



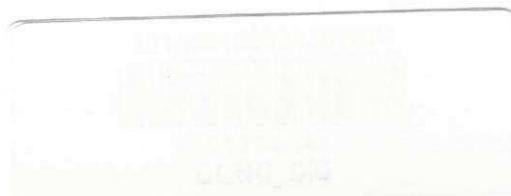
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS



**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES QUITOSANA/ARGILA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE IBUPROFENO**

Faldrecya Sousa Queiroz Borges

Campina Grande
Dezembro/2013



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

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES QUITOSANA/ARGILA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE IBUPROFENO**

Faldrecya Sousa Queiroz Borges

**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: Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande

Dezembro/2013



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

B732p

Borges, Faldrecya Sousa Queiroz.

Preparação e caracterização de biofilmes quitosana/argila para liberação controlada de ibuprofeno. / Faldrecya Sousa Queiroz Borges. – Campina Grande, 2013.

74 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2013.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof.^a Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva".

Referências.

1. Bionanocompósito. 2. Quitosana. 3. Ibuprofeno. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Silva, Suédina Maria de Lima. III. Título.

CDU 678.7(043)

Dedicatória

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta trajetória. Ao meu esposo, Odir Borges, pelo apoio, incentivo e companheirismo que de forma especial me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, quero agradecer também aos meus filhos, Igor e Davi, que embora não tivessem conhecimento disto, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos. E não deixando de agradecer principalmente a meus pais José Geraldo e Beta, meu alicerce, minha vida, pelo incentivo e ajuda, cuidando dos meus filhos na minha ausência e também aos meus irmãos, Falkandre e Faldryene, que sempre torceram para que eu conseguisse realizar este sonho. Agradecer também a Da Guia que com todo amor e carinho ajudou a cuidar dos meus filhos para que eu pudesse me ausentar. Sem eles nada seria possível.

VITAE DO CANDIDATO

• **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

- Graduação em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba- UEPB – Campina Grande – PB, 1998.
- Pós-graduação em Bioquímica pela Universidade Estadual da Paraíba- UEPB- Campina Grande – PB, 1999.
- Pós-graduação em Citologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas- SBAC- Campina Grande - PB, 2005.


• **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

- Farmacêutica-bioquímica-citologista concursada do laboratório municipal de Condado - PB, desde 2002.
- Bioquímica do Banco de Leite Humano Dra. Vilani Kherle da Maternidade Dr. Peregrino Filho, responsável pelo controle de qualidade do leite materno, Patos-PB, desde 2003.
- Citologista do Instituto Patoense de Análises clínicas IPAC, realizando leitura das lâminas citopatológicas do município de Patos - PB, desde 2007.
- Citologista do laboratório regional de análises clínicas de Piancó, responsável pela leitura das lâminas citopatológicas do município de Piancó – PB, desde 2008.
- Citologista do Laboratório Dr. Artêmio Vanderlei, realizando leitura das lâminas citopatológicas do município de Pombal PB, desde 2009.
- Secretária de saúde do município de Condado-PB, período de 2001 a 2004.
- Bioquímica responsável pelo programa de Tuberculose do município de Patos-PB, período de 2001 a 2009.
- Bioquímica plantonista do laboratório municipal de Patos, atuando nas áreas de bioquímica e hematologia, período de 2002 a 2011.
- Farmacêutica responsável pela farmácia hospitalar da Maternidade Dr. Peregrino Filho em Patos-PB, período de 2004 a 2009.
- Membro consultora da comissão de controle de infecção hospitalar da Maternidade Dr. Peregrino Filho, período de 2006 a 2008.

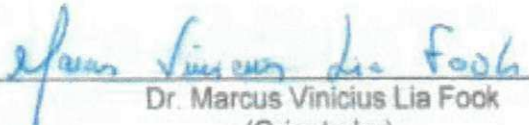
PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIONANOCOMPÓSITOS
QUITOSANA/ARGILA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE IBUPROFENO.

FALDRECYA DE SOUSA QUEIROZ BORGES

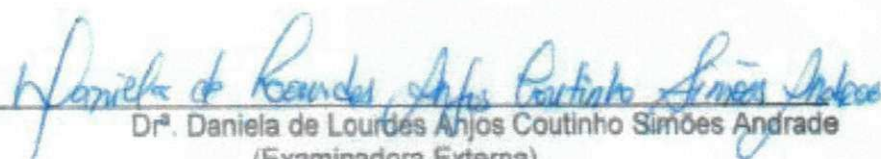
Dissertação Aprovada em 20/12/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:




Dr.^a Suedina Maria de Lima Silva
(Orientadora)
UAEMa/UFCG



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Dr.^a Daniela de Lourdes Anjos Coutinho Simões Andrade
(Examinadora Externa)
Pesquisadora da UFCG



Dr.^a Carla Ramalho Costa Braga
(Examinadora Externa)
Pesquisadora da UFCG

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela família e pelos amigos.

À Minha família pelo apoio e força em mais essa etapa da minha vida.

Aos Professores, em especial Suédina Maria de Lima Silva, uma pessoa maravilhosa, que com muita paciência, atenção e amizade me ajudaram a desvendar uma área totalmente nova em minha vida profissional e acadêmica, a Marcus Vinicius Lia Fook, pela oportunidade e apoio que nos deu, a Daniela de Lourdes Anjos Coutinho pelas importantes orientações. Agradeço principalmente pela confiança em mim depositada.

A banca examinadora por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições.

A Carla Ramalho Costa Braga e as alunas Ríllen Gomes Leal, Nadiê katyllie Silva Diniz e Maria do Carmo Cabral Mota Matos pelo auxílio na preparação das amostras.

A Márcia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela atenção que sempre me dispensou.

Ao laboratório do Certbio pela realização das análises

Aos amigos especiais...

A Associação médica da Paraíba, que nos deu a oportunidade de realizar este tão sonhado mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES QUITOSANA/ARGILA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE IBUPROFENO

RESUMO

Biofilmes de quitosana, quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita, preparados na ausência e na presença de ibuprofeno, foram obtidos pela técnica de solução e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectrometria no infravermelho, difratometria de raios X e espectrometria UV-vis. Os efeitos do tipo de argila, da forma de incorporação do ibuprofeno, bem como, das condições de secagem dos referidos biofilmes contendo o fármaco foram estudados. Os resultados indicaram que as interações quitosana/argila foram efetivas e que bionanocompósitos foram obtidos. Os biofilmes apresentaram aglomerados argilosos sendo estes menores e melhor distribuídos na matriz polimérica para o caso em que a argila montmorilonita foi empregada. Com relação à forma de incorporação do ibuprofeno e as condições de secagem dos biofilmes contendo o fármaco, foi observado que a dissolução do ibuprofeno em álcool etílico antes do mesmo ser incorporado ao biopolímero quitosana e a secagem do biofilme feita à temperatura ambiente seguida de secagem em estufa com circulação forçada de ar resultou na obtenção de biofilmes com superfície compacta e isenta de poros. Quanto à avaliação da liberação do ibuprofeno ficou evidenciado que a incorporação das argilas montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ e bentonita sódica Argel 35 a quitosana favoreceu a uma taxa de liberação do ibuprofeno mais lenta e que a argila montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ promoveu o controle da liberação do fármaco de forma mais efetiva devido a uma maior acomodação das moléculas do fármaco nas galerias da montmorilonita.

Palavras-chave: Bionanocompósito, quitosana, ibuprofeno.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOFILMS CHITOSAN / CLAY FOR CONTROLLED RELEASE IBUPROFEN

ABSTRACT

Biofilms of chitosan, chitosan/montmorillonite and chitosan/bentonite prepared in the absence and presence of ibuprofen were obtained by solution and characterized by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and UV- vis spectroscopy. The type of clay, the method of ibuprofen incorporation and the biofilm drying conditions were studied. The results indicated that the chitosan/clay interactions were effective and that bionanocomposites were obtained. Biofilms presented clay agglomerates, however when the montmorillonite clay was employed these agglomerates were smaller and better distributed in the polymeric matrix. Regarding the form of incorporation of ibuprofen and the drying conditions of biofilms containing the ibuprofen drug it was observed that the dissolution of ibuprofen in ethyl alcohol before it is incorporated in chitosan biopolymer as well as the drying of biofilm at room temperature followed by drying in oven with air forced circulation resulted in biofilms with compact surface without pores. Regarding the evaluation of the release of ibuprofen was demonstrated that the incorporation of sodium Cloisite ® Na⁺ montmorillonite clays and Argel 35 sodium bentonite in chitosan resulted in a release rate slower ibuprofen and montmorillonite Cloisite ® Na⁺ promoted drug controlled release more effectively due to higher accommodation of the drug molecules in the galleries of montmorillonite.

Keywords: Bionanocomposite, chitosan, ibuprofen.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
SÍMBOLOS E ABREVIações.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Quitosana.....	5
3.1.1 Estrutura e Extração da Quitosana.....	5
3.1.2 Propriedades da Quitosana.....	7
3.1.3 Aplicações Quitosana.....	9
3.2 Argilas.....	10
3.3 Bionanocompósitos Quitosana/Argila.....	13
3.4 Ibuprofeno.....	16
3.5 Liberação Controlada de Fármaco.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Materiais.....	22
4.2 Métodos.....	23
4.2.1 Preparação dos biofilmes de quitosana.....	23
4.2.2 Preparação dos biofilmes quitosana/argila.....	23
4.3 Caracterização.....	26
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	27
4.3.3 Difratomia de raios X (DRX).....	27
4.3.4 Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS).....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	39
5.3. Difratomia de Raios X (DRX).....	42
5.4 Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS).....	45
5 CONCLUSÕES.....	49

6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana.	8
Tabela 4.1 - Descrição das formas de apresentação do Ibuprofeno (Ibu) e dos métodos de secagem na preparação dos biofilmes carregados.	25
Tabela 5.1 - Concentração de quitosana em PBS.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura Química da Quitosana.....	5
Figura 3.2 - Estrutura Química da Quitina.....	5
Figura 3.3 - Representação esquemática das etapas de obtenção da quitosana.	6
Figura 3.4 - Representação esquemática da montmorilonita.....	12
Figura 3.5 - Intercalação da quitosana em montmorilonita.	15
Figura 3.6 - Estrutura química do ibuprofeno.	18
Figura 4.1 - Microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550.	26
Figura 4.2 - Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer.....	27
Figura 4.3 - Difratorômetro de raios X Shimadzu XDR-7000.	28
Figura 4.4 - Espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini - 1240.	30
Figura 5.1 - A foto (a) e a micrografia da área transversal (b) do biofilme de quitosana (Q).	31
Figura 5.2 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme Q1CL1.....	32
Figura 5.3 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme Q1AP1.....	33
Figura 5.4 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno, macerado e peneirado em malha 325, e obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/E).	34
Figura 5.5 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ib/A/E).....	35
Figura 5.6 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa de circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/A/T/E).	36
Figura 5.7 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b,c) e da área transversal (d) do biofilme de quitosana/montmorilonita sódica comercial com razão mássica de 1/1 carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q1CL1/Ibu/A/T/E).	37
Figura 5.8 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b,c) e da área transversal (d) do biofilme de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada	

com razão mássica de 1/1 carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q1AP1/Ibu/A/T/E).	38
Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 4000 cm ⁻¹ a 650 cm ⁻¹ das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).	39
Figura 5.10 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 1800 cm ⁻¹ a 1400 cm ⁻¹ dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).	42
Figura 5.11 - Difrátogramas das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) e os biofilmes de quitosana e quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 carregados com ibuprofeno que apresentaram a melhor condição de preparo (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E).	44
Figura 5.12 - Curva de calibração do ibuprofeno em PBS pH 7,4 ($\lambda = 222 \text{ nm}$).	46
Figura 5.13 - Perfil de liberação do ibuprofeno incorporado aos biofilmes de quitosana (Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E).	47

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AN - Bentonita sódica Argel 35[®]

AP - Bentonita sódica Argel 35[®] Purificada

CL - Montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺

Ibu - ibuprofeno

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

IV - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

DRX - Difractometria de raios X

UV-visível - Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

Q - Biofilme de quitosana

Q1CL1 - Biofilmes de quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ usando razão mássica equivalente a 1/1

Q1AP1 - Biofilme de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada usando razão mássica equivalente a 1/1

Q/Ibu/A/T/E - Biofilme quitosana carregado com ibuprofeno

Q1CL1/Ibu/A/T/E - Biofilme quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ com razão mássica de 1/1 carregado com ibuprofeno

Q1AP1/Ibu/A/T/E - Biofilme quitosana/ bentonita purificada com razão mássica de 1/1 carregado com ibuprofeno

1 INTRODUÇÃO

Os nanocompósitos polímero/argila têm atraído grande interesse já que combinam a estrutura e propriedades físicas e químicas de ambos os materiais, orgânicos e inorgânicos. A maioria dos trabalhos desenvolvidos tem empregado polímeros sintéticos, mas nos últimos anos estudos sobre nanocompósitos com polímeros de origem natural (bionanocompósitos) têm sido realizados (Pandey e Mishra, 2011). Os bionanocompósitos constituem um novo 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, Tanaka e Nishida, 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 láctico), a poli (caprolactona), o poli (ácido glicólico) e a quitosana (Viseras *et al.*, 2010).

O biopolímero quitosana tomou-se interessante não só por ser oriundo de um recurso renovável abundante, mas também por ser biocompatível, biodegradável, apresentar capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e quando em contato com células humanas não provocar reações adversas. Além do mais, pode ser degradado por enzimas amplamente encontradas no corpo humano gerando resíduos não tóxicos (Casarin, 2004; Pachekoski, Agnelli e Belem, 2009; Dash *et al.*, 2011).

A quitosana é um polissacarídeo natural, semicristalino, catiônico composto de unidades de repetição de D-glucosamina e N-acetil-glucosamina obtida a partir da desacetilação da quitina, principal componente da casca de crustáceos e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose (Awaja, Daver e Kosior, 2004). Este biopolímero pode ser facilmente dissolvido em soluções de ácidos fracos, devido à protonação de seus grupos amina, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. E por apresentar alta hidrofiliabilidade, em função do grande número de grupos hidroxila e grupos amina presentes na sua cadeia polimérica, apresenta propriedades específicas (antimicrobiana e mucoadesiva) que possibilita sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel, microfibras e membranas (Del Nobile *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012).

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 a argila. Esta associação 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, Colilla e Ruiz-Hitzky, 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, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2005; Han *et al.*, 2010).

Dentre os benefícios que podem ser conseguidos pela preparação de bionanocompósitos quitosana/argila 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 carregamento (imobilização) de drogas carregadas negativamente e (d) os grupos amina presentes na

quitosana são sítios para imobilização do fármaco (Yuan *et al.*, 2010). A solubilidade limitada, no pH gástrico, dos bionanocompósitos 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 nanocompósitos de quitosana/argila têm um grande potencial como carregados de medicamentos.

Um dos aspectos que tem dificultado o uso da quitosana para tal aplicação é o fato das quitosanas disponíveis, principalmente no Brasil, serem de procedências diversas e apresentarem diferentes graus de pureza, além de não seguirem industrialmente um procedimento comum de desacetilação, tornando os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si, dificultando, dessa maneira, o estabelecimento de um processamento padrão para obtenção de bionanocompósitos com características reprodutíveis. Além disso, o comportamento de liberação da droga pode ser influenciado por outros fatores, como por exemplo, tipo de quitosana, tipo de argila e proporção quitosana/argila. Com base no exposto, a condução deste estudo visa elucidar fatores ainda não esclarecidos no que se refere a preparação e caracterização de bionanocompósitos quitosana/argila, para sistemas de liberação controlada de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa tem como principal objetivo desenvolver novos dispositivos baseados em bionanocompósitos de quitosana/argila para imobilização de um fármaco modelo, o ibuprofeno, visando a liberação controlado e prolongada do mesmo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Preparar bionanocompósitos quitosana/argila pelo processo de intercalação por solução.
2. Analisar a influência do tipo de argila na morfologia dos biofilmes quitosana/argila.
3. Analisar a influência do ibuprofeno na morfologia dos biofilmes quitosana/argila.
4. Avaliar a cinética da liberação do fármaco mediante ensaios *in-vitro* pela técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quitosana

3.1.1 Estrutura e Extração da Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo semicristalino linear composto de unidades de repetição de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (Zhao *et al.*, 2013). A estrutura química deste polímero está mostrada na Figura 3.1. Como tal, a quitosana não é extensivamente encontrada no ambiente, contudo, ela pode ser facilmente derivada da desacetilação parcial de um polímero natural: a quitina (Figura 3.2). 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 (Croisier e Jérôme, 2013).

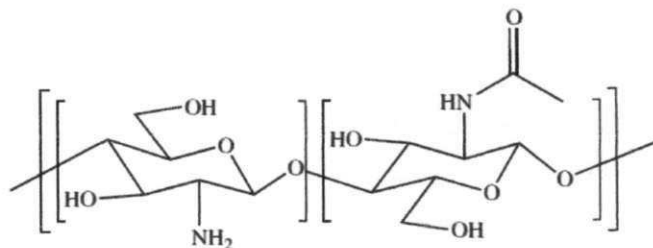


Figura 3.1 - Estrutura Química da Quitosana.
Fonte: Croisier e Jérôme (2013).

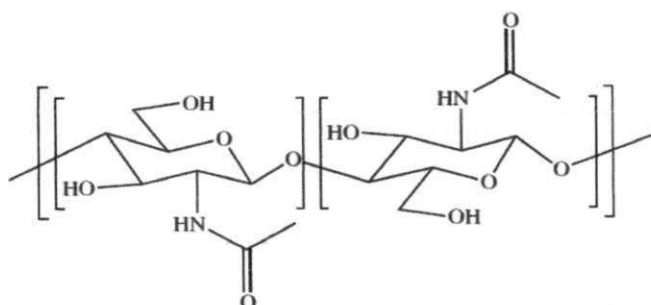


Figura 3.2 - Estrutura Química da Quitina.
Fonte: Croisier e Jérôme (2013).

A desacetilação de quitina é realizada por meio de hidrólise química sob condições alcalinas (NaOH concentrado) ou por hidrólise enzimática na presença de enzimas particulares (Borschiver, Almeida e Roitman, 2008; Bordes, Pollet e Avérous, 2009). Contudo, antes da desacetilação as seguintes etapas são conduzidas: (a) desmineralização (remoção ácida do carbonato de cálcio) das cascas e ou esqueletos que são secados e moídos; (b) tratamento do pó com solução de ácido clorídrico e (c) desproteínação do material que é executada com uma solução diluída de NaOH. Estas etapas visam à remoção de algumas impurezas como material inorgânico, proteínas, pigmentos e lipídios presentes na quitina (Costa Jr e Mansur, 2008). A Figura 3.3 mostra uma representação esquemática das etapas de obtenção da quitosana.

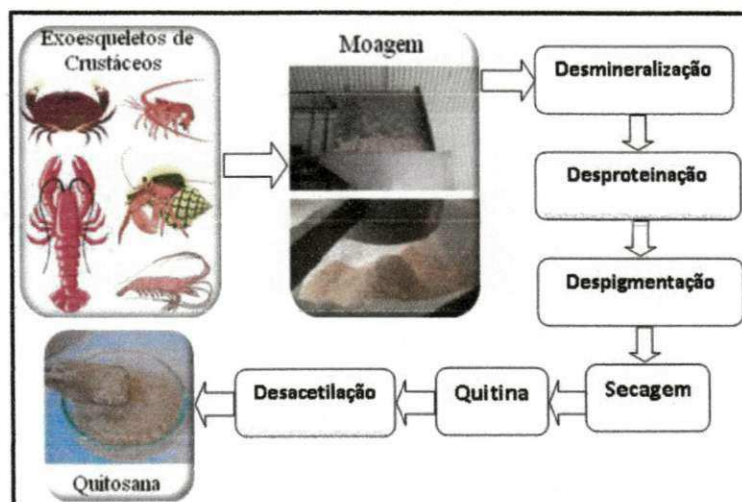


Figura 3.3 - Representação esquemática das etapas de obtenção da quitosana.
Fonte: Bordes, Pollet e Avérous (2009).

Depois da celulose, a quitina é o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza e, em escala industrial, as suas duas principais fontes são os exoesqueletos de crustáceos e as paredes celulares de fungos (Parra *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013). Ao contrário da quitosana extraída de fonte animal, onde ocorre variabilidade do produto que pode conduzir a características físico-químicas inconsistentes (Brito *et al.*, 2011), a quitosana obtida a partir de cogumelos garante uma melhor reprodutibilidade das propriedades e é mais segura para aplicações biomédicas. A quitosana

extraída de cogumelos apresenta distribuição de massa molar mais estreita do que a obtida a partir de exoesqueletos de crustáceos e pode também diferir em termos de massa molar, grau de desacetilação e distribuição de grupos desacetilados (Sahoo, Misra e Mohanty, 2011). Dependendo da fonte e preparação, o grau de desacetilação e a massa molar da quitosana podem variar entre 60 e 95% e de 300 a 1000 kDA, respectivamente (Bordes *et al.*, 2008). Além disso, em função de se tratar de um composto de base natural, a quitosana pode ser contaminada por impurezas orgânicas e inorgânicas e apresentar larga polidispersidade (Bordes, Pollet e Avérous, 2009).

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas como titulação potenciométrica, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para determinação da massa molar, os métodos mais indicados são viscosimetria e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) (Zhao *et al.*, 2013).

3.1.2 Propriedades da Quitosana

As propriedades químicas e biológicas da quitosana são determinadas pelo grau de desacetilação e massa molar da mesma. A Tabela 3.1 apresenta um resumo da relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana.

A quitosana é um polímero semicristalino e mostra polimorfismo dependendo do seu estado físico. Dependendo da origem do polímero e do seu tratamento durante a extração, a cristalinidade pode variar consideravelmente. A cristalinidade é máxima para quitosana totalmente desacetilada. De acordo com a literatura, a origem da quitina influencia não só a sua cristalinidade e pureza, mas também o arranjo da cadeia polimérica e assim suas propriedades (Zhao *et al.*, 2013). Tem também sido observado que a área superficial dos materiais está relacionada com a fonte (caranguejo > lagosta > camarão). A técnica de caracterização mais empregada para avaliar a cristalinidade da quitosana é a difratometria de raios X (DRX). Conforme DRX da quitosana é

observada uma célula unitária ortorrômbica com parâmetros $a = 0,807\text{nm}$, $b = 0,844\text{ nm}$ e $c = 1,034\text{ nm}$ (Azevedo *et al.*, 2007).

Tabela 3.1 - Relação entre os parâmetros estruturais e as propriedades da quitosana.

<i>Propriedade</i>	<i>Característica estrutural</i>
Solubilidade	↑ GD
Cristalinidade	↓ GD
Biodegradabilidade	↓ GD, ↓ Massa molar
Viscosidade	↑ GD
Biocompatibilidade	↑ GD
Mucoadesão biológica	↑ GD, ↑ Massa molar
Analgésica	↑ GD
Antimicrobiana	↑ GD, ↑ Massa molar
Aumento de permeação	↑ GD
Antioxidante	↑ GD, ↓ Massa molar
Hemostática	↑ GD

Fonte: Dash *et al.* (2011).

O biopolímero quitosana é uma base fraca insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas diluídas, onde as unidades de glucosamina ($-\text{NH}_2$) podem ser convertidas na sua forma protonada e solúvel (NH_3^+). A solubilidade da quitosana depende da sua origem biológica, massa molar e grau de desacetilação e isso afeta diretamente as aplicações deste biopolímero (Tavaria *et al.*, 2013). Devido à protonação em meio ácido dos grupos amino presentes em sua cadeia carbônica, além das hidroxilas provenientes dos grupos álcool, a quitosana apresenta caráter higroscópico e é capaz de formar gel, podendo absorver até 400% da sua massa inicial em meio aquoso. Fatores como pH do solvente utilizado, concentração e massa molar da quitosana

estão diretamente relacionados à viscosidade do gel obtido, bem como às propriedades do biomaterial final (Campos, 2007; Nomura *et al.*, 2009).

Uma propriedade fundamental na transformação metabólica da quitosana no corpo é essencial para todos os polímeros usados em sistemas carreadores de fármacos é a biodegradabilidade. Na quitosana ela pode ser de dois tipos: química ou enzimática. A química é a que se refere à degradação catalisada por ácido, tal como a que ocorre no estômago. Enzimaticamente, a quitosana pode ser degradada por enzimas capazes de hidrolisar a glucosamina-glucosamina, glucosamina-Nacetyl-glucosamina e N-acetil-glucosamina, N-acetilglucosamina ligações (Kean e Thanou, 2010).

3.1.3 Aplicações Quitosana

As principais áreas de aplicação da quitosana são: na agricultura como mecanismos defensivos e adubo para plantas (Villalobos *et al.*, 2006); no tratamento de águas atuando como floculante para clarificação, na remoção de íons metálicos, como polímero ecológico e na remoção de odores (Wang *et al.*, 2008); na indústria alimentar como fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante, fungicida e bactericida, e no revestimento para frutos; na indústria cosmética como esfoliante para a pele, no tratamento da acne, na composição de hidratante capilar e creme dental (De Faria e Martins-Franchetti, 2010; Zhao *et al.*, 2013) e na biomedicina em suturas cirúrgicas, na reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de medicamentos, encapsulamento de materiais, bandagem para lesões e engenharia de tecidos (Misra *et al.*, 2010).

As aplicações da quitosana na área médica devem-se essencialmente às suas propriedades de biocompatibilidade, capacidade bactericida e o fato de que quando em contato com células humanas não provoca reações adversas; ou seja, é uma substância segura para o organismo humano. A quitosana pode ser degradada 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 conduzir fármacos ao seu alvo seletivamente (Costa Jr e Mansur, 2008). A alta hidrofiliabilidade 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 hemostáticas (Avella, Martuscelli e Raimo, 2000; De Carvalho Canella e Garcia, 2001; Jiang *et al.*, 2008). 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 o grau de desacetilação (Casarin, 2004; Casarin, 2010).

Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, sistema de liberação controlada de fármacos, e até mesmo material para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções (Nomura *et al.*, 2009).

3.2 Argilas

Nos últimos anos argilas do tipo montmorilonitas e bentonitas têm sido muito estudadas como carga para a preparação de nanocompósitos poliméricos. Além das propriedades apresentadas por estas argilas, como a capacidade que estas têm de ser expandida, ou intercalada ou ainda delaminada por moléculas orgânicas sob condições apropriadas (Koh e Dixon, 2001; Saujanya e Radhakrishnan, 2001), aspectos econômicos e ambientais estão entre as principais razões para o grande interesse no uso deste tipo de carga na preparação de nanocompósitos e bionanocompósitos poliméricos.

Montmorilonita é o nome dado à argila que foi encontrada próxima da Montmorillonite na França, e então identificada por Knight em 1896 (Coelho, De Ssantos e De Ssantos, 2007). É o filossilicato mais usado para preparação de nanocompósitos poliméricos. A montmorilonita é conhecida por vários nomes, tais como: esmectita, montmorilonita sódica, bentonita sódica ou bentonita que

incha (bentonita de Wyoming (EUA); bentonita sódica-ativada (UK); bentonita sódio-trocável etc.; a bentonita que não-incha (em água) e a montmorilonita cálcica ou bentonita Mississipi (EUA); sub-bentonita (bentonita Texas, UK). As montmorilonitas podem também ser: magnesiana (Saponita e Armagositita); potássica (Metabentonita) e lítica (Hectorita), etc. Comercialmente, a montmorilonita é fornecida na forma de pó com um tamanho de partícula de aproximadamente 8 μm , cada uma contendo cerca 3000 lâminas com uma razão de aspecto moderada ($p=10 - 300$) (Utracki, 2004).

Os nomes bentonitas, esmectitas e montmorilonita são frequentemente usados como sinônimos, no entanto, industrialmente esses termos representam minerais diferentes com diferentes graus de pureza. Bentonitas são rochas sedimentares constituídas de uma grande proporção de argilominerais (esmectitas) tais como montmorilonita (geralmente > 80%), beidelita, saponita, nontronita e hectorita. Bentonitas podem também conter outros argilominerais e minerais não argilosos. 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 trocável, tais como Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} ou algum destes cátions for o cátion trocável monovalente M. A presença de impurezas como matéria orgânica e minerais associados, também podem colorir as bentonitas (Utracki, 2004; Coelho, De Ssantos e De Ssantos, 2007).

Montmorilonita é o argilomineral mais abundante do grupo das esmectitas, cuja fórmula química geral é dada pela $\text{M}_x(\text{Al}_{4-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$. Possui partículas com tamanhos que podem variar de 0,1 μm a 2 μm (tamanho médio de 0,5 μm) e formato de placas ou lâminas. Pertence ao grupo dos filossilicatos 2:1, caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, unidas entre si por átomos de oxigênio comuns a ambas as folhas. As folhas apresentam continuidade nas direções dos eixos a e b e geralmente possui orientação aproximadamente paralela nos planos (001) dos cristais, o que lhe confere a estrutura laminada (De Souza Santos e Santos, 1992; Utracki, 2004). A representação esquemática da estrutura da montmorilonita esta apresentada na Figura 3.4.

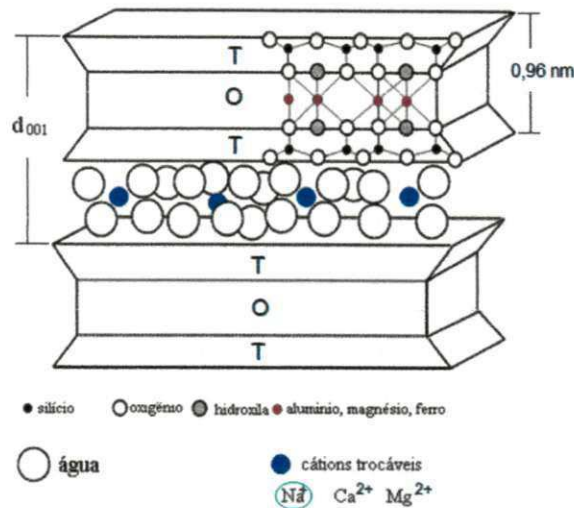


Figura 3.4 - Representação esquemática da montmorilonita.
 Fonte: Silva *et al.* (2012).

Bentonitas são argilas esmectitas constituídas predominantemente pelo argilomineral montmorilonita. Sua abundância natural, baixo custo, elevada capacidade de troca de cátions (CTC), capacidade de inchamento, propriedades de adsorção e grande área superficial são as principais razões para a sua vasta gama de aplicações (Xi *et al.*, 2007). As esmectitas são formadas por argilominerais trifórmicos 2:1, ou seja, tem uma estrutura na forma de sanduíche que consiste de duas folhas tetraédricas envolvendo uma folha central octaédrica, unidas entre si por oxigênios comuns às folhas para formar uma camada. 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, 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, que são

fixados reversivelmente nos espaços entre as camadas (espaços interlamelares - galerias) (80%) e nas superfícies laterais das 10 camadas (20%) mantendo assim o equilíbrio elétrico. Os cátions trocáveis não pertencem à estrutura do cristal e estão fracamente ligados à superfície do mesmo, sendo facilmente trocados por cátions orgânicos (Murray, 2000; Aguzzi *et al.*, 2007; Salles *et al.*, 2007).

O espaçamento basal, conforme determinada por medidas de difratometria de raios X, pode variar de 1,0 a 1,4 nm para os silicatos em camadas nas formas anidra e hidratada, respectivamente. A área superficial específica é de 750 a 800 m²/g, sendo o valor teórico de 834 m²/g. A capacidade de troca de cátions (CTC) varia de 80 a 120 meq/100g e pode ser resultado do desequilíbrio de cargas provenientes das substituições isomórficas no próprio retículo cristalino, das ligações químicas quebradas nas arestas das partículas e da substituição de hidrogênio por hidroxilas, ou seja, é uma medida da carga total das camadas. Esta propriedade (CTC) é altamente dependente da natureza das substituições isomórficas nas camadas tetraédricas e octaédricas e, portanto, da natureza do solo onde a argila foi formada. Isto explica porque montmorilonitas de diferentes origens apresentam diferentes valores de CTC (Kornmann, Lindberg e Berglund, 2001).

3.3 Bionanocompósitos Quitosana/Argila

Os bionanocompósitos constituem um novo 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 bionanohíbrida 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, Tanaka e Nishida, 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 láctico), 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 3.5 mostra uma representação esquemática da intercalação da quitosana em montmorilonita (Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 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 floculações.

Estudos realizados por Tan e colaboradores (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 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 (-NH₃⁺) 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 (d₀₀₁) para o caso onde uma estrutura bicamada é obtida é em torno de 2,02 nm.

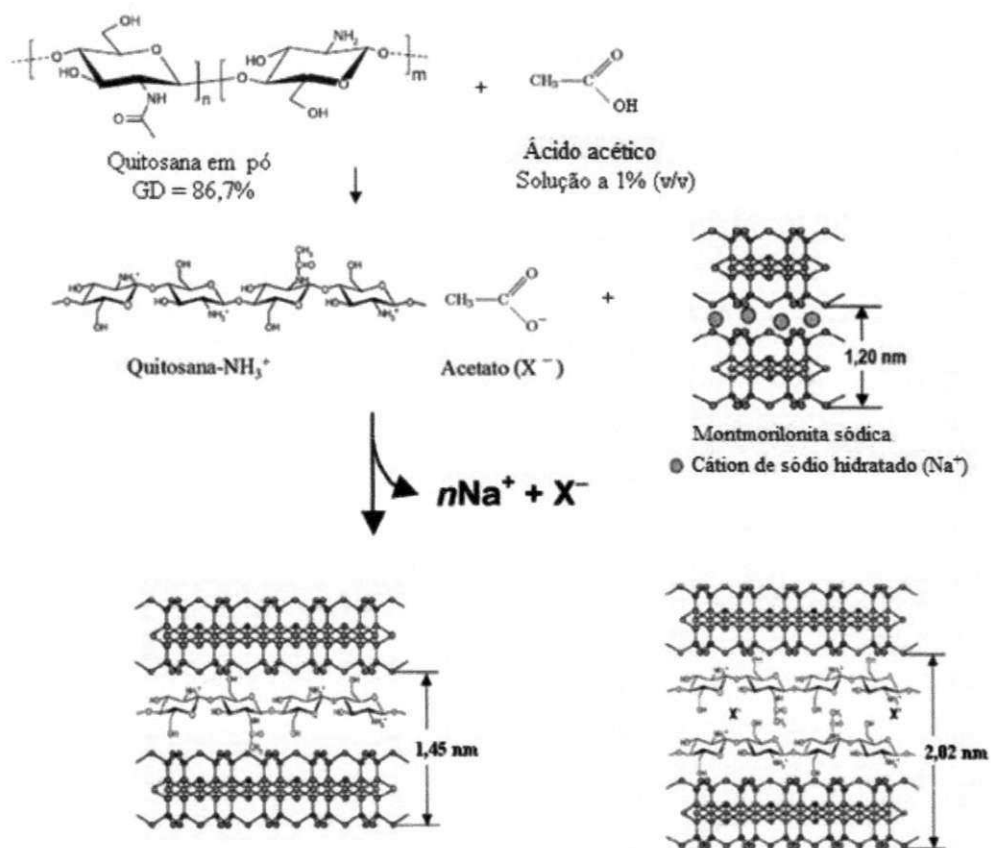


Figura 3.5 - Intercalação da quitosana em montmorilonita.
Fonte: Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky (2003).

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 policatiónica em meio ácido, apresenta boa miscibilidade com este tipo de silicato, podendo ser intercalada entre as suas lamelas, por meio de troca catiónica e ligações de pontes de hidrogênio (Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2003; Lenz e Marchessault, 2005). O mecanismo de troca catiónica envolve interações entre a carga positiva do grupo amina protonada (NH_3^+) da quitosana e os sítios carregados negativamente na estrutura da argila (Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2005).

Dentre os benefícios que podem ser conseguidos pela preparação de bionanocompósitos quitosana/argila se destacam: (a) a intercalação da quitosana catiónica nas galerias da argila pode resultar na neutralização da forte ligação da droga (fármaco) catiónica 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 catiónica, ao contrário da argila, proporciona a possibilidade de carregamento (imobilização) de drogas carregadas negativamente e (d) os grupos amina presentes na quitosana são sítios para imobilização do fármaco (Yuan *et al.*, 2010). A solubilidade limitada, no pH gástrico, dos bionanocompósitos 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.

3.4 Ibuprofeno

Até meados da década de 70 o Ácido Acetilsalicílico (AAS) era o fármaco anti-inflamatório não esteróide mais usado em todo o mundo. Entretanto, após ter sido revelada a associação entre uso de AAS e síndrome de Reye, o AAS deixou de ser utilizado em crianças nos EUA, Canadá e em

diversos países da Europa, sendo substituído pelo acetaminofeno ou ibuprofeno (Litalien e Jacqz-Aigrain, 2001; Bricks, 2003).

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE) sendo também analgésico e antipirético, utilizado frequentemente para o alívio sintomático da dor de cabeça (cefaléia), dor dentária, dor muscular (mialgia), moléstias da menstruação (dismenorreia), febre e dor pós-cirúrgica. Também é usado para tratar quadros inflamatórios, como os que se apresentam em artrites, artrite reumatóide (AR) e artrite gotosa. O seu nome vem das iniciais do ácido iso-butil-propinóico-feólico noia (Daver, Gupta e Kosior, 2008).

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 atualmente usado por milhões de consumidores via oral, na forma de comprimidos, drágeas, suspensão oral ou granulado e encontra-se disponível também em supositórios, creme ou gel para aplicação local (Moraes, 2005).

As características físico-químicas do ibuprofeno são as seguintes: fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$; massa molecular $206,28 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto de fusão $75 - 78^\circ\text{C}$ (Almeida, 2009). É um pó branco, com um leve odor característico, sendo praticamente insolúvel em água, mas 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 (Ghanbari *et al.*, 2013). O seu nome IUPAC é ácido (2RS)-2-[4-(2-metilpropil) fenilpropanóico]. A estrutura química deste fármaco está apresentada na Figura 3.6.

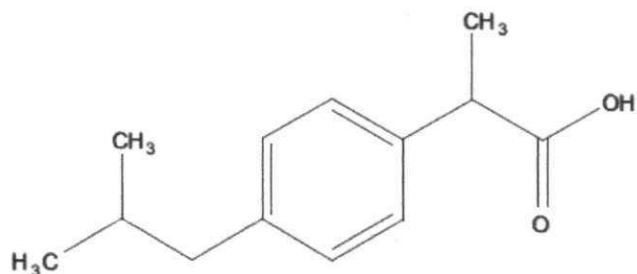


Figura 3.6 - Estrutura química do ibuprofeno.
Fonte: Almeida (2009).

Conforme descrito por Silva e Silva (2012), os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são fundamentais no controle da dor. Eles promovem a inibição da ciclooxygenase (COX), bloqueando a conversão do ácido araquidônico em prostanóides, representados pelas prostaglandinas e tromboxanos, envolvidos no processo inflamatório e na sensibilização dolorosa central e periférica. Portanto, o alívio da dor (analgesia) se deve principalmente ao bloqueio periférico da produção de prostaglandinas e está associado com o tipo de fármaco, a dose e a via de administração. Uma vez que os AINEs apresentam baixa toxicidade, sendo os efeitos cardiovasculares e respiratórios raros, exceto em situações de envenenamento, estes são os mais frequentemente utilizadas para o tratamento da dor, seja ela de intensidade moderada a grave.

Com o uso dos anti-inflamatórios do tipo AINEs tem-se o bloqueio da enzima endoperóxido-sintetase ou ciclooxygenase (COX) de ácidos graxos, que é a primeira enzima envolvida na síntese de prostaglandinas, diminuindo o quadro inflamatório. Além disso, os AINEs diminuem a sensibilidade dos vasos sanguíneos à bradicinina e à histamina, afetam a produção de linfocinas pelos linfócitos T e reverterem a vasodilatação da inflamação (Muri, Sposito e Metsavaht, 2009).

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 (Marques, 2009). Portanto, seu uso deve ser criterioso e bem indicado para que possa proporcionar mais benefícios do que riscos ao paciente (Marques, 2009). Assim, a imobilização do ibuprofeno em bionanocompósitos quitosana/argila, visando a liberação controlada do mesmo, pode minimizar estes efeitos adversos e estender a ação deste anti-inflamatório.

3.4.1 Propriedades Farmacocinéticas

Conforme descrito nas informações técnicas aos profissionais de saúde (bula Novalfem[®] - Ibuprofeno) o ibuprofeno apresenta:

boa absorção oral, com aproximadamente 80% da dose absorvida no trato gastrointestinal, havendo diferença quando da administração em jejum ou após refeição, pois a presença de alimentos diminui a absorção. O início de ação ocorre em cerca de 15 a 30 minutos. A taxa de ligação proteica é alta (99%) e a concentração plasmática máxima é atingida em 1,2 a 2,1 horas, tendo duração de 4 a 6 horas, com meia vida de eliminação de 1,8 a 2 horas. A biotransformação é hepática e a excreção praticamente se completa em 24 horas após a última dose, sendo menos de 1% excretado na forma inalterada.

(Medley, 2012)

3.5 Liberação Controlada de Fármaco

O conceito de sistema de liberação de fármaco é geralmente baseado nas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas das drogas (Gonzalez *et al.*, 2005). O uso de materiais que prolongam a liberação de drogas, ajuda na redução de reações indesejáveis diminuindo os efeitos colaterais e prolongando sua ação, aumentando a resposta do tratamento ao paciente (Grassie, Murray e Holmes, 1984a; b; Hablot *et al.*, 2008; Shen, Worrell e Patel, 2010). Os mecanismos usados para alcançar um bom resultado na liberação controlada

são variados, complexo, e depende da sua aplicação, que pode funcionar, simultaneamente, em diferentes fases de um processo de liberação (Haralabakopoulos, Tsiourvas e Paleos, 1999).

Nas últimas décadas muitas alternativas têm surgido de diferentes áreas das ciências, com sistemas que apresentam características que tem permitido transportar substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos do organismo e ou modular a velocidade de liberação em função do tempo. Esses sistemas podem modificar o perfil de biodisponibilidade do fármaco sem alterar a estrutura química da molécula transportadora (Geraldo, 2008). Dentre esses sistemas destacam-se os compósitos constituídos por uma matriz polimérica e uma fase dispersa de argila por aumentar a solubilidade a microencapsulação, a granulação das drogas, por produzir um bom ambiente de liberação de drogas e por controlar, atrasar ou prolongar a liberação de fármacos (Lenz e Marchessault, 2005; Kumar *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2010).

Tanto os polímeros naturais como os sintéticos podem ser usados como matrizes em sistemas para liberação controlada de fármaco. Entre os polímeros naturais pode-se destacar: a quitosana, os polipeptídeos e as proteínas (como a albumina, o fibrinogênio, a gelatina e o colágeno) e células vivas (por exemplo, os eritrócitos). Entre os sintéticos, incluem-se os poliésteres alifáticos de hidroxi-ácidos, por exemplo, o poliácido láctico-PLA e o poliácido láctico glicólico-PLGA. Estes polímeros devem ser quimicamente inertes ou livres de impurezas, possuírem uma estrutura física apropriada e serem rapidamente biodegradados.

As argilas são geralmente utilizadas na indústria farmacêutica como excipientes ou substâncias ativas. Vários estudos estão relacionados para diminuir a absorção oral de vários medicamentos com argilas, mas essas interações podem também ser usadas para ter vantagens tecnológicas e biofarmacêuticas. Assim, este foi o ponto de partida para a utilização de argilas em sistemas de liberação controlada de fármaco (Aguzzi *et al.*, 2007).

Pesquisas visando aperfeiçoar a ação de vários tipos de fármacos que possam manter níveis de drogas contínuos em um tecido desejado, reduzindo

os efeitos colaterais têm sido conduzidas por diversos pesquisadores do Brasil e do mundo.

Kelly e colaboradores (Maiti, Batt e Giannelis, 2007) desenvolveu um gel termosensível para aplicação periodontal com uma boa atividade antibacteriana, que consiste numa suspensão de drogas transportadas em nanotubos revestidos com quitosana (Mendes, 2009).

Nanda e colaboradores (Mohanty, Misra e Drzal, 2005) utilizaram quitosana/poliácido com diferentes quantidades de montmorilonita como um sistema de liberação de paclitaxel, um medicamento anti-tumoral. Kavadiya e colaboradores (Rosa *et al.*, 2002) utilizando o polissacarídeo de alginato de sódio para preparar o composto montmorilonita-diclofenaco-alginato observou que a incorporação da montmorilonita ao sistema diclofenaco-alginato favoreceu a um melhor perfil de liberação do diclofenaco, em fluido intestinal simulado (pH 7,4).

Algumas argilas, por exemplo, "Bentonita", foram usadas na formulação de hidrogéis mucoadesivos (De Moraes, 2004), enquanto que a montmorilonita foi usada na formulação de liberação controlada (Rauwendaal, 2001; Rosa *et al.*, 2002; Pellicano, 2008; Quental *et al.*, 2010; Praphulla e Praphulla, 2012). A Cloisite® 15A (montmorilonita natural modificada por um sal de amônio quaternário) foi usada como portador de algumas formulações contendo broncodilatadores e drogas anti – inflamatórias (Roy *et al.*, 2012).

Sistemas de nanocompósitos para encapsulação de fármaco foram obtidos com quitosana e argila e indicaram uma melhora na eficiência de encapsulação do fármaco além de abrandar a liberação da droga (Verhoogt, Ramsay e Favis, 1994; Scheirs, 2003; Sorrentino, Gorrasi e Vittoria, 2007; Yuan *et al.*, 2010).

Sorrentino e colaboradores (2007), demonstraram que o nanocompósito de quitosana/montmorilonita tem uma boa biocompatibilidade, estimula a proliferação de células, e apresentam propriedades mucoadesivas combinados com baixa solubilidade em meio ácido, além de retardar a liberação do fármaco em ambientes gástrico, e liberar o fármaco de uma forma controlada no ambiente intestinal (Verhoogt, Ramsay e Favis, 1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A quitosana, fornecida na forma de pó pela Polymar/Brasil, com grau de desacetilação de 86,7% e densidade de $0,2 \text{ g/cm}^3$, conforme informações do fabricante, foi utilizada como matriz polimérica na preparação dos biofilmes.

A bentonita sódica Argel 35[®] (AN) foi fornecida pela Bentonit União Nordeste (BUN)/Brasil e purificada no Laboratório de Nanocompósitos Poliméricos da Universidade Federal de Campina Grande. A argila bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) foi usada como nanocarga na obtenção dos biofilmes a base de quitosana e apresenta uma capacidade de troca de cátions (CTC) de 92 meq/100g (Leite *et al.*, 2010). A montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) fornecida pela Southem Clay Products/EUA, na forma de pó, também foi empregada como nanocarga na preparação dos biofilmes a base de quitosana. De acordo com o fabricante, este silicato apresenta uma capacidade de troca de cátions (CTC) de 90 meq/100g de argila.

O ácido acético glacial P.A de 99,9%, foi usado como solvente para a quitosana e o hidróxido de sódio, na forma de pastilhas, foi utilizado para ajustar o pH da solução de quitosana bem como para assegurar a completa neutralização dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila. Estes reagentes foram fornecidos pela Vetec e usados como recebidos.

A substância ativa ibuprofeno (Ibu), referência I4883 $\geq 98\%$ e lote 122K0676V foi fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich e utilizada como fármaco modelo para estudo da liberação controlada e prolongada em biofilmes de quitosana e quitosana/argila.

O Álcool etílico 70% fornecido por Nalgon equipamentos científicos Ltda. foi utilizado como solvente do fármaco ibuprofeno.

O Tampão fosfato - PBS 0,1M (pH 7,2), referência P3288 - 12VL e lote 038k614, foi fornecido pela Sigma-Aldrich e 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).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos biofilmes de quitosana

Os biofilmes de quitosana foram obtidos pelo método de evaporação do solvente que consistiu em preparar uma solução de quitosana pela dissolução de 1g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético sob agitação magnética a 45°C por 2 h. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel, depois vertida em placas de Petri e acondicionada em estufa a 50°C por 20 h para a formação dos biofilmes. Para assegurar a completa remoção dos resíduos ácidos os biofilmes foram encharcados em uma solução de hidróxido de sódio a 1M, por 30 min, depois lavados com água destilada até pH neutro e secos a temperatura ambiente. Os biofilmes de quitosana foram codificados como Q.

4.2.2 Preparação dos biofilmes quitosana/argila

Os biofilmes quitosana/argila foram preparados seguindo a metodologia empregada em estudos realizados por Darder e colaboradores (2005), conforme descrito a seguir. A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético sob agitação magnética a 45°C por 2h. Obtida a solução polimérica, o pH da mesma foi ajustado para 4,9 com adição de uma solução de hidróxido de sódio a 1M sob agitação. Uma vez que um valor de pH ácido é necessário para promover a formação de grupos amina protonados ($-\text{NH}_3^+$) na estrutura da quitosana. Em seguida, foram preparadas dispersões argila/água destilada na concentração de 1% sob agitação mecânica a 3000 rpm e $53 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min. A solução de quitosana foi adicionada a dispersão da argila usando razão mássica de quitosana/argila equivalente a 1/1 mantida sob agitação mecânica a 1200 rpm e $53 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 h. A dispersão quitosana/argila foi vertida em

placas de Petri e acondicionadas em estufa a 50°C por 20 h para a formação dos biofilmes. Obtidos os biofilmes, os mesmos foram cobertos com uma solução de hidróxido de sódio a 1M por 30 min para assegurar a neutralização dos resíduos de ácido. Em seguida, lavados com água destilada até pH neutro e secos a temperatura ambiente. Os biofilmes de quitosana (Q)/montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) e quitosana(Q)/bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) usando razão mássica equivalente a 1/1 foram codificados como Q1/CL1 e Q1/AP1, respectivamente.

4.2.3 Preparação dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila carregados com Ibuprofeno

A metodologia empregada na preparação dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila com razão mássica de 1/1 carregados com ibuprofeno foi adaptada de estudos realizados por Depan e colaboradores (Depan, Kumar e Singh, 2009). O ibuprofeno (Ibu) a uma concentração de 10% em relação à massa de quitosana foi adicionado à solução de quitosana e quitosana/argila sob agitação magnética por 24h, depois a mistura reacional foi vertida em placas de Petri, levadas a etapa de secagem para obtenção dos biofilmes carregados com ibuprofeno. Sendo utilizadas duas formas de apresentação do ibuprofeno a ser adicionado ao meio reacional e dois métodos de secagem como descrito na Tabela 4.1. Obtidos os biofilmes, os mesmos foram cobertos com uma solução de hidróxido de sódio a 1M por 30 min para assegurar a neutralização dos resíduos de ácido. Em seguida, lavados com água destilada até pH neutro e secos a temperatura ambiente.

Tabela 4.1 - Descrição das formas de apresentação do Ibuprofeno (Ibu) e dos métodos de secagem na preparação dos biofilmes carregados.

<i>Biofilmes</i>	<i>Apresentação do IBU</i>	<i>Método de secagem</i>	<i>Codificação dos biofilmes</i>
Q	Macerado e peneirado em malha 325	Em estufa com circulação de ar a 50°C por 20h	Q/Ibu/E
Q	Dissolvido em álcool etílico na proporção de 0,01g de IBU para 1ml de álcool etílico	Em estufa com circulação de ar a 50°C por 20h	Q/Ibu/A/E
Q	Dissolvido em álcool etílico na proporção de 0,01g de IBU para 1ml de álcool etílico	A temperatura ambiente por 24h com 20h em estufa com circulação de ar a 50°C	Q/Ibu/A/T/E
Q1CL1	Dissolvido em álcool etílico na proporção de 0,01g de IBU para 1ml de álcool etílico	A temperatura ambiente por 24h com 20h em estufa com circulação de ar a 50°C	Q1CL1/Ibu/A/T/E
Q1AP1	Dissolvido em álcool etílico na proporção de 0,01g de IBU para 1ml de álcool etílico	A temperatura ambiente por 24h com 20h em estufa com circulação de ar a 50°C	Q1AP1/Ibu/A/T/E

4.3 Caracterização

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise microestrutural da área superficial e transversal dos biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razões mássicas equivalentes a 1/1 (Q1/CL1, Q1/AP1), dos biofilmes de quitosana carregado com ibuprofeno (Q/Ibu/E, Q/Ibu/A/E, Q/Ibu/A/T/E) e dos biofilmes de quitosana/argila com razão mássica de 1/1 carregado com ibuprofeno (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550, Figura 4.1. Para análise das áreas superficiais e transversais as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro utilizando um metalizador Sanyu electron modelo Quick Coater SC-701. No entanto, para análise da área transversal a amostra de quitosana (Q) foi fraturada a temperatura ambiente e as demais amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido antes do recobrimento com uma fina camada de ouro.

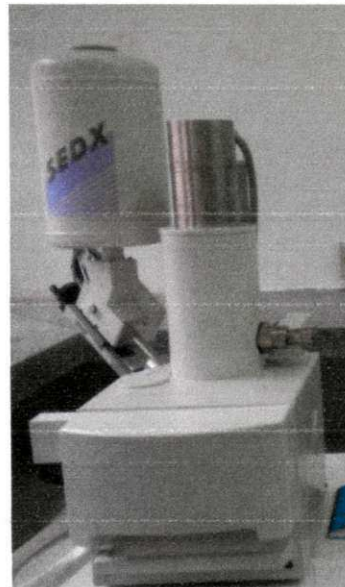


Figura 4.1 - Microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As análises por IV da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), da montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL), dos biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) e dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 carregados com ibuprofeno que apresentaram a melhor condição de preparo (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) foram realizadas à temperatura ambiente em um espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer, Figura 4.2, com varredura de 4000 a 650 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹, operando na forma ATR.



Figura 4.2 - Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer.

4.3.3 Difratometria de raios X (DRX)

As medidas de DRX foram conduzidas à temperatura ambiente em um equipamento Shimadzu XDR - 7000, Figura 4.3, utilizando radiação CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As argilas bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) e montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) e os biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) e os biofilmes de quitosana e quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 carregados com ibuprofeno que apresentaram a melhor condição de preparo (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E,

Q1AP1/Ibu/A/T/E) foram examinados em um intervalo de 2θ entre 2° e 30° . O espaçamento interplanar basal (d_{001}) das argilas e dos biofilmes quitosana/argila foi determinado com base na lei de Bragg conforme Equação 4.1 (Utracki, 2004).

$$d_{001} = \frac{8,8264273}{2\theta} \quad (4.1)$$

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



Figura 4.3 - Difratorômetro de raios X Shimadzu XDR-7000.

4.3.4 Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS)

A metodologia empregada na confecção da curva de calibração foi adaptada de estudos realizados por Braga, (2005). Em resumo, foi preparada uma solução mãe na concentração de $1 \mu\text{g/ml}$ de ibuprofeno em solução salina tampão fosfato (PBS) pH 7,4. Desta solução, foram preparadas, por diluição

em PBS pH 7,4, soluções nas concentrações de 50,0; 20,0; 12,5; 10,0; 7,5; 5,0; 2,5; 2,0 e 1,0 µg/ml (conforme os cálculos apresentados no Anexo 1), as quais tiveram seus espectros determinados por espectrofotometria nas regiões do ultra violeta e do visível (UV-VIS), apresentando pico de absorbância máximo em 222 nm. Em seguida, foi plotado um gráfico com os valores de absorbância em 222 nm versus a concentração correspondente. Depois a curva foi linearizada e obtida a equação da curva de calibração do fármaco ibuprofeno (Equação 4.2).

$$\text{Abs} = k_1 * C + K_0 \quad (4.2)$$

Onde:

Abs = valores de absorbância

C = Concentração do ibuprofeno em (µg/ml)

K₁ = Coeficiente angular da reta

K₀ = Intercepto

O estudo, *in vitro*, da liberação do ibuprofeno incorporado aos biofilmes que apresentaram a melhor condição de preparo, isto é, quitosana (Q/Ibu/A/T/E) e quitosana/argila com razão mássica de 1/1 (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) foi adaptado de estudos realizados por Depan *et al.* (2009). Em que cada biofilme foi imerso em 700 ml da solução salina tamponada de fosfato - PBS 0,1 M (pH 7,2), utilizada como meio de diluição, e mantidos sob contínua agitação a temperatura de 37°C.

Para o sistema biofilmes de quitosana e quitosana/argila carregado com ibuprofeno (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) uma alíquota de 3 ml de PBS foi retirada, após intervalos na faixa de 10 min a 420 min, e os 700 ml da solução completados com uma nova solução de PBS. A concentração do fármaco contido na alíquota de PBS foi quantificada utilizando um espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini - 1240, Figura 4.4, através do valor de absorbância médio, obtido a partir de duas leituras em λ igual a 222 nm, aplicado à equação da curva de calibração do ibuprofeno (Equação 4.2).

As concentrações de quitosana obtidas das alíquotas do sistema biofilmes de quitosana (Q) imerso em 700 ml da solução salina tamponada de fosfato - PBS 0,1 M (pH 7,2) após intervalos de tempo de 10, 60, 120 e 420 min foram consideradas como controle.



Figura 4.4 - Espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini - 1240.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 5.1 apresenta a foto (a) e a micrografia da área transversal (b) do biofilme de quitosana (Q). Visualmente o biofilme revelou-se transparente com coloração amarelada, característica do biopolímero quitosana, e a micrografia evidenciou uma superfície plana, com uma espessura de 21,2 μm e ausente de vazios.

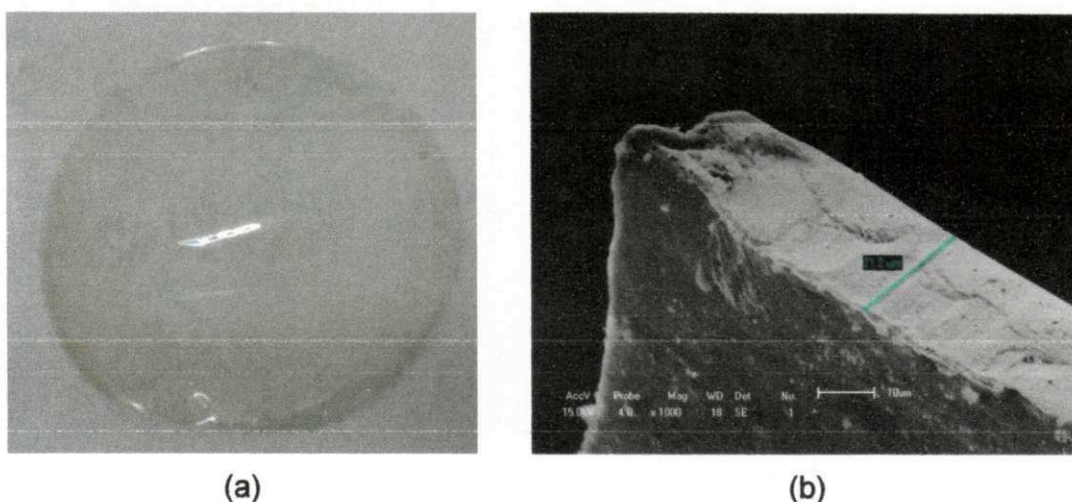


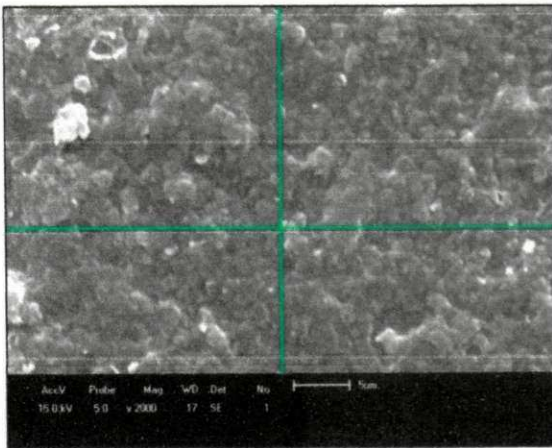
Figura 5.1 - A foto (a) e a micrografia da área transversal (b) do biofilme de quitosana (Q).

As fotos e as micrografias superficiais e transversais dos biofilmes de quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] e quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada com razão mássica quitosana/argila equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) estão apresentadas nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente. De forma geral, a incorporação das argilas (CL e AP) à matriz de quitosana resultou em biofilmes mais opacos e rígidos. As micrografias evidenciaram a presença de duas fases e heterogeneidade nas dispersões das argilas incorporadas à matriz de quitosana que resultaram em aglomerados, sendo estes menores e melhor distribuídos na matriz polimérica para o caso em que a argila montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) foi

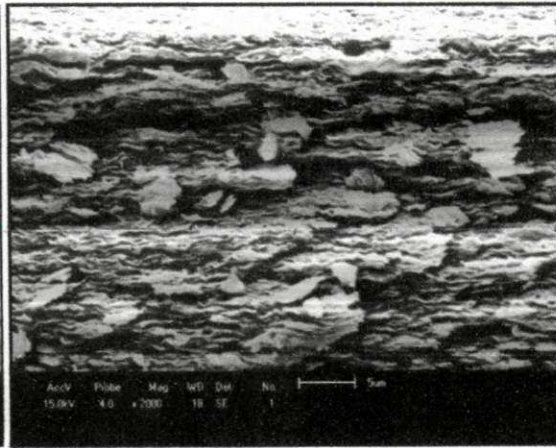
empregada. De acordo com estudo realizado por Wang e colaboradores (2005) a formação de aglomerados em sistemas quitosana/montmorilonita é resultado das interações aresta-aresta (*edge-edge*) dos grupos hidroxílicos presentes nas camadas octaédricas da montmorilonita.



(a)

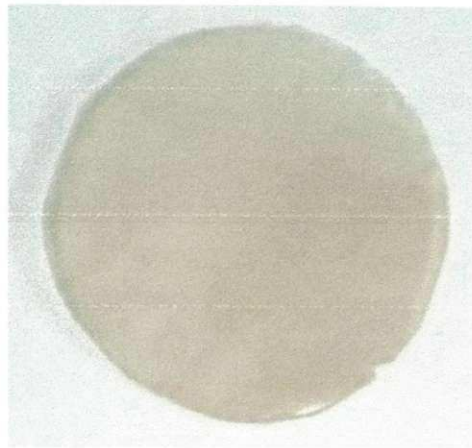


(b)

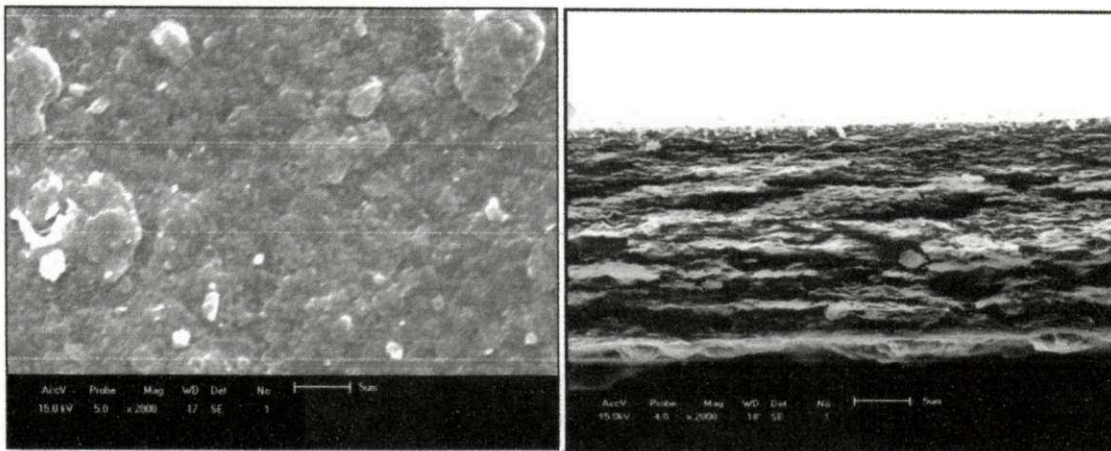


(c)

Figura 5.2 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme Q1CL1.



(a)



(b)

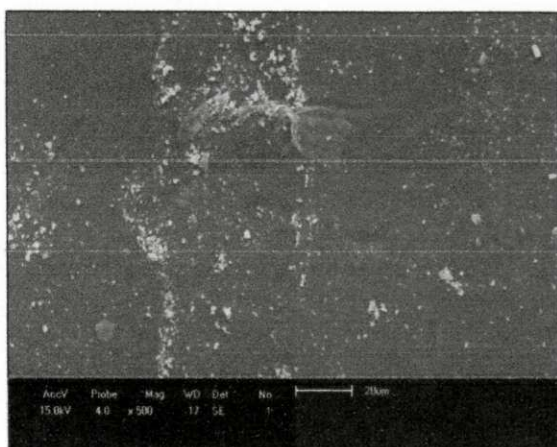
(c)

Figura 5.3 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme Q1AP1.

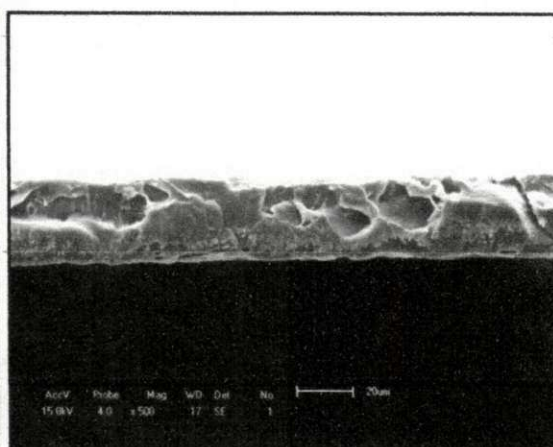
A Figura 5.4 apresenta a foto (a), as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com ibuprofeno, sendo este misturado ao meio reacional, solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético a 1% (v/v), na forma de pó macerado e peneirado em malha 325 e o biofilme obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50 °C por 20h (Q/Ibu/E). A partir da análise visual do biofilme e das micrografias do mesmo (Q/Ibu/E) foi possível observar que o ibuprofeno apresentou má distribuição e dispersão, este fato provavelmente atribuído à baixa solubilidade do ibuprofeno em meio ácido (Sogias, Williams e Khutoryanskiy, 2012).



(a)



(b)



(c)

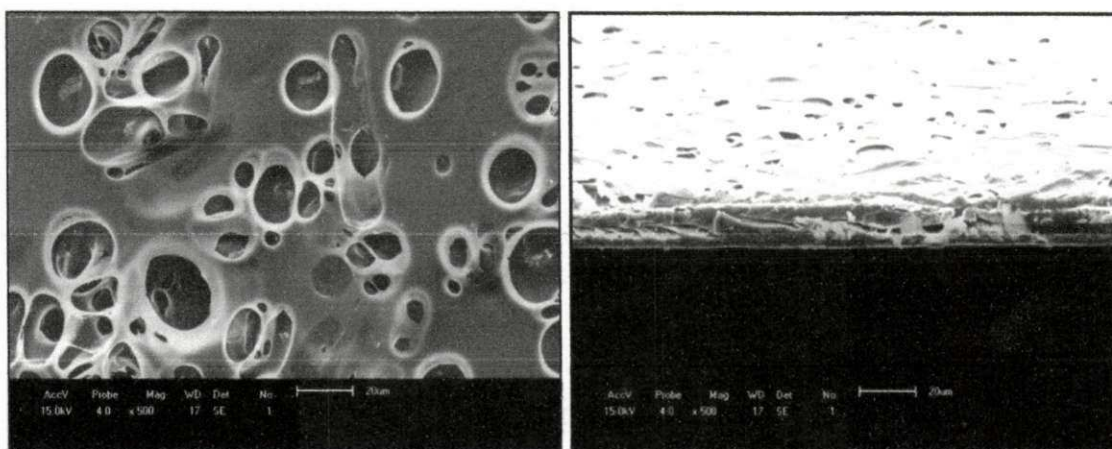
Figura 5.4 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno, macerado e peneirado em malha 325, e obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/E).

A Figura 5.5 apresenta a foto (a), as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico antes de ser misturado ao meio reacional, solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético a 1% (v/v) e o biofilme obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/A/E). A partir da análise visual do biofilme (Q/Ibu/A/E) foi possível observar uma boa distribuição e uma razoável dispersão do ibuprofeno na superfície do biofilme de quitosana. Quanto à análise das micrografias, estas evidenciaram na superfície do biofilme a formação de poros com ibuprofeno depositados no fundo e no interior do mesmo a presença de uma trinca. A

formação dos poros e da trinca provavelmente pode ser atribuída à rápida volatilidade do álcool a 50°C, temperatura de secagem do biofilme.



(a)



(b)

(c)

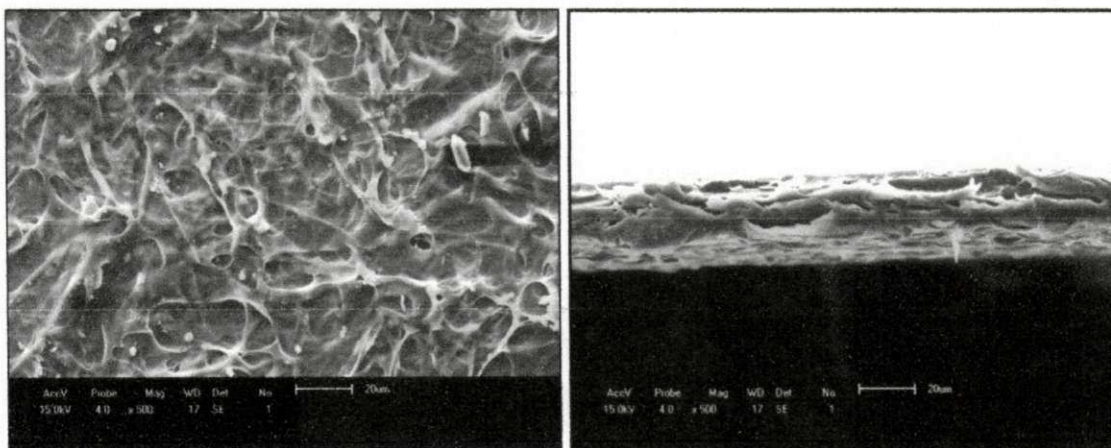
Figura 5.5 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ib/A/E).

A Figura 5.6 apresenta a foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno, previamente dissolvido em álcool etílico, e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/A/T/E). A análise visual do biofilme (Q/Ibu/A/E) evidenciou uma boa distribuição e dispersão do ibuprofeno na

superfície do biofilme e as micrografias evidenciaram poucos aglomerados de ibuprofeno e uma diminuição significativa dos poros na superfície do biofilme provavelmente atribuída a obtenção do biofilme por secagem prévia a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h.



(a)



(b)

(c)

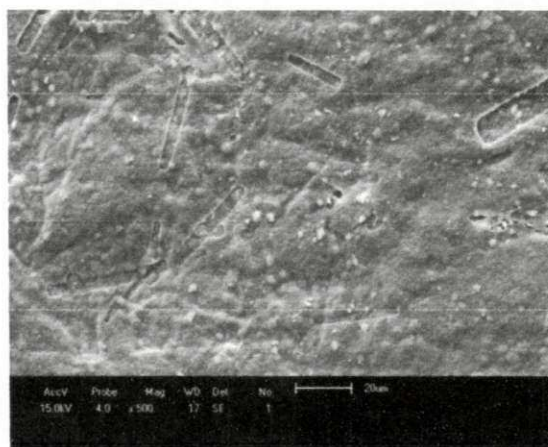
Figura 5.6 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b) e da área transversal (c) do biofilme de quitosana carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa de circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q/Ibu/A/T/E).

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam as fotos (a) e as micrografias da área superficial (b,c) e da área transversal (d) dos biofilmes de quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite® e quitosana/bentonita

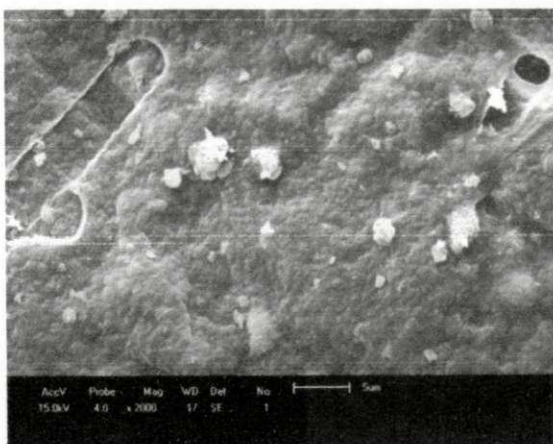
sódica Argel 35 purificada com razão mássica quitosana/argila equivalente a 1/1 carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico, e o biofilme obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E), respectivamente. A escolha desta metodologia para obtenção dos biofilmes quitosana/argila/ibuprofeno foi baseada na redução significativa dos poros no sistema quitosana/ibuprofeno obtido por esse método.



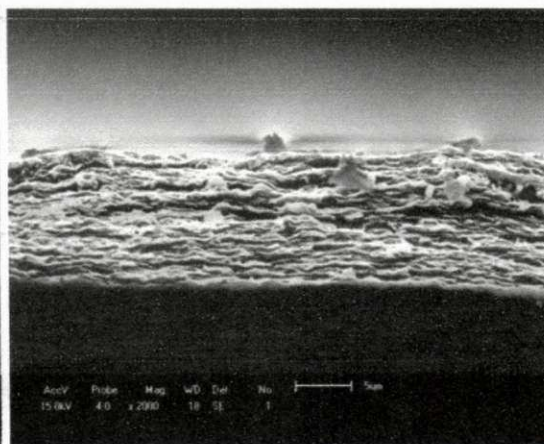
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.7 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b,c) e da área transversal (d) do biofilme de quitosana/montmorilonita sódica comercial com razão mássica de 1/1 carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q1CL1/Ibu/A/T/E).

As micrografias dos biofilmes Q1CL1/Ibu/A/T/E e Q1AP1/Ibu/A/T/E, Figuras 5.7 e 5.8, evidenciaram a ausência de poros, formação de aglomerados de ibuprofeno e de argila, sendo estes menores e melhor distribuídos na matriz polimérica para o caso em que a argila montmorilonita sódica comercial Cloisite® (CL) foi empregada, corroborando com os resultados apresentas pelos mesmos sistemas sem ibuprofeno, Figuras 5.2 e 5.3.

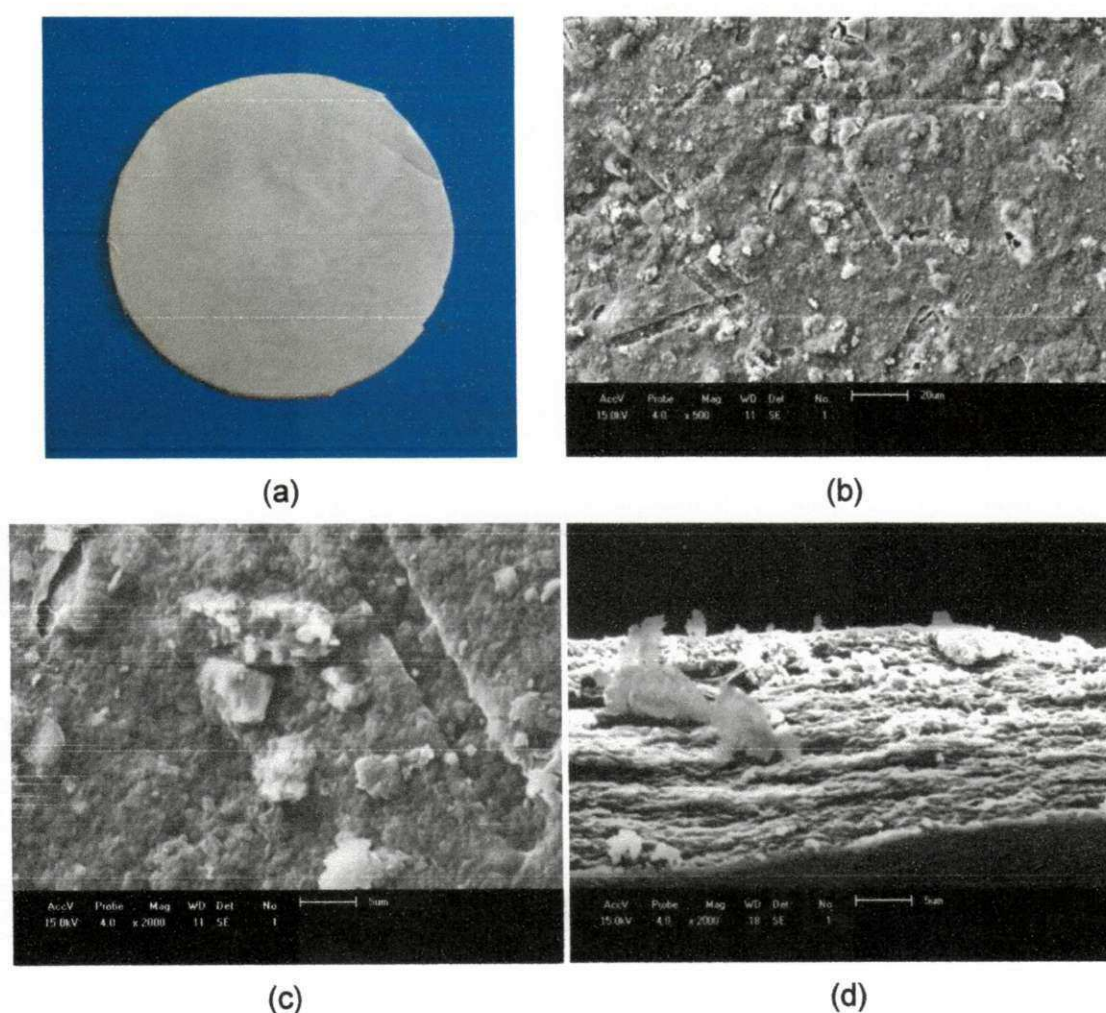


Figura 5.8 - A foto (a) e as micrografias da área superficial (b,c) e da área transversal (d) do biofilme de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada com razão mássica de 1/1 carregado com o ibuprofeno previamente dissolvido em álcool etílico e obtido por secagem a temperatura ambiente por 24h seguida de secagem em estufa circulação forçada de ar a 50°C por 20h (Q1AP1/Ibu/A/T/E).

5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

A Figura 5.9 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho da montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL), da bentonita purificada (AP) dos biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) e dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila carregados com ibuprofeno (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

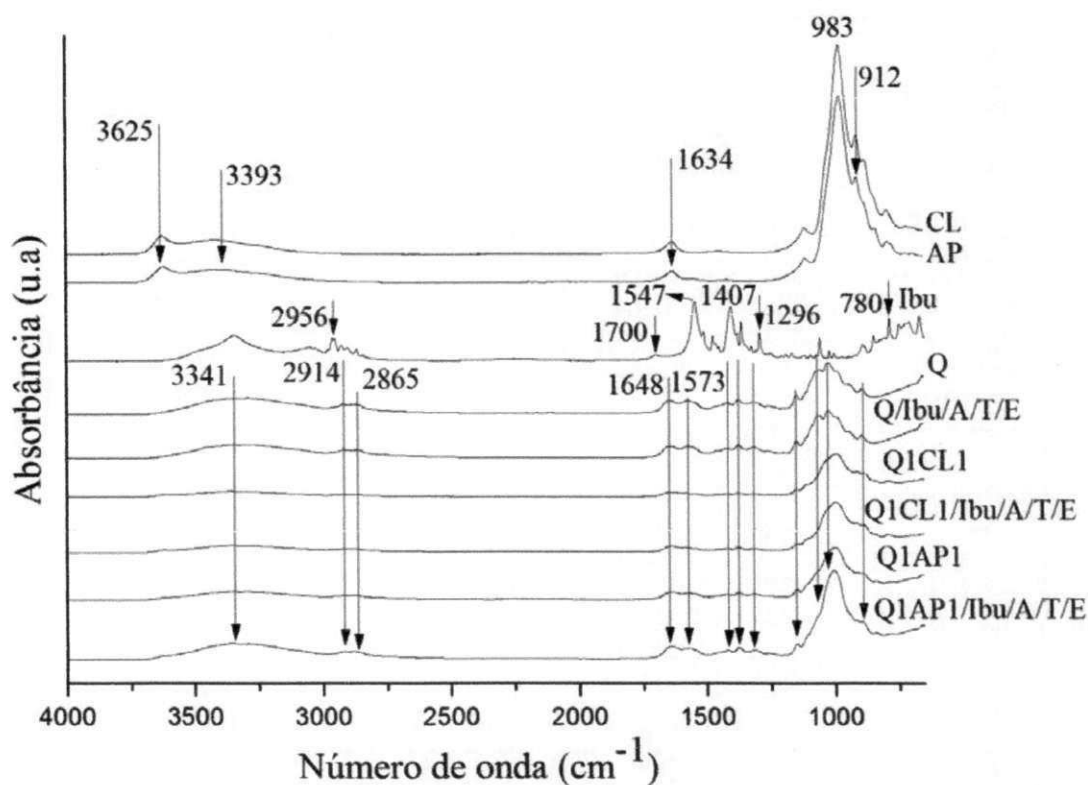


Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

Os espectros das argilas (CL e AP) apresentados na Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

mostram bandas de absorção em: 3625 cm^{-1} [ν_{OH}] atribuída às vibrações de estiramento do grupo estrutural hidroxílico Al-OH e Si-OH próprio da argila, sendo típica de esmectitas com grande quantidade de alumínio na camada octaédrica; 3393 cm^{-1} [ν_{OH}] e 1634 cm^{-1} [δ_{HOH}] atribuídas, respectivamente, as vibrações angulares de água adsorvida na superfície da argila; 983 cm^{-1} [$\nu_{\text{Si-O}}$] atribuída às vibrações de estiramento axial do grupo Si-O-Si; 912 cm^{-1} [$\delta_{\text{Al-Al-OH}}$] atribuída às vibrações angulares da hidroxila do grupo Al_2OH (Bora, Ganguli e Dutta, 2000; Madejova, 2003; Leite *et al.*, 2010).

O espectro de absorção do fármaco ibuprofeno (ibu), Figura 5.9, mostra bandas características em 2956 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo O-H; 1700 cm^{-1} associada ao estiramento do grupo C=O; 1547 devido à presença dos grupos carboxílicos ionizados e um número de bandas presentes entre 1500 cm^{-1} e 700 cm^{-1} , muitas das quais são devido à presença do anel aromático na estrutura do fármaco. Bandas características nesta região estão presentes em 1407 cm^{-1} atribuída ao estiramento C=C (aromática); em 1296 cm^{-1} devido às vibrações do grupamento CH_3 e em 780 cm^{-1} associada ao estiramento C-H (aromática) (Rodríguez *et al.*, 2003; Sogias *et al.*, 2012).

As principais bandas de absorção do biofilme de quitosana (Q), Figura 5.9, são devido ao estiramento axial do grupo O-H na faixa de 3750 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} sobrepostas à banda de estiramento N-H; em 2914 cm^{-1} e 2817 cm^{-1} atribuídas ao estiramento axial assimétrico e simétrico da ligação C-H dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, respectivamente. Vibrações angulares dos grupos metileno e metil também são visíveis em 1376 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} , respectivamente (Mano, Koniarova e Reis, 2003). A absorção em 1648 cm^{-1} associada à deformação axial da ligação carbonila C=O da amida secundária e em 1573 cm^{-1} [$\delta_{\text{NH}_3^+}$] referente às vibrações angulares do grupo amina protonado (Marchessault, Ravenelle e Zhu, 2006); a absorção na faixa de 1160 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} é atribuída as vibrações do grupo C-O (Xu *et al.*, 2006). A banda em 1144 cm^{-1} é relativa às vibrações assimétricas do grupo C-O resultantes da desacetilação da quitosana. As bandas na faixa de 1073 cm^{-1} a 1024 cm^{-1} são atribuídas as vibrações do grupo C-O no anel COH, COC e CH_2OH . Em 893 cm^{-1} corresponde as vibrações da estrutura sacarídea da

quitosana (Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2003; Yuan *et al.*, 2010; Paluszkiwicz *et al.*, 2011).

Os espectros dos biofilmes de quitosana/argila (Q1CL1, Q1AP1),

Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

, apresentam bandas na faixa de 3323 a 3359 cm^{-1} , 1640 a 1645 cm^{-1} e 997 a 1030 cm^{-1} que correspondem às bandas de vibração do silicato sobrepostas às bandas de absorção da quitosana. E bandas na faixa de 2878 a 2890 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} , 1313 a 1320 cm^{-1} e 1149 cm^{-1} atribuídas à absorção da quitosana. Para avaliar a interação entre o biopolímero quitosana com as argilas (CL e AP) uma ampliação dos espectros, na faixa de 1800 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} , dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila, com e sem ibuprofeno, estão apresentados na Figura 5.10.

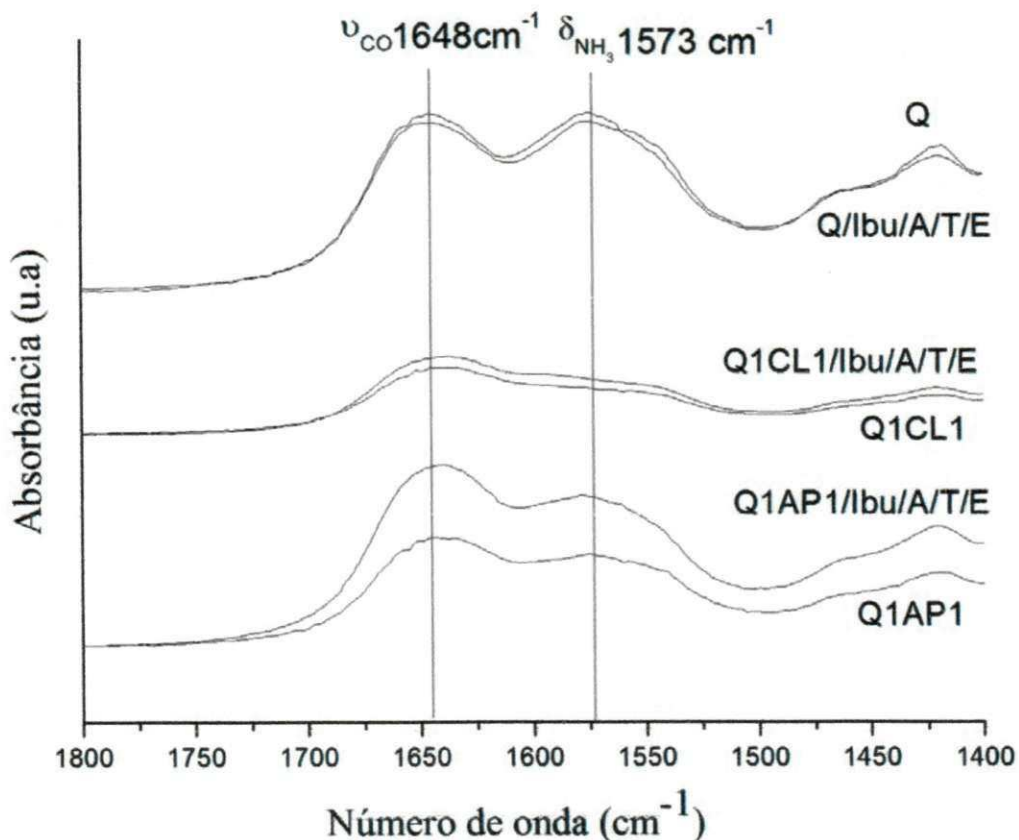


Figura 5.10 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 1800 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

Os espectros dos biofilmes quitosana/argila (Q1CL1, Q1AP1) mostram um deslocamento da banda [δ_{NH_3}] para números de ondas mais baixos. Uma vez que um deslocamento na banda de vibração angular do grupo amina protonada [δ_{NH_3}] pode ser esperado quando os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana interagem eletrostaticamente com os sítios aniônicos das argilas. Este fato pode estar relacionado à forte e a fraca interação eletrostática entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana e os sítios aniônicos do silicato dos biofilmes. A banda em 1648 cm^{-1} do biofilme de quitosana, Figura 5.10, está associada à deformação axial C=O da amida primária [ν_{CO}] e nos biofilmes quitosana/silicato esta banda é sobreposta à banda de vibração angular das argilas em 1634 cm^{-1} [δ_{HOH}] mostrada na Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho na faixa de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana, sem e com ibuprofeno, (Q, Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q1/CL1, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1/AP1, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

(Darder, Colilla e Ruiz-Hitzky, 2005; Wang e Wang, 2007; Tan *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010).

Com relação aos biofilmes carregados com ibuprofeno (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E), Figura 5.9, foi observada o mesmo perfil dos espectros obtidos para os biofilmes sem ibuprofeno (Q, Q1CL1, Q1AP1) sugerindo que provavelmente não ocorrem interações moleculares entre o fármaco, o biopolímero quitosana e as argilas.

5.3. Difractometria de Raios X (DRX)

Para confirmar a efetiva intercalação da quitosana e do ibuprofeno no espaçamento interlamelar das argilas, amostras das argilas montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na^+ (CL) e bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) e dos biofilmes de quitosana e quitosana/argila, sem e com ibuprofeno, (Q, Q1CL1, Q1AP1, Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) foram

caracterizadas por difratometria de raios X e seus respectivos difratogramas estão apresentados na Figura 5.11.

O difratograma do biofilme de quitosana (Q) apresenta pico em torno de 10° e 20° característico do biopolímero quitosana. O difratograma do biofilme de quitosana carregado com ibuprofeno (Q/Ibu/A/T/E) revelou um aumento de intensidade do pico em torno de 10° . Isto indica que provavelmente a incorporação do ibuprofeno favoreceu a um aumento na cristalinidade da quitosana.

Os difratogramas das argilas (CL e AP), Figura 5.11, mostra um pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em torno de 2θ igual a $5,87^\circ$ e a $6,05^\circ$ correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}), calculada com base na equação de Bragg, de $1,50\text{ nm}$ e $1,46\text{ nm}$, respectivamente. O pico (001) referente à montmorilonita nos biofilmes quitosana/montmorilonita (Q1CL1) e quitosana/bentonita purificada (Q1AP1) foi deslocado para valores de 2θ de $3,74^\circ$ e $3,97^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de $2,36\text{ nm}$ e $2,22\text{ nm}$, respectivamente. Isto indica que bionanocompósitos intercalados foram obtidos e que possivelmente bicamadas de quitosana foram posicionadas entre as camadas do argilomineral montmorilonita. Tan e colaboradores (2008) consideram que valores referentes a uma distância interplanar basal (d_{001}) em torno de $2,02\text{ nm}$ indicam que bicamadas de quitosana são posicionadas entre as camadas da montmorilonita. Esta intercalação é favorecida pela interação eletrostática dos grupos ($-\text{NH}_3^+$) da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando acessíveis os sítios para troca aniônica.

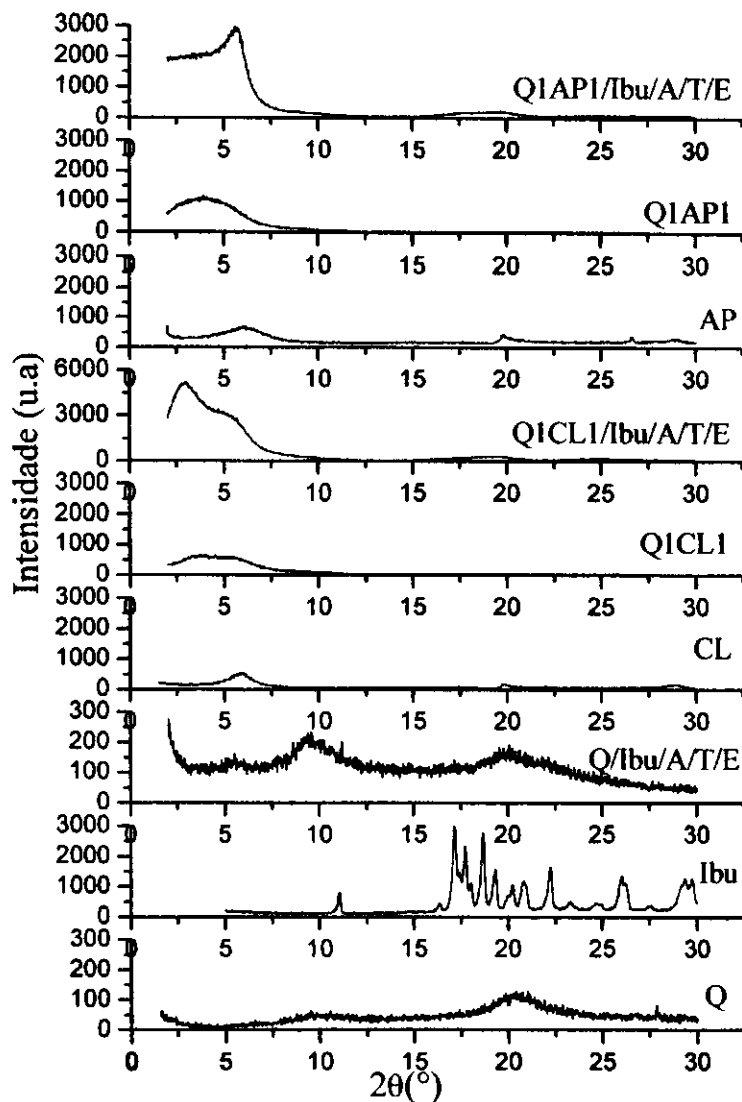


Figura 5.11 - Difractogramas das argilas (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e dos biofilmes de quitosana (Q), quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 (Q1CL1, Q1AP1) e os biofilmes de quitosana e quitosana/argila com razão mássica equivalente a 1/1 carregados com ibuprofeno que apresentaram a melhor condição de preparo (Q/Ibu/A/T/E, Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

Com relação aos biofilmes de quitosana/argila carregados com ibuprofeno (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E), os difractogramas revelaram que o pico (001) referente à montmorilonita nos biofilmes quitosana/montmorilonita (Q1CL1/Ibu/A/T/E) e quitosana/bentonita purificada (Q1AP1/Ibu/A/T/E) foi deslocado para valores de 2θ de 2,93 e 5,65, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 3,01 nm e 1,56 nm, respectivamente. Isto indica que bionanocompósitos intercalados ordenados

foram obtidos e que devido o aumento de 27,5% da distância interplanar basal do biofilme Q1CL1/Ibu/A/T/E quando comparado ao biofilme Q1CL1 provavelmente ocorreu a intercalação do ibuprofeno juntamente com a quitosana entre as galerias do argilomineral montmorilonita.

5.4 Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS)

A avaliação da liberação, *in vitro*, do ibuprofeno incorporado aos biofilmes de quitosana (Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E) foi realizada utilizando a técnica de espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS) e como meio de diluição foi utilizada a solução salina tamponada PBS 0,1M (pH 7,4), esta considerada um meio biorelevante uma vez que o ibuprofeno apresenta-se solúvel neste meio, por ser um fluido com características físico-química semelhante ao sangue e por ocorre a gelificação da quitosana em pH maior que 6,8 (Braga, 2005). A Tabela 5.1 mostra a partir dos valores de concentração da quitosana em 222 nm que os biofilmes obtidos com base no biopolímero quitosana podem ser considerados insolúveis em solução salina tamponada PBS 0,1M (pH 7,4), para os tempos de imersão 10, 60, 120 e 420 min.

Tabela 5.1 - Concentração de quitosana em PBS.

Tempo (min)	Concentração de quitosana (µg/ml)	Concentração de quitosana (%)
10	0,0856	0,00003424
60	0,5492	0,0002197
120	0,5298	0,0002119
420	0,5879	0,0002351

A Figura 5.12 apresenta o gráfico de absorvância em 222 nm do ibuprofeno, em PBS (pH 7,4), em função das seguintes concentração: 50; 20; 12,5; 10; 7,5; 5; 2,5; 2; 1; 0 (µg/ml).

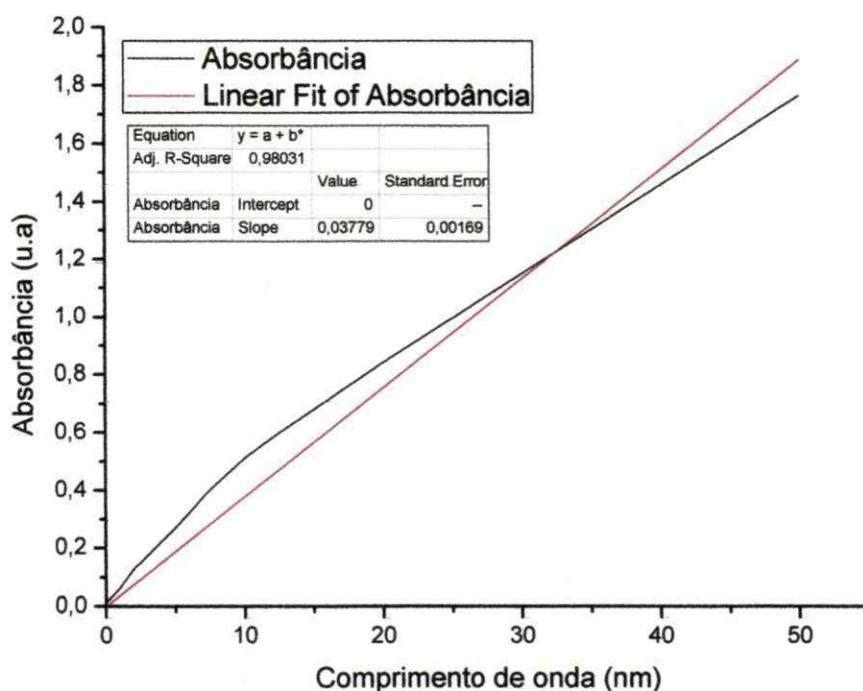


Figura 5.12 - Curva de calibração do ibuprofeno em PBS pH 7,4 ($\lambda = 222$ nm).

Como pode ser observado na Figura 5.12, a partir da linearização da curva de absorvância a concentração de ibuprofeno em µg/ml pode ser

quantificada através da equação 5.1, a qual apresenta um coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,98031.

$$\text{Abs} = 0,03779 * C \quad (5.1)$$

Onde:

Abs = valores de absorvância em λ igual a 222nm

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

A Figura 5.13 apresenta os perfis da liberação, *in vitro*, do ibuprofeno incorporado aos biofilmes de quitosana (Q/Ibu/A/T/E), quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q1CL1/Ibu/A/T/E) e quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q1AP1/Ibu/A/T/E) imersos em solução salina tamponada PBS 0,1M (pH 7,4) a 37°C e mantidos sob agitação.

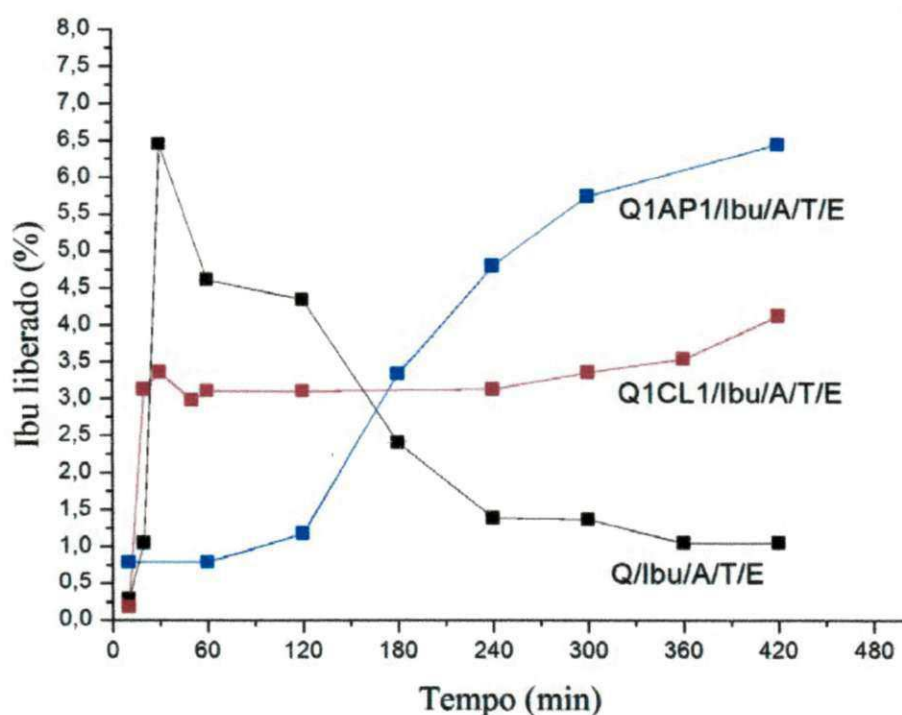


Figura 5.13 - Perfil de liberação do ibuprofeno incorporado aos biofilmes de quitosana (Q/Ibu/A/T/E) e de quitosana/argila (Q1CL1/Ibu/A/T/E, Q1AP1/Ibu/A/T/E).

Como pode ser observado na Figura 5.13, o biofilme de quitosana contendo ibuprofeno (Q/Ibu/A/T/E) apresentou uma rápida liberação do

ibuprofeno com pico máximo em 30min referente a 6,45% de ibuprofeno liberado, seguido por reduções significativas até 240 min com teor de 1,39% de ibuprofeno liberado. No entanto, na faixa de tempo de 240 min a 420 min variações discretas foram observadas.

O biofilme de quitosana/argila Q1CL1/Ibu/A/T/E, Figura 5.13, apresentou para o tempo de 30 min um teor de ibuprofeno de 3,4%, sendo este teor considerado praticamente constante até um período de tempo de 420min. Portanto, a incorporação da montmorilonita a quitosana favoreceu a um controle da liberação do ibuprofeno. Este fato sugere que a redução na taxa de liberação do ibuprofeno é atribuída à acomodação das moléculas do fármaco nas galerias do argilomineral montmorilonita, como mostra os resultados obtidos por difratometria de raios X.

Com relação ao biofilme Q1CL1/Ibu/A/T/E foi observado um perfil de liberação constate, em torno de 1%, no período de tempo de 120 min. No entanto, nos tempos de 180 min, 240 min, 300 min e 420 min foram observados teores de ibuprofeno liberado de 3,3%, 4,8%; 5,8% e 6,5%, respectivamente. Isto indica que a bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) também favoreceu a uma taxa de liberação do ibuprofeno mais lenta, pois o teor de 6,5% de ibuprofeno liberado só foi alcançado em 420 min. No entanto, o biofilme quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada não promoveu o controle da liberação do fármaco de forma mais efetiva porque provavelmente os aglomerados argilosos, como mostrados nos resultados de microscopia eletrônica de varredura, favorecidos pelas interações aresta-aresta dos grupos hidroxílicos presentes nas camadas octaédricas do argilomineral montmorilonita impediram à acomodação de uma maior quantidade de moléculas do fármaco nas galerias do mesmo como indicado pelo resultado da distância interplanar basal obtido para o biofilme (Q1AP1/Ibu/A/T/E).

5 CONCLUSÕES

Biofilmes, sem e com ibuprofeno, de quitosana, quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) e quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) com razão mássica quitosana/argila de 1/1 foram preparados pelo método de intercalação por solução e de acordo com os resultados de espectroscopia no infravermelho, difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura ficou evidenciado que ocorreram efetivas interações entre o biopolímero quitosana e a argila, que bionanocompósitos intercalados foram obtidos e que os biofilmes apresentaram aglomerados argilosos sendo estes menores e melhor distribuídos na matriz polimérica para o caso em que a argila montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) foi empregada.

Com relação à incorporação do ibuprofeno, o método de dissolução e as condições de secagem afetaram a dispersão deste fármaco no biofilme de quitosana. No entanto, a presença do ibuprofeno nos biofilmes quitosana/argila não afetou a formação de bionanocompósitos. Quanto à avaliação da liberação do ibuprofeno ficou evidenciado que a incorporação das argilas (CL e AP) a quitosana favoreceram a uma taxa de liberação do ibuprofeno mais lenta e que a argila montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) promoveu o controle da liberação do fármaco de forma mais efetiva.

6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

- Avaliar a cinética de Liberação *in vitro* do ibuprofeno para sistemas com outras razões mássicas quitosana/argila.
- Avaliar a citotoxicidade do biofilme de quitosana.
- Avaliar o efeito do teor e do tipo de argila na citotoxicidade de biofilme de quitosana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUZZI, C. et al. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1, p. 22-36, 2007. ISSN 0169-1317.

ALMEIDA, H. E. P. P. D. J. **Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno**. 2009. 136f (Dissertação de mestrado). Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto - Portugal.

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. ISSN 0022-2461.

AWAJA, F.; DAVER, F.; KOSIOR, E. Recycled poly (ethylene terephthalate) chain extension by a reactive extrusion process. **Polymer Engineering & Science**, v. 44, n. 8, p. 1579-1587, 2004. ISSN 1548-2634.

AZEVEDO, V. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BORA, M.; GANGULI, J. N.; DUTTA, D. K. Thermal and spectroscopic studies on the decomposition of [Ni {di (2-aminoethyl) amine}< sub> 2</sub>]-and [Ni (2, 2': 6', 2''-terpyridine)< sub> 2</sub>]-Montmorillonite intercalated composites. **Thermochimica acta**, v. 346, n. 1, p. 169-175, 2000. ISSN 0040-6031.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 2, p. 125-155, 2009. ISSN 0079-6700.

BORDES, P. et al. Structure and Properties of PHA/Clay Nano-Biocomposites Prepared by Melt Intercalation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 209, n. 14, p. 1473-1484, 2008. ISSN 1521-3935.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F.; ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 256-261, 2008. ISSN 0104-1428.

BRAGA, G. K. **Determinação das especificações do processo de spray drying na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica**. 2005. 82 f (Dissertação de Mestrado (Fármacos e medicamentos)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto-SP.

BRICKS, L. F. Uso judicioso de medicamentos em crianças. **J Pediatr**, v. 79, n. 1Supl, p. 107-14, 2003.

BRITO, G. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de farmacos.** 2007.

CASARIN, S. **Desenvolvimento e caracterização de blendas e compostos empregando polímeros biodegradáveis.** 2004. 112 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências), UFSCar, São Carlos, 2004. Disponível em: < <http://libdigi.unicamp.br/document>

CASARIN, S. A. **Desenvolvimento e caracterização de blendas e de compostos empregando polímeros biodegradáveis.** 2010.

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. ISSN 0100-4042.

COSTA JR, E. D. S.; MANSUR, H. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** 2008. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

DA SILVA, A. F.; DA SILVA, D. A. Fármacos Anti-inflamatórios não esteroidais mais dispensados em uma farmácia comercial do município de Itaocara, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, p. 1-14, 2012. ISSN 2236-0867.

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. ISSN 0897-4756.

_____. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. **Applied Clay Science**, v. 28, n. 1, p. 199-208, 2005. ISSN 0169-1317.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011. ISSN 0079-6700.

DAVER, F.; GUPTA, R.; KOSIOR, E. Rheological characterisation of recycled poly (ethylene terephthalate) modified by reactive extrusion. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 204, n. 1, p. 397-402, 2008. ISSN 0924-0136.

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 FARIA, A. U.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biodegradação de Filmes de Polipropileno (PP), Poli (3-hidroxibutirato)(PHB) e Blenda de PP/PHB por Microrganismos das Águas do Rio Atibaia. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 141-147, 2010.

DE MORAES, M. F. V. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BLENDA POLIMÉRICA BIODEGRADÁVEL POLI (HIDROXIBUTIRATO)[PHB]/CO-**

POLIÉSTER ALIFÁTICO AROMÁTICO [ECOFLEX®] PARA APLICAÇÕES EM EMBALAGENS. 2004. Universidade Federal de Ouro Preto

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

DEL NOBILE, M. et al. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, v. 93, n. 1, p. 1-6, 2009. ISSN 0260-8774.

DEPAN, D.; KUMAR, A. P.; SINGH, R. P. Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. *Acta biomaterialia*, v. 5, n. 1, p. 93-100, 2009. ISSN 1742-7061.

DIAS, M. L.; SILVA, A. P. Extensão de Cadeia em Poli (Naftalato de Etileno) pelo Fosfito de Trifenila. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n. 3, p. 102-108, 2001. ISSN 0104-1428.

GHANBARI, A. et al. A novel approach to control thermal degradation of PET/organoclay nanocomposites and improve clay exfoliation. *Polymer*, v. 54, n. 4, p. 1361-1369, 2013. ISSN 0032-3861.

GONZALEZ, A. et al. Application of pyrolysis/gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy and TGA techniques in the study of thermal degradation of poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer degradation and stability*, v. 87, n. 2, p. 347-354, 2005. ISSN 0141-3910.

GRASSIE, N.; MURRAY, E.; HOLMES, P. The thermal degradation of poly (-D)- β -hydroxybutyric acid): Part 1—Identification and quantitative analysis of products. *Polymer degradation and stability*, v. 6, n. 1, p. 47-61, 1984a. ISSN 0141-3910.

_____. The thermal degradation of poly (-D)- β -hydroxybutyric acid): part 2—changes in molecular weight. *Polymer Degradation and Stability*, v. 6, n. 2, p. 95-103, 1984b. ISSN 0141-3910.

HABLOT, E. et al. Thermal and thermo-mechanical degradation of poly (3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, n. 2, p. 413-421, 2008. ISSN 0141-3910.

HAN, Y.-S. et al. Preparation and characterization of chitosan–clay nanocomposites with antimicrobial activity. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 71, n. 4, p. 464-467, 4// 2010. ISSN 0022-3697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022369709003540> >.

HARALABAKOPOULOS, A.; TSIOURVAS, D.; PALEOS, C. Chain extension of poly (ethylene terephthalate) by reactive blending using diepoxides. *Journal of applied polymer science*, v. 71, n. 13, p. 2121-2127, 1999. ISSN 1097-4628.

JIANG, L. et al. Study of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhisker composites prepared by solution casting and melt processing. *Journal of Composite Materials*, v. 42, n. 24, p. 2629-2645, 2008. ISSN 0021-9983.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010. ISSN 0169-409X.

KOH, S.-M.; DIXON, J. B. Preparation and application of organo-minerals as sorbents of phenol, benzene and toluene. **Applied Clay Science**, v. 18, n. 3, p. 111-122, 2001. ISSN 0169-1317.

KORNMANN, X.; LINDBERG, H.; BERGLUND, L. A. Synthesis of epoxy-clay nanocomposites. Influence of the nature of the curing agent on structure. **Polymer**, v. 42, n. 10, p. 4493-4499, 5// 2001. ISSN 0032-3861. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386100008016> >.

KUMAR, M. et al. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8406-8415, 2010. ISSN 0960-8524.

LEITE, I. F. et al. Characterization of pristine and purified organobentonites. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 100, n. 2, p. 563-569, 2010. ISSN 1388-6150.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2005. ISSN 1525-7797.

LITALIEN, C.; JACQZ-AIGRAIN, E. Risks and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children. **Paediatric drugs**, v. 3, n. 11, p. 817-858, 2001. ISSN 1174-5878.

MACHADO, M. L. et al. Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010. ISSN 0104-1428.

MADEJOVA, J. FTIR techniques in clay mineral studies. **Vibrational spectroscopy**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2003. ISSN 0924-2031.

MAITI, P.; BATT, C. A.; GIANNELIS, E. P. New biodegradable polyhydroxybutyrate/layered silicate nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 11, p. 3393-3400, 2007. ISSN 1525-7797.

MANO, J.; KONIAROVA, D.; REIS, R. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 127-135, 2003. ISSN 0957-4530.

MARCHESSAULT, R. H.; RAVENELLE, F.; ZHU, X. X. **Polysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications**. An American Chemical Society Publication, 2006. ISBN 0841239606.

MARQUES, L. Um fármaco com Sucesso. Departamento e Centro de Química da Universidade de Évora, 2009. Disponível em: < http://www.videos.uevora.pt/quimica_para_todos/qpt_ibuprofeno.pdf >.

MEDLEY. Ibuprofeno - bula, 2012 Disponível em: <http://www.medley.com.br/portal/bula/ibuprofeno_gotas.pdf> Acesso em Dez. de 2013.

MENDES, F. M. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE AMIDO DE BATATA, POLI-HIDROXIBUTIRATO E POLI-HIDROXIBUTIRATO-CO-VALERATO**. 2009. (Dissertação de mestrado.). Universidade de São Paulo - São Paulo

MISRA, S. K. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 31, n. 10, p. 2806-2815, 4// 2010. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296120901432X>>.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. **Natural fibers, biopolymers, and biocomposites**. CRC Press, 2005. ISBN 0203508203.

MORAES, M. F. V. D. Produção e caracterização da blenda polimérica biodegradável poli (hidroxibutirato)[PHB]/co-poliéster alifático aromático [Ecoflex®] Para aplicações em embalagens. 2005.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. D. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local:[revisão]; Non-steroidal anti-inflammatory drugs and their local pharmacology:[review]. **Acta fisiátrica**, v. 16, n. 4, 2009. ISSN 0104-7795.

MURRAY, H. H. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. **Applied clay science**, v. 17, n. 5, p. 207-221, 2000. ISSN 0169-1317.

NOMURA, L. M. et al. Processo cicatricial de sutura em ceco com os fios polipropilene, poliglicaprone 25 e glicomer 60 em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 22, n. 2, p. 82-8, 2009.

PACHEKOSKI, W. M.; AGNELLI, J. A. M.; BELEM, L. P. Thermal, mechanical and morphological properties of poly (hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing. **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 159-164, 2009. ISSN 1516-1439.

PALUSZKIEWICZ, C. et al. FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 4, p. 784-788, 2011. ISSN 1386-1425.

PANDEY, S.; MISHRA, S. B. Organic–inorganic hybrid of chitosan/organoclay bionanocomposites for hexavalent chromium uptake. **Journal of colloid and interface science**, v. 361, n. 2, p. 509-520, 2011. ISSN 0021-9797.

PARRA, D. et al. Influence of poly (ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical–chemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate). **Polymer degradation and stability**, v. 91, n. 9, p. 1954-1959, 2006. ISSN 0141-3910.

PELLICANO, M. **Desenvolvimento e caracterização de blendas PHBV/Ecoflex e suas modificações com amidos**. 2008. 130f (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Carlos. São Paulo

PRAPHULLA, P.; PRAPHULLA, P. **Studies on Reactive Blends of Poly (hydroxybutyrate-co-valerate) and Poly (butylene succinate) Bioplastics**. 2012.

QUENTAL, A. C. et al. **Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade**. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 438-446, 2010.

RAUWENDAAL, C. **Polymer extrusion**. ,. Munich: editora Carl Hanser,. 2001. p.206 ISBN 1569905398.

RAVI KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000. ISSN 1381-5148.

ROSA, D. S. et al. **Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado**. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002. ISSN 0104-1428.

ROY, N. et al. **Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material**. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, n. 2, p. 346-353, 2012. ISSN 0144-8617.

SAHOO, S.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. **Enhanced properties of lignin-based biodegradable polymer composites using injection moulding process**. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 42, n. 11, p. 1710-1718, 11// 2011. ISSN 1359-835X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359835X11002314> >.

SALLES, F. et al. **Determination of the Driving Force for the Hydration of the Swelling Clays from Computation of the Hydration Energy of the Interlayer Cations and the Clay Layer**. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 35, p. 13170-13176, 2007. ISSN 1932-7447.

SAUJANYA, C.; RADHAKRISHNAN, S. **Structure development and crystallization behaviour of PP/nanoparticulate composite**. *Polymer*, v. 42, n. 16, p. 6723-6731, 2001. ISSN 0032-3861.

SCHEIRS, J. **Additives for the Modification of Poly (Ethylene Terephthalate) to Produce Engineering-Grade Polymers**. *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*, p. 495-540, 2003. ISSN 0470090685.

SHEN, L.; WORRELL, E.; PATEL, M. K. **Open-loop recycling: A LCA case study of PET bottle-to-fibre recycling**. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 55, n. 1, p. 34-52, 11// 2010. ISSN 0921-3449. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344910001618> >.

SILVA, S. M. et al. **Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites**. In: (CROATIA), T. T. I. R. (Ed.). *Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites*. **Capítulo 3 (22 pp) na obra: Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology**, 2012. p.22. ISBN ISBN 978-953-51-0537-4.

SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012. ISSN 0378-5173.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 84-95, 2007. ISSN 0924-2244.

TAN, W. et al. 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, 11// 2008. ISSN 0266-3538. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266353807004058> >.

TAVARIA, F. K. et al. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013. ISSN 1517-3151.

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. ISSN 0011-9164.

UTRACKI, L. A. **Clay-containing polymeric nanocomposites. 1.** iSmithers Rapra Publishing, 2004. ISBN 1859574378.

VERHOOGT, H.; RAMSAY, B.; FAVIS, B. Polymer blends containing poly (3-hydroxyalkanoate) s. **Polymer**, v. 35, n. 24, p. 5155-5169, 1994. ISSN 0032-3861.

VILLALOBOS, M. et al. Oligomeric chain extenders for economic reprocessing and recycling of condensation plastics. **Energy**, v. 31, n. 15, p. 3227-3234, 2006. ISSN 0360-5442.

VISERAS, C. et al. Current challenges in clay minerals for drug delivery. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 3, p. 291-295, 2010. ISSN 0169-1317.

WANG, L.; WANG, A. Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 979-985, 2007. ISSN 0304-3894.

WANG, L. et al. Processability modifications of poly (3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending, and stabilizing. **Journal of applied polymer science**, v. 107, n. 1, p. 166-173, 2008. ISSN 1097-4628.

WANG, S. et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 1, p. 123-131, 2005. ISSN 0141-3910.

XI, Y. et al. Thermal stability of octadecyltrimethylammonium bromide modified montmorillonite organoclay. **Journal of colloid and interface science**, v. 311, n. 2, p. 347-353, 2007. ISSN 0021-9797.

XU, S. W. et al. Interaction of functional groups of gelatin and montmorillonite in nanocomposite. **Journal of applied polymer science**, v. 101, n. 3, p. 1556-1561, 2006. ISSN 1097-4628.

YUAN, Q. et al. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1140-1148, 2010. ISSN 1742-7061.

ZHAO, H. et al. Processing and characterization of solid and microcellular poly(lactic acid)/polyhydroxybutyrate-valerate (PLA/PHBV) blends and PLA/PHBV/Clay nanocomposites. **Composites Part B: Engineering**, v. 51, p. 79-91, 2013. ISSN 13598368.

ANEXO 1

Diluições:

Para 50 µg/ml

1mg-----1000µg

X mg----- 50 µg

$$X = 0,05$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,05 \text{ mg} * v_2$$

V₂ = 20 ml (acrescenta 19 ml de PBS).

Para 20 µg/ml

1mg-----1000µg

X mg----- 20 µg

$$X = 0,02$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,02 \text{ mg} * v_2$$

V₂ = 50 ml (acrescenta 30 ml de PBS a diluição anterior).

Para 12,5 µg/ml

1mg-----1000µg

X mg----- 12,5 µg

$$X = 0,0125$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,0125\text{mg} * v_2$$

V₂ = 80 ml (acrescenta 30 ml de PBSa diluição anterior).

Para 10 µg/ml

1mg-----1000µg

X mg----- 10 µg

$$X = 0,01$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,01 \text{ mg} * v_2$$

V₂ = 100 ml (acrescenta 20 ml de PBSa diluição anterior).

Para 7,5 µg/ml

1mg-----1000µg

$$X \text{ mg} \text{-----} 7,5 \mu\text{g}$$

$$X = 0,0075$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,0075 \text{ mg} * v_2$$

$$V_2 = 133,3 \text{ ml (acrescenta 33,3 ml de PBSa diluição anterior).}$$

Para 5,0 $\mu\text{g/ml}$

$$1\text{mg} \text{-----} 1000\mu\text{g}$$

$$X \text{ mg} \text{-----} 5,0 \mu\text{g}$$

$$X = 0,005$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,005 \text{ mg} * v_2$$

$$V_2 = 200 \text{ ml (acrescenta 66,7 ml de PBSa diluição anterior).}$$

Para 2,5 $\mu\text{g/ml}$

$$1\text{mg} \text{-----} 1000\mu\text{g}$$

$$X \text{ mg} \text{-----} 2,5 \mu\text{g}$$

$$X = 0,0025$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,0025\text{mg} * v_2$$

$$V_2 = 400 \text{ ml(acrescenta 200 ml de PBSa diluição anterior).}$$

Para 2,0 $\mu\text{g/ml}$

$$1\text{mg} \text{-----} 1000\mu\text{g}$$

$$X \text{ mg} \text{-----} 2,0 \mu\text{g}$$

$$X = 0,002$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,002 \text{ mg} * v_2$$

$$V_2 = 500 \text{ ml (acrescenta 100 ml de PBSa diluição anterior).}$$

Para 1,0 $\mu\text{g/ml}$

$$1\text{mg} \text{-----} 1000\mu\text{g}$$

$$X \text{ mg} \text{-----} 1,0 \mu\text{g}$$

$$X = 0,001$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\text{mg} * 1 \text{ ml} = 0,001 \text{ mg} * v_2$$

$$V_2 = 1000 \text{ ml (acrescenta 500 ml de PBSa diluição anterior).}$$