apresentar toxicidade acumulativa. Um dos métodos de obtenção da cafeína consiste na descafeinação do café, onde se obtém um café com quantidades mínimas de cafeína. A cafeína extraída é purificada e posteriormente comercializada [12].

Na extração utilizando água, o material a ser extraído entra em contacto com a água e extrai a cafeína, posteriormente, a solução obtida é misturada com solvente orgânico que extrai o alcaloide (cafeína), o qual é recuperado do solvente por destilação. A vantagem da extração com a utilização de água como agente extrator deve-se ao facto de se obterem grandes taxas de extração, eliminação de ceras insolúveis e obtenção de uma cafeína mais pura [12].

A cafeína foi descoberta e isolada do café pelo químico Ferdinand Runge em 1820 na Alemanha. Em 1827 foi também isolada do chá preto por Oudry [12].

Na natureza, a cafeína é encontrada em mais de 63 espécies de plantas e é hoje considerada como substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, por pessoas de todas as idades, independente do sexo e da localização geográfica. As plantas que contêm cafeína são encontradas ao longo de todo o globo terrestre, tanto em regiões de clima frio como tropical [11, 27].

A cafeína faz parte do grupo das bases de purina e é quimicamente conhecida por 1,3,7 – trimetilxantina ou trimetildioxipurina. A cafeína, a teofilina (1,3 – dimetilxantina) e a teobromina (3,7 – dimetilxantina) são bases deste grupo de purina que possuem importância farmacêutica e que são todas derivadas da xantina, quimicamente conhecida por 2,6 – dioxipurina, como mostra a figura 8 [12].

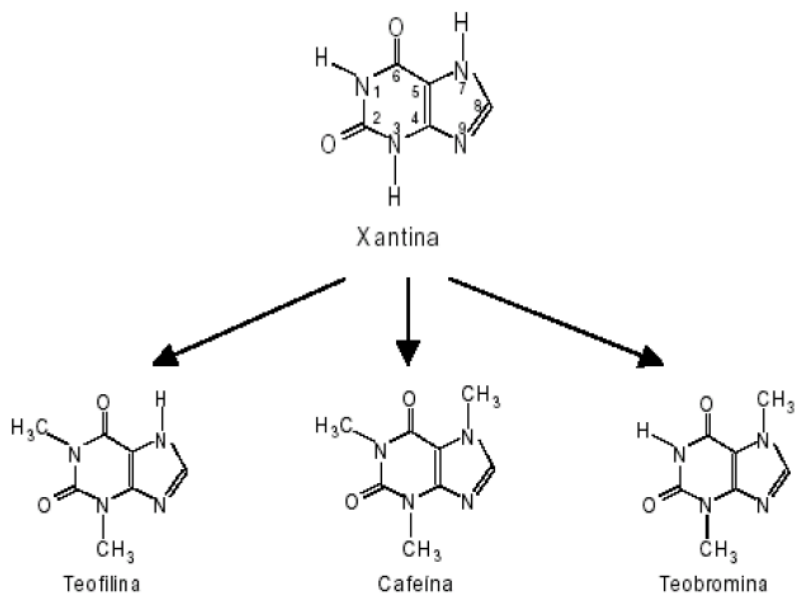


Figura 8 – Xantina e derivados – fórmulas estruturais [12].

As substâncias que derivam da xantina diferenciam-se pela potência das suas ações farmacológicas sobre o sistema nervoso central. A cafeína é uma substância capaz de excitar e restaurar as funções cerebrais e bulbares, sendo normalmente utilizada e livremente comercializada, por não causar muita dependência. A cafeína tem sido classificada como uma droga, pois é caracterizada por efeitos farmacológicos de ação estimulante, podendo ser encontrada em alguns medicamentos como agente para antagonizar o efeito calmante de certos fármacos [12].

Na figura 9 é apresentada a solubilidade da cafeína em água. De acordo com alguns autores, a solubilidade da cafeína em clorofórmio é cerca de nove vezes maior que em água, à mesma temperatura. A cafeína é inodora, mas possui um sabor amargo. É relativamente tóxica e apresenta uma dose letal de 75 mg / Kg, mas para se obter uma dose letal de cafeína, o indivíduo teria de ingerir uma quantidade muito grande de café num curto período de tempo [12].

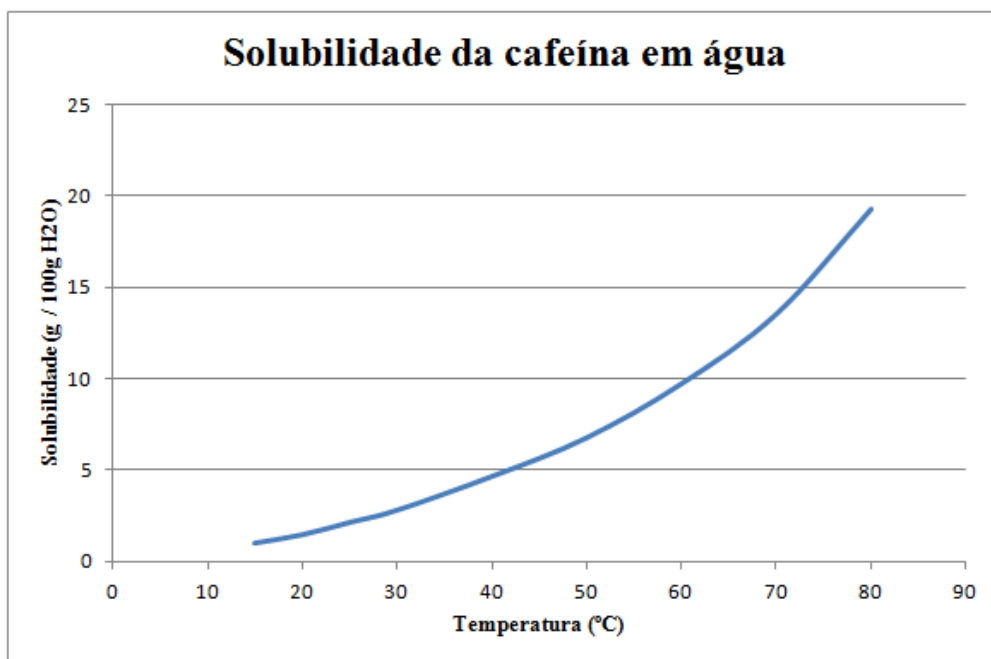


Figura 9 - Solubilidade da cafeína em água [Adaptado de 12].

A cafeína é classificada como um alcaloide farmacologicamente ativo e não apresenta valor nutricional. Os alcaloides são substâncias orgânicas nitrogenadas de carácter básico, geralmente de origem vegetal e que provocam efeitos fisiológicos característicos no organismo humano, nomeadamente, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostasia de cálcio. Do ponto de vista químico, os alcaloides não constituem um grupo homogêneo de substâncias. Quase todos, porém, apresentam estrutura química derivada de um composto heterociclo. Uma classificação química de alcaloides baseia-se na estrutura deste heterociclo: alcaloides da piridina (ex.: nicotina), alcaloides de xantina (ex.: cafeína) [12].

Devido aos efeitos provocados pela cafeína no sistema nervoso central, algumas pessoas preferem usar café descafeinado. A descafeinação reduz o conteúdo de cafeína do café para aproximadamente 0.03%. O café descafeinado (onde a cafeína é o subproduto da descafeinação) tem um mercado muito grande nos EUA e na Europa. A extração da cafeína dos grãos de café é realizada utilizando CO₂ supercrítico e o café geralmente utilizado neste processo é o *canephora* pois possui um teor de cafeína maior que 2% [12].

Na medicina, a cafeína tem sido usada para auxiliar no tratamento de dores, principalmente, nas dores de cabeça e enxaquecas. Mais recentemente a cafeína tem sido usada como coadjuvante em muitos remédios para o controlo do peso, alívio de alergias e auxiliar no estado de atenção [12, 27].

O consumo de cafeína estimula a lipólise (quebra das moléculas de gordura no organismo), o que, teoricamente, favorece o emagrecimento. No entanto, essa ação ocorre a um custo elevado para o organismo, com mobilização dos depósitos de gordura fazendo aumentar os níveis da mesma no sangue. Desta forma, pode haver um aumento dos níveis de colesterol sanguíneo e, conseqüentemente, aumento do risco de enfarte. A mobilização dos depósitos de gordura pode ser útil para atletas em treinamento intenso, fazendo com que o organismo utilize a gordura como fonte de energia em detrimento do glicogénio muscular, tornando o corpo mais resistente à fadiga. Por estas razões o seu uso é cada vez mais comum no meio desportivo [12].

Quanto aos efeitos metabólicos da cafeína, esta é rápida e eficientemente absorvida, através do gastrointestinal, após administração oral. Esta substância pode ser administrada de diversas formas, sendo de realçar a administração intraperitoneal, injeções subcutânea ou intramuscular e aplicação de supositórios. Todos os tecidos podem ser alvo da ação desta substância, uma vez que o seu transporte é feito através da corrente sanguínea, sendo posteriormente degradada e excretada pela urina na forma de co-produtos. Nos humanos, a maior parte do metabolismo da cafeína ocorre pela mudança na posição do grupo metil 1,3,7 possibilitando uma metabolização com predominância (84%) na forma de paraxantina (1,7-dimetilxantina), seguida de teofilina (1,3-dimetilxantina) e de teobromina (3,7-dimetilxantina), sendo esses dois últimos metabolizados em menor quantidade [12].

De acordo com a análise e investigação dos diversos tipos de aplicações medicinais da cafeína e do estudo das suas características, durante este trabalho, surgiu a oportunidade de testar este alcaloide como um possível sistema de libertação controlada de fármacos.

É de realçar que a utilização da cafeína como um sistema de libertação controlada de fármacos no organismo é apenas um caso de estudo e pretendem-se obter resultados promissores durante o projeto, focado na capacidade de encapsulamento e posterior libertação controlada de fármacos através da cafeína, uma vez que este alcaloide é já encontrado em alguns fármacos.

Capítulo 2

2. Parte Experimental

Neste trabalho pretende-se medir as curvas de saturação e regeneração da cafeína quando passa através de uma coluna preenchida com o MOF ZIF-8, através da aplicação de uma técnica de cromatografia líquida num sistema de HPLC.

Neste capítulo serão apresentados os reagentes e os materiais utilizados, além de que será descrito todo o processo experimental e equipamento necessário para a sua realização.

2.1.Reagentes e Materiais

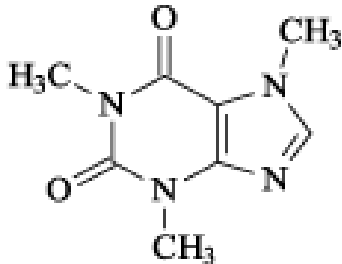
2.1.1.Adsorvato

Neste trabalho, a cafeína foi o adsorvato escolhido, foi adquirido na Sigma-Aldrich (Pureza > 99%) e não foi submetido a qualquer processo antes da sua utilização. Na tabela 3 está representada a estrutura molecular e as propriedades físico-químicas deste adsorvato.

A cafeína é encontrada, principalmente nas sementes de café e nas folhas de chá verde e é consumida na sua maioria em bebidas, no entanto, esta também é encontrada em fármacos, por exemplo em antigripais [28, 29].

A absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV) pela cafeína foi descrita no início do século XX, posteriormente, descobriu-se que a cafeína apresenta um valor máximo de absorção no UV entre os comprimentos de onda de 271 e 275 nm [27].

Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do adsorvato cafeína [11, 24, 28, 30].

Estrutura Molecular	Propriedades
	Massa Molar [g/mol]: 194.19 Ponto de ebulição [K]: 628.2 Ponto de fusão [K]: 508 – 511 Solubilidade em água a 15°C [g/100g H ₂ O]: 1,00 Massa Volúmica [g/cm ³]: 1.321 – 1.333 Volume molar a 298 K [mL/mol]: 144

2.1.2. Adsorvente

Como adsorvente foi utilizado o MOF ZIF-8 e foi adquirido sob a sua forma comercial na *Sigma-Aldrich* e este não foi submetido a qualquer teste antes da sua utilização. Na tabela 4 são apresentadas as propriedades referentes a este adsorvente.

Tabela 4 - Propriedades físicas e químicas do adsorvente MOF - ZIF-8 [Adaptado de 22].

ZIF-8 (C ₈ H ₁₂ N ₄ Zn)	
Aparência:	Pó branco
Tamanho da partícula:	4.9 µm
Massa molar:	229.60 [g/mol]
Área de superfície total:	1300-1800 [m ² /g]
Solubilidade	Insolúvel (H ₂ O e solventes orgânicos)

2.2.Equipamento

2.2.1.Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas com a sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina [31].

Na figura 10 é possível observar-se um esquema representativo da constituição básica de um sistema de HPLC. Este sistema foi ajustado para medir as curvas de rutura e é um equipamento da marca *Jasco*.

Nesta técnica o eluente é alimentado através de uma ou mais bombas, que asseguram a passagem de um caudal controlado ao longo dos diversos componentes do sistema cromatográfico,

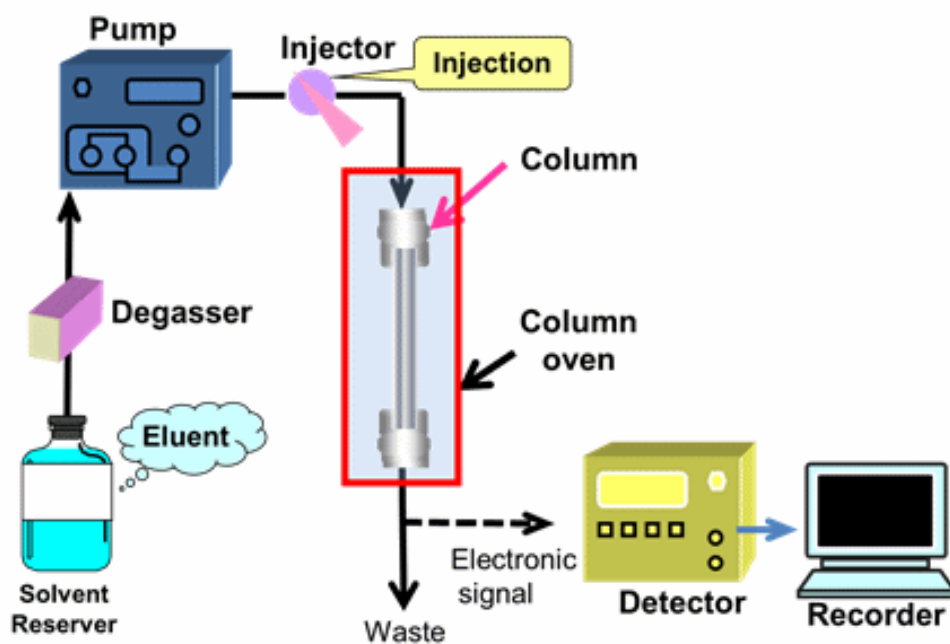


Figura 10 – Diagrama representativo de um sistema HPLC.

Na figura 10 pode observar-se que o equipamento de HPLC utilizado é constituído por uma bomba, *PU-2080 plus inteligente pump* que bombeia o solvente presente no reservatório, denominado de fase móvel até à coluna. A separação dos componentes da fase estacionária ocorre na coluna.

A captação da fase móvel é feita através de um filtro presente no tubo que está no reservatório, este filtro remove as partículas suspensas também chamadas de impurezas, que podem obstruir a linha de passagem do líquido ou contaminar a bomba e a coluna.

Alguns gases, como o oxigénio ou nitrogénio normalmente têm tendência para ser dissolvidos pela fase móvel, por esta razão deve ser previamente desgaseificada, de maneira a não prejudicar a performance da coluna e do detetor, *UV-2075 plus inteligente detetor*. É necessário ter sempre atenção à fase móvel, pois no caso de esta estar abaixo do filtro existe entrada de ar, ocorrendo a formação de bolhas de ar no tudo que liga o reservatório até à válvula. Neste caso é necessário abrir a purga e direccionar o solvente para o esgoto e com o auxílio de uma seringa retiram-se as bolhas de ar. Este procedimento deve ser repetido sempre que se inicia um teste.

A fase móvel quando sai do reservatório é direccionada para a válvula de injeção e posteriormente para a coluna, quando ultrapassa a coluna circula até ao detetor, local onde, neste caso é medida a absorvância do eluente. O valor de absorvância é posteriormente convertido num sinal elétrico que é enviado para um sistema de aquisição de dados (computador) e convertido pelo programa *SRI – Peak Simple chromatography data system*, num ficheiro *Excel* para tratamento de dados.

A massa de cafeína, era sempre medida numa balança e posteriormente diluída. A mistura era preparada num balão volumétrico utilizando como solvente água destilada sendo posteriormente passada para um frasco de vidro. A fase móvel é depois alimentada ao sistema de cromatografia líquida.

A separação é efetuada na fase estacionária e baseia-se na diferença de tempo com que os solutos se distribuem entre a fase móvel e a fase estacionária. O tempo de retenção na coluna relaciona-se com a maior ou menor afinidade entre os solutos e o adsorvente.

Como já foi referido, o detetor mede de forma contínua as propriedades físico-químicas da amostra, enviando através do programa *Peak Simple* um sinal para o computador.

Enquanto o sinal é enviado para o computador, existe um acesso visual em tempo real às curvas de saturação e regeneração.

Após a leitura da absorvância pelo detetor, a solução é transportada por um tubo que faz a ligação desde o detetor até ao recipiente que contém os restos.

2.2.2.Coluna

A coluna é um dos elementos fulcrais do sistema de HPLC, pois é nesta que está contida a fase estacionária – local onde ocorre a separação dos componentes da amostra.

A coluna, presente na figura 11, utilizada neste projeto experimental já estava presente no laboratório, é feita de aço inoxidável e possui 4 cm de comprimento.

A coluna foi empacotada, para os testes iniciais com esferas de vidro de 1 mm de diâmetro e posteriormente com MOF ZIF-8.



Figura 11 – Coluna final.

2.2.3.Bomba de Vácuo e Placa de Agitação

Como já foi referido anteriormente é necessário proceder à degaseificação da fase móvel para não danificar o sistema de HPLC.

Existem alguns problemas associados à entrada de bolhas de ar, como a redução de caudal que leva a uma queda de pressão no sistema. Se a bolha possuir dimensões elevadas a bomba não empurra o solvente e com isto a pressão diminui e se esta estiver a um valor menor que o definido (neste caso 50 MPa), a bomba pode parar.

Outro problema associado às bolhas de ar é quando estas passam desde a solução inicial até à bomba, no entanto quando chega ao detetor, a pressão do sistema volta à pressão atmosférica e a bolha pode aparecer no interior da célula de fluxo do detetor, causando

picos no cromatograma, como aconteceu em alguns testes realizados, que foram posteriormente repetidos.

Este método, tem por objetivo a remoção do ar para que não ocorra a formação de bolhas, para tal foi utilizado um sistema de desgaseificação, como mostra a figura 12. Neste sistema é utilizada uma bomba de vácuo com ajuda de uma placa de agitação. Esta técnica foi utilizada ao longo de todo o estudo.



Figura 12 – Sistema de desgaseificação. A) Bomba de vácuo. B) Placa de agitação.

2.3.Procedimento Experimental

Antes de qualquer teste era necessário proceder à manutenção do equipamento de HPLC, para tal retiravam-se os filtros dos tubos e colocavam-se num goblé com acetona pura e eram levados a um banho de ultrassons, como representa a figura 13, duas vezes durante 15 minutos.

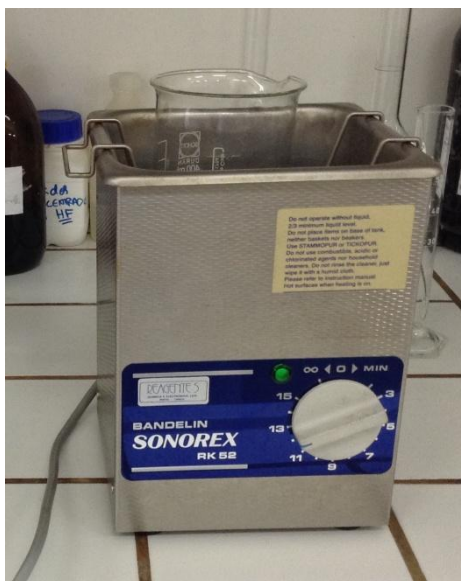


Figura 13 – Sistema utilizado no banho por ultrassons.

Após o banho por ultrassons, os filtros eram colocados novamente no sistema de HPLC. Fazia-se então passar o solvente durante 10 minutos pelos tubos, diretamente para o esgoto.

Para se verificar se o sistema estava a funcionar de forma correta observava-se sempre a pressão e o caudal.

De forma a se confirmar o caudal estabelecido na bomba, decidiu-se proceder à sua medição experimental periodicamente. Para tal, utilizou-se uma proveta e um cronómetro. Estas medições foram realizadas utilizando apenas água destilada como eluente.

2.3.1.Preparação das soluções

2.3.1.1.Solução de Cafeína

Neste estudo experimental prepararam-se soluções aquosas de cafeína com concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mg/ml.

Inicialmente colocou-se a massa de cafeína sobre um vidro de relógio e pesava-se na balança até acertar a massa desejada. Esta massa era vertida para dentro de um balão volumétrico de 1000 ml, adicionou-se água destilada e mexeu-se até dissolver o

fármaco. Posteriormente esta solução era transferida para dentro de um frasco de vidro de 1000 ml e colocou-se a desgaseificar durante 10 horas.

Fez-se passar as soluções de cafeína pela coluna em três situações distintas: numa fase inicial a coluna estava vazia, depois foi empacotada com esferas de 1 mm de diâmetro e por fim empacotada com o MOF previamente preparado. Este procedimento foi utilizado para se poder perceber qual o efeito provocado pelo MOF aquando da capacidade de dessorção e encapsulamento.

2.3.1.2.Preparação do MOF

O MOF ZIF-8 possui a forma de um pó muito fino e para se poder empacotar a coluna, este necessita de ser submetido a alguns processos físicos.

Inicialmente adicionou-se uma ou duas gotas de etanol ao MOF para se poder criar uma pasta. A pasta obtida foi a uma prensa, onde sofreu uma pressão de, no máximo, 4 toneladas, para não destruir os cristais. No final obteve-se uma pastilha.

A pastilha foi então triturada e pesada. Ao pesar constatou-se que o valor da massa estava sempre a diminuir, isto acontecia devido à evaporação constante do etanol. Para a activação da amostra colocou-se no forno e fez-se uma rampa em que a temperatura variava 1°C por minuto. A temperatura inicial foi de 28°C e a temperatura final de 170°C. Este processo durou 12 horas.

Quando se retirou a pastilha triturada do forno, procedeu-se ao empacotamento da coluna, como representa a figura 14. O empacotamento foi realizado com o auxílio de uma microespátula.



Figura 14 – Coluna empacotada com MOF. O MOF é vertido para o orifício representado pela letra A.

No final do empacotamento da coluna, foi colocado o *fritz* de $0.1\mu\text{m}$ na extremidade aberta. Depois de colocados os *fritz*, a coluna era posta no sistema de HPLC com o auxílio de chaves inglesas, pois tinha de estar bem apertada para não verter solvente.

Quando a coluna estava empacotada e colocada no sistema de HPLC, já se podiam realizar os testes de dessorção, para tal, era necessário colocar os frascos, devidamente degaseificados, no seu local e iniciar o processo. O processo era iniciado quando se realizava o *switch*, ou seja, após o bombeamento completo da fase móvel, desde o recipiente até ao detetor, através do tubo correspondente à fase móvel, e é através do *switch* que é realizada uma troca.

De acordo com o caudal estipulado, fazia-se a injeção enchendo o tubo na totalidade, este tem início no recipiente que contém a fase móvel até à coluna que contém a fase estacionária (estrutura sólida e porosa) no seu interior. Todos os testes foram realizados a temperaturas entre os 18 e os 20°C .

Todos os valores obtidos em *Excel* eram normalizados entre 0 e 1.

Capítulo 3

3. Apresentação e Discussão de Resultados

Como já foi referido, todos os resultados obtidos neste estudo foram tratados em *Peak-Simple* (programa inerente ao sistema de HPLC) e Excel, sendo que o *Peak-Simple* apenas servia para visualizar os dados durante o processo. Os resultados obtidos por este programa eram automaticamente exportados para um ficheiro *Excel* (.xls), onde eram tratados.

Foram realizados *ensaios em branco*, onde o principal objetivo é determinar qual o comprimento de onda, mais adequado para cada caudal de entre os selecionados previamente (0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7 e 10 ml/min). Os *ensaios em branco* consistiam em passar uma solução de cafeína com concentração de 1 mg / L por uma coluna vazia e posteriormente por uma coluna preenchida com esferas de 1 mm de diâmetro. No final da passagem da cafeína era necessário limpar a coluna e por isso fazia-se passar, do mesmo modo, água destilada pela coluna.

O estudo realizado aquando da passagem da cafeína pela coluna designa-se por *saturação*. O estudo realizado aquando da passagem da água destilada para eliminar a cafeína tem o nome de *regeneração*.

Na figura 15 é apresentado o gráfico correspondente à curva de saturação quando a solução passa através da coluna preenchida com esferas de vidro. Pode-se verificar que à medida que se aumenta o caudal, o tempo de saturação diminui.

Na figura 15 são também apresentados os comprimentos de onda mais adequados a cada caudal e verifica-se que estes variam entre os 275 e os 290 nm, contudo foram testados também os comprimentos de onda de 260 e 270 nm. A escolha do melhor comprimento de onda para cada caudal tem por objectivo obter a melhor resolução no estudo das curvas de saturação ou regeneração.

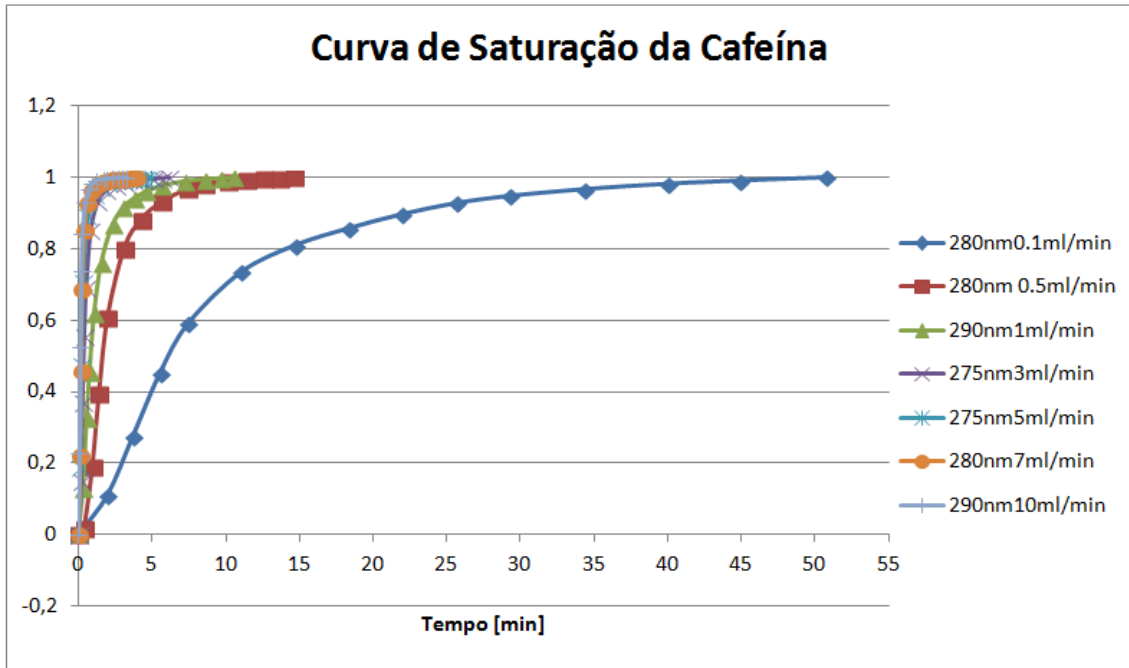


Figura 15-Efeito do caudal na curva de saturação da coluna preenchida com esferas.

Na figura 16 é apresentado o mesmo estudo mas para as curvas de regeneração.

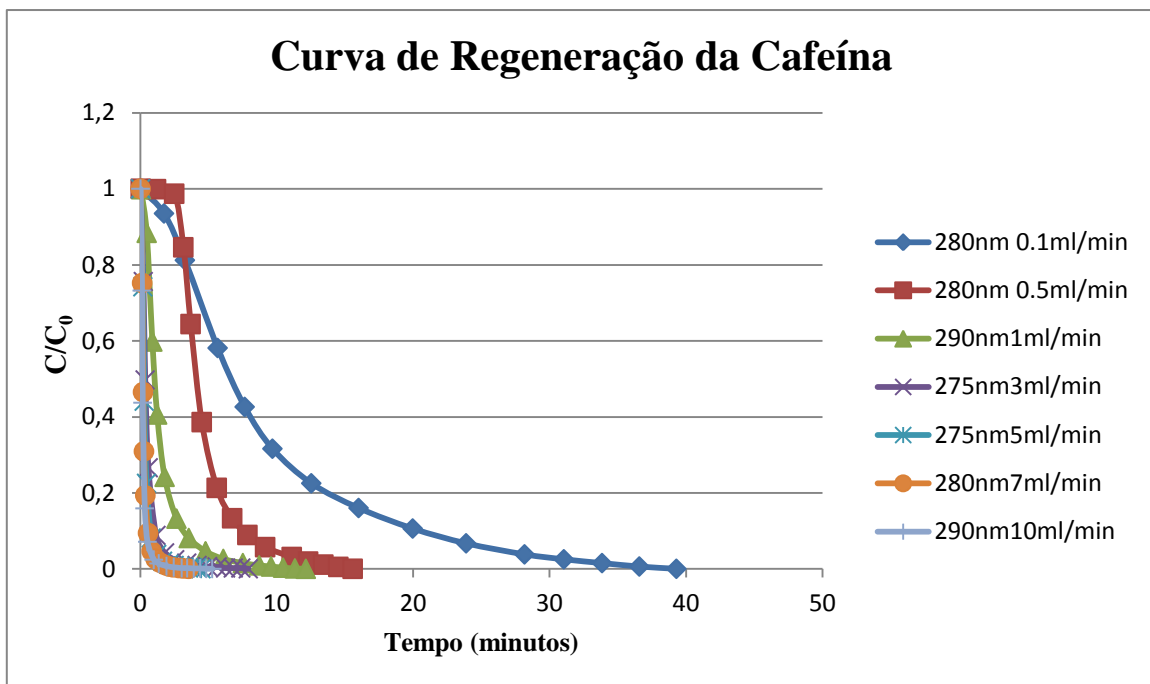


Figura 16 – Efeito do caudal na curva de regeneração da coluna preenchida com esferas.

Como explicado no procedimento experimental, as diferentes soluções de cafeína foram passadas pela coluna de 3 diferentes formas: vazia, preenchida com esferas de 1 mm de

diâmetro e preenchida com o MOF, de forma a estudar os tempos de passagem da cafeína na coluna quando esta está preenchida com um inerte ou com o MOF.

Nas figuras seguintes irão ser apresentados os resultados relativos a estes testes. Foram testados diversos caudais: 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 ml/min, no entanto foram escolhidos apenas os 3 caudais menores para a apresentação de resultados.

Na figura 17, estão representadas as curvas de saturação referentes a um caudal de 0.1 ml/min com uma solução de cafeína de concentração 1 mg/L. O gráfico compara as curvas entre os três diferentes tipos de coluna.

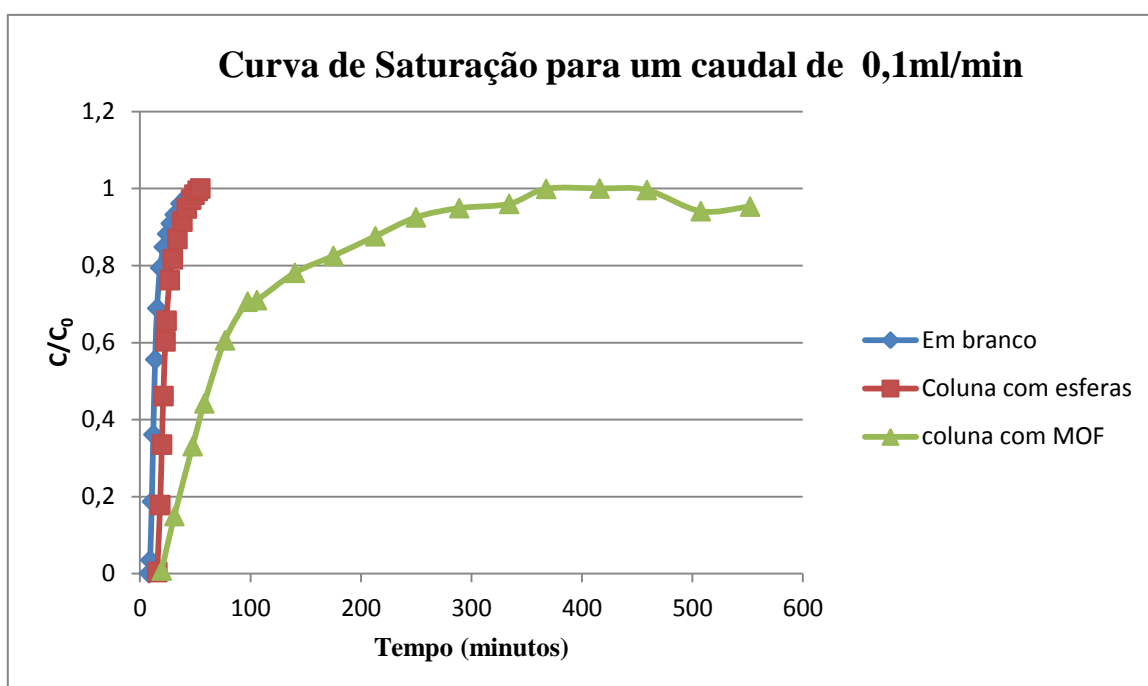


Figura 17 – Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de concentração 1 mg/L e caudal de 0.1 mL/min.

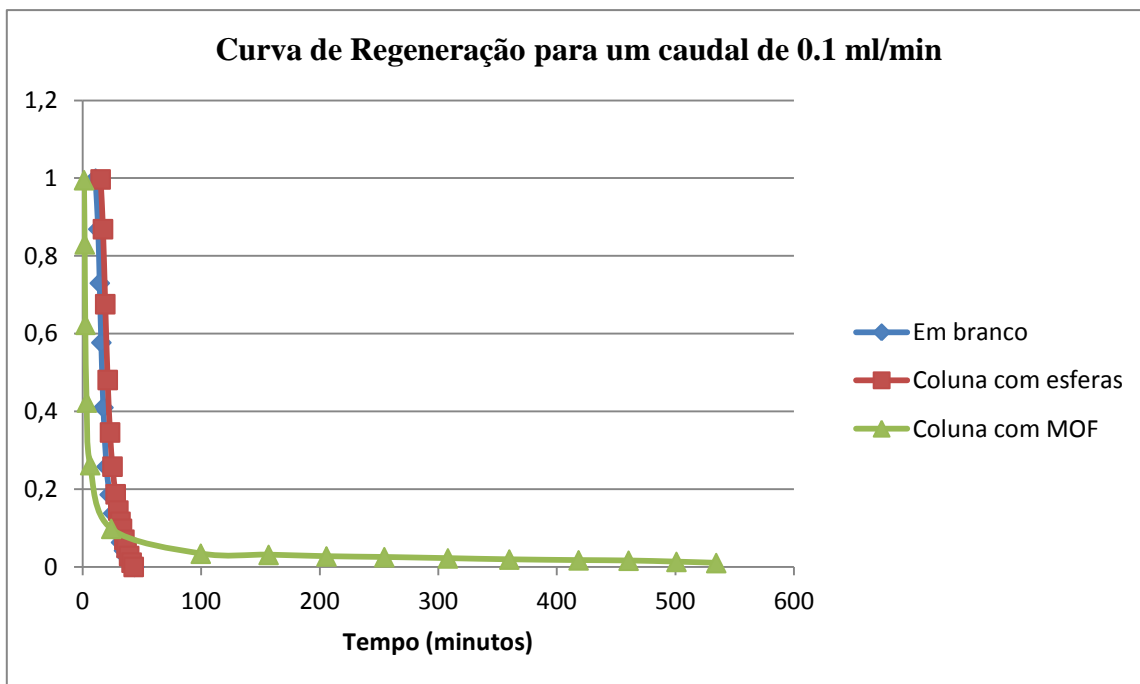


Figura 18 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.1 mL/min..

Quando se observam as figuras 17 e 18 conclui-se que quando se utiliza uma coluna vazia ou com esferas, os tempos de saturação e regeneração são muito semelhantes, no entanto quando se compara este tempo com a passagem da solução numa coluna preenchida com MOF, o tempo aumenta mais de 5 vezes, o que mostra que o MOF tem a capacidade de encapsular a cafeína.

As figuras 19 e 20 representam, respetivamente a comparação entre as curvas de saturação e regeneração referentes a um caudal de 0.5 ml/min.

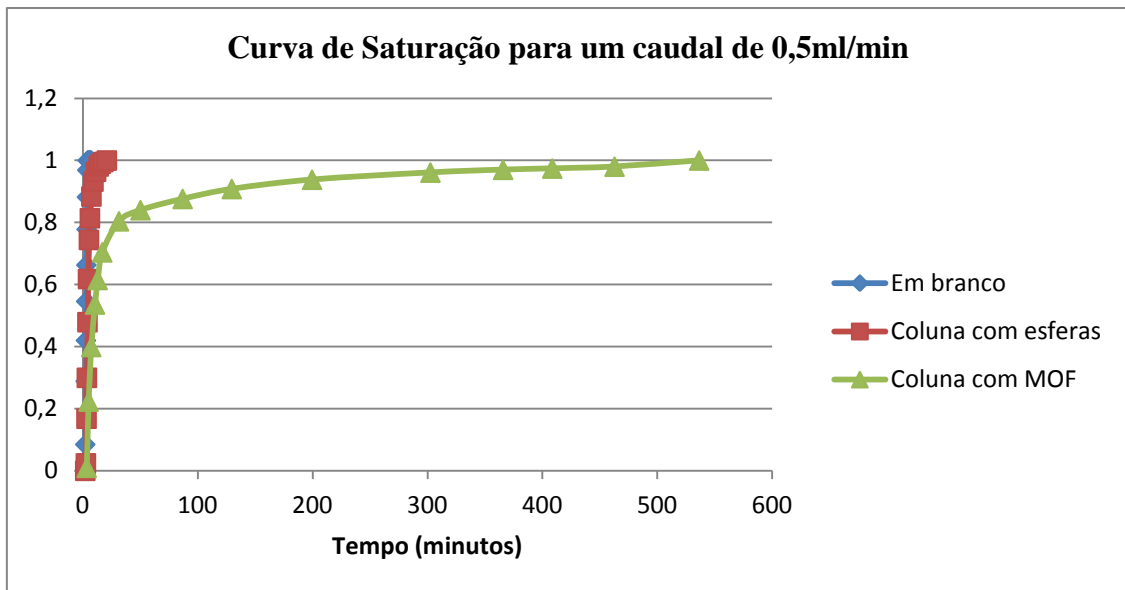


Figura 19 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.5 mL/min.

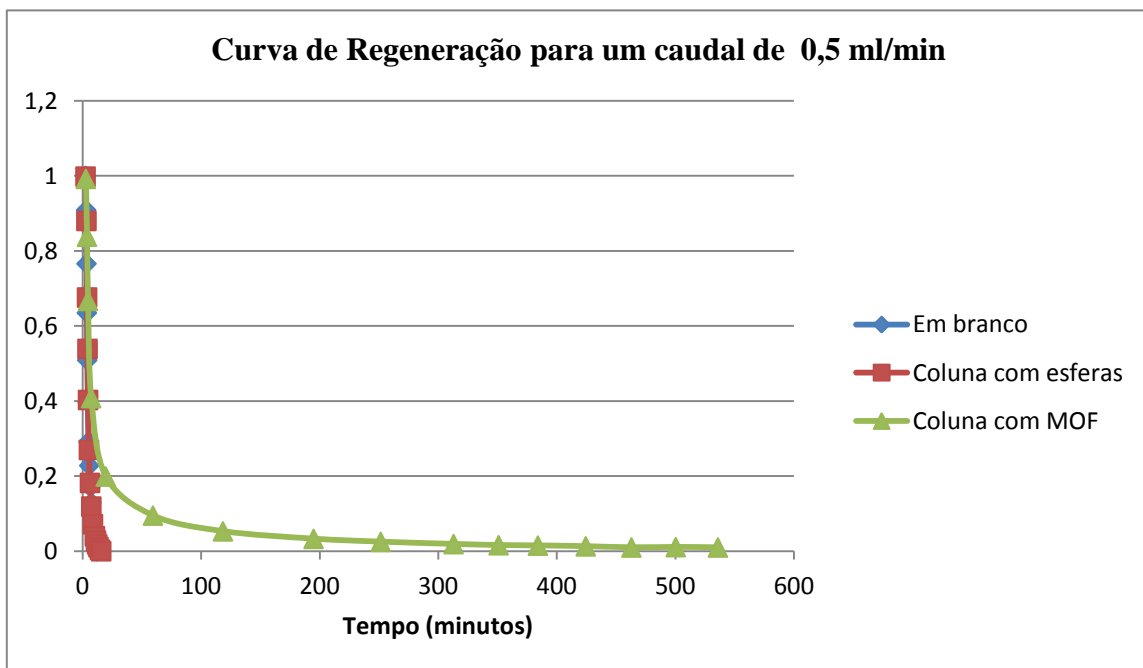


Figura 20 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 0.5 mL/min..

Na observação das figuras 19 e 20, verifica-se a mesma situação que no caudal de 0.1 ml/min, ou seja, para uma coluna vazia ou preenchida com esferas o equilíbrio é atingido muito mais rápido que para uma coluna preenchida com MOF, pela mesma

razão apresentada anteriormente, ou seja, o MOF tem a capacidade de encapsular a cafeína

Nas figuras 21 e 22 são exibidos os resultados referentes às curvas de saturação e regeneração para um caudal de 1 ml/min e uma solução de cafeína de concentração 1 mg/L.

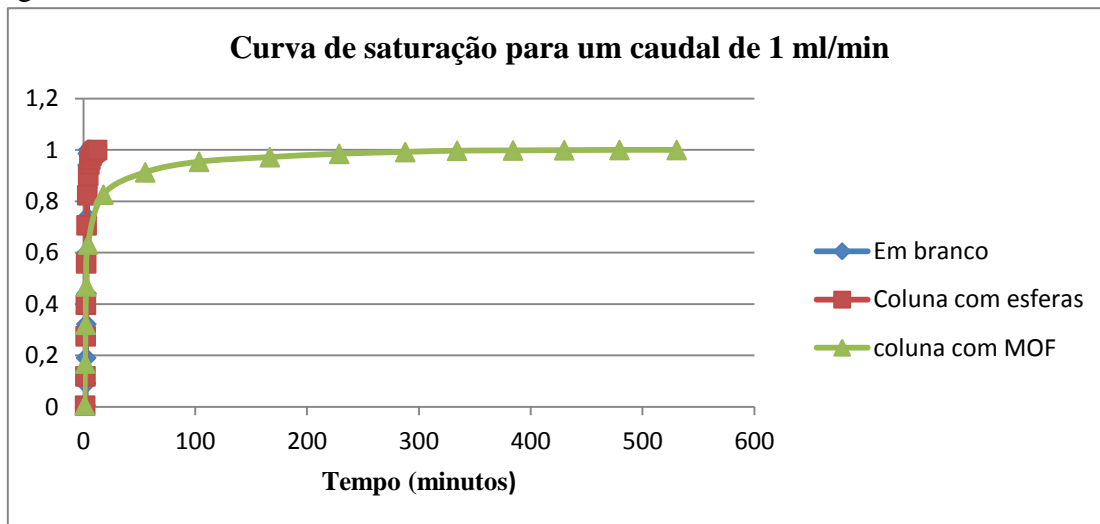


Figura 21 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 1 mL/min.

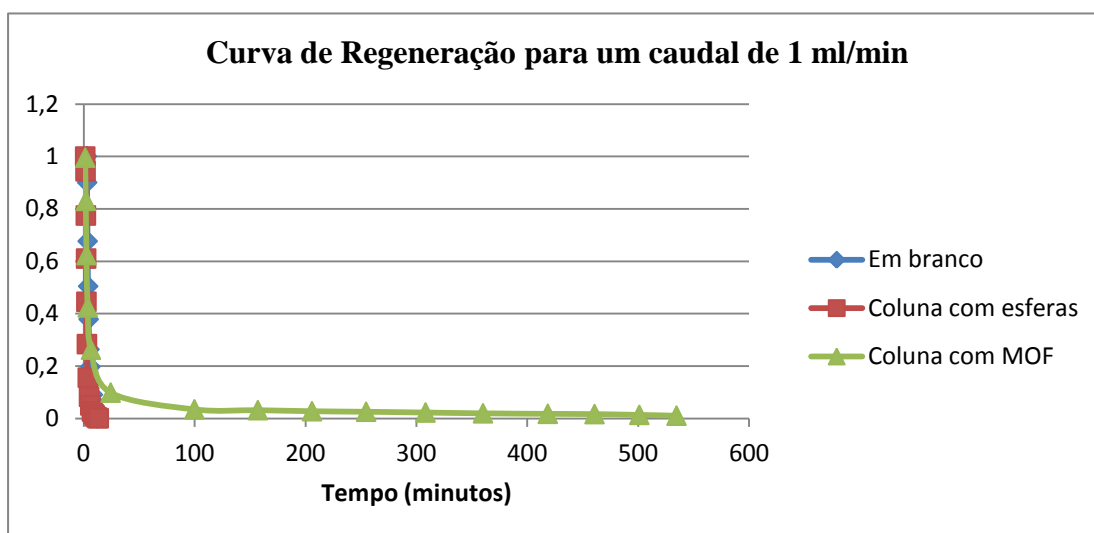


Figura 22 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para uma solução de cafeína de 1 mg/L e caudal de 1 ml/min..

Para o caudal de 1 ml/min, as curvas de saturação e regeneração são obtidas de forma mais rápida que para os caudais inferiores.

A partir das figuras 18, 20 e 22, é possível concluir que o tempo necessário para a água destilada “limpar” toda a cafeína encapsulada, presente no sistema, é praticamente instantâneo para uma coluna vazia ou preenchida com esferas, ao invés de uma coluna preenchida com MOF – ZIF 8 que demora cerca de 500 minutos.

Como um dos objetivos era comparar o tempo de regeneração ao variar a concentração da solução de cafeína, nas figuras seguintes são exibidos os resultados referentes a este estudo

Na figura 23 mostra-se a comparação, para um caudal fixo de 0.1 ml/min, entre as concentrações de 0.1 mg/L, 0.5 mg/L e 1 mg/L.

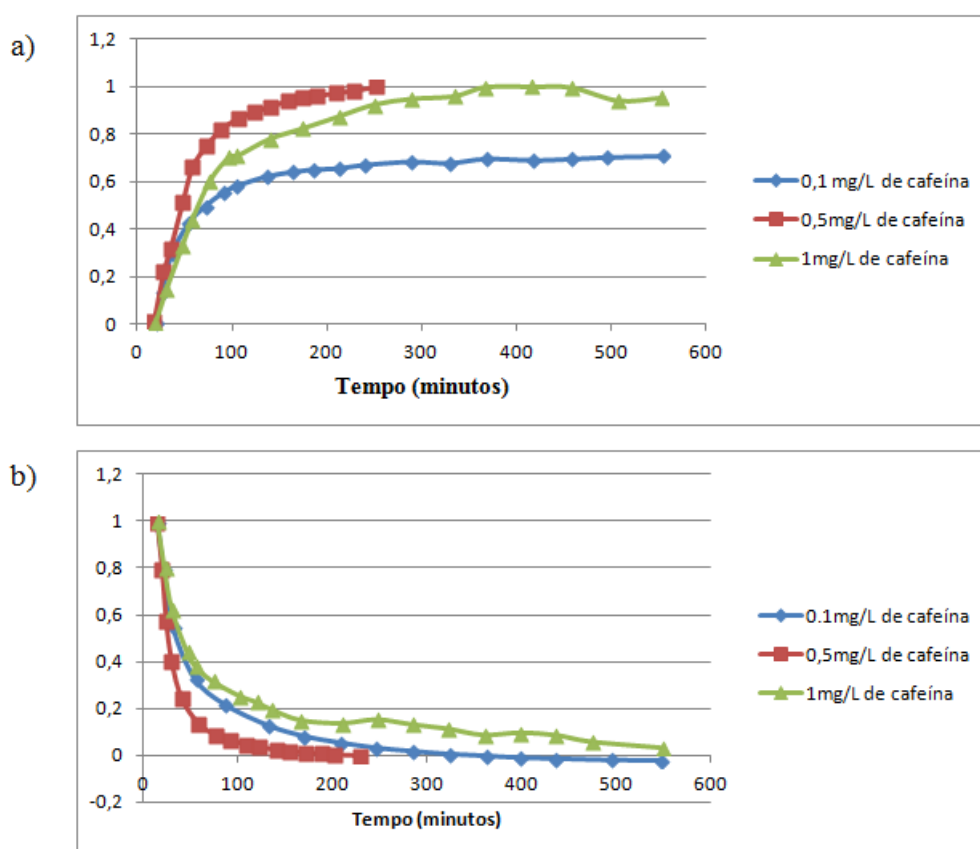


Figura 23 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para diferentes soluções de cafeína a caudal fixo de 0.1 mL/min.. a) Curva de saturação. b) Curva de regeneração.

Após a análise da figura 23, constata-se que a regeneração é mais rápida quando a coluna foi saturada com uma solução de cafeína de 0.5 mg/L. Para as outras soluções o

tempo até atingir a fase de equilíbrio é semelhante, rodando os 550 minutos, tanto para saturação como para regeneração.

A partir da figura 23a), é possível concluir que a concentração de MOF-ZIF 8 aumenta rapidamente até aos 20 minutos, no entanto a saturação da coluna ocorre muito mais tarde. Aos 250 minutos, para todas as concentrações, a coluna está praticamente saturada com MOF-ZIF 8.

Na figura 24 pode analisar-se uma comparação entre as três soluções preparadas para um caudal de 0.5 ml/min.

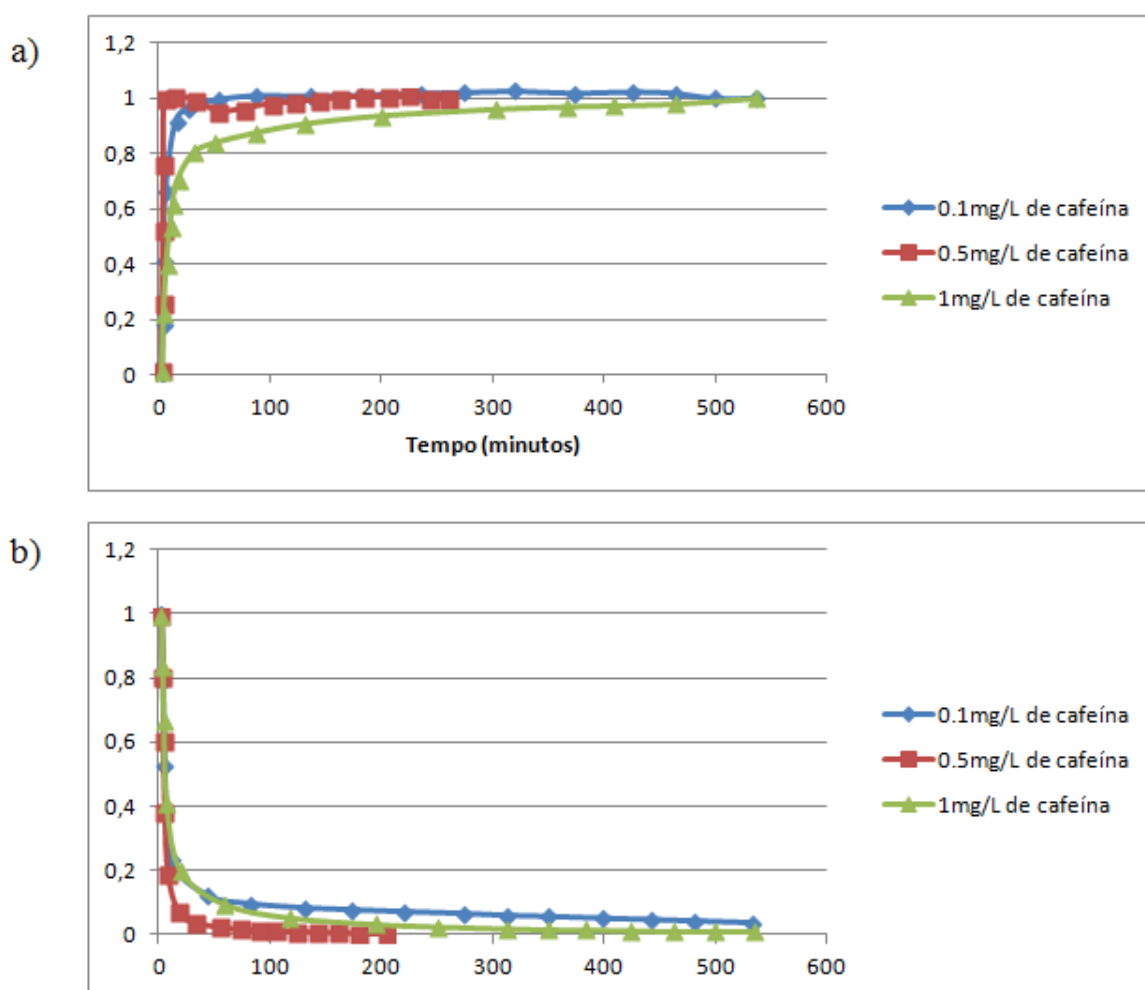


Figura 24 Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para diferentes soluções de cafeína a caudal fixo de 0.5 mL/min. a) curva de saturação. b) curva de regeneração.

Como observado para o caudal de 0.1 ml/min, também para o caudal de 0.5 ml/min, a fase de equilíbrio é atingida mais facilmente para uma solução de 0.5 mg/L que para as restantes soluções. Existe uma melhor adsorção do MOF-ZIF 8 para a concentração de 1mg/L porque a fase de equilíbrio é atingida aos 200 minutos, ao invés das outras concentrações (0.1mg/L e 0.5mg/L), onde a fase de equilíbrio é atingida aos 550 minutos, aproximadamente.

Na figura 25 é exibido o mesmo estudo agora para um caudal de 1 ml/min.

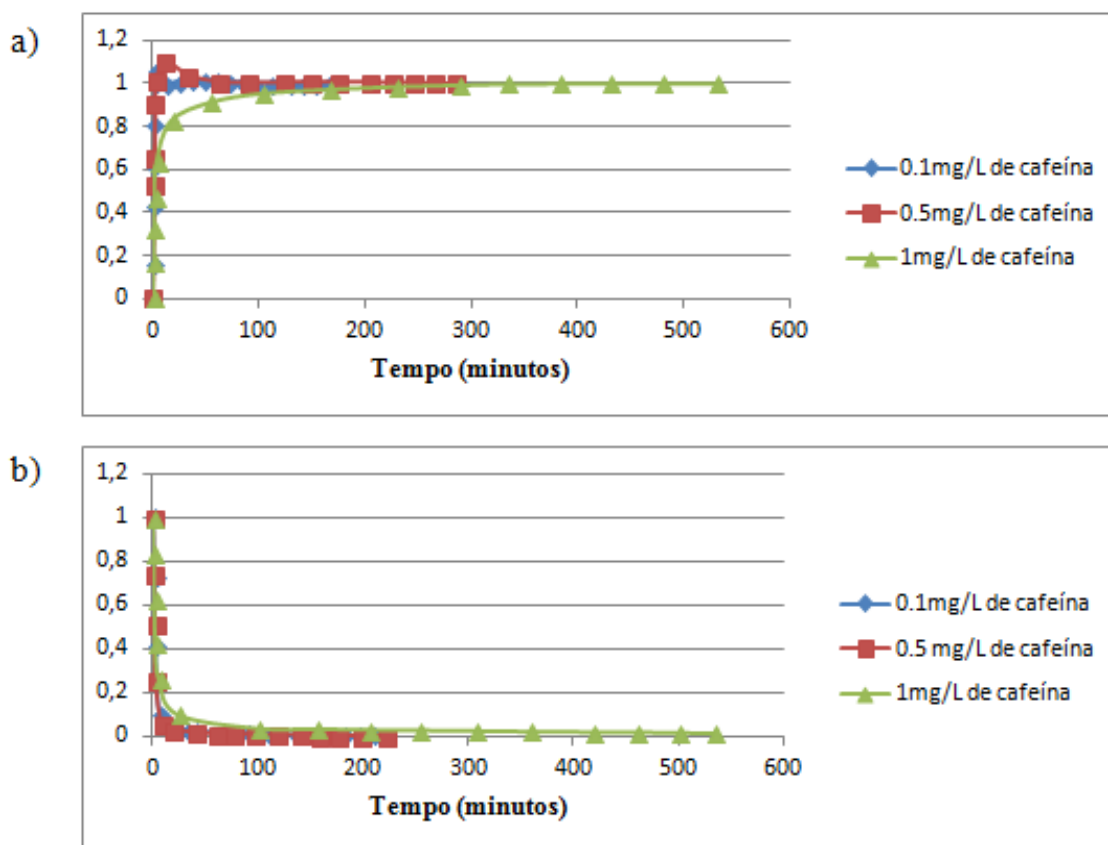


Figura 25 - Comparação das curvas de regeneração entre os três testes efetuados para diferentes soluções de cafeína a caudal fixo de 1 mL/min. a) Curva de saturação. b) Curva de regeneração.

Para o caudal de 1 ml/min pode afirmar-se que a fase de equilíbrio é atingida mais tarde para uma solução de 1 mg/L. Constata-se também que à medida que se aumenta a concentração da solução de cafeína, também aumenta o tempo em que se atinge o equilíbrio, sendo assim, há uma melhor adsorção para uma concentração de 0.5 mg/L de cafeína.

Capítulo 4

4. Conclusão

No trabalho realizado, apresentou-se um estudo da encapsulação e libertação de cafeína no MOF ZIF-8. Para tal desenvolveu-se uma metodologia experimental que utilizou uma técnica de cromatografia frontal num sistema HPLC. Foi possível concluir que o MOF ZIF-8 tem uma boa capacidade de encapsular a cafeína com tempos de rutura que podem atingir os 160 min para um caudal de 0.1 mL/min e concentração de cafeína de 1 mg/L.

No presente trabalho foram encontradas algumas dificuldades e como tal, é aconselhável proceder a algumas mudanças no protocolo experimental, nomeadamente utilizar uma coluna diferente com o intuito de melhorar o empacotamento.

No futuro seria indispensável repetir os testes com diferentes soluções de cafeína, ou seja testar outras concentrações para se entender melhor qual o efeito provocado.

Num trabalho próximo poderiam utilizar-se outra classe de fármacos, como por exemplo o ibuprofeno (anti-inflamatório), uma vez que são dos fármacos mais prescritos em todo o mundo.

Fazer a comparação entre esferas de diferentes tamanhos, ou seja, testar micro e nanocápsulas para se entender qual o efeito provocado no fármaco e no organismo pela estrutura dos encapsuladores.

Realizar todos os testes e no final obter resultados com os vários tipos de isotérmicas de dessorção de forma a entender quais são possíveis aplicar numa interfase líquido-sólido e porque as outras não são aplicáveis.

Bibliografia

- [1] Horcajada P., Serre C., Vallet-Regí M., Sebban M., Taulelle F., Férey G. (2006). *Metal-Organic Frameworks as Efficient Materials for Drug Delivery*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 5974 – 5978. França.
- [2] Rodrigues N. (2012). *Estudo da Liberação Controlada de Fármacos por Hidrógeis de PVA/Atapulgita*. Projeto de Graduação. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- [3] Cabral P. (2004). Monografia: *Sistemas de Liberação Controlada de Drogas: Uma Revisão*. Universidade Federal de Campina Grande, Brasil.
- [4] Way D. (2013). *Estudo da Reação de Produção de Partículas de Gelatina para Aplicação na Liberação Controlada de Doxiciclina*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia. Rio de Janeiro, Brasil.
- [5] Schaffazick S., Guterres S., Freitas L., Pohlmann A. (2003). *Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 5, 726-737.
- [6] Figueiredo E., Dias A., Arruda M. (2008). *Impressão Molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos*. Universidade Estadual de Campinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* vol. 44, n. 3. Brasil.
- [7] Coimbra P. (2010). *Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. Dissertação de Doutorado. Universidade de Coimbra – Faculdade de Ciências e Tecnologias. Coimbra, Portugal.
- [8] Henrique J., Falcare R., Lopes P. (2006). *Sistemas de Liberação Controlada*. Universidade Anhemí Morumbi. Pharmacia Brasileira. São Paulo, Brasil.

- [9] Fernandes G. (2007). *Extração e Purificação de Cafeína da casca de Café*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química. Uberlândia.
- [10] Pires A. (2009). *Adsorção de Atenolol em carvão ativado, nanofibras e nanotubos de carbono*. Tese de Mestrado. Universidade Complutense de Madrid – Faculdade de Ciências Químicas.
- [11] Jin Y., Choi D., Row k. (2007). *Adsorption Isotherms of Caffeine on Molecular Imprinted Polymer*. *Korean J. Chem. Eng.*, 25 (4), 816-818 (2008). Coreia.
- [12] Carpiné D. (2011). *Recuperação do Aroma Álcool Femiletilico por Dessorção em Batelada e em Coluna*. Dissertação de Mestrado. Curitiba.
- [13] James S. (2003). *Metal-organic frameworks*. *Chem. Soc. Rev.*, 2003, **32**, 276–288. Universidade de química. Irlanda do Norte.
- [14] Lavich R. (2003). *Simulação de uma Coluna de Adsorção em leito Fixo para a Remoção de Poluentes de gás e Petróleo*. Monografia. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Graduação em Engenharia Química. Florianópolis.
- [15] Oliveira P. (2009). *Remoção de Azul de Metileno numa coluna de adsorção com enchimento de casca de noz carbonizada*. Tese de Mestrado – Mestrado Integrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- [16] Silva, P. (2012). *Síntese e caracterização de MOFs – Metal Organic Frameworks*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- [17] Keskin, S., Kizilel, S. (2010). *Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks*. American Chemical Society. Turquia, Istambul.
- [18] Ramos A., Tanase S., Rothenberg G. (2013). *Redes Metalorgânicas e suas Aplicações em Catálise*. Universidade de Amsterdão. Amesterdão, Holanda.
- [19] McKinlay C., Morris R., Horcajada P., Frey G., Gref R., Couvreur P., e Serre C. (2010). *BioMOFs: Metal–Organic Frameworks for Biological and Medical Application*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6260 – 6266.

- [20] Tuci G., Rossin A., Xu X., Ranocchiarì M., Bokhoven J., Luconi L., Manet I., Melucci M., Giambastiani G. (2013). “Click” on MOFs: A Versatile Tool for the Multimodal Derivatization of N3-Decorated Metal Organic Frameworks. Sociedade Americana de Química. Chem. Mater. 2013, 25, 2297–2308.
- [21] João C. (2013). *Encapsulação e Libertação Controlada de Fármacos*. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, Portugal.
- [22] Peralta D., Chaplais G., Simon-Masseron A., Barthelet K., Pirngruber G., (2012). *Separation of C₆ Paraffins using zeolitic imidazolate frameworks: Comparasion with Zeolitic 5A*. Investigaçãõ Industrial e Engenharia Química. França.
- [23] Fundação Oswaldo Cruz (2010). *Farmacopeia Brasileira*. Volume 2– Monografias, 5ª edição. Brasília, Brasil;
- [24] Brenelli E. (2002). A extração de Cafeína em bebidas estimulantes – uma nova Abordagem para um Experimento Clássico em Química Orgânica. Universidade Federal Fluminense.
- [25] Phan A., Doonan C., Uribe-romo F., Knobler C., O’Keeffe, Yaghi O. (2009). *Synthesis, Structure, and Carbon Dioxide Capture Properties of Zeolitic Imidazolate Frameworks*. Accounts of chemical research 58-67 January 2010 Vol. 43, No. 1. Departamento de Química e Bioquímica – Universidade da Califórnia – Los Angeles.
- [26] Rodrigues C. (2013). *Preparação de novas membranas com MOFs e líquidos iônicos para aplicação em processos de captura de CO₂*. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- [27] Gruber R., Block R. (2005). Effects of caffeine on prospective duration judgements of various intervals depend on task difficulty. Hum Psychopharmacol Clin Exp 2005; 20: 275–285. Published online 25 April 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/hup.687. USA.
- [28] Monteiro M., Trugo L. (2005). Determinação de Compostos Bioativos em Amostras Comerciais de Café Torrado. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 4, 637-641, 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- [29] Maria C., Moreira R. (2006). *Cafeína: Revisão sobre métodos de análise*. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 99-105, 2007. Universidade Federal do rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

[30] Rotelok D., (2013). Síntese de novos materiais baseados em ftalocianinas para captura de CO₂. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal;

[31] Tonhi E., Collins K., Jardim I., Collins C. (2001). *Fases Estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE – FR) Baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados*. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002. Universidade estadual de Campinas. Campinas, Brasil.