

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Bárbara Fernanda Figueiredo dos Santos

**BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE IBUPROFENO**

Campina Grande – PB

2017

Bárbara Fernanda Figueiredo dos Santos

**BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE IBUPROFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suédina Maria de Lima Silva

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^aItamara Farias Leite

Agência Financiadora:CAPES

Campina Grande – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S237b Santos, Bárbara Fernanda Figueiredo dos.
Bionanocompósitos quitosana/ argila para liberação controlada de
ibuprofeno / Bárbara Fernanda Figueiredo dos Santos. – Campina Grande,
2017.
56 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em) – Universidade Federal de Campina Grande,
Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva, Profa. Dra.
Itamara Farias Leite".

Referências.

1. Quitosana. 2. Bionanocompósitos. 3. Ibuprofeno – Liberação
Controlada - Quitosana/ argila. I. Silva, Suédina Maria de Lima. II. Leite,
Itamara Farias. III. Título.

CDU 677.473 (043)

VITAE DO CANDIDATO

- Engenheira de Materiais pela UFPB (2014).

BARBARA FERNANDA FIGUEIREDO DOS SANTOS

BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE IBUPROFENO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais.**

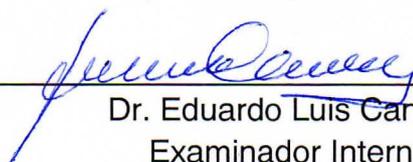
Aprovado em: 23/02/2017



Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva
Orientadora
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.^a Itamara Farias Leite
Examinadora Externa
DEMa/UFPB



Dr. Eduardo Luis Canedo
Examinador Interno
UFCG



Dr.^a Nadja Maria da Silva Oliveira
Examinadora Externa
UEPB

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando Cavalcanti e Maria Solange, ao meu irmão Luiz Neto e aos meus avôs Luiz Leite (in memorian) e Wilson Figueiredo (in memorian), com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela conclusão deste trabalho, pois Ele é o meu refúgio e fortaleza, sem Ele não conseguiria chegar a lugar nenhum.

Aos meus pais, Fernando Cavalcanti e Maria Solange, e ao meu irmão, Luiz Neto, por todo amor, atenção, dedicação e apoio. Eles são a minha base, são os meus bens mais preciosos dados por Deus. Sempre me incentivam a continuar lutando e ir atrás dos meus maiores sonhos. Obrigada, minha família amada!

À minha orientadora, Professora Suédina Maria de Lima Silva, pela paciência, compreensão, orientação, disponibilidade a todo o momento que precisei, pelo apoio incondicional prestado, pela forma dedicada, interessada e extraordinária como acompanhou este trabalho, e, principalmente, pela amizade e carinho durante esse tempo. Ela é uma bênção de Deus na minha vida.

Meus sinceros e mais que especiais agradecimentos ao Professor Eduardo Luis Canedo por todo seu ensinamento, por toda paciência e gentileza ao me explicar cada detalhe que eu não entendia e por estar sempre disposto a tirar todas as minhas dúvidas, independente da hora ou do dia (inclusive nos finais de semana). Sou muito grata por sua grandiosa contribuição dada a este trabalho.

À Professora Itamara Farias Leite, minha co-orientadora, que faz parte da carreira acadêmica desde a minha graduação e sempre será parte de todas as minhas conquistas profissionais.

Ao casal Mário Nunes e Jéssica Raquel, meus amigos de sempre, com quem passei todo o mestrado, dividindo alegrias, preocupações, tristezas e vitórias.

Às amigas que fiz ao longo desses anos na universidade e se tornaram muito especiais para mim: Hellen Torrano, Sloany Medeiros, Thayse Ricardo.

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa do laboratório Nanopol, em especial aos que me acompanharam de perto e me auxiliaram neste trabalho: Hanniman Denizard, Albaniza Alves, Cristiano Farias e Aracelle Albuquerque.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa, bem como a concessão da bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) pelas análises de difratometria de raios X (DRX).

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram com este trabalho de forma direta ou indireta. Obrigada!

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi preparar bionanocompósitos quitosana/argila (na forma de microesferas), pelo método de precipitação, para imobilização do fármaco ibuprofeno, visando o estudo da liberação controlada do mesmo, mediante ensaio *in-vitro*. Os efeitos dos parâmetros de processo e do teor de argila nas propriedades das microesferas foram avaliados. Os resultados de microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que o teor de argila (10 e 20 % em massa) teve pouca influência no tamanho e na distribuição de tamanho das microesferas. Por outro lado, a condição de preparação das microesferas (vazão de ar do sistema de arraste: 2,5 e 10 mL.min⁻¹) teve uma influência mais efetiva. As microesferas preparadas com maior vazão de ar apresentaram menores diâmetros e formato ovalado. Com relação à rugosidade e o tamanho médio de poros, avaliados por MEV, foi observado comportamento semelhante para as duas vazões de ar e os dois teores de argila estudados. Entretanto, comparado às microesferas de quitosana, as de quitosana/argila apresentaram tamanho de poros consideravelmente menores. A incorporação do fármaco também contribuiu para a redução do tamanho dos poros das microesferas. Os dados de difratometria de raios X (DXR) sugerem que tanto o biopolímero quitosana quanto o fármaco ibuprofeno formam intercalados entre as camadas de argila, e que a quantidade de argila misturada à quitosana afetou a morfologia dos bionanocompósitos obtidos. Bionanocompósitos com morfologia intercalada foram obtidos quando preparados com 20% de argila e esfoliada quando preparados com 10% de argila. Por fim, os ensaios de liberação do fármaco em soluções tampão PBS com pH 7,2 realizados em espectrofotômetro UV-vis, mostraram que a quantidade de ibuprofeno liberada pelas microesferas foi afetada pelos parâmetros de processo e teor de argila. A maior velocidade de ar e o menor teor de argila resultaram na maior quantidade de fármaco liberada. Os materiais preparados foram baseados em mineral natural e biopolímero abundantes, de baixo custo e sintetizados com um equipamento desenvolvido em laboratório.

Palavras-chave: Bionanocompósitos. Quitosana. Argila. Ibuprofeno. Liberação controlada.

ABSTRACT

The objective of this research was to prepare chitosan/clay bionanocomposites (in the form of microspheres), by the precipitation method, for the immobilization of the drug ibuprofen, aiming the study of the controlled release of the same, by in vitro test. The effects of the process parameters and the clay content on the microsphere properties were evaluated. The results of optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM) showed that the clay content (10 and 20% by mass) had little influence on the size and size distribution of the microspheres. On the other hand, the condition of preparation of the microspheres (air flow of the drag system: 2.5 and 10 mL.min⁻¹) had a more effective influence. The microspheres prepared with higher air flow showed smaller diameters and oval shape. Regarding the roughness and the average pore size, evaluated by SEM, similar behavior was observed for the two air flows and the two clay contents studied. However, compared to chitosan microspheres, chitosan/clay showed a considerably smaller pore size. The incorporation of the drug also contributed to the reduction of the pore size of the microspheres. X-ray diffraction (XRD) data suggest that both the chitosan biopolymer and the drug ibuprofen are intercalated between the clay layers, and that the amount of clay mixed with chitosan affected the morphology of the bionanocomposites obtained. Bionanocomposites with intercalated morphology were obtained when prepared with 20% clay and exfoliated when prepared with 10% clay. Finally, the drug release assays in PBS buffer solutions pH 7.2 performed on a UV-vis spectrophotometer showed that the amount of ibuprofen released by the microspheres was affected by process parameters and clay content. Higher air velocity and lower clay content resulted in the greater amount of drug released. The materials prepared were based on natural mineral and biopolymer abundant, low cost and synthesized with a laboratory developed equipment.

Keywords: Bionanocomposites. Chitosan. Clay. Ibuprofen. Controlled release.

PUBLICAÇÕES

Lima, P.S., Brito, R.S.F., Santos, B.F.F., Tavares, A.A., Agrawal, P., Andrade, D.L.A.C.S., Wellen, R.M.R., Canedo, E.L. and Silva, S.M.L. (2017) 'Rheological properties of HDPE/chitosan composites modified with PE-g-MA', ***Journal of Materials Research***, pp. 1–13. doi: 10.1557/jmr.2016.519.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitosana (Dash <i>et al.</i> , 2011).	3
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da montmorilonita (Silva <i>et al.</i> , 2012).	6
Figura 3 - Intercalação da quitosana em montmorilonita (Darder <i>et al.</i> , 2003).	8
Figura 4 - Estrutura Química do Ibuprofeno (Rainsford, 2005).	10
Figura 5 - Esquema do funcionamento da liberação controlada (Choudhary e Devi, 2015).	11
Figura 6 - Diagrama esquemático (a) e protótipo (b) do equipamento experimental usado para preparar as microesferas de quitosana e quitosana/argila: (1) microcontrolador eletrônico, (2) zona de injeção, (3) gotejador, (4) agitador magnético, (5) rotâmetro e (6) bomba (Barbosa, 2015).	16
Figura 7 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana Q (A), Q/Ibu (B), Q/CL5 (C), Q/CL5/Ibu (D), Q/CL10 (E) e Q/CL10/Ibu (F), preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 mL.min ⁻¹	20
Figura 8 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana Q (A), Q/Ibu (B), Q/CL5 (C), Q/CL5/Ibu (D), Q/CL10 (E) e Q/CL10/Ibu (F), preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹	20
Figura 9 - Diâmetro equivalente das microesferas preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (A) e 10 mL.min ⁻¹ (B), nas diferentes composições.	21
Figura 10 - Área superficial das microesferas preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (A) e 10 mL.min ⁻¹ (B), nas diferentes composições.	21
Figura 11 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b).	24
Figura 12 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b).	27
Figura 13 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b).	28
Figura 14 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 mL.min ⁻¹	29
Figura 15- Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 mL.min ⁻¹	30

Figura 16 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 2,5 mL.min ⁻¹ .	31
Figura 17 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹ .	32
Figura 18 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹ .	33
Figura 19 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹ .	34
Figura 20 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de Q/Ibu, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b), bem como suas respectivas ampliações.	36
Figura 21 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de Q/CL5/Ibu, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b), bem como suas respectivas ampliações.	37
Figura 22 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de Q/CL10/Ibu, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min ⁻¹ (b), bem como suas respectivas ampliações.	38
Figura 23 – Difractogramas da quitosana (Q), da argila (CL),do ibuprofeno (Ibu) e das composições Q/Ibu e Q/CL/Ibu.	39
Figura 24 - Interação da quitosana em motmorilonita (Darder <i>et al.</i> , 2003).	41
Figura 25 - Interação da quitosana e ibuprofeno em motmorilonita, adaptada de Darder <i>et al.</i> (2003).	42
Figura 26 - Exemplo da evolução da banda característica do ibuprofeno em 222 nm.	43
Figura 27 - Curva de calibração do ibuprofeno em PBS pH 7,2 ($\lambda = 222$ nm).	44
Figura 28 - Perfis da massa liberada do ibuprofeno a partir dos sistemas Q/Ibu, Q/CL5/Ibu e Q/CL10/Ibu, com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (A) e 10mL.min ⁻¹ (B), em pH 7,2.	45
Figura 29 - Perfis da fração liberada do ibuprofeno a partir dos sistemas Q/Ibu, Q/CL5/Ibu e Q/CL10/Ibu, com vazão de injeção de 0,150 mL.min ⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (A) e 10 mL.min ⁻¹ (B), em pH 7,2.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dimensionais das microesferas.....	22
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Quitosana	3
2.2	Argila	4
2.3	Bionanocompósitos Quitosana/Argila	6
2.4	Ibuprofeno	9
2.5	Liberação de fármaco	11
2.5.1	Quitosana/Argila para liberação controlada de Ibuprofeno	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Materiais	14
3.2	Metodologia	14
3.2.1	Preparação das Microesferas	14
3.2.2	Encapsulamento do Ibuprofeno (Ibu)	17
3.2.3	Caracterização	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Microscopia Ótica (MO)	20
4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
4.3	Difratometria de Raios X (DRX)	39
4.4	Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)	43
5	CONCLUSÃO	49
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

Os bionanocompósitos constituem um grupo de compostos de natureza híbrida, orgânico-inorgânico, baseada na mistura de polímeros de fonte natural com sólidos inorgânicos, onde os constituintes interagem em escala nanométrica. Estes materiais combinam as excelentes propriedades mecânicas, térmicas e de barreira a gases e líquidos, típicas dos nanocompósitos convencionais preparados com polímeros sintéticos, mas com o caráter intrínseco de biocompatibilidade e biodegradabilidade associado aos biopolímeros (Han *et al.*, 2010). Portanto, estes nanocompósitos de natureza bio-nanohíbrida podem ser aplicados como bioplásticos para o envase de alimentos; como implantes ou sistemas liberadores de fármacos em biomedicina e também como dispositivos eletroquímicos como, por exemplo, sensores e biosensores (Kumar, 2000; Uragami *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2012; Elsabee e Abdou, 2013).

Estudos sobre o desenvolvimento de bionanocompósitos quitosana/argila para sistemas carreadores de fármacos não têm sido tão difundidos quanto àqueles com quitosana pura. Contudo, vários benefícios podem ser alcançados para essa aplicação quando a quitosana é associada à argila. Entre os materiais argilosos, a montmorillonita tem atraído grande atenção devido à sua capacidade de liberar fármacos de uma maneira controlada, capacidade mucoadesiva para as formulações farmacêuticas, capacidade de atravessar a barreira gastrointestinal e biodisponibilidade por via oral. Ela também tem capacidade de adsorver toxinas alimentares e é atóxica (Joshi *et al.*, 2009).

A associação quitosana/montmorillonita é possível uma vez que a quitosana, devido à sua natureza hidrofílica e policatiônica em meio ácido, apresenta boa miscibilidade com este tipo de silicato, podendo ser intercalada entre as suas lamelas, por meio de troca catiônica e ligações de pontes de hidrogênio (Darder *et al.*, 2003). O mecanismo de troca catiônica envolve interações entre a carga positiva do grupo amina protonada (NH_3^+) da quitosana e os sítios carregados negativamente na estrutura da argila (Darder *et al.*, 2005). Dentre os benefícios que podem ser conseguidos com esta associação se destacam: (a) a intercalação da quitosana catiônica nas galerias da argila pode resultar na neutralização da forte ligação da droga (fármaco) catiônica com a argila aniônica; (b) a solubilidade da quitosana no pH do suco gástrico irá diminuir e com isso minimizar a liberação prematura da

droga; (c) a quitosana catiônica, ao contrário da argila, proporciona a possibilidade de imobilização de drogas carregadas negativamente e (d) os grupos amina presentes na quitosana são sítios para imobilização do fármaco. A solubilidade limitada, no pH gástrico, dos híbridos quitosana/argila carregados com o fármaco oferece vantagens significativas para liberação da droga em sítios específicos pois não são destruídos pelo pH ácido do estômago e na presença de enzimas digestivas. Além disso, a propriedade mucoadesiva da quitosana pode melhorar a biodisponibilidade de medicamentos no trato gastrointestinal (Yuan et al., 2010). Portanto, os bionanocompósitos de quitosana/argila têm um grande potencial como carregados de fármacos.

O comportamento de liberação da droga pode ser influenciado por vários fatores, como por exemplo, tipo de quitosana (grau de desacetilação e massa molar), tipo de argila e proporção quitosana/argila. Com base no exposto, a condução desta pesquisa visa auxiliar na elucidação dessas questões e avaliar fatores ainda não esclarecidos no que se refere a preparação e propriedades de bionanocompósitos quitosana/argila, para sistemas de liberação controlada de ibuprofeno (Ibu).

O fármaco ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteróide, derivado do ácido propiônico, é eficiente no controle da dor, mas o uso indiscriminado e prolongado deste medicamento pode provocar gastrite ou úlcera estomacal, pelo fato de bloquear a produção da barreira de proteção da mucosa gástrica. Pode causar também indigestão, náuseas, diarreia, acidez, dor de estômago e úlceras. Outros efeitos adversos incluem sonolência, vertigem, zumbidos nos ouvidos, perturbações visuais, retenção de água e dificuldades respiratórias. Portanto, seu uso deve ser criterioso e bem indicado para que possa proporcionar mais benefícios do que riscos ao paciente (Rainsford, 2005). Assim, a imobilização do ibuprofeno em bionanocompósitos quitosana/argila, visando à liberação controlada do mesmo, poderá minimizar estes efeitos adversos e estender a ação deste anti-inflamatório. Contudo, são poucos os estudos que tratam do uso de nanocompósitos quitosana/argila para liberação controlada de ibuprofeno (Abdeen e Salahuddin, 2013; Peres, 2014). Com base no exposto, o objetivo desta pesquisa é preparar bionanocompósitos quitosana/argila para imobilização do fármaco ibuprofeno, visando à liberação controlada do mesmo, mediante ensaio *in-vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quitosana

A quitosana, cuja estrutura química está apresentada na Figura 1, é um copolímero linear composto de unidades de repetição de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (glicosamina) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) e pode ser obtido pela desacetilação parcial da quitina, que é um polissacarídeo encontrado na natureza em crustáceos, insetos e alguns fungos (Dash *et al.*, 2011). O grau de desacetilação (GD) da quitosana, dado que indica o número de grupos amino ao longo das cadeias, é calculado como a razão entre D-glucosamina e a soma de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Para ser nomeada “quitosana”, a quitina desacetilada deve conter pelo menos 60% de resíduos de D-glucosamina (Muzzarelli *et al.*, 2004; Dash *et al.*, 2011; Croisier e Jérôme, 2013).

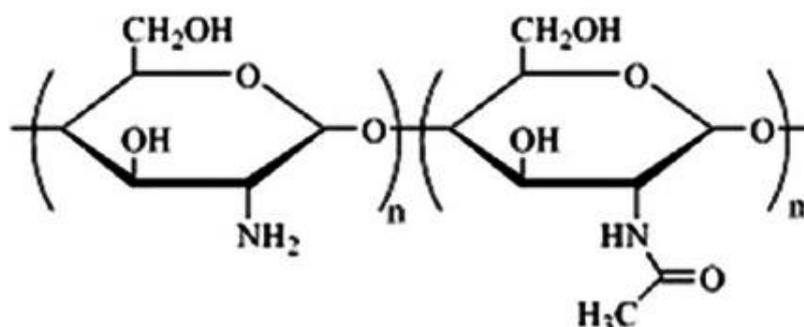


Figura 1- Estrutura química da quitosana (Dash *et al.*, 2011).

A quitosana comercializada possui geralmente grau de desacetilação variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de 104 a 106 g.mol⁻¹. Muitas propriedades deste polissacarídeo estão intimamente relacionadas a esses dois parâmetros. O conhecimento preciso do teor dos grupos N-desacetilados, e conseqüentemente, de grupos NH₂ é importante, de maneira a caracterizar qualquer processo de desacetilação, ou outra modificação química. Desta forma, amostras de quitosana podem ter características diferentes quanto ao grau de desacetilação, afetando as propriedades químicas e físicas como: solubilidade, reatividade química, biodegradabilidade, viscosidade e distribuição de massa, que irão influenciar no desempenho final do polímero (Silva *et al.*, 2012).

O biopolímero quitosana pode ser degradado por enzimas amplamente encontradas no corpo humano, e os oligômeros podem ativar macrófagos e estimular a síntese de ácido hialurônico. Além disso, a quitosana é reconhecida por células tumorais, e conseqüentemente, pode trazer fármacos ao seu alvo seletivamente. A alta hidrofiliçidade da quitosana, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de pós, flocos, microesferas, nanopartículas, gel, membranas, esponjas, colméias, fibras e fibras ocas micropartículas (Dias e Silva, 2001; Del Nobile *et al.*, 2009). A quitosana exibe propriedades analgésicas mucoadesiva e antibacteriana, juntamente com atividade antifúngica e hemostática. Além do mais, a quitosana pode ser facilmente biodegradada gerando resíduos não tóxicos e sua taxa de degradação está relacionada com a massa molar do polímero e com seu grau de desacetilação (Avella *et al.*, 2000; De Carvalho Canella e Garcia, 2001; Jiang *et al.*, 2008).

A utilização da quitosana como sistema de liberação de fármacos (Drug-delivery systems) surgiu desde a década de 1980 e representa um biomaterial utilizado como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas e locais, capaz de proporcionar uma taxa de liberação controlada e prolongada da droga com o mínimo de efeito colateral. Por ser um material seletivamente permeável, surgiu como bom candidato para liberação controlada de medicamentos no meio gastrintestinal e na mucosa oral (Kumar, 2000).

2.2 Argila

Argilas são silicatos em camadas constituídas de uma grande proporção do argilomineral montmorilonita (geralmente > 80%), podendo conter outros argilominerais tais como beidelita, saponita, nontronita e hectorita e minerais não argilosos como quartzo, feldspato caulinita e diferentes cátions; sendo suas características funcionais derivadas de seu maior constituinte (montmorilonita). Sua cor varia de branco a amarelo, de verde oliva a marrom ou azul, dependendo da presença de cátions coloridos, sejam eles estruturais e ou trocáveis, tais como Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} . A presença de impurezas como matéria orgânica e minerais associados, também podem colorir as argilas (Utracki, 2004; Coelho *et al.*, 2007).

A estrutura básica destas argilas consiste de duas folhas tetraédricas (T) envolvendo uma folha central octaédrica (O), unidas entre si por oxigênios comuns às folhas para formar uma camada, conforme representação esquemática apresentada na Figura 2. A espessura da camada é de aproximadamente 0,96 nm e sua dimensão lateral pode variar de 30 nm até vários micrometros. São estruturalmente derivadas da pirofilita [$\text{Si}_8\text{Al}_4\text{O}_{20}(\text{OH})_4$], ou do talco [$\text{Si}_8\text{Mg}_6\text{O}_{20}(\text{OH})_4$] por substituições principalmente nas folhas octaédricas (O), onde Al^{3+} pode ser substituído por Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+} ou Li^+ . Nas posições tetraédricas pode haver substituição isomórfica em percentagem moderada, cerca de 15%, do Si^{4+} por Al^{3+} . Estas substituições isomórficas, no retículo do mineral, geram cargas negativas, e as camadas ficam eletricamente desequilibradas com uma deficiência de aproximadamente 0,66 cargas positivas por célula unitária. Esta deficiência é equilibrada principalmente por cátions hidratados denominados cátions alcalinos e alcalinos terrosos denominados cátions trocáveis, como por exemplo, sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), que são fixados reversivelmente nos espaços entre as camadas (espaços interlamelares - galerias) (80%) e nas superfícies laterais das camadas (20%) mantendo assim o equilíbrio elétrico (De Souza Santos e Santos, 1992; Utracki, 2004).

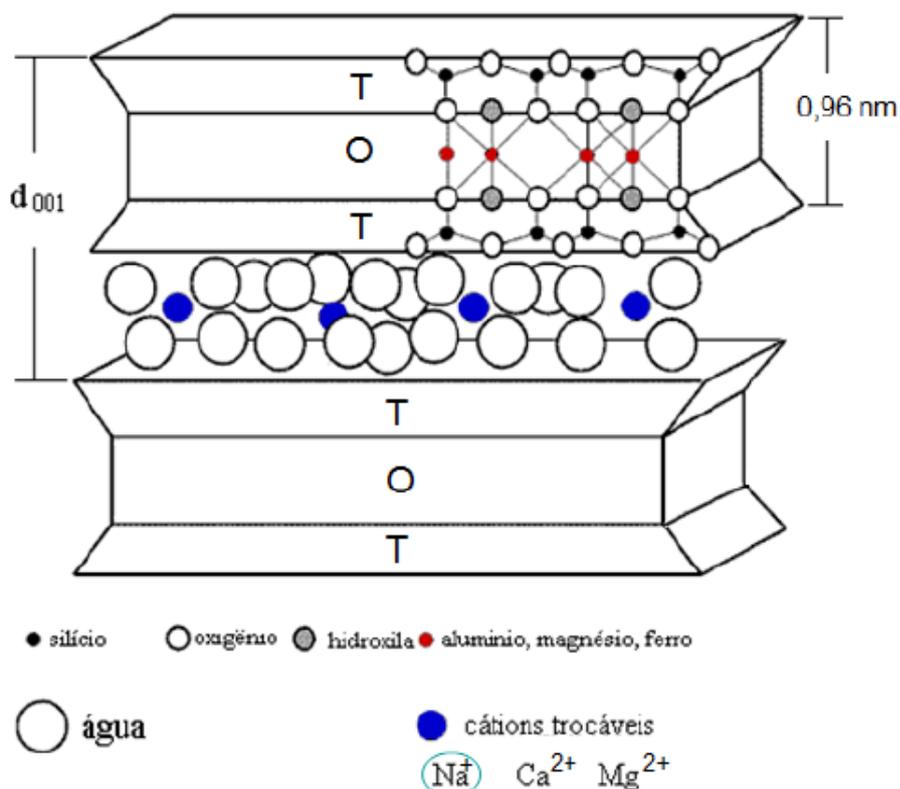


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da montmorilonita (Silva *et al.*, 2012).

As argilas montmorilonita e bentonita apresentam área superficial específica de 750 a 800 m²/g, sendo o valor teórico de 834 m²/g; capacidade de troca de cátions (CTC) de 80 a 120 meq/100g e espaçamento basal de 1,0 a 1,4 nm para as argilas nas formas anidra e hidratada, respectivamente (Utracki, 2004).

2.3 Bionanocompósitos Quitosana/Argila

Os bionanocompósitos constituem um grupo de compostos de natureza híbrida, orgânico-inorgânico, baseada na mistura entre polímeros de fonte natural e sólidos inorgânicos através de interações entre os constituintes em escala nanométrica. Estes materiais combinam as excelentes propriedades mecânicas, térmicas e de barreira a gases e líquidos, típicas dos nanocompósitos convencionais preparados com polímeros sintéticos, mas com o caráter intrínseco de biocompatibilidade e biodegradabilidade associado aos biopolímeros (Han *et al.*, 2010). Portanto, estes materiais de natureza bio-nanohíbrida podem ser aplicados como bioplásticos para o envase de alimentos, como implantes ou sistemas liberadores de fármacos em biomedicina e também como dispositivos eletroquímicos

como, por exemplo, sensores e biossensores (Ravi Kumar, 2000; Uragami *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2012). Uma das aplicações mais interessantes deste tipo de material concentra-se no campo da biomedicina, sendo os biopolímeros mais utilizados nesta área o poli(ácido lático), a policaprolactona, o poli(ácido glicólico) e a quitosana (Viseras *et al.*, 2010).

Devido à natureza hidrofílica e policatiônica do biopolímero quitosana, em meio ácido, este apresenta boa miscibilidade com os silicatos em camadas, montmorilonita sódica e bentonita sódica, podendo ser intercalada entre as lamelas do argilomineral, montmorilonita, por meio de troca catiônica. Por outro lado, grupos funcionais amino protonados ($-NH_3^+$) e hidroxílicos ($-OH$), presentes na quitosana, podem formar ligações de pontes de hidrogênio com os grupos hidroxílicos terminais presentes na montmorilonita, acarretando fortes interações entre a quitosana e a montmorilonita as quais afetam fortemente as propriedades macroscópicas do bionanocompósito. A Figura 3 mostra uma representação esquemática da intercalação da quitosana em montmorilonita (Darder *et al.*, 2003; 2005).

De acordo com a literatura, as fortes interações quitosana-montmorilonita podem resultar na formação de bionanocompósitos, preparados pelo método de intercalação por solução, com estruturas floculadas. A quantidade de argila misturada com quitosana afeta a morfologia dos bionanocompósitos. Conforme reportado por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2005), para pequenas quantidades de montmorilonita, 2,5% em massa, os bionanocompósitos quitosana/montmorilonita obtidos pelo método de intercalação por solução apresentaram estrutura intercalada e esfoliada e que para quantidades de montmorilonita de 5% e 10% em massa os bionanocompósitos apresentaram morfologia intercalada com ocasionais floclulações.

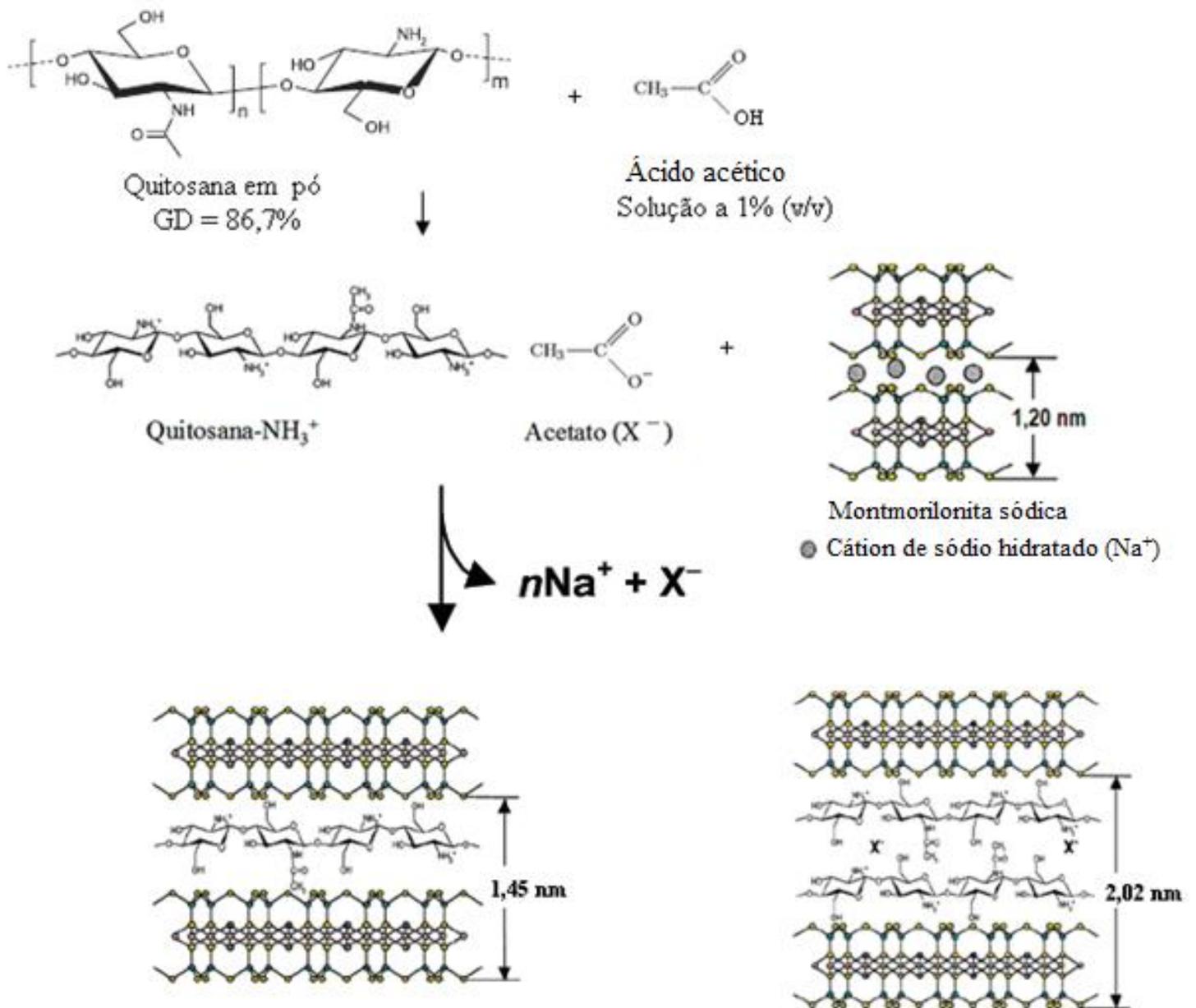


Figura 3 - Intercalação da quitosana em montmorilonita (Darder *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Tan e colaboradores (Tan *et al.*, 2008) mostraram que a partir da análise de difratometria de raios X e de acordo com os valores obtidos para a distância interplanar basal (d_{001}), dois tipos de bionanocompósitos quitosana/montmorilonita podem ser descritos: um com monocamada e outro com bicamada de quitosana no espaço interlamelar, respectivamente. A intercalação da monocamada de quitosana em montmorilonita deve-se principalmente ao processo de troca catiônica e ao bionanocompósito ser obtido a partir de pequena quantidade

de quitosana. A intercalação da bicamada de quitosana em montmorilonita resulta em bionanocompósitos com alta quantidade de quitosana. Esta intercalação é favorecida pela interação eletrostática dos grupos ($-\text{NH}_3^+$) da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando-se acessíveis os sítios para troca aniônica. O valor da distância interplanar basal (d_{001}) para o caso onde uma estrutura bicamada é obtida é em torno de 2,02 nm.

Conforme descrito anteriormente, estudos sobre o desenvolvimento de bionanocompósitos quitosana/argila para aplicações biomédicas (sistemas carreadores de fármacos), não tem sido tão difundidos quanto àqueles com quitosana pura. Contudo, vários benefícios podem ser alcançados para essa aplicação quando a quitosana é associada à montmorilonita. Esta associação é possível uma vez que a quitosana, devido à sua natureza hidrofílica e poliaciônica em meio ácido, apresenta boa miscibilidade com este tipo de silicato, podendo ser intercalada entre as suas lamelas, por meio de troca catiônica e ligações de pontes de hidrogênio (Darder *et al.*, 2003; Liu, 2007). O mecanismo de troca catiônica envolve interações entre a carga positiva do grupo amina protonada (NH_3^+) da quitosana e os sítios carregados negativamente na estrutura da argila (Darder *et al.*, 2005).

Portanto, os benefícios conseguidos pela preparação de bionanocompósitos quitosana/argila, as vantagens significativas para liberação da droga em sítios específicos pois não são destruídos pelo pH ácido do estômago e na presença de enzimas digestivas e a propriedade mucoadesiva da quitosana tornam os bionanocompósitos quitosana/argila um grande potencial para carregamento de fármacos.

2.4 Ibuprofeno

O ibuprofeno, potente anti-inflamatório não esteróide, derivado do ácido propiônico, é classificado como anti-inflamatório não seletivo. Possui a capacidade de inibir a atividade das duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) (Rainsford, 2005). A estrutura química deste fármaco está representada na Figura 4.

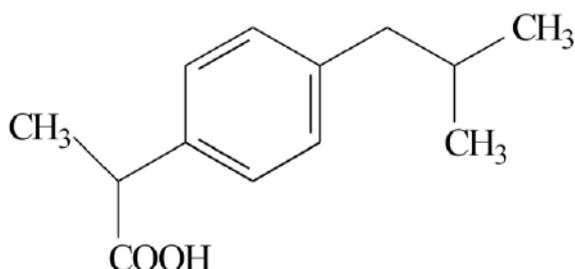


Figura 4 - Estrutura Química do Ibuprofeno (Rainsford, 2005).

Quimicamente, o Ibuprofeno é um pó branco, com um leve odor característico. Este fármaco é praticamente insolúvel em água, mas já é solúvel em soluções aquosas diluídas de hidróxidos alcalinos e de carbonatos, e também em alguns solventes orgânicos como a acetona, o álcool etílico, o éter, o diclorometano e o clorofórmio (Rainsford, 2005).

O Ibuprofeno foi sintetizado pela primeira vez em Dezembro de 1961 no Reino Unido, pelo Dr. Stewart Adams e seus colegas John Nicholson e Colin Burrows. Nesse mesmo ano, este fármaco foi patenteado. Mas apenas em 1969 aparece comercializado no Reino Unido e posteriormente nos EUA, em 1974. Hoje é comercializado em todo o mundo sendo usado por milhões de consumidores (Marques, 2009). É utilizado para combater a dor, a inflamação ou a febre e, nos casos de reumatismo e em lesões dos tecidos moles, para controlar a dor e a inflamação. Utiliza-se também para controlar a dor em múltiplas situações como a dismenorreia (dores menstruais), traumatismos com entorses, luxações e fraturas, em dores de dentes, em dor associada a qualquer processo inflamatório e em situações de febre de diversa etiologia, para controlar a temperatura elevada (Rainsford, 2005).

Embora o ibuprofeno seja eficiente no controle da dor, o uso indiscriminado e prolongado deste medicamento pode provocar gastrite ou úlcera estomacal, pelo fato de bloquear a produção da barreira de proteção da mucosa gástrica. Pode causar também indigestão, náuseas, diarreia, acidez, dor de estômago e úlceras. Outros efeitos adversos incluem sonolência, vertigem, zumbidos nos ouvidos, perturbações visuais, retenção de água e dificuldades respiratórias. Portanto, seu uso deve ser criterioso e bem indicado para que possa proporcionar mais benefícios do que riscos ao paciente (Rainsford, 2005). Assim, a imobilização do ibuprofeno em

membranas quitosana/argila, visando a liberação controlada do mesmo, pode minimizar estes efeitos adversos e estender a ação deste anti-inflamatório.

2.5 Liberação de fármaco

Sistemas de liberação controlada de fármacos são todos aqueles que têm como objetivo fornecer uma dose terapêutica de uma droga para um local do corpo predeterminado, e manter a concentração desejada, de modo controlado em velocidade e tempo apropriado, buscando também manter os níveis sanguíneos terapêuticos ótimos e evitar, a níveis plasmáticos, a problemática da toxicidade e/ou doses tóxicas (Allen Jr *et al.*, 2013). Desta forma, esse sistema faz com que o fármaco seja liberado gradativamente, a um ritmo ditado pelas necessidades do corpo, por um período específico de tratamento (Gennaro e Remington, 2004). Na Figura 5 está apresentado o mecanismo de funcionamento da liberação controlada.

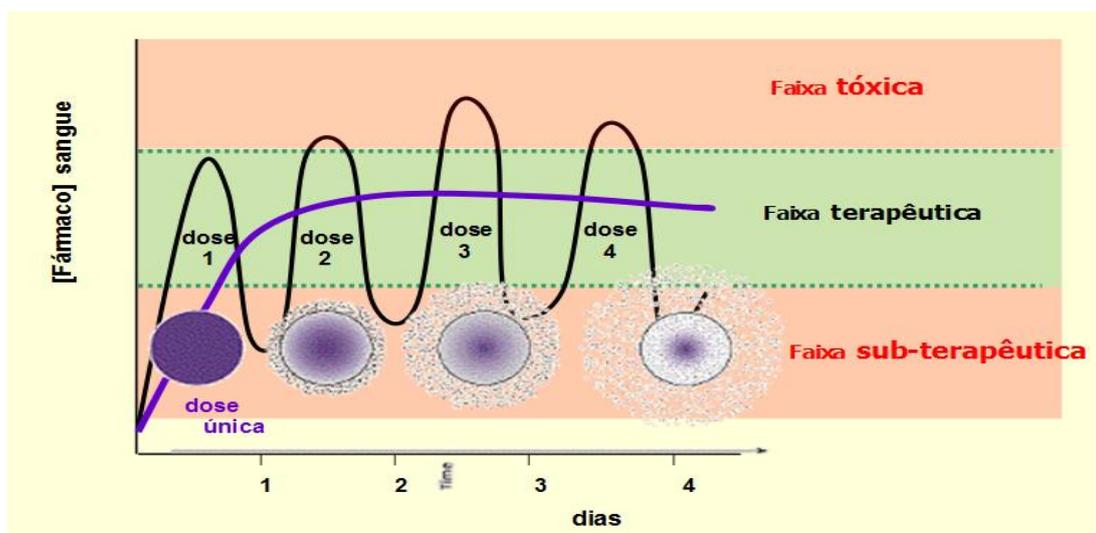


Figura 5 - Esquema do funcionamento da liberação controlada (Choudhary e Devi, 2015).

Os tratamentos convencionais utilizados para combater processos infecciosos (soluções, suspensões, pílulas, entre outros) requerem uma administração por um longo período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Muitas vezes, tais níveis não são alcançados, pois o tratamento não exhibe resultados ou apresenta efeitos colaterais devido à alta concentração do fármaco. A manutenção da concentração do medicamento na corrente sanguínea, dentro da faixa terapêutica do medicamento,

leva à redução no número de doses requeridas e ao aumento na eficácia do tratamento, pois desta forma diminui a possibilidade de alcançar níveis tóxicos ou subterapêuticos (Mishra *et al.*, 2010).

Quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, os sistemas de liberação controlada oferecem algumas vantagens como, por exemplo, maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas e tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas (Choudhary e Devi, 2015).

Um fator importante durante o carregamento de fármacos é a interação entre o fármaco e o sistema carreador (matriz de suporte) porque com o aumento desta interação (fármaco-matriz de suporte), tanto o carregamento quanto a eficiência de retenção do fármaco aumentam; entretanto, a taxa de liberação diminui. Para alta eficiência de retenção, é necessário que o fármaco interaja preferencialmente com a matriz de suporte (polímero, lipídios) em vez de interagir com o meio circundante (Opanasopit *et al.*, 2006).

2.5.1 Quitosana/Argila para liberação controlada de Ibuprofeno

A quitosana tem se mostrado muito atrativa para a indústria farmacêutica, visando, principalmente, seu uso como matriz para sistemas de liberação controlada de fármacos. O uso combinado de quitosana com argila montmorilonita é uma opção interessante, pois a junção destes dois materiais poderá resultar na capacidade de liberar o fármaco ibuprofeno de uma maneira controlada e, também, devido a capacidade mucoadesiva destes materiais as formulações farmacêuticas poderão ter a capacidade de adsorver toxinas alimentares e minimizar os efeitos colaterais do fármaco. Contudo, são poucos os trabalhos que tratam do uso de nanocompósitos quitosana/argila para liberação controlada de ibuprofeno.

Peres (2014) preparou um complexo iônico contendo quitosana e ibuprofeno por meio de uma reação ácido base entre ambos. Em uma segunda etapa, preparou um nanocompósito de montmorilonita/quitosana contendo o fármaco ibuprofeno. As amostras preparadas foram caracterizadas por diferentes técnicas, incluindo análise

elementar, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H , termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difratometria de raios X (DRX) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os resultados indicaram que a dissociação do ibuprofeno no nanocompósito quitosana/montmorilonita resultou na maior retenção do mesmo e o autor atribuiu tal fato a interação do ibuprofeno com a argila, dificultando a dissociação do mesmo.

Abdeen e Salahuddin (2013) estudaram a intercalação de ibuprofeno em montmorilonita sódica, em quitosana e em nanocompósitos de quitosana/montmorilonita. As amostras foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os autores observaram que houve um aumento do espaçamento basal da montmorilonita, indicando a intercalação da quitosana e do ibuprofeno entre as lamelas da argila. Os resultados da liberação do fármaco, por estudo da liberação *in vitro*, empregando espectroscopia UV, mostraram que o processo de liberação do fármaco a partir da montmorilonita, da quitosana e do nanocompósito foi influenciado pelo pH do meio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Quitosana na forma de pó, com grau de desacetilação de aproximadamente 92%, fornecida pela Polymar-Fortaleza/CE foi utilizada como matriz na preparação dos bionanocompósitos.

A argila montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (fornecida pela Southern Clay Products, Texas/EUA) foi empregada como nanocarga para preparação dos bionanocompósitos.

O ácido acético glacial P.A de 99,9% foi usado como solvente para a quitosana e o hidróxido de sódio foi utilizado para ajustar o pH da solução de quitosana bem como assegurar a formação das microesferas, servindo de solução coagulante. Estes reagentes foram fornecidos pela Vetec e usados como recebidos.

A substância ativa usada neste estudo foi o Ibuprofeno (Ibu) - (C₁₃H₁₈O₂), fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich – São Paulo/SP.

O álcool etílico 99% fornecido pela Sigma – Aldrich foi utilizado como solvente do fármaco Ibuprofeno.

A solução tampão fosfato - PBS 0,1M (pH 7,2) fornecido pela Sigma Aldrich– São Paulo/SP foi utilizado como um meio para simular os fluidos corpóreos no estudo *in vitro* da liberação controlada do fármaco pela técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-visível).

O Acetato de sódio (3H₂O P.A.), fornecido pela Nuclear, foi utilizado na preparação da solução de quitosana para aumentar a densidade das microesferas preparadas.

3.2 Metodologia

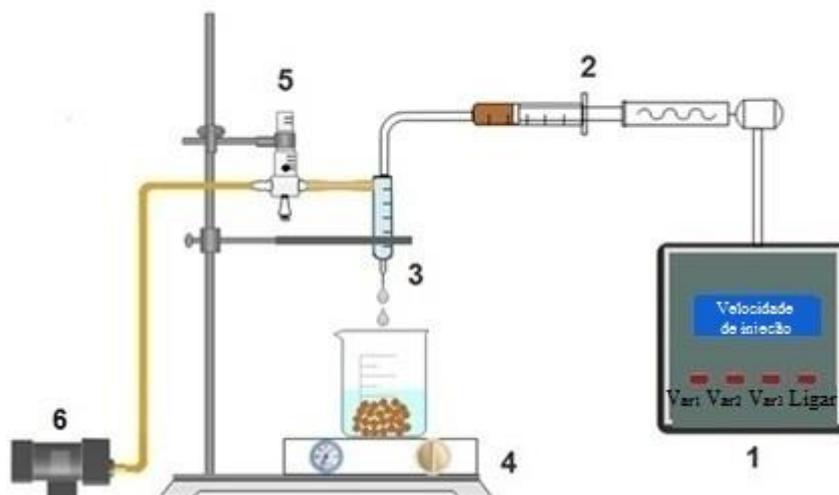
3.2.1 Preparação das Microesferas

Microesferas de quitosana/argila foram preparadas pelo método de precipitação, empregando um aparelho com um sistema de fluxo de injeção automático (Figura 5), desenvolvido pelo aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da UFCG, Hanniman Denizard Cosme Barbosa. De acordo com o aluno este dispositivo é uma adaptação do sistema proposto por Dias *et al.* (2008) e Prado (2010), e apresenta como melhoria a

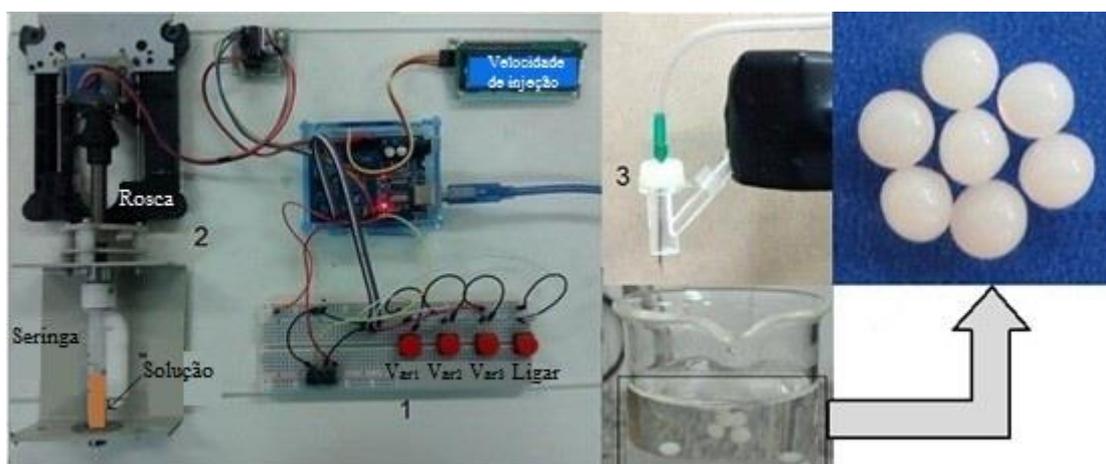
eliminação do gradiente de pressão entre o início e o fim processo de obtenção das microesferas, devido ao uso de um microcontrolador eletrônico (Arduino) que possibilita a automação do sistema de injeção, que tem a função de controlar o fluxo da solução polimérica e o diâmetro das microesferas.

A preparação das microesferas foi feita conforme adaptações do método proposto por Prado (2010). Em resumo, 2g de quitosana e 2g de acetato de sódio foram dissolvidas em 50 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 5% (v/v), sob agitação magnética a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 2h. Passado este tempo, o pH da solução foi ajustado para 4,9 com adição de uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar e, em seguida, uma dispersão aquosa da argila, preparada na concentração de 1% (m/v), foi adicionada a mesma. As dispersões de quitosana/argila, com razões mássicas de 10:1 e 5:1 (teores de argila de 10% e 20% em massa, respectivamente), foram mantidas sob agitação mecânica a 600 rpm e $50 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 horas e 30 minutos. Em seguida, foram gotejadas dentro de uma solução coagulante, solução aquosa de hidróxido de sódio a 8% (m/v), empregando um sistema de injeção contendo uma agulha de insulina de 0,45 mm (Figura 5). Uma vazão de injeção ($0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e duas vazões de ar do sistema de arraste ($2,5$ e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) foram testadas. As microesferas formadas foram coletadas, lavadas com água destilada (2000 mL) e secas em estufa a 50°C durante 24 h. Microesferas de quitosana foram fabricadas pelo mesmo método e usadas para fins de comparação. As microesferas secas de quitosana e quitosana/argila foram armazenadas em dessecador para uso.

As microesferas de quitosana foram codificadas por Q e as de quitosana/argila preparadas com razões mássicas de quitosana/argila de 10:1 e 5:1 (teores de argila de 10% e 20% em massa), foram codificadas por Q/CL10 e Q/CL5, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 6 - Diagrama esquemático (a) e protótipo (b) do equipamento experimental usado para preparar as microsferas de quitosana e quitosana/argila: (1) microcontrolador eletrônico, (2) zona de injeção, (3) gotejador, (4) agitador magnético, (5) rotâmetro e (6) bomba (Barbosa, 2015).

3.2.2 Encapsulamento do Ibuprofeno (Ibu)

A preparação das microesferas de quitosana e quitosana/argila carregadas com ibuprofeno (Ibu) foi realizada do seguinte modo: o Ibu foi diluído, a uma concentração de 10% em relação à massa de quitosana, em álcool étílico absoluto, sendo 1 mL de álcool para cada 1 mg de Ibu, a temperatura ambiente sob agitação magnética por 10 min, em seguida, o Ibu em solução foi adicionado às soluções de quitosana e às dispersões de quitosana/argila, que foram mantidas sob agitação magnética por 30 min à temperatura ambiente. Com o auxílio do sistema de injeção, as soluções contendo Ibu foram gotejadas em uma solução coagulante de hidróxido de sódio 8% mantida sob leve agitação. A solução coagulante contendo as microesferas, foi filtrada em um kitasato junto com o funil de Büchner e as microesferas foram lavadas com água destilada até pH 7,0. Para finalizar, as microesferas foram postas em uma estufa a 50° C por 24h.

As microesferas de quitosana/Ibu e quitosana/argila/Ibu foram codificadas por: Q/Ibu, Q/CL5/Ibu e Q/CL10/Ibu.

3.2.3 Caracterização

3.2.4.1 Microscopia Ótica (MO)

A microscopia ótica das microesferas de quitosana e quitosana/argila, sem e com o fármaco, foi conduzida em um microscópio modelo Q734ZT série 059 da DP Instrumentos Científicos LTDA. As micrografias obtidas foram utilizadas na determinação do diâmetro, volume, área superficial e esfericidade das microesferas preparadas, com o auxílio do software Pixcavator 6.0.

3.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A topografia superficial das microesferas de quitosana e quitosana/argila, sem e com o fármaco, foi examinada em um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SSY-550). Uma pequena quantidade de microesferas secas, pelo menos 10 microesferas, foi colocada sobre suportes de alumínio; fixadas em uma fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro.

3.2.3.3 Difractometria de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX da argila e dos sistemas quitosana/argila e quitosana/argila/Ibu foram obtidos em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1, 5418 Å), em um intervalo de 2θ entre 2 e 12 graus, tensão de 40 kV, corrente 30 mA e velocidade de 2°/min. O espaçamento interplanar basal (d_{001}) das argilas não incorporadas e incorporadas aos sistemas quitosana/argila e quitosana/argila/Ibu foi determinado por meio da lei de Bragg, conforme Equação 1 (Utracki, 2004).

$$d_{001} = \frac{8,8264273}{2\theta} \quad (1)$$

Onde: d_{001} é a reflexão basal do plano (001) do argilomineral na argila em (nm) e θ é o ângulo do pico referente à reflexão basal (001) da montmorilonita em (graus).

3.2.3.4 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)

Esta técnica de caracterização foi usada no estudo da liberação *in vitro* do ibuprofeno, incorporado nas microesferas de quitosana e quitosana/argila, que envolveu duas etapas: 1ª) confecção da curva de calibração e 2ª) determinação da quantidade de fármaco liberada pelas microesferas.

A metodologia empregada na confecção da curva de calibração foi a seguinte: uma solução padrão na concentração de 100 µg/mL de ibuprofeno em solução salina tampão fosfato (PBS) pH 7,2 foi analiticamente preparada. Desta solução, foram preparadas, por diluição em PBS pH 7,2, soluções nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, as quais tiveram os valores de absorvância em 222 nm (Zheng *et al.*, 2007) determinados por espectrofotometria no UV, em espectrofotômetro UV-Vis da Perkim Elmer modelo Lambda 35, tendo o PBS pH 7,2 como branco. Os valores de absorvância médios (y) adquiridos foram relacionados em gráfico como uma função da concentração de ibuprofeno (x). A curva de absorvância em função da concentração de fármaco foi linearizada e a equação resultante está apresentada abaixo.

$$C = k \cdot \text{Abs} \quad (2)$$

Onde:

C = Concentração do ibuprofeno em ($\mu\text{g/mL}$)

K = Coeficiente angular da reta

Abs = Absorbância em 222 nm

O estudo da liberação *in vitro* do ibuprofeno foi conduzido também no espectrofotômetro da Perkim Elmer modelo Lambda 35, operando na faixa de 300 nm a 190 nm. Cerca de 0,5 g das microesferas de quitosana/lbu e quitosana/argila/lbu foram armazenadas individualmente em recipientes contendo 50 mL da solução salina tamponada com fosfato - PBS 0,1 M (pH 7,2) e mantidos sob agitação a temperatura constante de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e uma velocidade de agitação de 100 rpm em incubadora Shaker. Após intervalos de 30 min a 8h, alíquotas de 2 mL foram coletadas do meio de dissolução contendo o fármaco liberado, sendo analisado por espectrofotometria a 222 nm (Zheng *et al.*, 2007). O volume amostrado foi repostado com meio de dissolução fresco (PBS). A concentração de ibuprofeno na solução de PBS foi determinada a partir da Equação 2. Para determinação da massa e da fração de ibu liberados pelas microesferas utilizou-se as equações 3 e 4, respectivamente.

$$m(t) = C(t) \cdot V \quad (3)$$

Onde $m(t)$ é a massa de fármaco liberada pelas microesferas em um tempo t , C e a concentração de fármaco liberada pelas microesferas em um tempo t e V é o volume de solução PBS.

$$f = \frac{m(t)}{m_0} \quad (4)$$

Onde f é a fração de fármaco liberada pelas microesferas, m é massa de ibuprofeno liberada pelas microesferas em um tempo t e m_0 é a massa inicial de fármaco nas microesferas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia Ótica (MO)

As Figuras 7 e 8 apresentam as imagens das microesferas de quitosana e quitosana/CL sem e com Ibu, obtidas por microscopia ótica (MO), preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de 2,5 e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Através dessa técnica foi avaliada a influência da vazão de ar do sistema de arraste nas dimensões das microesferas.

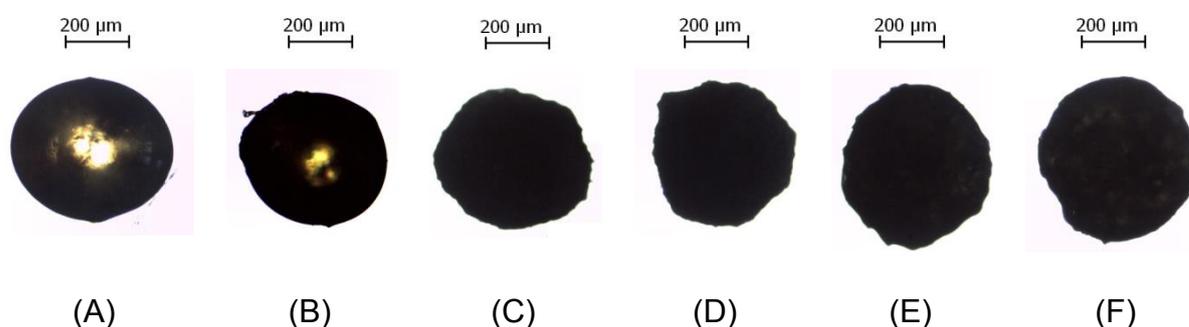


Figura 7 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana Q (A), Q/Ibu (B), Q/CL5 (C), Q/CL5/Ibu (D), Q/CL10 (E) e Q/CL10/Ibu (F), preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

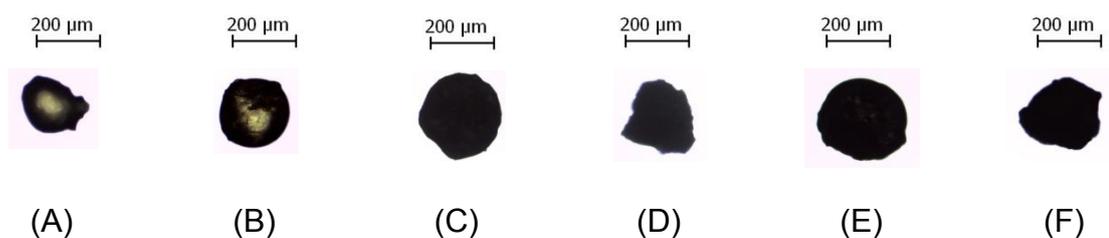


Figura 8 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana Q (A), Q/Ibu (B), Q/CL5 (C), Q/CL5/Ibu (D), Q/CL10 (E) e Q/CL10/Ibu (F), preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

De acordo com as Figuras 7 e 8 fica evidenciado que a vazão de ar afetou as dimensões das microesferas. Isso pode ser comprovado pelos valores do diâmetro, volume, área superficial e esfericidade de cada microesfera, obtidos das análises das imagens de MO das microesferas com o auxílio do software Pixcavator 6.0 (Tabela 1). Por outro lado, não se verificou variação relevante nas dimensões das

microesferas quando a argila montmorilonota Cloisite® Na⁺ (CL) e o fármaco Ibutrofeno (Ibu) foram incorporados a quitosana.

Os valores de diâmetro equivalente e área superficial das microesferas estão apresentados também nas Figuras 9 e 10.

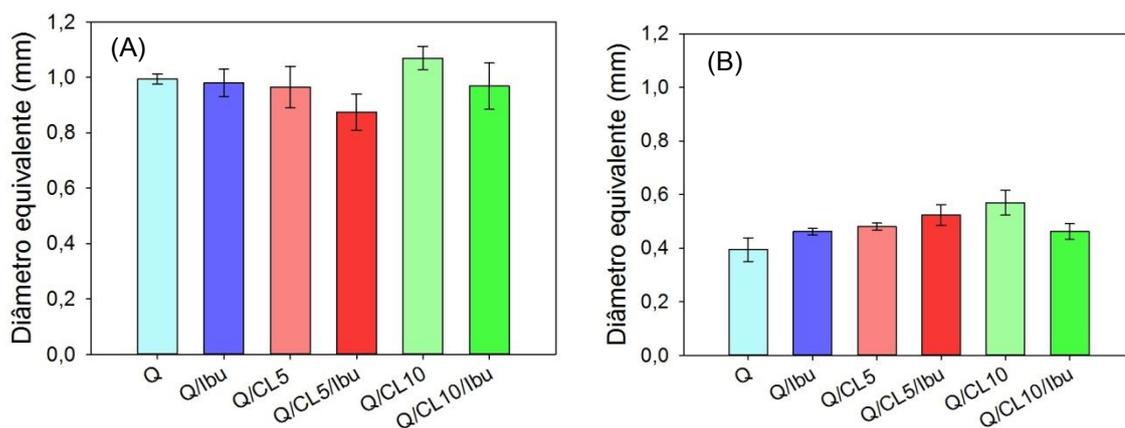


Figura 9 - Diâmetro equivalente das microesferas preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (A) e 10 mL.min⁻¹ (B), nas diferentes composições.

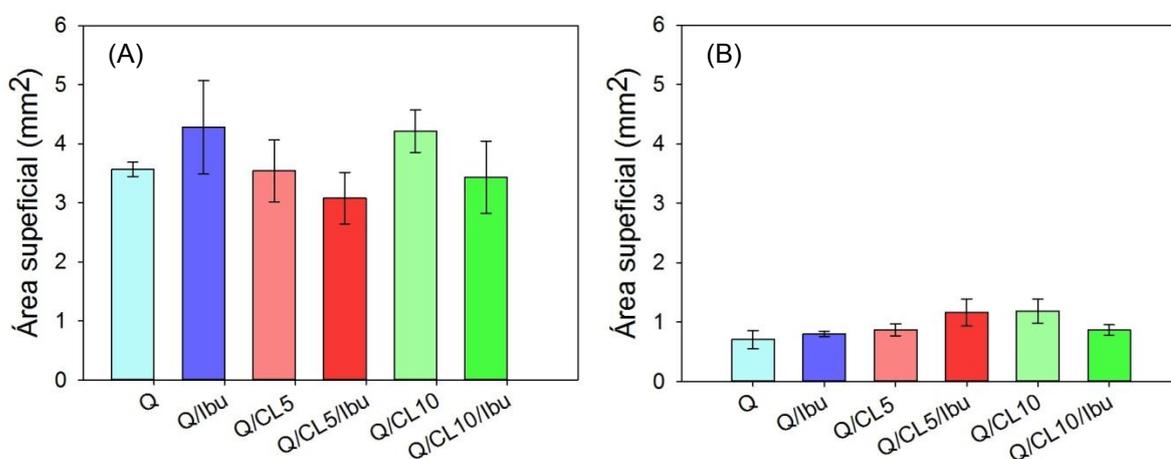


Figura 10 - Área superficial das microesferas preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (A) e 10 mL.min⁻¹ (B), nas diferentes composições.

Tabela 1 - Dados dimensionais das microesferas.

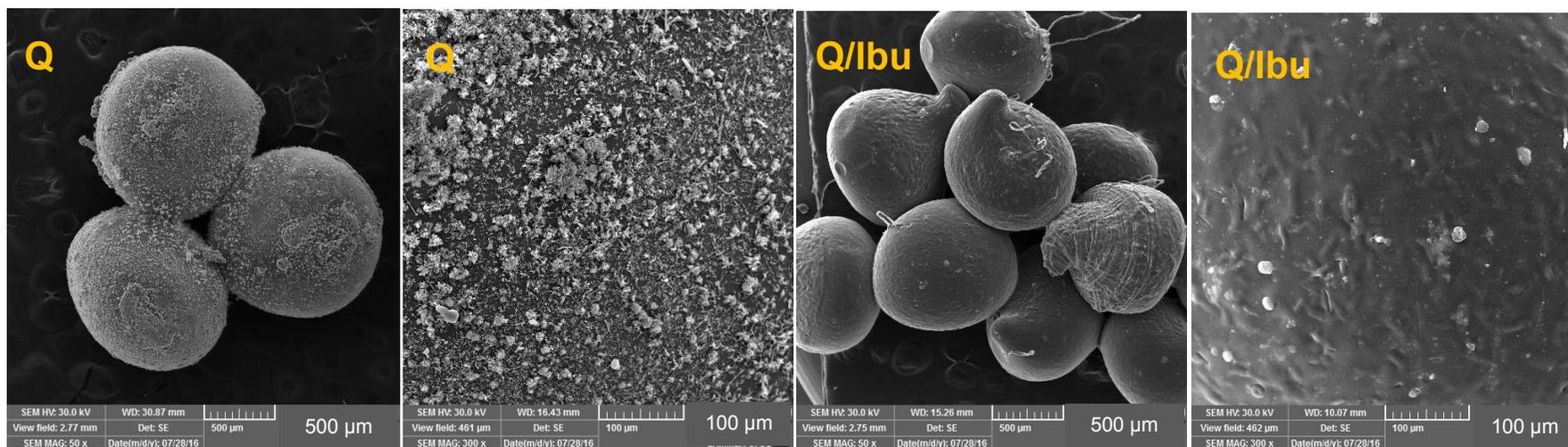
Vazão de ar (mL.min⁻¹)	Amostra	Diâmetro equivalente (mm)	Volume (mm³)	Área Superficial (mm²)	Esfericidade
2,5	Q	0,993 ± 0,018	0,513 ± 0,028	3,568 ± 0,120	1,073 ± 0,012
	Q/Ibu	0,980 ± 0,049	0,497 ± 0,077	4,277 ± 0,791	1,170 ± 0,143
	Q/CL5	0,964 ± 0,075	0,476 ± 0,115	3,540 ± 0,521	1,098 ± 0,386
	Q/CL5/Ibu	0,874 ± 0,066	0,354 ± 0,084	3,077 ± 0,439	1,130 ± 0,039
	Q/CL10	1,069 ± 0,042	0,643 ± 0,076	4,213 ± 0,357	1,081 ± 0,251
	Q/CL10/Ibu	0,968 ± 0,084	0,484 ± 0,133	3,434 ± 0,612	1,076 ± 0,340
10	Q	0,394 ± 0,044	0,045 ± 0,013	0,703 ± 0,150	1,194 ± 0,122
	Q/Ibu	0,462 ± 0,012	0,051 ± 0,206	0,801 ± 0,046	1,092 ± 0,022
	Q/CL5	0,480 ± 0,013	0,047 ± 0,015	0,868 ± 0,098	1,185 ± 0,029
	Q/CL5/Ibu	0,523 ± 0,038	0,075 ± 0,016	1,157 ± 0,224	1,154 ± 0,055
	Q/CL10	0,570 ± 0,047	0,098 ± 0,025	1,184 ± 0,205	1,072 ± 0,140
	Q/CL10/Ibu	0,462 ± 0,029	0,052 ± 0,010	0,865 ± 0,089	1,133 ± 0,026

É perceptível, por meio das imagens de MO, dados dimensionais da Tabela 1 e gráficos da Figura 9, que a maior vazão de ar do sistema de arraste resultou na diminuição do diâmetro das microesferas de quitosana, quitosana/CL sem e com Ibu, bem como na diminuição dos outros parâmetros de processo (volume, área superficial, esfericidade). A adição de cloisite às microesferas resultou em um contorno menos esférico, porém a variação no teor de cloisite não alterou de forma significativa as dimensões das microesferas. Segundo Dias *et al.* (2008), a vazão de ar que flui paralelamente à agulha é o principal responsável pelo arraste da gota, impedindo que esta cresça. Portanto, quanto maior o fluxo de ar, maior a força de arraste, impedindo o crescimento da gota, gerando, desta forma, uma microesfera com dimensões menores.

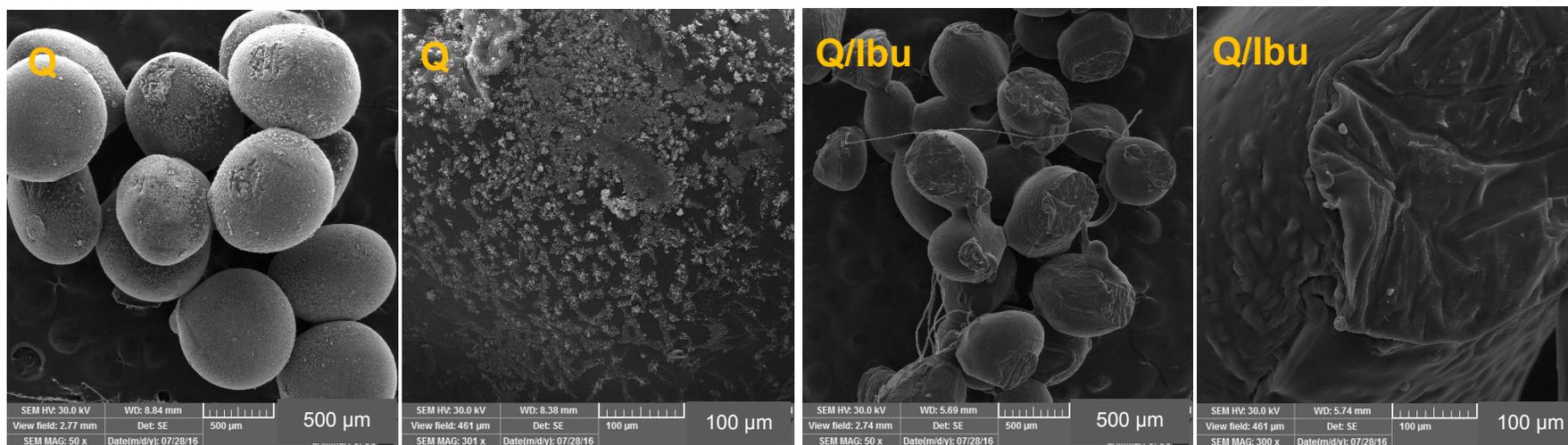
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das superfícies das microesferas de quitosana e quitosana/CL sem e com Ibu, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazões de ar de 2,5 e 10 mL.min⁻¹, foram também avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens das referidas morfologias estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13.

As microesferas de quitosana (Figura 11) apresentaram uma morfologia irregular, onde se observa domínios nodulares (em forma de cristais) distribuídos ao longo das microesferas. De acordo com Assis e Silva (2003), os núcleos encontrados são, provavelmente, aglomerados de cadeias poliméricas resultantes da interação em meio aquoso. Estrutura similar também foi relatada por Orrego e Valencia (2009) em sua pesquisa. As microesferas de quitosana/Ibu (Figura 11) apresentaram, ao contrário das de quitosana pura, morfologia mais regular (ausência de domínios nodulares) e uma superfície pouco rugosa. Conforme Hua *et al.* (2010), isto é indicativo de que o Ibu se dispersou na matriz de quitosana, eliminando os cristais de sua estrutura.



(a)



(b)

Figura 11 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min⁻¹ (b).

Observa-se também (Figura 11) que a vazão de ar afetou a forma e o tamanho das microesferas. As microesferas obtidas com menor vazão de ar de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 11a) são maiores e mais esféricas do que as obtidas com maior vazão de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 11b). Por outro lado, com a variação na vazão de ar, a rugosidade não foi aparentemente afetada.

As microesferas de quitosana/CL sem e com Ibu (Figuras 12 e 13) apresentaram uma superfície rugosa, este fato sugere que a adição de argila (CL) resultou na formação de nanocompósitos. Esta mudança morfológica na superfície, através da incorporação de CL, pode influenciar na capacidade de inchamento das microesferas, bem como, na liberação de Ibu (Hua *et al.*, 2010).

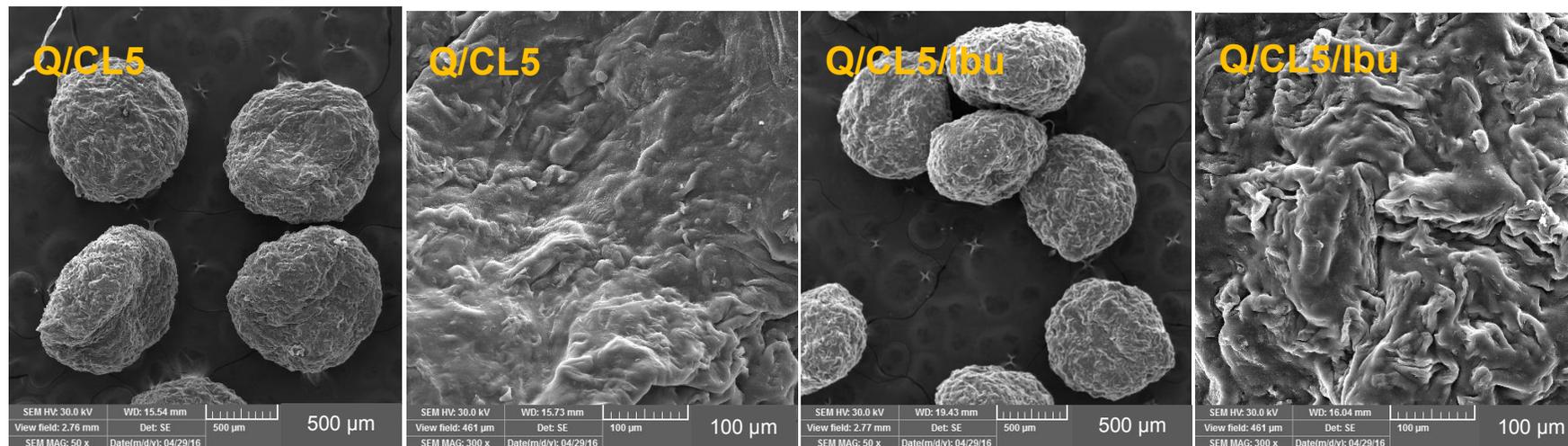
As microesferas preparadas com maior teor da argila CL (20% de argila que corresponde a uma razão quitosana/argila de 5:1 – Q/CL5) apresentaram-se mais rugosas do que as preparadas com menor teor (10% de argila, razão quitosana/argila de 10:1 – Q/CL10) (Figura 13). De acordo com a literatura (Flórido, 2013), isto é indicativo da presença de aglomerados de argila não dispersos.

Analisando os sistemas quitosana/CL/Ibu observa-se que, a adição de ibuprofeno à composição Q/CL5 favoreceu uma maior rugosidade quando comparada à mesma composição sem Ibu (Figura 12). Isto ocorreu devido à maior quantidade de cloisite que interagiu com o fármaco. Xu *et al.* (2006) comprovaram, em sua pesquisa, que os grupos $-\text{COOH}-$ (do ibuprofeno) poderiam interagir fortemente com os grupos hidroxila das camadas de montmorilonita. A intercalação do ibuprofeno em montmorilonita também foi investigada por Zheng *et al.* (2007) como um transportador na liberação controlada de fármacos. Em seu estudo, os compostos de intercalação foram caracterizados por diferentes técnicas entre elas: DRX e FTIR. O espaçamento basal de montmorilonita aumentou indicando que houve intercalação do Ibu.

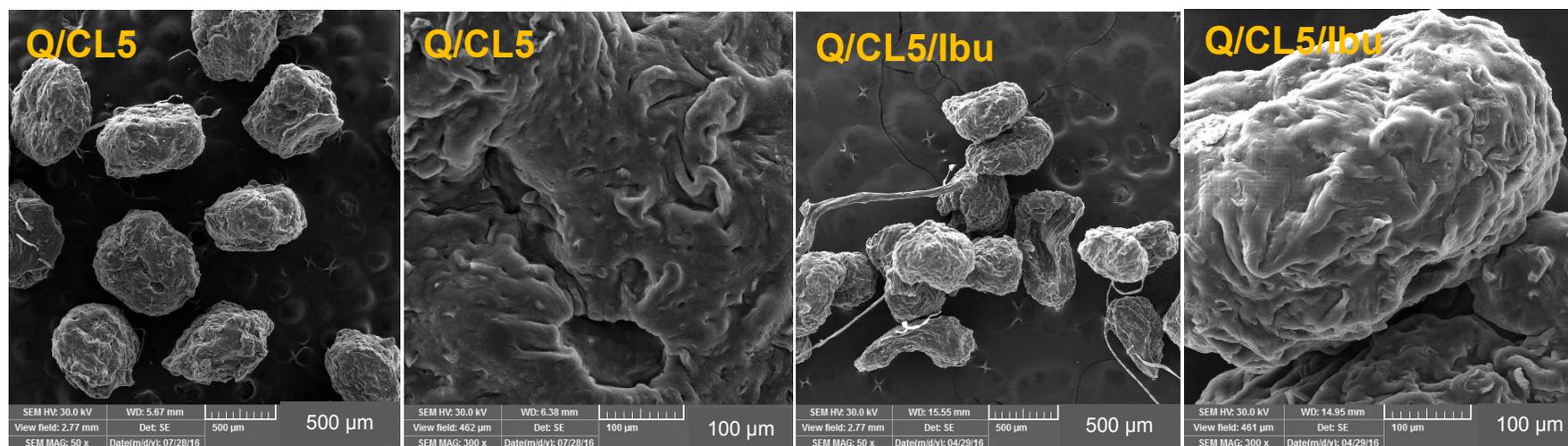
Para os sistemas Q/CL10 e Q/CL10/Ibu (Figura 13), ao contrário dos sistemas Q/CL5 e Q/CL5/Ibu (Figura 12), não foi observado rugosidade elevada, devido ao baixo teor de argila na composição dos mesmos. Entretanto, na vazão de ar $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fica evidenciado que o sistema Q/CL10/Ibu (Figura 13) apresentou-se menos esférico quando comparado ao sistema nessa mesma vazão e composição sem Ibu (Figura 13b). Isto ocorreu devido ao álcool (usado como solvente do

ibuprofeno) o que dificultou a obtenção das microesferas num fluxo de ar elevado, por ser muito volátil e causar obstrução na ponta da agulha.

Em análise comparativa e de modo geral, pode-se constatar que as microesferas obtidas com menor vazão de ar ($2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) são maiores do que as obtidas com maior vazão ($10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Observa-se, também, que as microesferas apresentaram formatos ainda mais ovalados quando a maior vazão de ar foi empregada na obtenção das mesmas. Com relação à rugosidade, foi observado comportamento semelhante para ambas as vazões de ar.

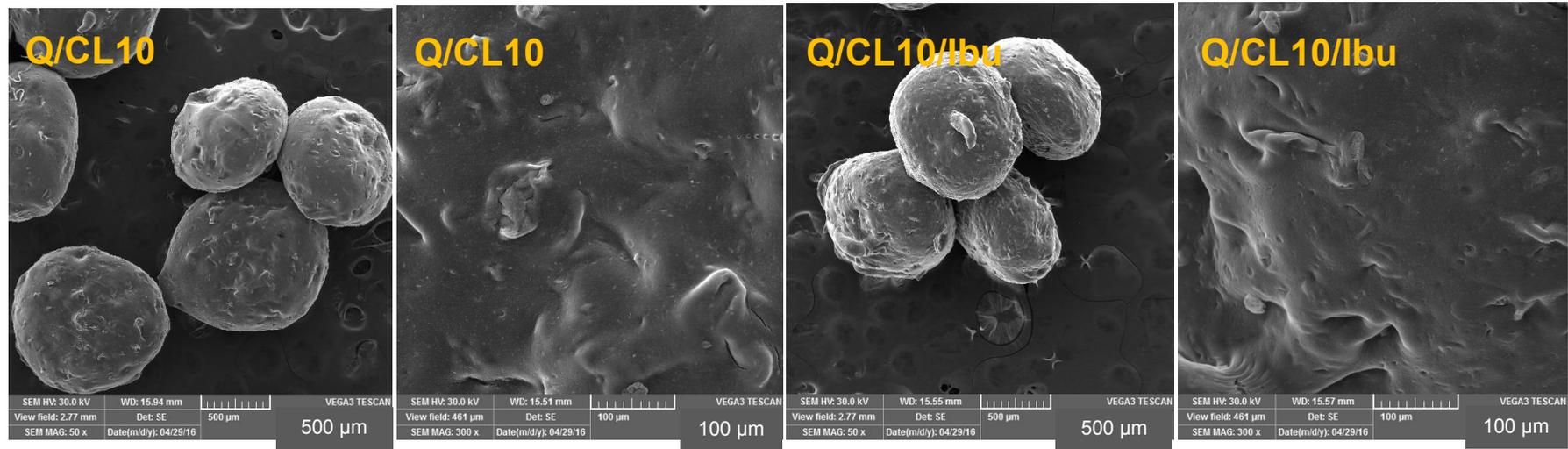


(a)

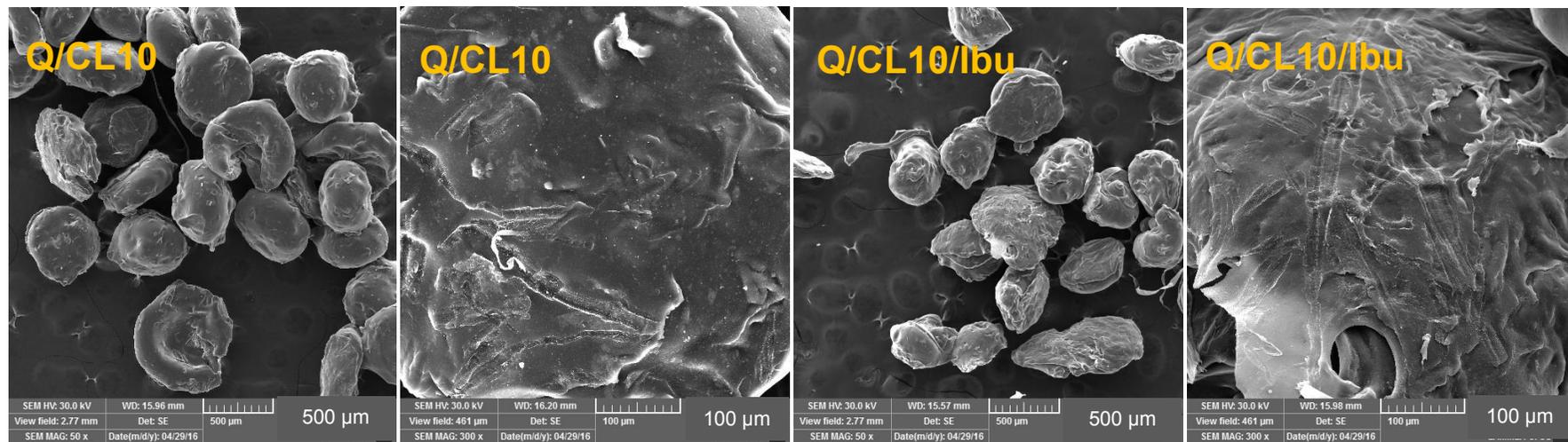


(b)

Figura 12 - Imagens, obtidas por MEV, das microsferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min⁻¹ (b).



(a)



(b)

Figura 13 - Imagens, obtidas por MEV, das microsferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 (a) e 10 mL.min⁻¹ (b).

Nas Figuras a seguir, 14 a 19, estão dispostas as ampliações de 2000 e 6000 vezes das microesferas de quitosana e quitosana/argila, sem e com Ibu, nas vazões de ar de 2,5 e 10 mL.min⁻¹.

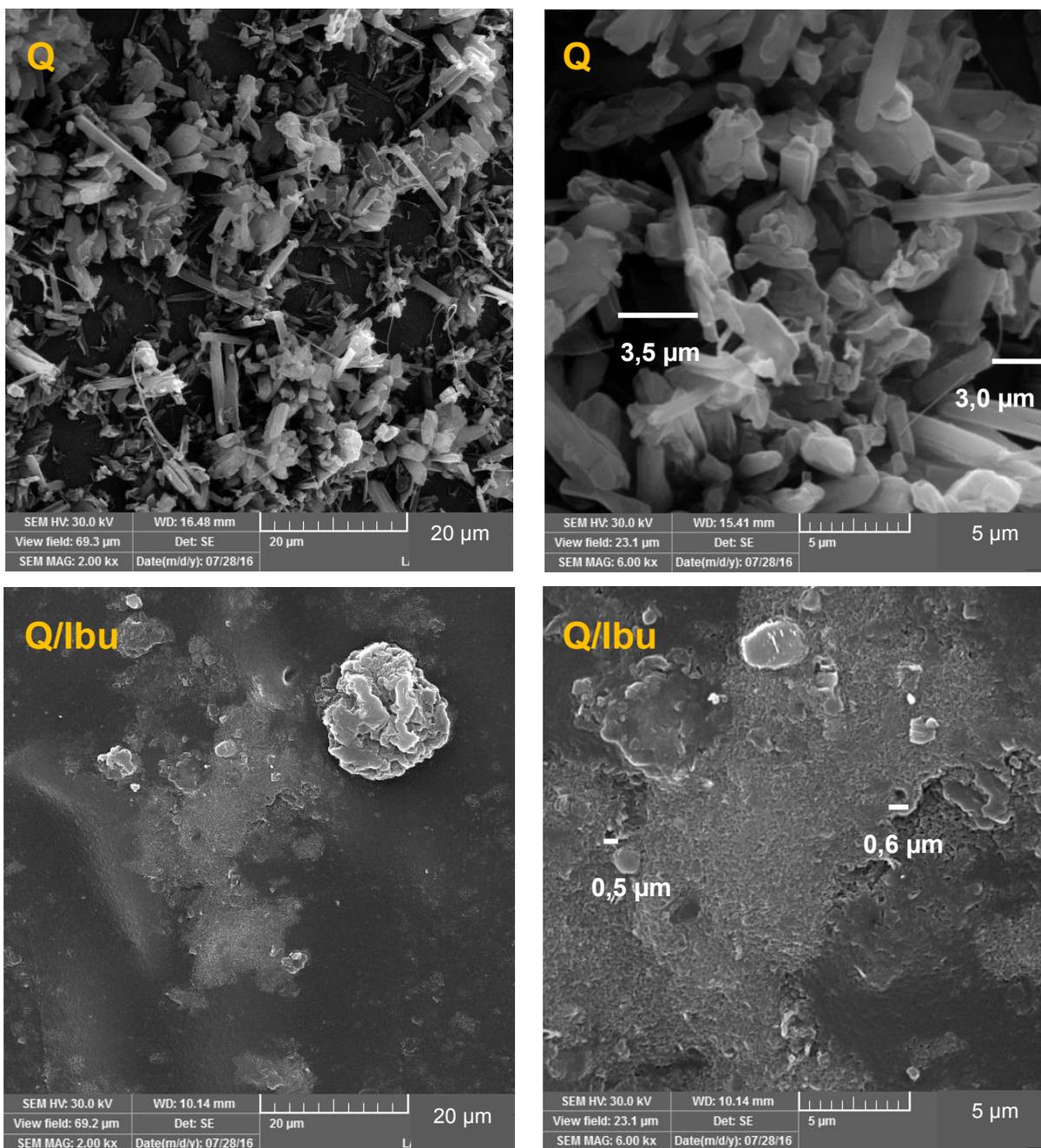


Figura 14 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazão de ar de 2,5 mL.min⁻¹.

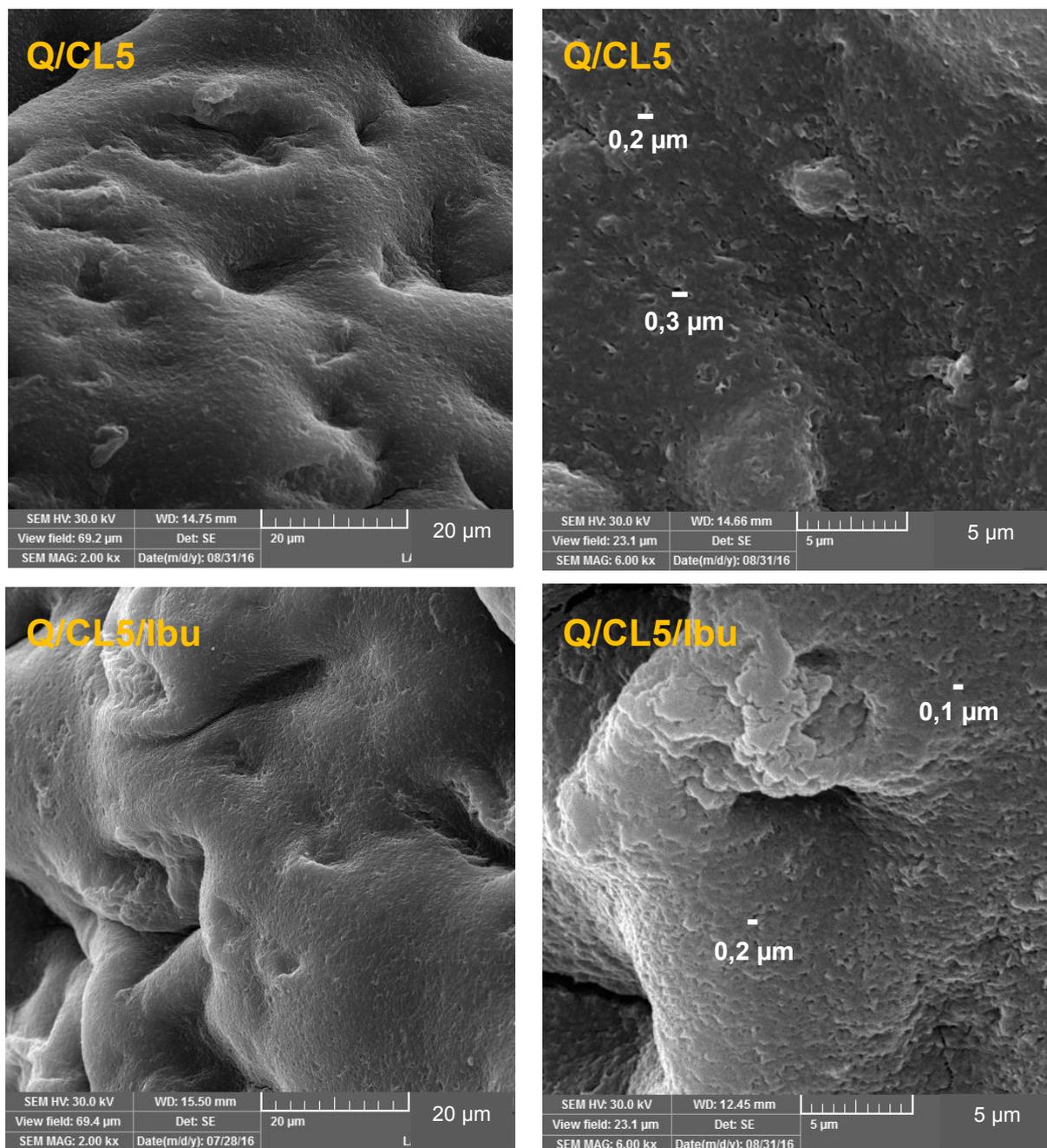


Figura 15- Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

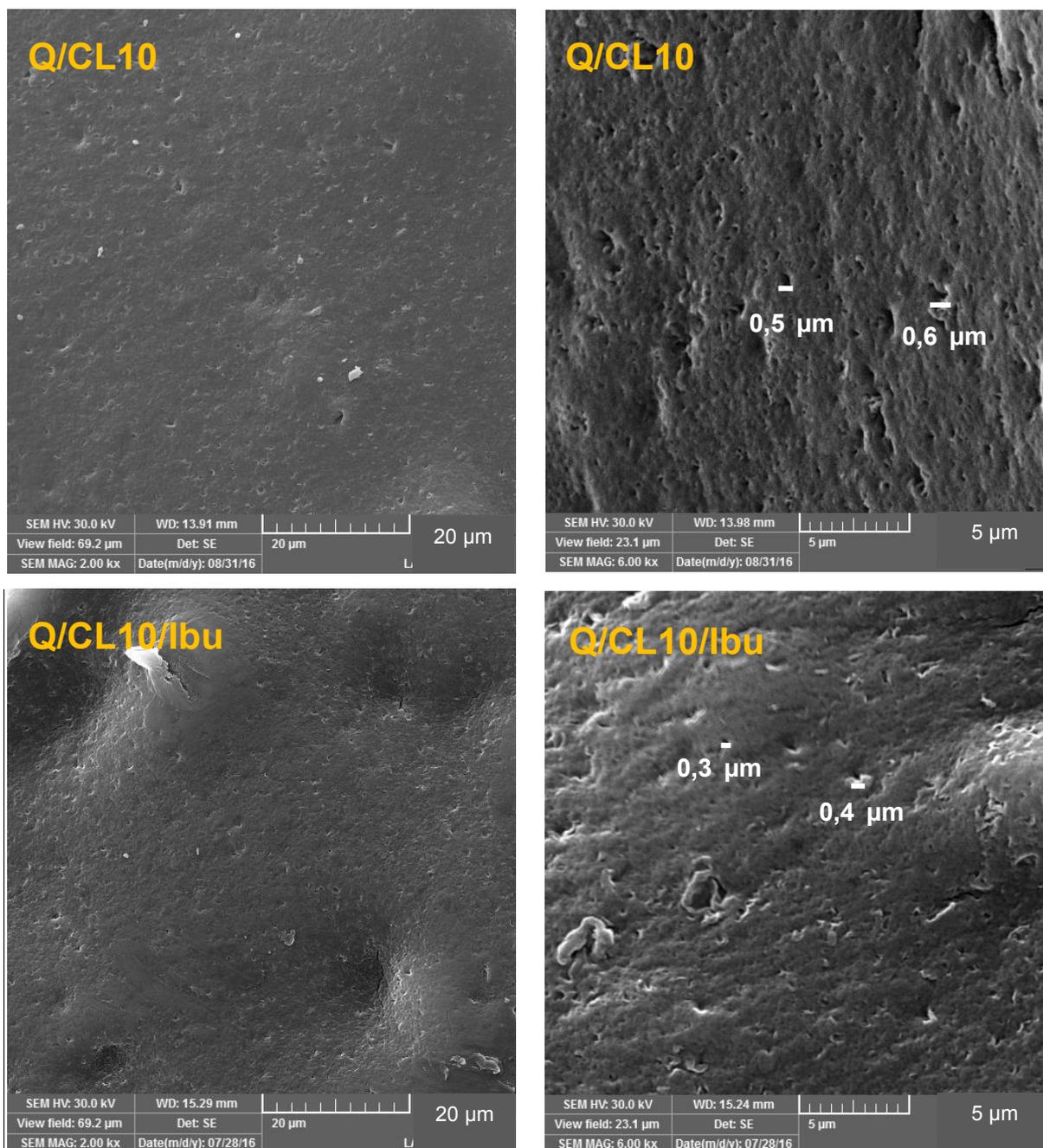


Figura 16 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

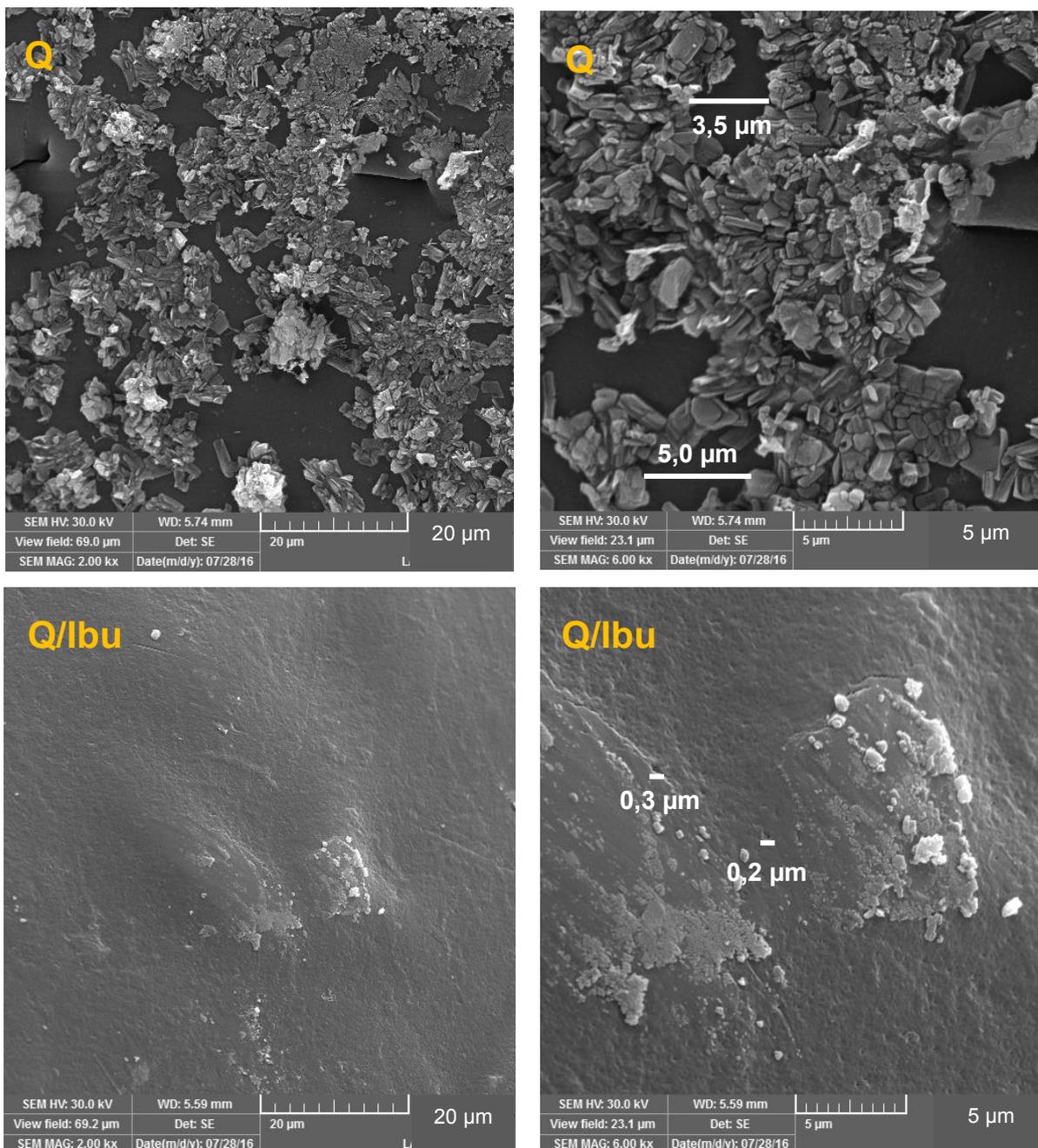


Figura 17 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana e quitosana/lbu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

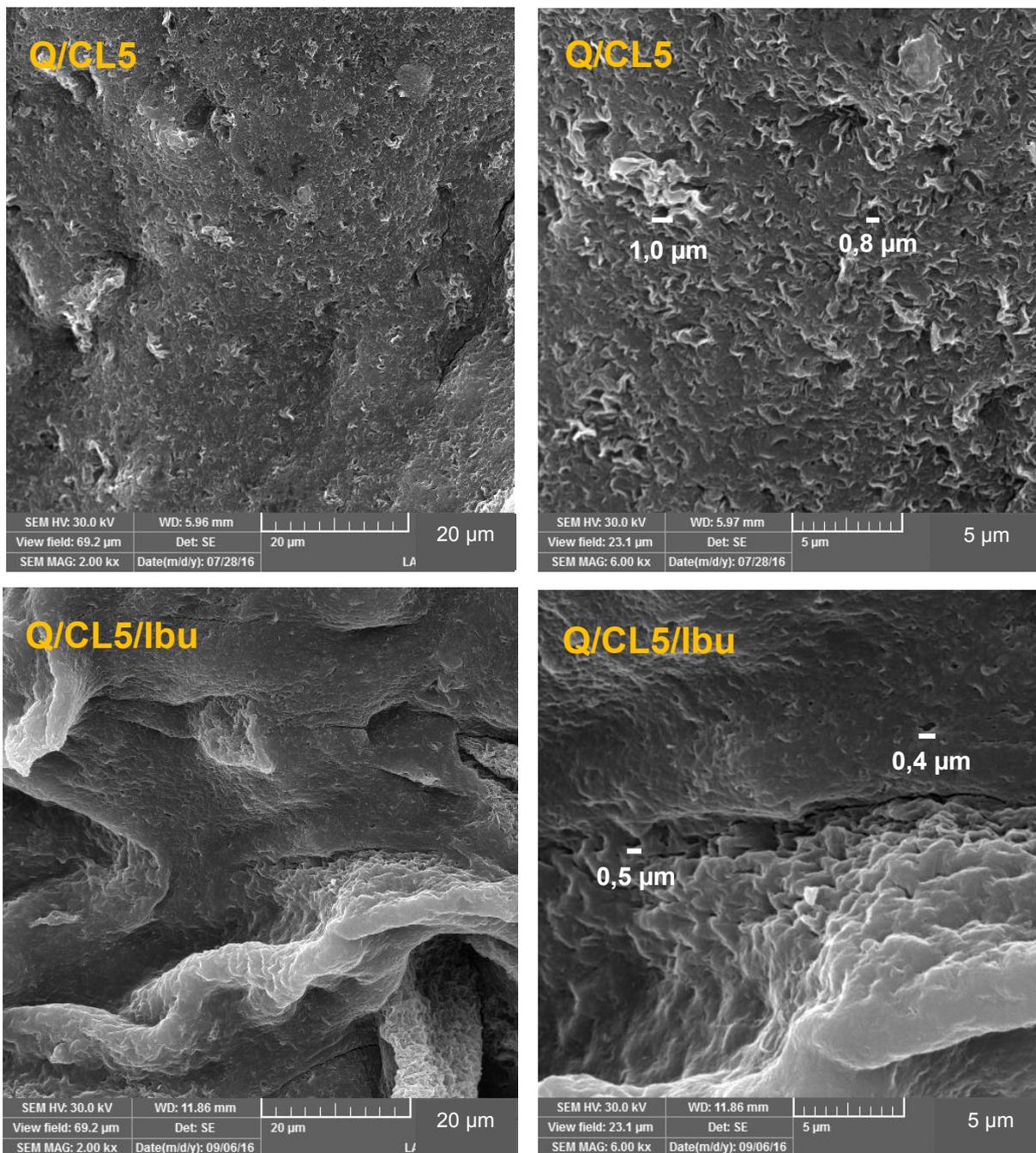


Figura 18 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL5 e quitosana/CL5/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

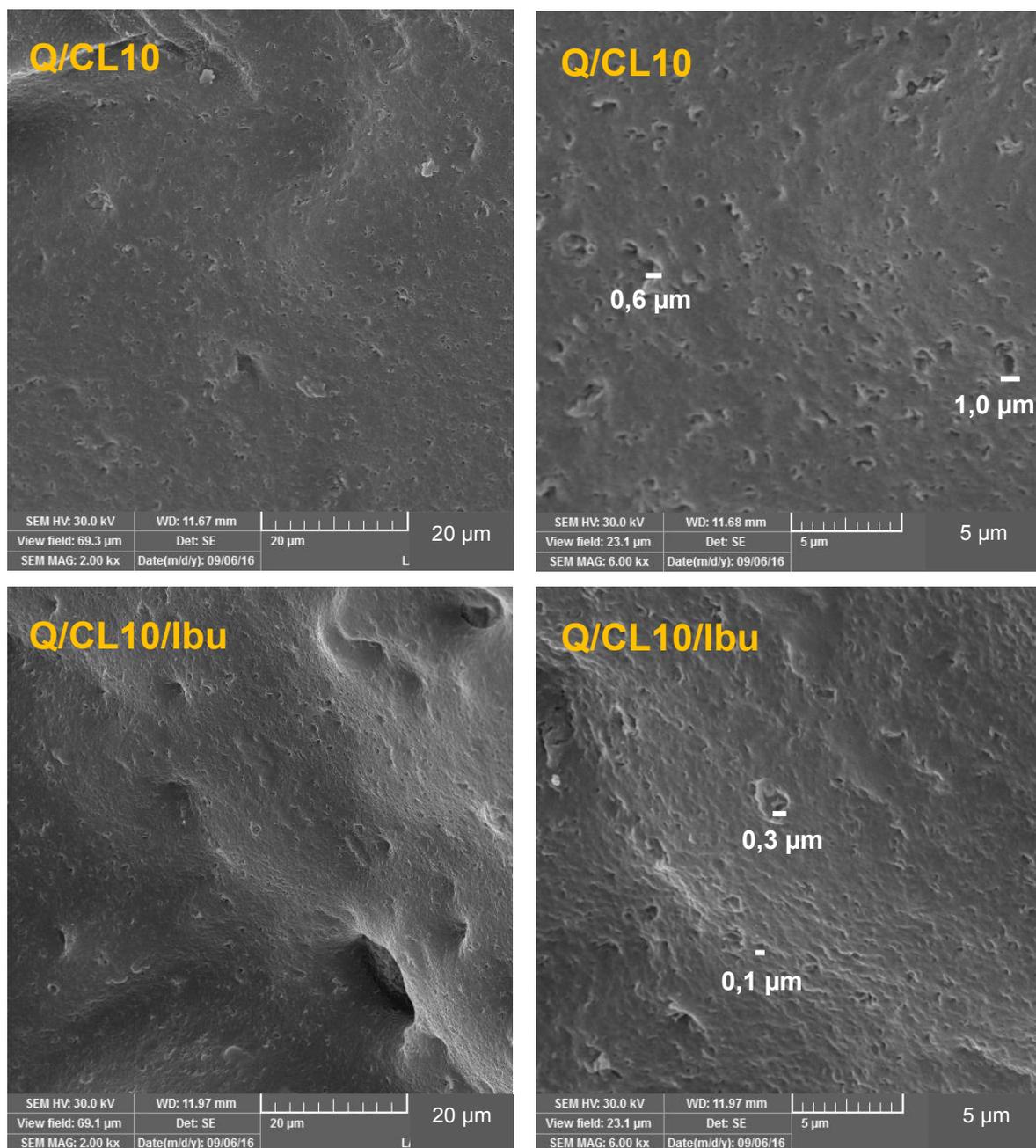


Figura 19 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de quitosana/CL10 e quitosana/CL10/Ibu, e suas respectivas ampliações, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de ar de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Com base nestas figuras (Figuras 14 a 19), pode-se observar que as microesferas de quitosana pura apresentam uma morfologia porosa, o que corrobora com morfologia encontrada por Azevedo *et al.* (2007) e por Pires (2010), enquanto que as microesferas contendo quitosana/CL e quitosana/CL/Ibu apresentaram morfologia diferenciada.

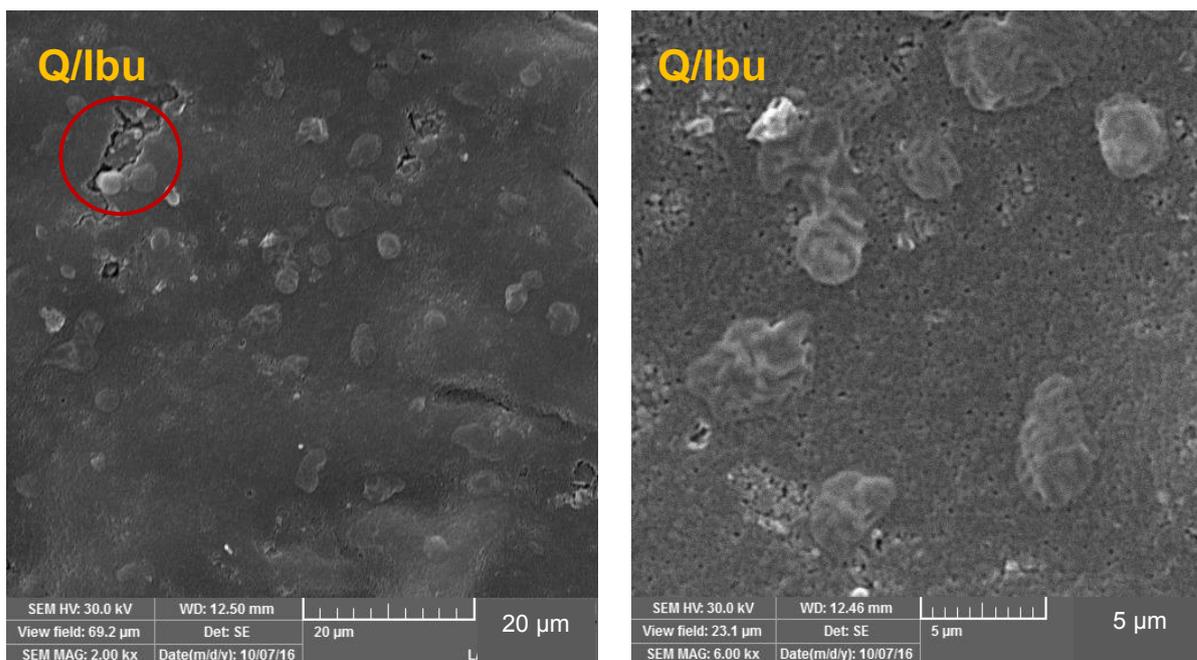
Nas figuras referentes à quitosana (Figuras 14 e 17) observou-se poros variando de 3,0 a 5,0 μm , e para a quitosana/cloisite foi observado poros menores entre 0,2 e 1,0 μm . Comportamento semelhante de redução do tamanho de poros foi verificado para a composição das microesferas de quitosana/lbu (Figura 14 e 17), com poros entre de 0,2 e 0,6 μm e para quitosana/CL/lbu (Figuras 15, 16 e 18, 19), com poros entre 0,1 e 0,5 μm .

Em análise comparativa, com relação à variação da proporção de argila (5:1 e 10:1) e à vazão de ar (2,5 e 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), constatou-se que esses dois parâmetros não afetaram significativamente o tamanho dos poros.

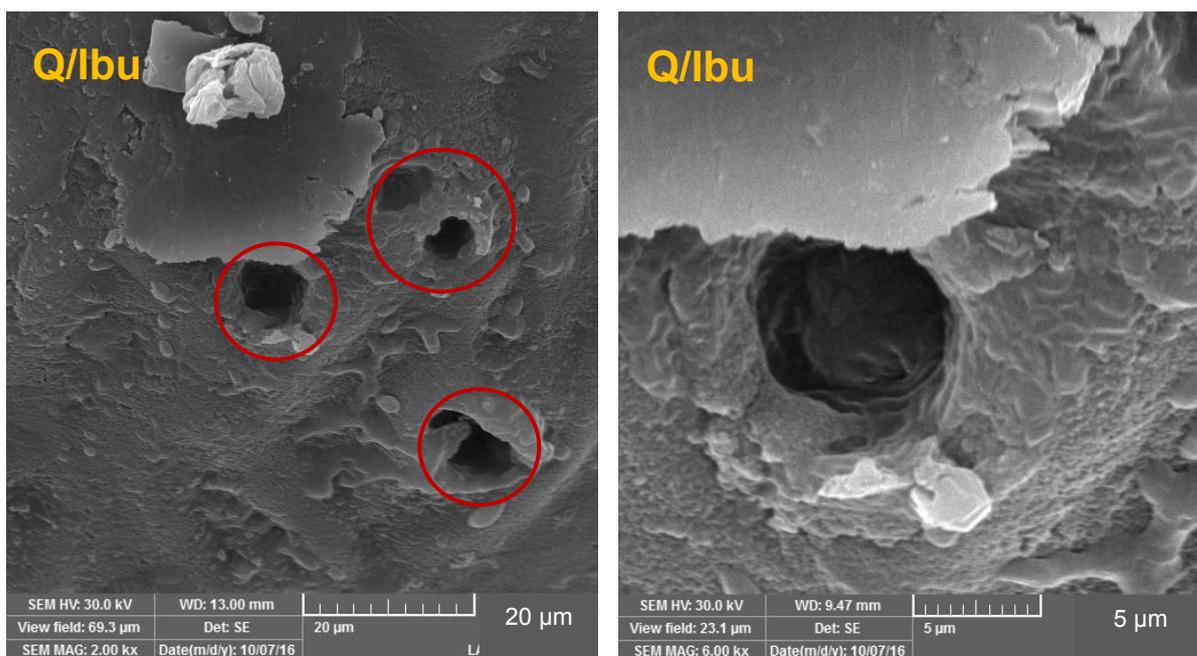
De forma geral, quando a argila foi misturada com a quitosana houve uma diminuição no tamanho dos poros, e com o encapsulamento do ibuprofeno à mistura quitosana/argila esta diminuição foi ainda maior. Portanto, a argila e o ibuprofeno contribuíram para o controle no tamanho dos poros das microesferas de quitosana, resultando na preparação de microesferas com uma morfologia mais uniforme, devido, possivelmente, a boa interação entre os componentes (Costa e Ferreira, 2014).

A morfologia das microesferas de quitosana/lbu e quitosana/CL/lbu após o ensaio de liberação controlada do fármaco também foi observada por MEV, e as imagens estão apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22. Após a liberação do fármaco, as microesferas apresentaram cavidades em sua morfologia (semelhantes a buracos), o que sugere que o ibuprofeno foi “arrancado” de sua estrutura, indicando, portanto, que o mesmo foi liberado para o meio (PBS).

As microesferas Q/lbu, preparadas com vazão de ar de 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 20b) apresentaram maiores cavidades (marcadas em vermelho). Isto pode ser porque as microesferas preparadas com vazão de ar de 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ são de tamanhos menores, e quanto menor o tamanho das microesferas, maior a superfície de contato, o que pode ter contribuído para que a difusão, mais fácil, do fármaco para o meio externo.

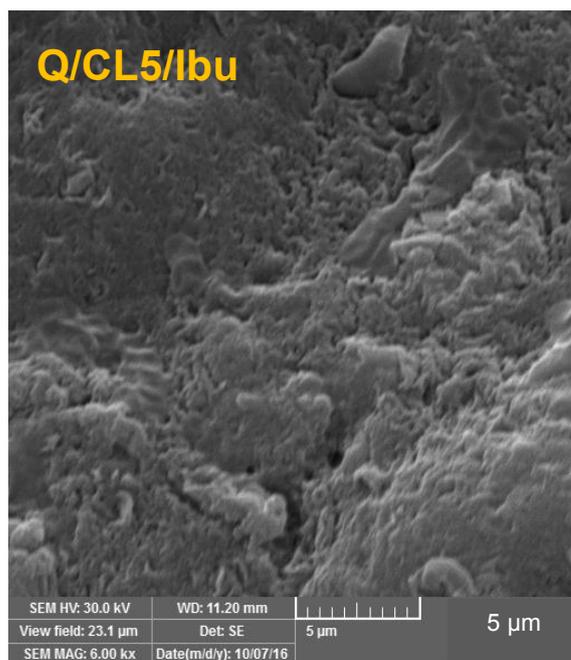
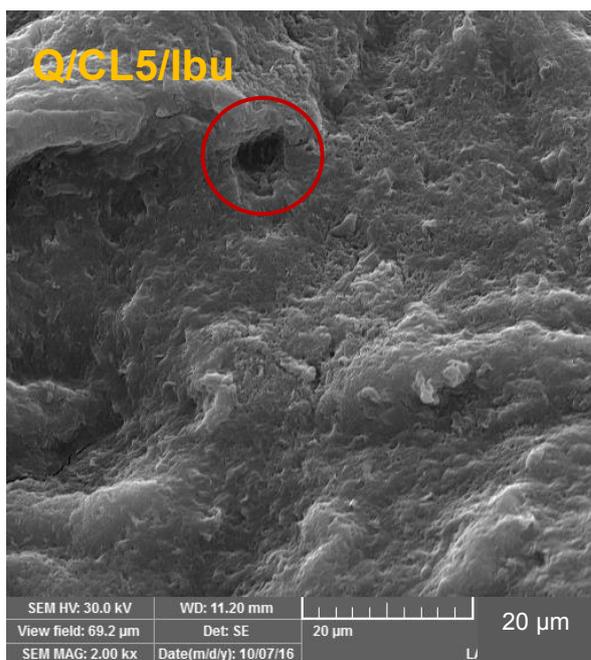


(a)

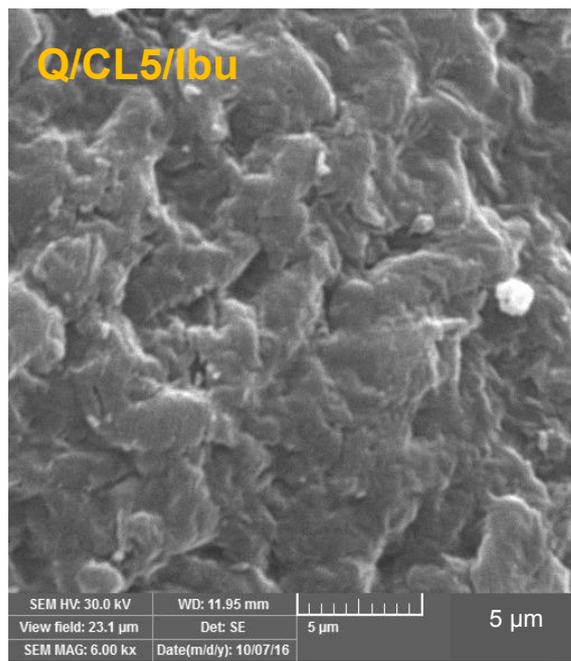
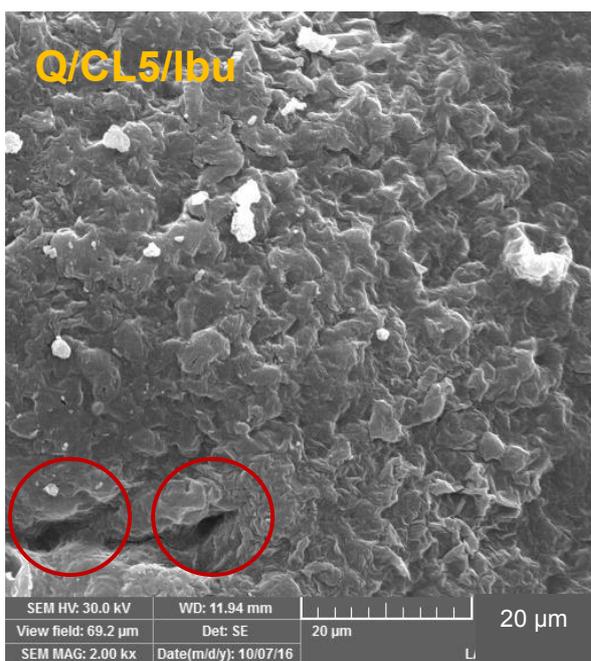


(b)

Figura 20 - Imagens, obtidas por MEV, das microsferas de Q/Ibu, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de $2,5$ (a) e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (b), bem como suas respectivas ampliações.

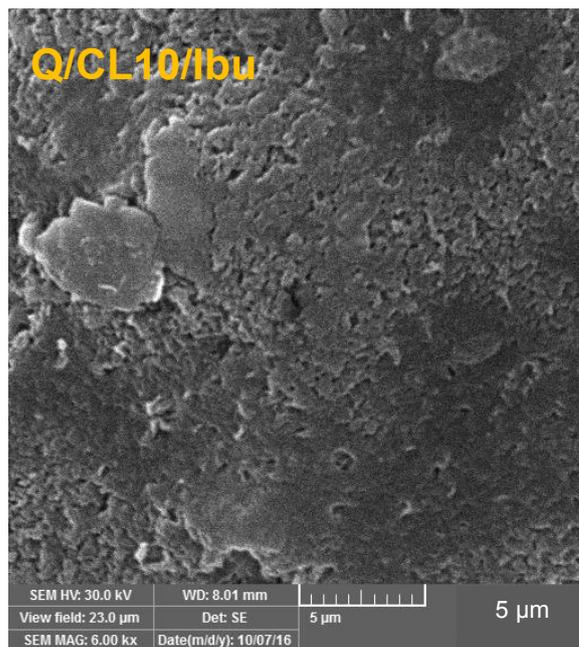
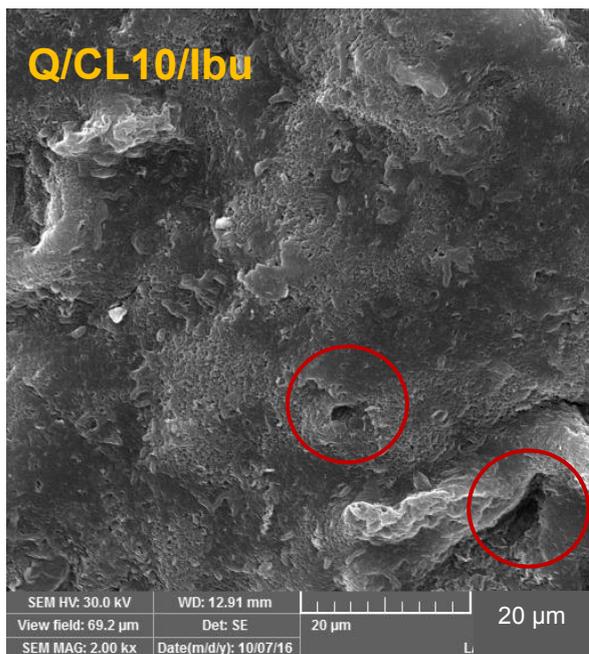


(a)

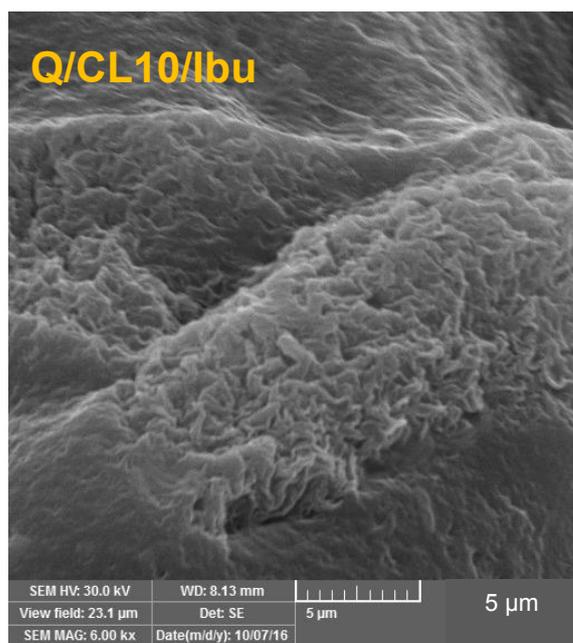
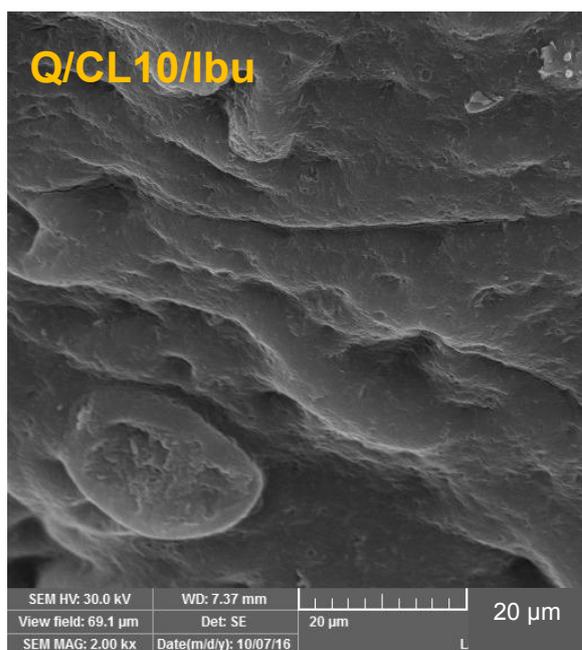


(b)

Figura 21 - Imagens, obtidas por MEV, das microsferas de Q/CL5/Ibu, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de 2,5 (a) e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (b), bem como suas respectivas ampliações.



(a)



(b)

Figura 22 - Imagens, obtidas por MEV, das microesferas de Q/CL10/Ibu, preparadas com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de 2,5 (a) e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (b), bem como suas respectivas ampliações.

4.3 Difractometria de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX do Ibu, CL, Q, Q/Ibu, Q/CL5, Q/CL5/Ibu, Q/CL10, Q/CL10/Ibu estão mostrados na Figura 23.

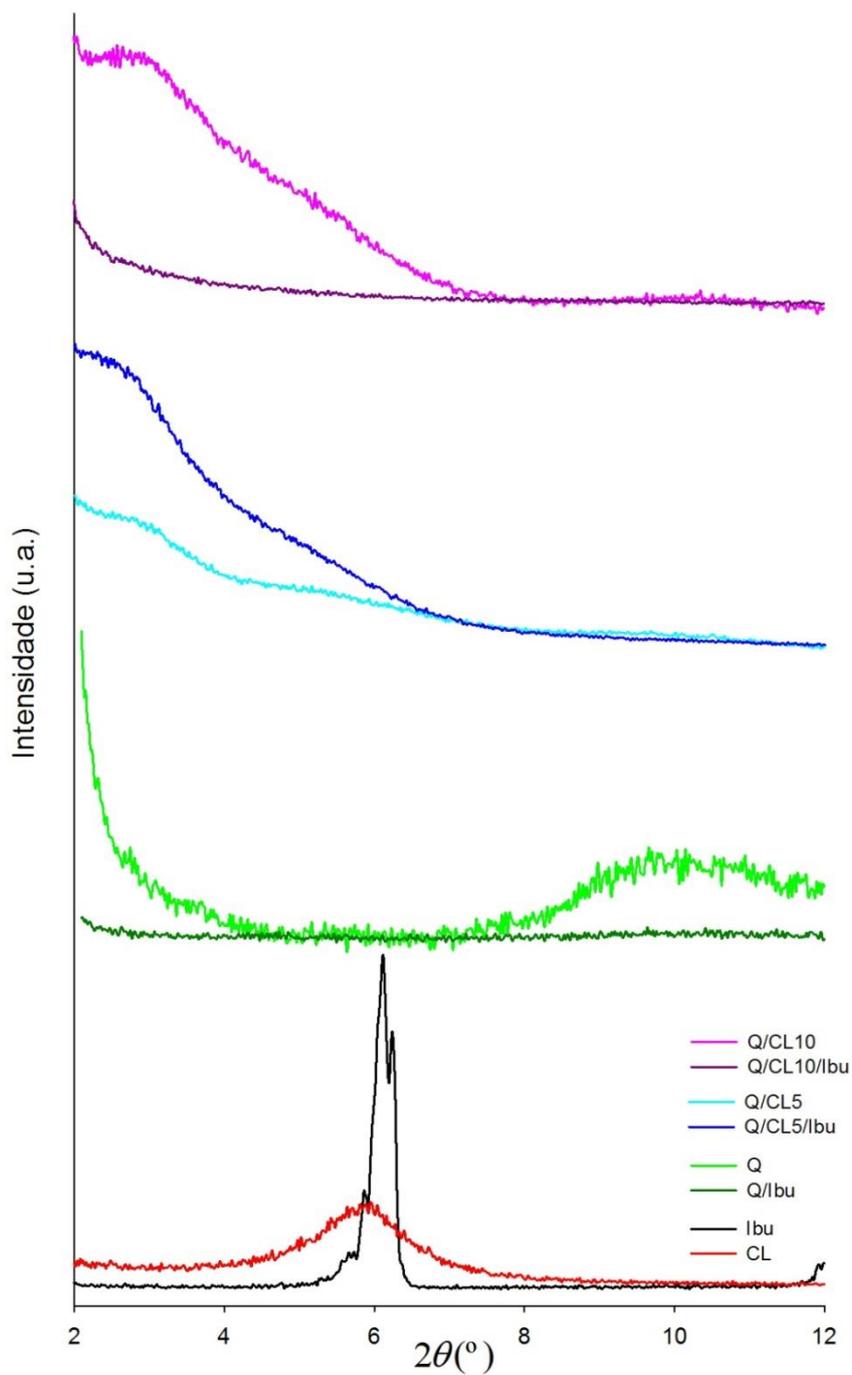


Figura 23 – Difractogramas da quitosana (Q), da argila (CL), do ibuprofeno (Ibu) e das composições Q/Ibu e Q/CL/Ibu.

O Ibu puro exibiu reflexão típica em $2\theta = 6,06^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar de aproximadamente 1,46 nm; sendo o mesmo valor encontrado por Zheng *et al.* (2007). A cloisite (CL) mostrou um pico em $2\theta = 5,93^\circ$, correspondente a um espaçamento basal de 1,48 nm. De acordo com De Paiva *et al.* (2008) esta reflexão é típica da montmorilonita sódica. O difratograma da quitosana (Q) apresentou pico típico de material semicristalino na faixa de $2\theta = 10^\circ$ que corrobora com Lima (2010) e Luo *et al.* (2011). Conforme descrito por Wan *et al.* (2003) esse pico, $2\theta = 10^\circ$, corresponde à forma cristalina I da estrutura da quitosana, essa forma é ortorrômbica e apresenta uma célula unitária com $a = 7,76 \text{ \AA}$, $b = 10,91 \text{ \AA}$ e $c = 10,30 \text{ \AA}$, que é referente ao plano de difração (100).

Quando Ibu foi incorporado na quitosana o pico característico da mesma em $2\theta = 10^\circ$ desapareceu, indicando que não foram encontrados cristais neste biopolímero carregado com o fármaco Ibu. Observa-se também que a reflexão em $6,06^\circ$, devido a presença de cristais de Ibu, desapareceram no difratograma Q/Ibu. Segundo Hua *et al.* (2010), isto indica a dispersão do Ibu em nível molecular na matriz de quitosana.

Os espaçamentos basais das amostras Q/CL10 e Q/CL5 foram de 2,98 nm ($2\theta = 2,96^\circ$) e 2,94 nm ($2\theta = 3,01^\circ$), respectivamente. Considerando a espessura da camada de montmorilonita de 0,96 nm (Utracki, 2004), as distâncias entre as camadas foram de 2,02 nm e 1,98 nm, respectivamente. De acordo com Tan *et al.* (2008), é possível que uma bicamada de moléculas de quitosana tenha sido intercalada entre as camadas da argila montmorilonota Cloisite® Na⁺ (Figura 24). Esta intercalação é favorecida pela interação eletrostática dos grupos (-NH₃⁺) da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando-se acessível os sítios para troca aniônica (Braga *et al.*, 2010).

Para os sistemas Q/CL10 e Q/CL5 contendo Ibu (Q/CL10/Ibu, Q/CL5/Ibu), observou-se o desaparecimento do pico correspondente à distância interplanar basal para o sistema Q/CL10/Ibu e um deslocamento do pico da argila para valores menores de 2θ ($2\theta = 2,65^\circ$) para o sistema Q/CL5/Ibu, resultando em um aumento da distância interlamelar ($d_{001} = 3,31 \text{ nm}$), indicando que além da intercalação do biopolímero quitosana houve a intercalação do Ibu nas lamelas da argila (Figura 25) e que a quantidade de argila misturada à quitosana afetou a morfologia dos nanocompósitos obtidos. A morfologia do sistema Q/CL10/Ibu apresentou-se

predominantemente esfoliada e a do sistema Q/CL5/lbu apresentou-se intercalada ordenada. Para estes sistemas, a reflexão em $6,06^\circ$ devido à presença de cristais de Ibu também desapareceu (Figura 23). Hua *et al.* (2010) e Peres (2014) atribuíram tal fato à dispersão do Ibu em nível molecular na matriz de quitosana, ou a intercalação do mesmo entre as camadas da argila.

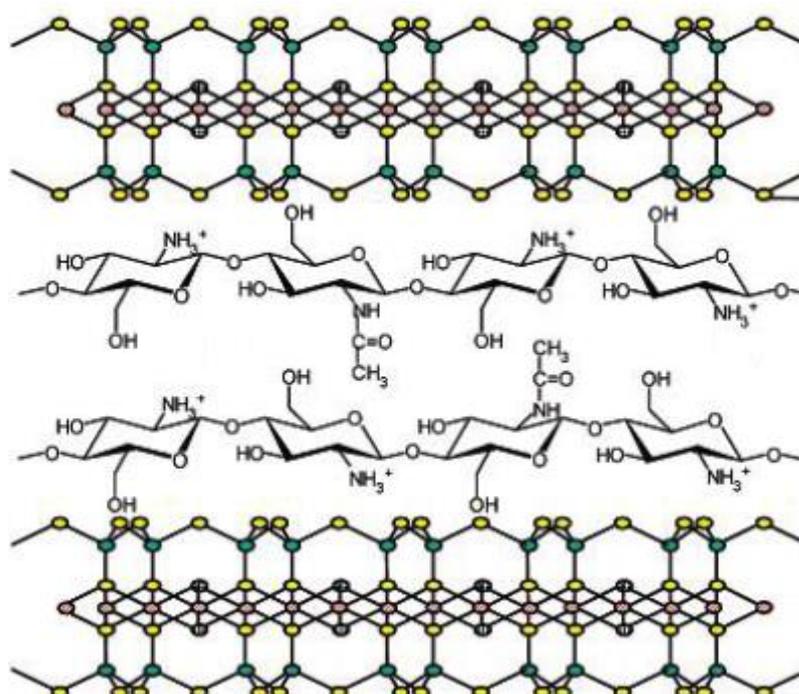


Figura 24 - Interação da quitosana em motmorilonita (Darder *et al.*, 2003).

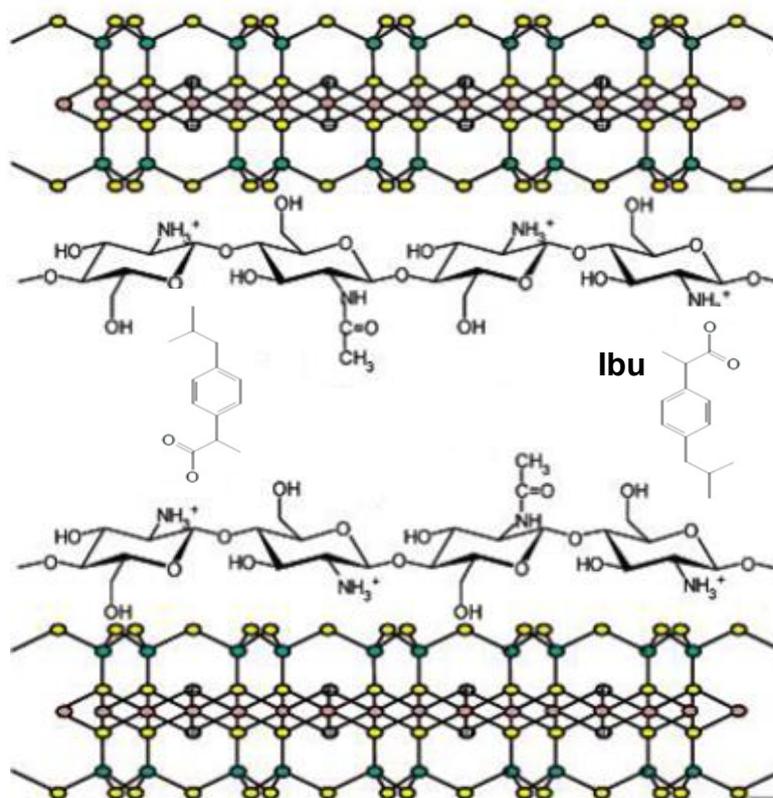


Figura 25 - Interação da quitosana e ibuprofeno em motmorilonita, adaptada de Darder *et al.* (2003).

4.4 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)

A espectroscopia na região do infravermelho foi empregada no estudo do processo de liberação do fármaco; etapa muito importante no desenvolvimento deste trabalho, pois revela a capacidade de utilizar os materiais híbridos sintetizados como dispositivos de liberação controlada, já que esta foi a aplicação proposta para estes materiais neste projeto de mestrado.

A concentração do ibuprofeno no meio de imersão em solução tampão PBS na temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ foi determinada a partir do monitoramento *in situ* da evolução da banda característica deste fármaco em 222 nm, região do espectro em que o fármaco apresenta sua absorção máxima (Zheng *et al.*, 2007). Um exemplo da evolução desta banda é mostrado na Figura 26.

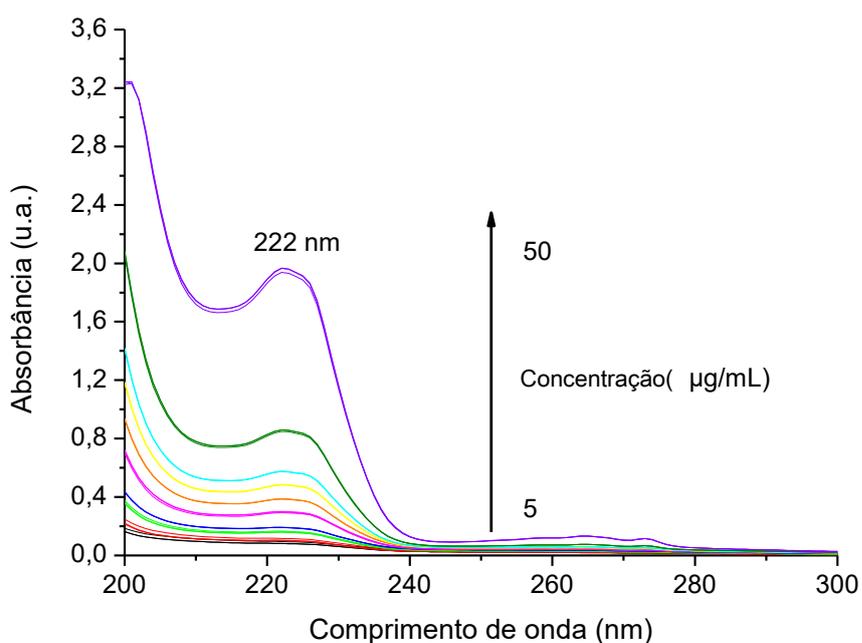


Figura 26 - Exemplo da evolução da banda característica do ibuprofeno em 222 nm.

A curva de calibração para o ibuprofeno no meio PBS está mostrada na Figura 27. A referida curva mostrou-se linear no intervalo de concentrações estudado (5 – 50 µg/mL) e a equação da reta fornecida pela regressão linear está apresentada na referida figura.

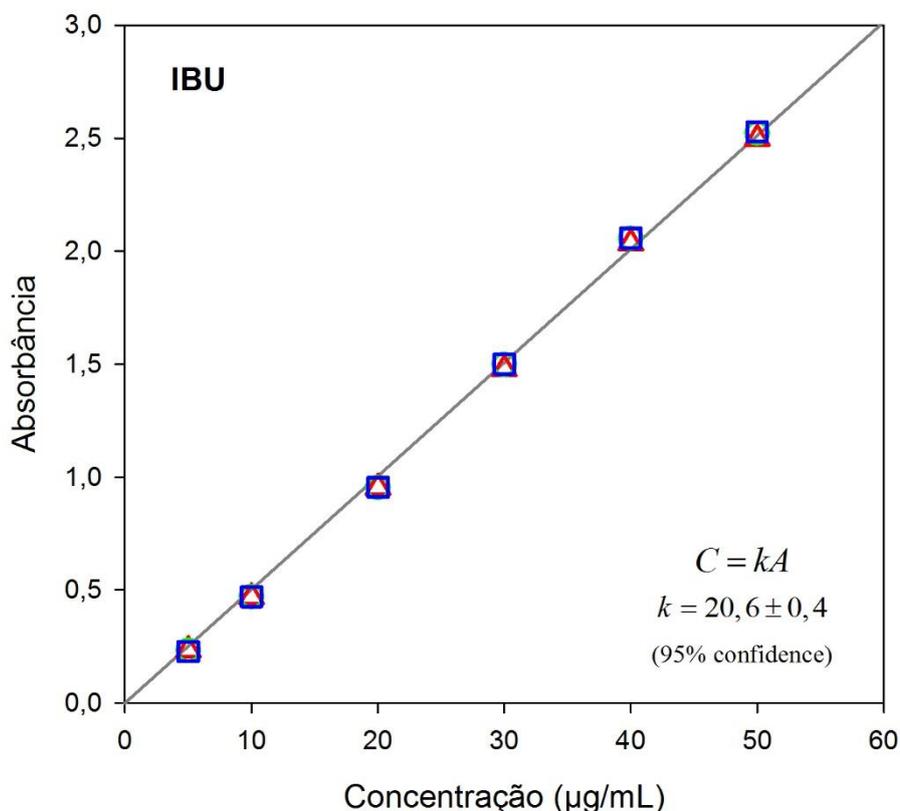


Figura 27 - Curva de calibração do ibuprofeno em PBS pH 7,2 ($\lambda = 222 \text{ nm}$).

A liberação do fármaco *in-vitro* foi estudada em solução tampão fosfato – PBS (pH = 7,2), que simula o ambiente gastrointestinal, e o meio de liberação foi quantificado por medida direta da absorbância à 222 nm, feita no UV-Vis.

Os perfis de liberação do ibuprofeno a partir dos sistemas Q/Ibu, Q/CL5/Ibu e Q/CL10/Ibu, com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de 2,5 e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ estão dispostos nas Figuras 28 e 29. A liberação do ibuprofeno foi analisada no pH 7,2, simulando o pH intestinal.

As curvas obtidas de massa liberada em função do tempo (Figura 28) mostraram que tanto para a vazão de ar de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 28A) quanto para a vazão de ar $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 28B) o sistema que obteve maior massa liberada foi o Q/CL10/Ibu, a partir de aproximadamente 55 horas. Analisando apenas a Figura 28A, observa-se que praticamente não se obteve mudança no comportamento das curvas, ou seja, a incorporação de argila no sistema não alterou de forma significativa a liberação, tendo um aumento discreto de 0,05 mg de Ibu liberado para

as microesferas de Q/CL10/Ibu. Enquanto que nas curvas da Figura 28B esse aumento foi de 0,12mg.

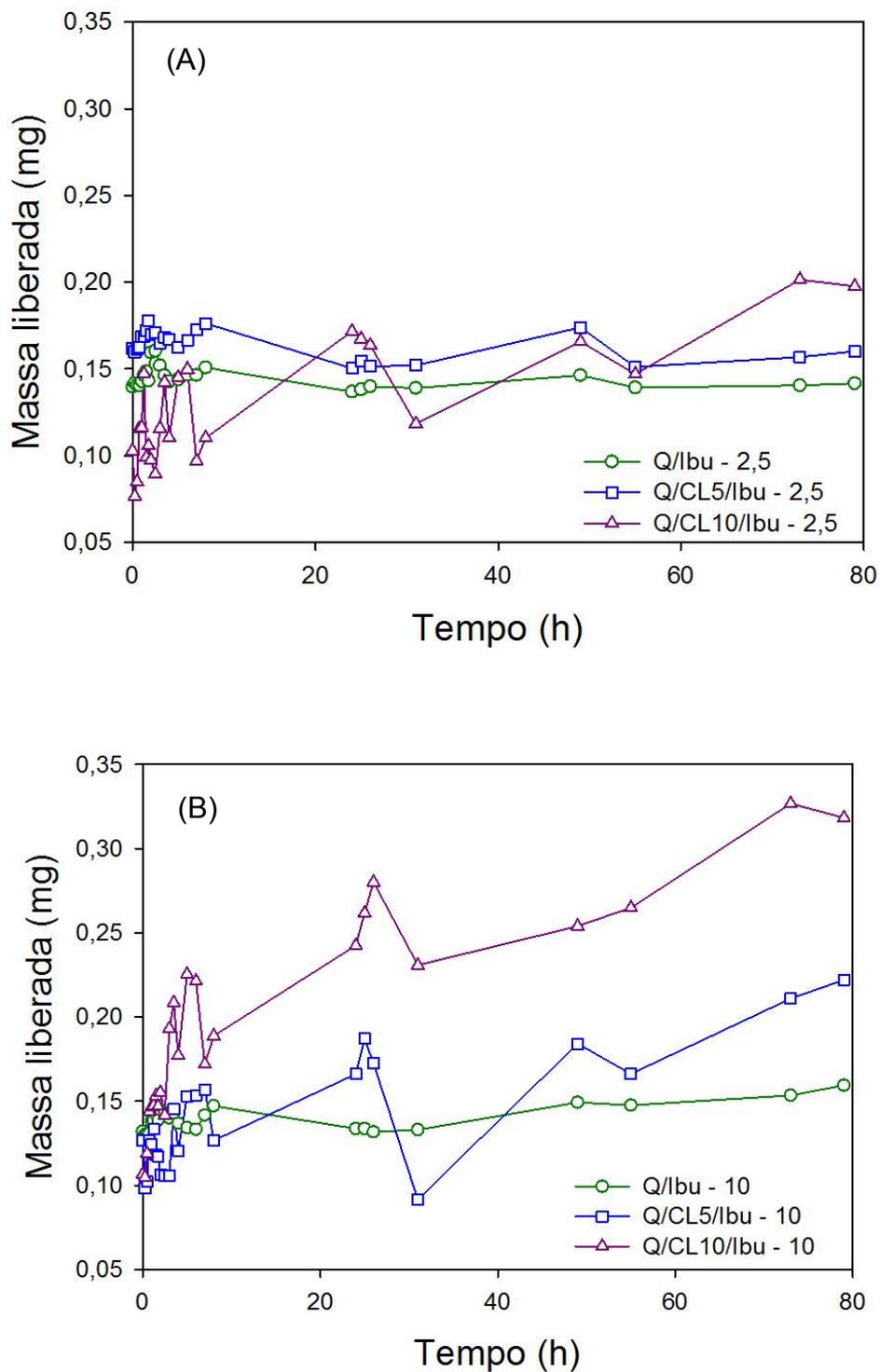


Figura 28 - Perfis da massa liberada do ibuprofeno a partir dos sistemas Q/Ibu, Q/CL5/Ibu e Q/CL10/Ibu, com vazão de injeção de 0,150 mL.min⁻¹ e vazões de ar de 2,5 (A) e 10mL.min⁻¹ (B), em pH 7,2.

A quantidade máxima de ibuprofeno liberado a partir das microesferas de Q/CL10/ibu na vazão de 2,5 mL.min⁻¹ foi de 0,20 mg. Em análise comparativa, observa-se que, para a vazão de ar de 10 mL.min⁻¹ o máximo de ibuprofeno liberado foi de 0,33 mg em 80 horas. Portanto, nos perfis de liberação da Figura 28B pode-se constatar que há uma influência maior da incorporação de argila no sistema. Os sistemas Q/CL5/ibu e Q/CL10/ibu liberam uma quantidade maior de Ibu em comparação com o sistema Q/ibu, sendo a maior taxa de liberação evidenciada na curva de Q/CL10/ibu.

O aumento na quantidade de Ibu liberado pelo sistema Q/CL10/ibu deve-se, principalmente, ao tipo de nanocompósito formado. Os resultados de DRX sugeriram a formação de um nanocompósito esfoliado para o sistema Q/CL10/ibu (que contém 10% de argila) corroborando com os resultados apresentados por Meneghetti e Qutubuddin (2006) e Suin *et al.* (2013) em estudo semelhante. De acordo com Zhu (2002), estruturas cristalinas tendem a resistir mais à difusão de um fármaco em relação à estruturas esfoliadas (amorfas), logo estruturas esfoliadas têm a tendência a liberar mais fármaco. Estudos conduzidos por Aguzzi *et al.* (2007) e Joshi *et al.* (2009) analisaram esse tipo de material em sistemas de liberação controlada e obtiveram resultados semelhantes.

O tamanho das microesferas nas diferentes vazões de ar (2,5 e 10 mL.min⁻¹) também foram de grande influência nos perfis de liberação do ibuprofeno. As microesferas menores (vazão de ar de 10 mL.min⁻¹) liberaram mais, possivelmente pelo fato delas possuírem maior superfície de contato, facilitando à difusão do Ibu.

Observa-se ainda que com uma maior quantidade de argila no sistema (Q/CL5/ibu) o Ibu não é liberado tão facilmente, indicando que a presença da argila no nanocompósito favorece a retenção do IBU na matriz (Peres, 2014).

Nas curvas de fração liberada em função do tempo (Figura 29) comportamento semelhante de liberação foi observado, tendo como máximo de Ibu liberado, pelo do sistema Q/CL10/ibu, um valor de aproximadamente 0,33% para as microesferas maiores (Figura 29A) e 0,60% para as microesferas menores (Figura 29B).

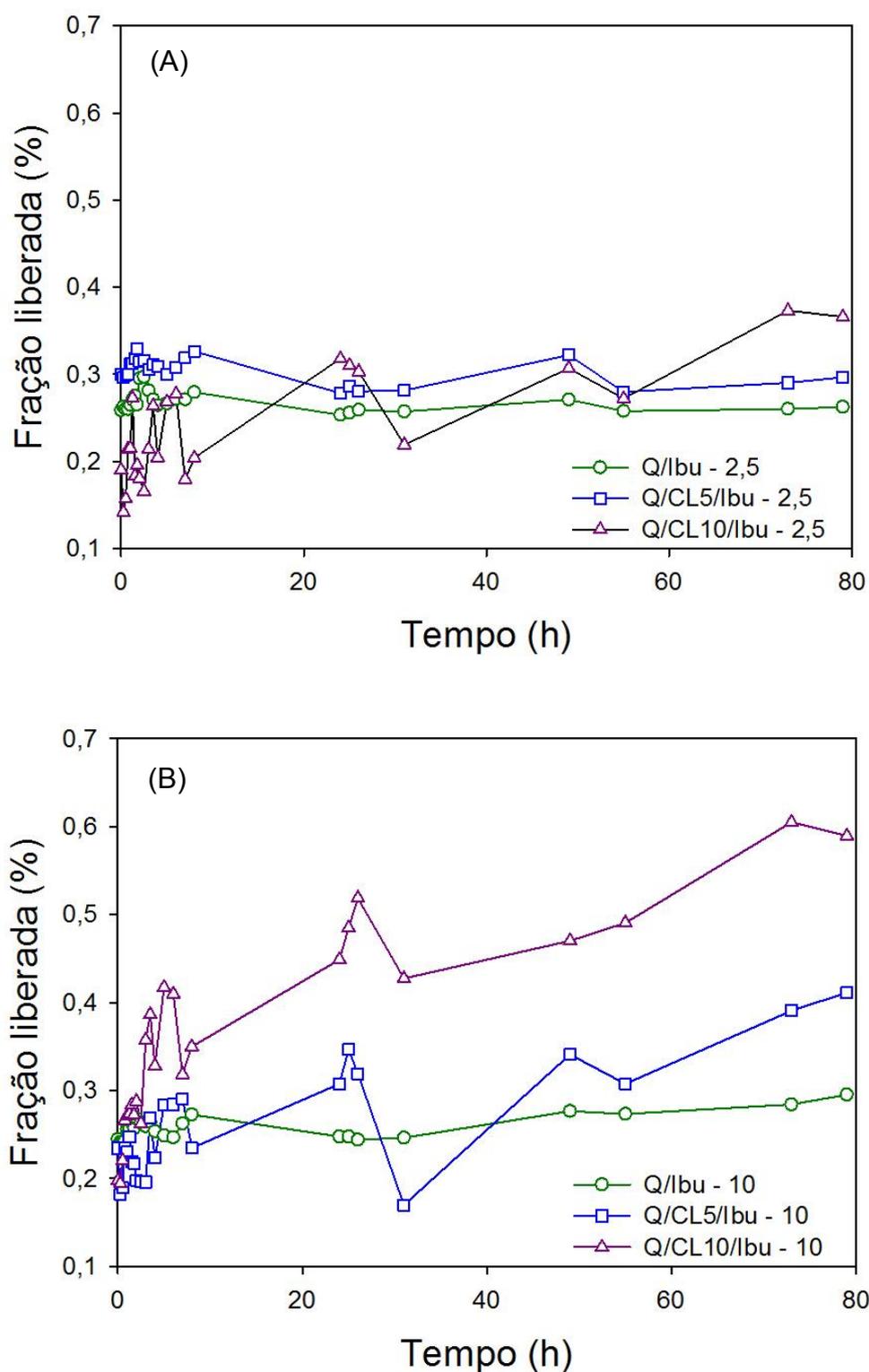


Figura 29 - Perfis da fração liberada do ibuprofeno a partir dos sistemas Q/ibu, Q/CL5/ibu e Q/CL10/ibu, com vazão de injeção de $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazões de ar de 2,5 (A) e $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (B), em pH 7,2.

Segundo Kim e Peppas (2003) os perfis de liberação de fármacos são determinados pelo grau de interação entre os componentes do sistema, como a quitosana, a argila (CL) e o ibuprofeno interagem muito fortemente entre si (Hua *et al.*, 2010) o Ibu foi liberado em pequenas quantidades nos sistemas avaliados.

5 CONCLUSÃO

Microesferas de quitosana e quitosana/argila sem e com o fármaco ibuprofeno foram obtidas visando à liberação controlada do mesmo.

A vazão de ar utilizada nas injeções para obtenção das microesferas afetou as dimensões das mesmas. Para uma maior vazão de ar ($10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) as microesferas adquiriram tamanhos menores e diminuíram a esfericidade, baseando-se nos dados de MO.

As microesferas contendo apenas quitosana e quitosana/lbu apresentaram uma morfologia lisa. No entanto, as microesferas contendo argila em sua composição apresentaram morfologia rugosa, sendo intensificada na composição 5:1 (20% argila) devido à maior quantidade de cloisite. Verificou-se ainda que as microesferas que possuíam quitosana/cloisite/ibuprofeno em sua composição, com vazão de ar $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, apresentaram-se menos esféricas quando comparadas às microesferas nessa mesma vazão sem lbu e que o tamanho de poros diminuiu com a adição de argila nas microesferas, conforme dados de MEV.

Foram obtidos bionanocompósitos com morfologia intercalada ordenada nas composições Q/CL5, Q/CL10 e Q/CL5/lbu, enquanto que a composição Q/CL10/lbu não apresentou picos, indicando a formação de uma estrutura esfoliada, ou seja, um bionanocompósito com morfologia esfoliada, sugerido por meio dos dados de DRX.

No estudo de liberação foi observado que o sistema Q/CL10/lbu apresentou maiores valores de fármaco liberado quando comparado aos outros sistemas, uma vez que as microesferas menores (vazão de ar de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) liberaram mais, pois elas possuem maior superfície de contato, facilitando à difusão do lbu e ainda, que as estruturas esfoliadas têm a tendência a liberar mais fármaco.

A forte interação do fármaco com a matriz impediu que o teor de fármaco liberado fosse satisfatório, não tornando, portanto, essa matriz um sistema eficiente para liberação do ibuprofeno.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As sugestões para trabalhos futuros são as seguintes:

- Avaliar outros tipos de matrizes poliméricas de forma que a interação fármaco-matriz não seja tão forte, visando favorecer a liberação de maiores quantidades de ibuprofeno;
- Avaliar outros tipos de argila na preparação das microesferas;
- Avaliar liberação *in- vitro* em pH 1,2 e pH 10;
- Quantificar por HPLC a eficiência de encapsulamento do fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEEN, R.; SALAHUDDIN, N. Modified Chitosan-Clay Nanocomposite as a Drug Delivery System Intercalation and In Vitro Release of Ibuprofen. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013. ISSN 2090-9063.

ABDEEN, R.; SALAHUDDIN, N. Modified Chitosan-Clay Nanocomposite as a Drug Delivery System Intercalation and In Vitro Release of Ibuprofen. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

AGUZZI, C.; CEREZO, P.; VISERAS, C.; CARAMELLA, C. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1, p. 22-36, 2007.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, 2013. ISBN 8565852857.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. D. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Review Properties of blends and composites based on poly (3-hydroxy) butyrate (PHB) and poly (3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)(PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 3, p. 523-545, 2000.

AZEVEDO, V.; CHAVES, S.; BEZERRA, D.; LIA FOOK, M.; COSTA, A. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BARBOSA, H. D. DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO PARA OBTENÇÃO DE MICROESFERAS DE BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA VISANDO LIBERAÇÃO CONTROLADA DO 5-FLUOROURACIL. In: SEMINÁRIO DE TESE DA UFCG, Campina Grande-PB., 2015.

BRAGA, C.; DE MELO, F.; VITORINO, I.; FOOK, M.; SILVA, S. BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/BENTONITA: MORFOLÓGIA E COMPORTAMENTO MECÂNICO. 2010.

CHOUHDARY, S.; DEVI, V. K. Potential of nanotechnology as a delivery platform against tuberculosis: current research review. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 65-75, 2015.

COELHO, A. C. V.; DE SSANTOS, P.; DE SSANTOS, H. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas-uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282, 2007.

COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. M. Estudo da influência da adição de argila MMT na preparação de biohidrogel a base de polímeros naturais. 2014.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.

DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 20, p. 3774-3780, 2003.

DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. **Applied Clay Science**, v. 28, n. 1, p. 199-208, 2005.

DASH, M.; CHIellini, F.; OTTENBRITE, R.; CHIellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE CARVALHO CANELLA, K. M. N.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel—influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

DE PAIVA, L.; MORALES, A.; DÍAZ, F. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, 2008.

DE SOUZA SANTOS, P.; SANTOS, H. S. **Ciência e tecnologia de argilas**. E. Blucher, 1992.

DEL NOBILE, M.; CONTE, A.; BUONOCORE, G.; INCORONATO, A.; MASSARO, A.; PANZA, O. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 1, p. 1-6, 2009.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160, 2008.

DIAS, M. L.; SILVA, A. P. Extensão de cadeia em poli (naftalato de etileno) pelo fosfito de trifênica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 102-108, 2001.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 5/1/ 2013.

FLÓRIDO, D. M. **Produção de microesferas de nanocompósitos de quitosano e argila para liberação controlada de fármacos**. 2013. Faculdade de Ciências e Tecnologia

GENNARO, A.; REMINGTON, A. **A ciência e a prática da farmácia**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004.

HAN, Y.-S.; LEE, S.-H.; CHOI, K. H.; PARK, I. Preparation and characterization of chitosan–clay nanocomposites with antimicrobial activity. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 71, n. 4, p. 464-467, 2010.

HUA, S.; YANG, H.; WANG, A. A pH-sensitive nanocomposite microsphere based on chitosan and montmorillonite with in vitro reduction of the burst release effect. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 36, n. 9, p. 1106-1114, 2010.

JIANG, L.; MORELIUS, E.; ZHANG, J.; WOLCOTT, M.; HOLBERY, J. Study of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhisler composites prepared by solution casting and melt processing. **Journal of Composite Materials**, 2008.

JOSHI, G. V.; KEVADIYA, B. D.; PATEL, H. A.; BAJAJ, H. C.; JASRA, R. V. Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1, p. 53-57, 2009.

KIM, B.; PEPPAS, N. A. Analysis of molecular interactions in poly (methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Polymer**, v. 44, n. 13, p. 3701-3707, 2003.

KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LIMA, R. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. 2010. 112f.** 2010. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande

LIU, P. Polymer modified clay minerals: A review. **Applied Clay Science**, v. 38, n. 1, p. 64-76, 2007.

LUO, D.; SANG, L.; WANG, X.; XU, S.; LI, X. Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen–chitosan–hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. **Materials Letters**, v. 65, n. 15, p. 2395-2397, 2011.

MARQUES, L. **Ibuprofeno: Um fármaco com Sucesso:** Departamento e Centro de Química da Universidade de Évora, http://www.uevora.pt/quimica_para_todos/qpt_ibuprofeno.pdf, acessado em 2009.

MENEGHETTI, P.; QUTUBUDDIN, S. Synthesis, thermal properties and applications of polymer-clay nanocomposites. **Thermochimica Acta**, v. 442, n. 1, p. 74-77, 2006.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010.

MUZZARELLI, C.; STANIC, V.; GOBBI, L.; TOSI, G.; MUZZARELLI, R. A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 73-82, 2004.

OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T.; CHAIDEDGUMJORN, A.; ROJANARATA, T.; APIRAKARAMWONG, A.; PHONGYING, S.; CHOOCHOTTIROS, C.; CHIRACHANCHAI, S. Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl chitosan-g-mPEG self-assembly micellar system. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 269-276, 2006.

ORREGO, C. E.; VALENCIA, J. S. Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 32, n. 2, p. 197-206, 2009.

PERES, F. D. O. **Estudo da dissociação de ibuprofeno utilizando matrizes de quitosana e montmorilonita/quitosana.** . 2014. 79f (Mestrado em Química

Analítica Inorgânica). Instituto de Química de São Paulo, , Universidade de São Carlos, São Carlos.

PIRES, G. **Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo**. 2010. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PRADO, A. P., IC; ALBUQUERQUE, RDA; HONORATO, FN; ALMEIDA, CM. Sistema de baixo custo para produção de microesferas de quitosana. **Analytica**, v. 44, p. 62-7, 2010.

RAINSFORD, K. D. **Ibuprofen. A critical bibliographic review**. Taylor and Francis Limited, 2005.

RAVIKUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

SILVA, S. M.; BRAGA, C. R.; FOOK, M. V.; RAPOSO, C. M.; CARVALHO, L. H.; CANEDO, E. L. Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. **Infrared spectroscopy-materials science, engineering and technology. Croatia: InTech**, p. 43-62, 2012.

SUIN, S.; SHRIVASTAVA, N. K.; MAITI, S.; KHATUA, B. Phosphonium modified organoclay as potential nanofiller for the development of exfoliated and optically transparent polycarbonate/clay nanocomposites: Preparation and characterizations. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 1, p. 49-60, 2013.

TAN, W.; ZHANG, Y.; SZETO, Y.-S.; LIAO, L. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites in the presence of hydroxy-aluminum oligomeric cations. **Composites science and technology**, v. 68, n. 14, p. 2917-2921, 2008.

URAGAMI, T.; TANAKA, Y.; NISHIDA, S. Permeation and separation under high temperature and high pressure for ethanol/water vapors through cross-linked quaternized chitosan composite membranes. **Desalination**, v. 147, n. 1, p. 449-454, 2002.

UTRACKI, L. A. **Clay-containing polymeric nanocomposites**. iSmithers Rapra Publishing, 2004. ISBN 1859574378.

VISERAS, C.; CERESO, P.; SANCHEZ, R.; SALCEDO, I.; AGUZZI, C. Current challenges in clay minerals for drug delivery. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 3, p. 291-295, 2010.

WAN, Y.; CREBER, K. A.; PEPPLEY, B.; BUI, V. T. Ionic conductivity of chitosan membranes. **Polymer**, v. 44, n. 4, p. 1057-1065, 2003.

WANG, S.; SHEN, L.; TONG, Y.; CHEN, L.; PHANG, I.; LIM, P.; LIU, T. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 1, p. 123-131, 2005.

XU, S. W.; ZHENG, J. P.; TONG, L.; YAO, K. D. Interaction of functional groups of gelatin and montmorillonite in nanocomposite. **Journal of applied polymer science**, v. 101, n. 3, p. 1556-1561, 2006.

YUAN, Q.; SHAH, J.; HEIN, S.; MISRA, R. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1140-1148, 2010.

ZHENG, J.; LUAN, L.; WANG, H.; XI, L.; YAO, K. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 4, p. 297-301, 2007.

ZHU, Y. **Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion**. 2002. (master's degree). The University of Texas at Austin