



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS**

GEORGTOWN ALMIR OLIVEIRA DA SILVA

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BLENDAS POLIMÉRICAS DE MEMBRANA DA
CASCA DO OVO/QUITOSANA COMO UM SISTEMA MATRICIAL DE LIBERAÇÃO
DO FÁRMACO NIMESULIDA**

JUAZEIRO - BA

2017

GEORGTOWN ALMIR OLIVEIRA DA SILVA

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BLENDAS POLIMÉRICAS DE MEMBRANA DA
CASCA DO OVO/QUITOSANA COMO UM SISTEMA MATRICIAL DE LIBERAÇÃO
DO FÁRMACO NIMESULIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Arlan de Assis Gonsalves

JUAZEIRO - BA

2017

S586p Silva, Geortown Almir Oliveira da
Preparação e avaliação da blenda polimérica de membrana da casca do ovo/quitosana como um sistema matricial de liberação do fármaco nimesulida / Geortown Almir Oliveira da Silva. -- Juazeiro, 2017.
xv, 91 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências doa Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro, Juazeiro-BA, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Arlan de Assis Gonsalves.

1. Polímeros. 2. Quitosana. 3. Sistemas de liberação de fármacos. 4. Nimesulida. 5. I. Título. II. Gonsalves, Arlan de Assis. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 620.192



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Avenida Antônio Carlos Magalhães, 510 - Santo Antônio. CEP: 48902-300 Juazeiro/BA

Tel/Fax: (74)21027645, www.univasf.edu.br/~cpgcm

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Preparação e avaliação da blenda polimérica de membrana da casca do ovo/quitosana como um sistema matricial de liberação do fármaco nimesulida por

Georgtown Almir Oliveira da Silva

Dissertação de mestrado APROVADA em sessão pública no dia 25 de abril de dois mil e dezessete perante a banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Arlan de Assis Gonsalves
(CPGCM-UNIVASF)

Prof. Dr. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro
(CPGCM-UNIVASF)

Prof. Dr. Marcos dos Santos Lima
(Dept. de Tec. de Alimentos - IF SERTÃO - PE)

*Dedico esse trabalho a minha mãe Marta
(in memoriam) e ao meu irmão Fábio (in
memoriam), tenho certeza que onde quer que
eles estejam estão felizes com mais essa
conquista importante na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela vida que me foi concedida e por avançar mais essa etapa na minha vida.

Meu muito obrigado ao professor Dr Arlan de Assis Gonsalves, por me orientar nesse trabalho e ter tido toda a paciência de passar todo embasamento necessário para produção do mesmo.

Obrigado a minha Vó, Maria do Socorro, que me ensinou a encarar cada dificuldade na vida como uma oportunidade de crescimento e renovação. Isso levarei por toda a minha vida.

Obrigado aos meus irmãos, Gutemberg, Fabiana e Paulo, a minha filha, Geysa, e aos meus sobrinhos, Gustavo, Artur, Carol e Themis, por estarem sempre alegrando a minha vida, fazendo com que eu tivesse sempre um motivo para continuar trabalhando.

De maneira especial, quero agradecer a Camila, por me dar todo apoio e incentivo para seguir em frente. Ela é a responsável por eu ter continuado e chegado até aqui.

Aos técnicos dos laboratórios da Univasf, Cícero (Laboratório de Química Analítica) e Ginneton (Laboratório de Espectroscopia).

A Antônio, técnico do Laboratório de Espectroscopia FTIR do IF-Sertão.

A todos os professores da minha graduação e pós-graduação, a toda a minha família e amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho. Obrigado!

“Se consegui enxergar mais longe, é porque pude me apoiar nos ombros dos gigantes”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A membrana da casca do ovo (MCO) é um biomaterial que vem sendo estudado cada vez mais por pesquisadores, demonstrando as mais diversas propriedades e aplicação de seu uso nos diversos campos das ciências. A quitosana (QTS) é muito usada na indústria farmacêutica como um exemplo os sistemas de liberação prolongada de fármacos. O objetivo do trabalho foi preparar uma blenda polimérica usando como matrizes biopoliméricas a MCO e a QTS. Para tal, a MCO foi obtida através de processo químico com uma solução de ácido acético. As blendas MCO/QTS foram preparadas em proporções 1:3, 1:1 e 3:1, respectivamente, após a preparação das blendas as mesmas foram submetidas as técnicas de caracterização de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Espectrometria com Transformada de Fourier na região do Infravermelho (FTIR), a partir do estudo da morfologia das blendas por meio do MEV e da análise em FTIR, a blenda 1:1 foi escolhida para seguir nos testes de liberação junto com a MCO. Após a obtenção das blendas foi feita a extração e purificação da nimesulida usando métodos químicos. Para caracterização da mesma foram usadas as técnicas de determinação do Ponto de Fusão (PF), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e MEV. A nimesulida extraída e purificada foi incorporada blenda 1:1 e a MCO. Posteriormente, as matrizes Blenda e MCO com nimesulida incorporada foram submetidas as técnicas de caracterização de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Espectrometria com Transformada de Fourier na região do Infravermelho (FTIR). Depois da avaliação das matrizes. A construção da curva analítica foi obtida usando uma solução de nimesulida em meio básico (pH = 7,4), onde foi possível observar que a absorção máxima da solução de nimesulida foi em 400 nm. Para os testes de liberação com o fármaco e as matrizes utilizou-se um sistema fechado de bombeamento acoplado a um espectrofotômetro de absorção molecular no Uv-visível contendo 25 mg das matrizes blenda e MCO, onde foram realizadas medidas de absorção em intervalos de tempo variados até um total de 60 minutos. Os resultados obtidos por meio de tratamento estatísticos demonstraram que o perfil de liberação da nimesulida usando MCO ou blenda foram muito próximos aos das matrizes reticuladas (MCO e Blenda), de modo que ambas as matrizes (reticuladas ou não reticuladas) apresentaram o perfil de liberação semelhante no tempo em estudo. Assim, os testes demonstraram que os perfis de liberação do fármaco usando as matrizes poliméricas funcionaram como sistema de liberação prolongada no tempo de 60 minutos. Os resultados mostraram ainda uma possibilidade de prosseguir com os estudos usando outros agentes reticulantes e até mesmo outro tipo de fármaco modelo.

Palavras chave: blenda polimérica, membrana de casca do ovo, nimesulida, quitosana, sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

The membrane of the egg shell (ESM) is a biomaterial which has been increasingly studied by researchers, demonstrating the most diverse properties and use in many fields of science. Chitosan (CTS) has been widely used in the pharmaceutical industry as an example of the extended-release systems. The use of polymeric blends in extended-release systems has increased since it is economically viable and demonstrates a good performance for this purpose. The objective of this study is to prepare a polymer blend using ESM and CTS as biopolymer arrays. For that purpose, The blend ESM/CTS was prepared in three different proportions (1:3, 1:1, and 3:1), following the proposal of Tonhi with some modifications. After obtaining the blends, the drug Nimesulide was extracted and purified from an acid-base reaction and then characterized by the techniques: melting point (MP) and nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR). The Nimesulide was incorporated to blends and ESM. Subsequently, the materials (Blend/Nimesulide and MCO/Nimesulide) were submitted to the techniques of characterization. To do that, scanning electron microscopy coupled to the energy dispersive spectroscopy (SEM/DSC) and Fourier transformed infrared mass spectroscopy (FTIR) were used. Based on these techniques, it was possible to choose the blend aspect ratio 1:1, continuing with the same for the release test. A solution of Nimesulide (10 ppm) was prepared, in a basic medium (pH = 7.4), for the construction of the analytic curve. The analysis of that solution by UV-VIS spectroscopy revealed the maximum absorption at 400 nm. From the release tests conducted *in vitro* with pumping system coupled to a molecular absorption spectrophotometer Uv-visible at intervals of 60 minutes. From the study, it was possible to demonstrate that there is a possibility of using hens' egg shell membrane (ESM) and polymeric ESM/CTS in extended-release drug system. Obtaining promising results for its use in extended-release drug systems, which can contribute to the reduction of some drawbacks caused by medicinal products for immediate release the patients in treatment.

Keywords: Polymer blend, Egg shell membrane, Nimesulide, Chitosan, Drug delivery systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre as concentrações plasmáticas de um fármaco ao longo do tempo usando diferentes sistemas de liberação.....	25
Figura 2. Representação dos tipos de polímeros linear (a), ramificado (b) e reticulado (c).	26
Figura 3. Classificação dos copolímeros baseando-se na distribuição dos monômeros nas cadeias.....	27
Figura 4. Esquema de formação de uma blenda polimérica.....	27
Figura 5. Liberação de um fármaco de uma forma farmacêutica (FF) matricial do tipo monolítico.....	30
Figura 6. Liberação de um fármaco de uma forma farmacêutica (FF) matricial do tipo reservatório.....	30
Figura 7. Estrutura macroscópica da MCO junto à casca do ovo.....	32
Figura 8. Estrutura química da quitosana.....	33
Figura 9. Estrutura química da nimesulida.....	35
Figura 10. Representação do Espectro eletromagnético.	43
Figura 11. Representação das vibrações angulares.	45
Figura 12. Espectro no infravermelho da 4-hidroxi-4-metilpentanona.	45
Figura 13. Sistema em fluxo fechado montado para os ensaios de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes poliméricas sob estudo.....	49
Figura 14. Ovos antes da remoção da casca e após três dias imersos em solução aquosa de ácido acético.....	53
Figura 15. Membrana da casca do ovo.....	54
Figura 16. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da MCO <i>in natura</i>	55
Figura 17. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da QTS sólida <i>in natura</i> .	56
Figura 18. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO/QTS 1:3.....	57
Figura 19. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO/QTS 1:1.....	57
Figura 20. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO/QTS 3:1.....	59
Figura 21. Espectros de FTIR da MCO <i>in natura</i> (a) e QTS <i>in natura</i> (b).....	60

Figura 22. Espectros de FTIR das blendas MCO/QTS 3:1 (a), 1:1 (b) e 1:3 (c)...	62
Figura 23. Par ácido-base conjugado da nimesulida em meio aquoso.....	64
Figura 24. Fármaco nimesulida após purificação por cristalização.....	64
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H da nimesulida em CDCl ₃ em 400 MHz.....	65
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C da nimesulida em CDCl ₃ em 400 MHz.....	66
Figura 27. Espectro de absorção molecular do fármaco nimesulida.....	67
Figura 28. Imagem de MEV dos cristais de nimesulida extraída e purificada.....	68
Figura 29. Espectro de FTIR da nimesulida extraída e purificada.....	69
Figura 30. Curva de referência para a determinação espectrofotométrica de nimesulida.....	70
Figura 31. Espectros de FTIR da MCO/nimesulida (a) e blenda MCO/QTS/nimesulida (b).....	72
Figura 32. Aparência da MCO original sem nimesulida incorporada (a) e com nimesulida incorporada (b).....	73
Figura 33. Aparência da blenda MCO/QTS (1:1) original sem nimesulida incorporada (a) e com nimesulida incorporada (b).....	73
Figura 34. Aparência da MCO com nimesulida incorporada e reticulada (a) e blenda MCO/QTS (1:1) com nimesulida incorporada e reticulada (b).....	75
Figura 35. Perfil de liberação de nimesulida em meio tamponado básico (pH 7,4) a partir da MCO e da blenda MCO/QTS originais (sem reticular).....	76
Figura 36. Liberação cumulativa percentual de nimesulida em meio tamponado básico (pH 7,4) a partir da MCO e da blenda MCO/QTS originais (sem reticular).....	78
Figura 37. Perfil de liberação de nimesulida em meio tamponado básico (pH 7,4) a partir da MCO e da blenda MCO/QTS reticuladas.....	79
Figura 38. Liberação cumulativa percentual de nimesulida em meio tamponado básico (pH 7,4) a partir da MCO e da blenda MCO/QTS reticuladas.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções em massa na preparação das blendas.....	41
Tabela 2. Teor médio de nimesulida incorporada nas matrizes poliméricas sob estudo.....	75
Tabela 3. Parâmetros dos modelos cinéticos teóricos da liberação de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO/QTS originais e reticuladas.....	82

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Modelo dependente de ordem zero.....	37
Equação 2. Modelo dependente de primeira ordem.....	37
Equação 3. Modelo dependente de Higuchi.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS QUÍMICOS

AINE: Anti-inflamatório não esteroideal
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDCl₃: Clorofórmio deuterado
COX-2: Ciclo-oxigenase 2
DDS's: Drug Delivery Systems
EDS: Espectroscopia de Energia Dispersiva
Eq.: Equação
FF: Forma farmacêutica
ft: Quantidade de fármaco
FTIR: Infravermelho com Transformada de Fourier
GD: Grau de desacetilação
GlcN: 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopiranosose
GlcNAc: 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopiranosose
h: Hora
K₀: Constante de liberação de ordem zero
K₁: Constante de liberação de primeira-ordem
K_H: Constante de Higuchi
L: Litro
MCO: Membrana da casca do ovo de galinha
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
mg: Miligrama
mL: Mililitro
nm: Nanômetro
°C: Grau Celsius
°GL: Grau Gay Lussac
PF: Ponto de fusão
Q₀: Quantidade inicial de fármaco
Q_t: Quantidade de fármaco
QTS: Quitosana
R²: Coeficiente de determinação
RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SCB: sistema brasileiro de classificação biofarmaceutica

t: Tempo

$t^{1/2}$: Raiz quadrada do tempo decorrido no ensaio de liberação

UV-Vis: Ultravioleta visível

δ : Deslocamento químico

λ : Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1. Sistemas modificados de liberação de fármacos.....	22
3.1.1. Sistema de liberação prolongada.....	23
3.1.2. Sistema de liberação retardada.....	23
3.1.3. Sistema de liberação repetida.....	24
3.1.4. Sistema de liberação vetorizada.....	24
3.1.5. Sistema de liberação controlada.....	24
3.2. Polímeros.....	25
3.2.1. Aspectos gerais e blendas poliméricas.....	25
3.2.2. Polímeros em sistemas modificados de liberação de fármacos.....	28
3.3. Membrana da casca do ovo de galinha.....	31
3.4. Quitosana.....	33
3.5. Nimesulida.....	35
3.6. Modelos cinéticos de liberação de fármacos.....	36
3.6.1. Modelo dependente de ordem zero.....	37
3.6.2. Modelo dependente de primeira ordem.....	37
3.6.3. Modelo dependente de Higuchi.....	38
4. METODOLOGIAS	39
4.1. Reagentes e equipamentos.....	40
4.2. Obtenção da membrana da casca do ovo (MCO)	40
4.3. Preparação de blendas membrana da casca do ovo-quitosana(MCO-QTS).	41
4.4. Caracterização da MCO e das blendas MCO-QTS.....	42
4.5. Extração e purificação da nimesulida a partir de comprimidos.....	45
4.6. Caracterização da nimesulida extraída e purificada.....	46
4.7. Construção da curva analítica para a determinação da nimesulida.....	46
4.8. Incorporação da nimesulida nas matrizes poliméricas.....	47
4.9. Reticulação das matrizes poliméricas.....	47

4.10. Determinação do teor de nimesulida nas matrizes poliméricas.....	48
4.11. Montagem do sistema para os ensaios de liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas.....	49
4.12.. Ensaios de liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas.....	50
4.13. Aplicação de modelos teóricos para explicar os perfis de liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas.....	50
4.14. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Obtenção da membrana da casca do ovo.....	53
5.2. Preparação e caracterização das blendas poliméricas.....	54
5.3. Extração, purificação e caracterização da nimesulida a partir de comprimidos.....	63
5.4. Curva analítica para a determinação da nimesulida.....	69
5.5. Incorporação da nimesulida nas matrizes poliméricas.....	71
5.6. Teor da nimesulida nas matrizes poliméricas.....	74
5.7. Liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas.....	76
5.8. Aplicação de modelos teóricos aos resultados de liberação.....	81
6. CONCLUSÕES.....	83
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	85
8. REFERENCIAS.....	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Investimentos em inovação tecnológica na indústria farmacêutica são estratégias fundamentais de competitividade no setor, sendo inclusive um ponto vital para sua sobrevivência. Neste sentido, uma das estratégias mais comuns e rápidas de inovação no setor farmacêutico é o desenvolvimento de novas apresentações farmacêuticas, as quais são geralmente mais eficazes e/ou potentes, ou estão disponíveis numa forma mais fácil e segura de administração, ou apresentam um mínimo de efeitos adversos e/ou colaterais, ou ainda que possam atuar como sistemas modificados de liberação de fármacos (VIEIRA; OHAYON, 2006).

A maioria das formulações farmacêuticas (comprimidos, cápsulas, drágeas etc.) fundamenta-se em sistemas de liberação imediata de fármacos, ou seja, medicamentos que, após serem administrados por via oral, por exemplo, disponibilizam dentro de alguns minutos toda a dose ingerida do fármaco para ser prontamente absorvida pelo organismo. Este processo termina resultando, muitas vezes, na necessidade de administração repetida do medicamento ao longo de um mesmo dia, fato que é bastante inconveniente, principalmente para aquelas pessoas que fazem uso de vários medicamentos ao longo do dia (ANSEL, 2013).

A forma de administração do medicamento no paciente influencia diretamente nos níveis plasmáticos do fármaco no sítio alvo. Uma dose alta do medicamento pode provocar flutuações consideráveis no nível plasmático do fármaco, fato que pode levar à intoxicação do paciente. Por outro lado, uma dose muito baixa pode fazer com que os níveis plasmáticos não atinjam a concentração mínima terapêutica e os resultados do tratamento não sejam satisfatórios. Portanto, o ideal é que a concentração de fármaco seja constante no sítio de ação durante todo o tratamento, condição esta que muitas vezes se torna difícil de ser alcançada usando os sistemas de liberação de fármacos convencionais (SALAZAR, 2015).

Uma alternativa eficiente para reduzir as flutuações dos níveis plasmáticos de um fármaco reduzindo o número de administrações de um dado medicamento por dia é fazer uso de formulações que atuem como sistemas modificados de liberação. No final da década de 60, sistemas modificados de liberação de fármacos foram desenvolvidos usando matrizes de natureza polimérica, onde o fármaco encontra-se molecularmente disperso de forma irregular, sendo que tais misturas atuam como carreadores do fármaco, aumentando a estabilidade química e mantendo as

concentrações terapêuticas do fármaco ao liberar o fármaco de forma não imediata (ALVES et al., 2012). Atualmente, os sistemas modificados de liberação de fármacos já são uma realidade comum, sendo possível encontrar no mercado vários medicamentos disponíveis que empregam este tipo de formulação.

Desta forma, a busca por formulações inovadoras capazes de tornarem a indústria farmacêutica mais competitiva, tem direcionado o foco de muitas pesquisas da área de tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento e/ou aprimoramento de novos sistemas modificados de liberação de fármacos (SRIVASTAVA; MATTIASSON, 2007).

Assim, considerando esta importante área, a preparação de novos sistemas poliméricos biocompatíveis e capazes de serem aplicados como matrizes de incorporação e liberação de fármacos vêm ganhando amplo destaque no meio científico, devido às variadas possibilidades de avanços na terapêutica medicamentosa de muitas enfermidades.

Estudos previamente realizados no Laboratório de Química Analítica da UNIVASF (Campus Petrolina Centro) mostraram que a membrana da casca do ovo de galinha (MCO), um material de natureza proteica, e a quitosana (QTS), um biomaterial de natureza polissacarídica, são polímeros biocompatíveis capazes de formarem blendas poliméricas por interações eletrostáticas. Desta forma, e considerando que após uma vasta pesquisa na literatura não foram encontrados trabalhos relacionados com blendas de MCO-QTS, este trabalho visou a preparação, caracterização e estudo deste tipo de biomaterial para atuar como uma matriz polimérica alternativa para incorporação e liberação do fármaco nimesulida, uma droga anti-inflamatória adotada como molécula modelo neste trabalho.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Preparar uma blenda a partir da membrana da casca do ovo de galinha (MCO) e da quitosana (QTS) e avaliar esse biomaterial como uma possível matriz polimérica de liberação modificada do fármaco nimesulida.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar a membrana da casca do ovo de galinha (MCO).
- Preparar blendas de membrana da casca do ovo-quitosana (MCO-QTS) e caracterizá-las por técnicas instrumentais;
- Realizar estudos de incorporação do fármaco nimesulida na MCO e na blenda MCO-QTS;
- Realizar estudos de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes de MCO e da blenda MCO-QTS com o fármaco.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Sistemas modificados de liberação de fármacos

Uma grande parte dos medicamentos disponíveis no comércio são formulados de maneira convencional, usando sistemas de liberação imediata de fármacos. Estes sistemas são preparados contendo diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que assegurem que o fármaco presente na formulação seja liberado e dissolvido rapidamente após sua administração (PEZZINI et al., 2007). Muitas destas formas farmacêuticas precisam ser administradas no paciente enfermo, geralmente três ou quatro vezes ao dia para manter os níveis plasmáticos adequados, e o efeito terapêutico necessário. Assim, a necessidade da administração de várias doses ao dia, além de ser inconveniente, torna-se incômodo para muitos pacientes o fato de ter que lembrar de cada dose ao longo das 24 h, e pode gerar quadros clínicos de subdosagem ou superdosagem. Esses empecilhos podem levar o paciente à desistência ou não adesão ao tratamento (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Para contornar o problema da administração de um medicamento repetidas vezes ao dia, a indústria farmacêutica, no final da década de 1940 e início da década de 1950, começou a lançar no mercado uma nova classe de formas farmacêuticas, os medicamentos de liberação prolongada. Estes sistemas modificados de liberação disponibilizam o fármaco para absorção por um período de tempo mais prolongado do que a partir de uma forma farmacêutica convencional, a qual libera imediatamente seu princípio ativo após entrar em contato com o fluido biológico do estômago e intestino. Desta maneira, um medicamento disponibilizado com essa tecnologia pode ser administrado uma ou, no máximo, duas vezes ao dia, devendo inclusive manter os níveis plasmáticos adequados e o efeito terapêutico necessário (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Os sistemas modificados de liberação atuam como carreadores de fármacos, os quais “aprimoram” os ativos em seu interior, sempre visando melhorar parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, assim como, reduzir efeitos toxicológicos. Os primeiros estudos realizados para obtenção de sistemas carreadores eficazes tiveram como base o encapsulamento de moléculas, contudo, atualmente existem diversos sistemas carreadores disponíveis, tais como: lipossomas e aquossomas, micelas, micro e nanocápsulas, micro e nanoesferas, complexos de inclusão (ciclodextrinas),

dendrimeros etc. Cabe salientar que não existe um sistema de liberação ideal, já que cada fármaco poderá requerer um sistema carreador distinto em razão de fatores como concentração do ativo na formulação, natureza hidrofílica ou lipofílica do ativo, pH do meio de liberação, via de administração etc. (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

A comunidade internacional denomina abreviadamente os sistemas modificados de liberação de fármacos de DDS's, uma sigla oriunda da expressão inglesa "Drug Delivery Systems". De maneira geral, os DDS's podem ser classificados em: i) sistema de liberação prolongada, ii) sistema de liberação retardada, iii) sistema de liberação repetida, iv) sistema de liberação vetorizada e v) sistema de liberação controlada (ANSEL, 2013). Nos tópicos a seguir, serão descritas as diferenças entre os tipos de sistemas modificados de liberação considerando apenas formas farmacêuticas para administração por via oral, uma vez que esta é a rota mais popular para uso de medicamentos.

3.1.1. Sistema de liberação prolongada

A forma farmacêutica de liberação prolongada é concebida para liberar o fármaco gradualmente, mantendo-se a concentração plasmática em níveis terapêuticos, por um período de tempo prolongado, requerendo administrações menos frequentes se comparadas às convencionais, e reduzindo bastante as oscilações na concentração sanguínea do fármaco. Este tipo de sistema modificado de liberação é bastante comum, já que seu desenvolvimento envolve processos mais simples de preparação. Além disso, adaptações neste tipo de sistema visando atender a características mais específicas de alguns fármacos e determinados procedimentos terapêuticos muitas vezes podem ser concretizadas (PEZZINI et al., 2007).

3.1.2. Sistema de liberação retardada

A forma farmacêutica de liberação retardada é desenvolvida para liberar o fármaco em um tempo diferente daquele imediatamente após sua administração. Assim, neste tipo de sistema, o retardo na liberação pode ser determinado pelo tempo

ou pela influência das condições do meio, tal como o pH do trato estomacal ou intestinal (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

3.1.3. Sistema de liberação repetida

As formas farmacêuticas de ação repetida, em geral, contêm duas doses do medicamento: a primeira para a liberação imediata; e a segunda para a liberação retardada. Um comprimido de duas camadas, por exemplo, pode atuar como um sistema deste tipo, desde que seja preparado de modo que o fármaco contido na primeira camada comece a ser liberado imediatamente após a administração oral, enquanto que aquele presente na segunda camada seja liberado como uma segunda dose ou de maneira prolongada (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

3.1.4. Sistema de liberação vetorizada

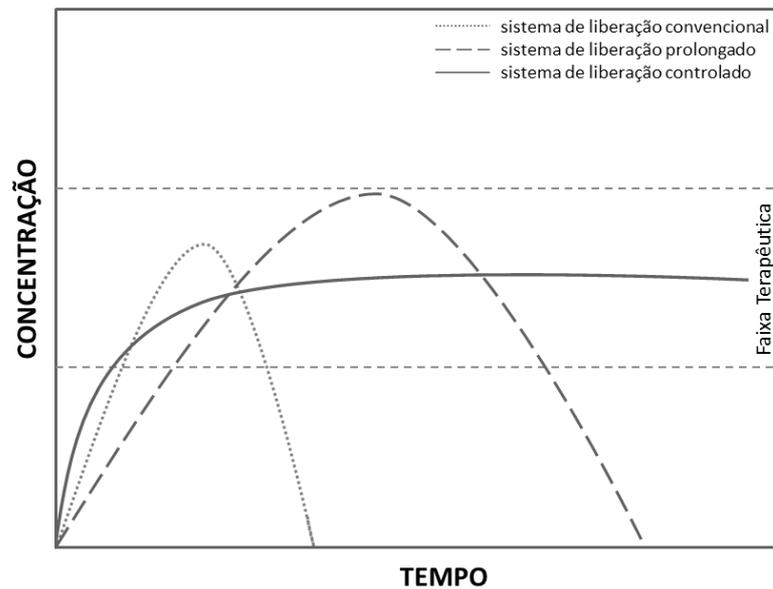
A liberação vetorizada descreve a liberação do fármaco de maneira dirigida ou concentrada em uma região do corpo, um tecido ou um sítio de absorção ou ação. Pode-se citar como exemplo um medicamento deste tipo contendo um pró-fármaco que precisa ser hidrolisado por enzimas produzidas pela flora bacteriana do intestino delgado para, só então, produzir o fármaco ativo que exercerá seu efeito majoritariamente no próprio local de sua liberação (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

3.1.5. Sistema de liberação controlada

A forma farmacêutica de liberação controlada é desenvolvida para liberar o fármaco de maneira definida, controlada e reprodutível, de forma a eliminar o surgimento de picos plasmáticos, e proporcionar uma absorção mais lenta e constante do fármaco pelo organismo (NICOLETTI; FRASSON, 2006). Em um sistema deste tipo, a concentração plasmática do fármaco tende a ficar constante por um período de tempo maior, sendo resultado de um equilíbrio bem estabelecido entre as etapas

sucessivas de administração, liberação, absorção, metabolização e excreção do fármaco no organismo. É, portanto, um sistema modificado de liberação de alta complexidade. A Figura 1 mostra um esquema comparativo de sistemas de liberação do tipo convencional, prolongado e controlado.

Figura 1. Comparação entre as concentrações plasmáticas de um fármaco ao longo do tempo usando diferentes sistemas de liberação.



Fonte: Autoria própria, 2017.

3.2. Polímeros

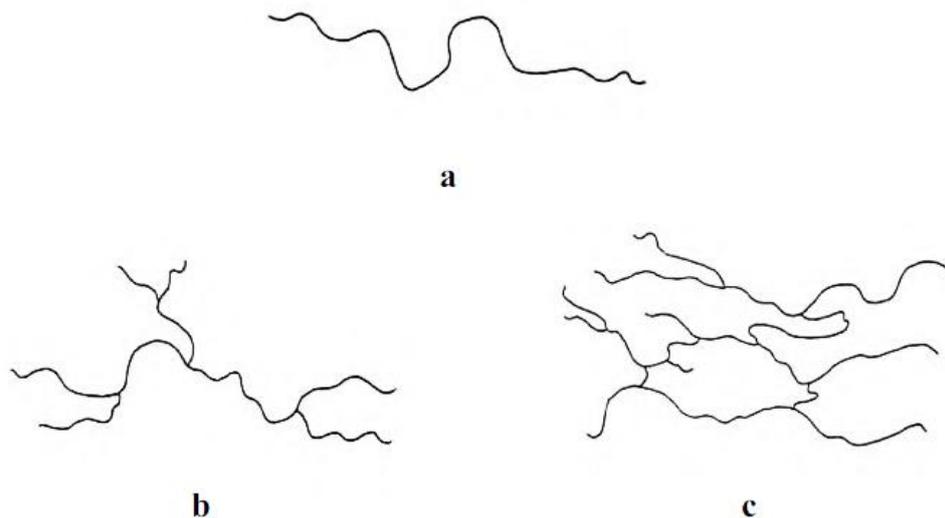
3.2.1. Aspectos gerais e blendas poliméricas

O termo polímero veio a ser utilizado a partir de 1922, quando Staudinger propôs a teoria da macromolécula. Trata-se de uma classe de materiais cujos compostos apresentam uma característica em comum, a elevada massa molar proveniente da repetição de unidades menores ligadas covalentemente entre si, denominadas de monômeros (NUNES; LOPES, 2014).

Polímeros formados por monômeros iguais são denominados de homopolímeros, já os que são formados por monômeros diferentes são os copolímeros (NUNES; LOPES, 2014).

Os polímeros podem ter origem natural, semissintética ou sintética, sendo classificados de diversas maneiras, de acordo com diferentes critérios. De maneira geral, os polímeros se classificam, de acordo com a arquitetura da cadeia polimérica, em: lineares, ramificados e reticulados como mostra a figura 2.

Figura 2. Representação dos tipos de polímeros linear (a), ramificado (b) e reticulado (c).



Fonte: MALCOLM, 1999 apud ANJOS, 2006.

Já os copolímeros se classificam, de acordo com a distribuição dos monômeros dentro das cadeias, em: alternados, aleatórios, blocados e enxertados. Quanto ao comportamento de fusão, os polímeros se classificam em: termoplásticos e termofixos. Já quanto ao comportamento mecânico, os polímeros são classificados em plásticos, elastômeros e fibras (NUNES; LOPES, 2014). De maneira geral, as propriedades dos polímeros estão diretamente relacionadas com a natureza química dos monômeros, o peso molecular e a estrutura macromolecular da matriz. Em razão disto, combinações de polímeros tem sido propostos na tentativa de adequar as propriedades físico-químicas de uma matriz polimérica a uma determinada aplicação (ALVES, 2012). A Figura 3 mostra um esquema que auxilia a compreender a classificação dos copolímeros baseando-se na distribuição dos monômeros nas cadeias.

Em geral, as blendas poliméricas podem ser classificadas em blendas homogêneas e heterogêneas. Nas blendas homogêneas, as cadeias macromoleculares distintas dos polímeros combinados se misturam a nível molecular, produzindo um material que se apresenta como uma fase única. Nas blendas heterogêneas, os polímeros combinados são imiscíveis entre si, porém, forças intermoleculares atuam para manter a estrutura da blenda, a qual mostra fases distintas (PARAMESWARANPILLAI; THOMAS; GROHENS, 2015).

A produção de blendas é uma alternativa economicamente mais acessível para promover a obtenção de polímeros com propriedades diferentes dos materiais de partida sem haver a necessidade de investir em novos processos de polimerização. A produção de novos monômeros, bem como, processos de polimerização e equipamentos para se produzir um novo polímero, teria um custo mais elevado do que o necessário para o desenvolvimento de uma blenda. Esse fato torna esse material extremamente atrativo para a indústria (DE PAOLI, 2008).

A formação de uma blenda pode produzir melhorias de propriedades físicas, físico-químicas e de processamento do novo material. Em muitas situações, a síntese de novos materiais poliméricos pode ser inviável devido a algumas propriedades dos polímeros, tal como a degradação a temperaturas abaixo de 0 °C. Desta forma, a produção de uma blenda polimérica pode contornar esse tipo de problema (TONHI; PEPLIS, 2002).

3.2.2. Polímeros em sistemas modificados de liberação de fármacos

Nos últimos 50 anos, a indústria farmacêutica vem usando a estratégia da incorporação de substâncias bioativas em matrizes poliméricas visando obter formulações com características inovadoras (LIECHTY et al., 2010). Desde o século passado várias formulações baseadas em sistemas matriciais ou reservatórios foram desenvolvidas e investigadas para atuarem como sistemas modificados de liberação de fármacos (BRUSCHI et al., 2006).

A utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos tipos de polímeros é o procedimento mais empregado quando o objetivo é o desenvolvimento de uma formulação baseada em um sistema modificado de liberação de fármaco para

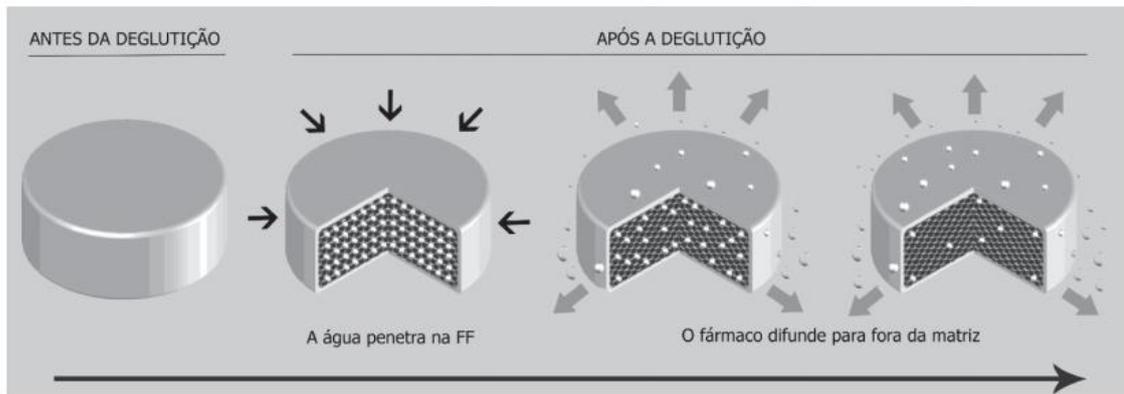
administração por via oral. Este fato deve-se às vantagens inerentes destes sistemas, tais como: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção associada ao uso de equipamentos e técnicas convencionais (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; LYRA et al., 2007).

Os sistemas matriciais monolíticos são dispersões de um fármaco, em uma ou mais substâncias, capazes de modular a liberação do fármaco, sendo geralmente polímeros de natureza hidrofílica, hidrofóbica, biodegradável ou inerte (insolúvel). Tais sistemas podem ser elaborados sob as formas de comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos e péletes (PEZZINI et al., 2007; LYRA et al., 2007).

Os processos de erosão, difusão e intumescimento são os mecanismos que proporcionam a liberação de um fármaco aprisionado em uma matriz polimérica. Em muitos casos, não existe um mecanismo majoritário responsável pela liberação do fármaco do sistema, assim, a liberação pode ser decorrente de um dos processos isoladamente ou, da combinação dos vários mecanismos possíveis, os quais iniciam logo após as matrizes entrarem em contato com o meio de dissolução (ou fluido biológico) (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

No processo de erosão, ocorre uma dissolução gradual da matriz polimérica pelo fluido do meio e, concomitantemente, o fármaco aprisionado em seu interior escapa do sistema por dissolução ou dispersão na fase fluida. No mecanismo de difusão, o fármaco aprisionado na matriz polimérica sofre inicialmente dissolução no fluido do meio que permeia o interior do sistema e, posteriormente, difusão por entre as cadeias poliméricas e poros que formam a estrutura da matriz, até alcançar o exterior do sistema. No processo de intumescimento, a matriz polimérica tem caráter hidrofílico e, desta forma, começa a sofrer solvatação pelo fluido do meio. Este processo origina um sistema gelatinoso, onde as cadeias poliméricas estão afastadas entre si, produzindo grandes poros que facilitam a saída do fármaco aprisionado em seu interior por dissolução ou dispersão na fase fluida (PEZZINI et al., 2007). A Figura 5 ilustra a liberação de um fármaco incorporado em um sistema matricial monolítico.

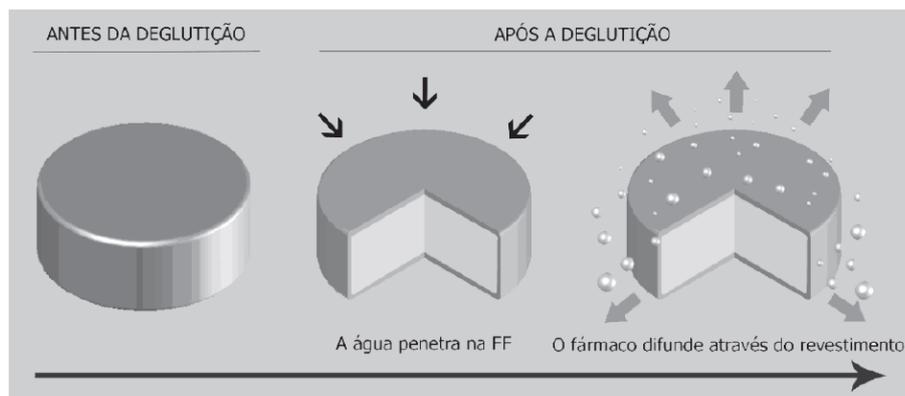
Figura 5. Liberação de um fármaco de uma forma farmacêutica matricial do tipo monolítico.



Fonte: PEZZINI et al., 2007.

Os sistemas matriciais do tipo reservatório são constituídos por um núcleo contendo o fármaco no estado sólido ou líquido, revestido por uma membrana ou parede permeável de natureza polimérica. Nestes sistemas, o fármaco é liberado por difusão através da membrana de revestimento, a qual pode ser microporosa ou não apresentar poros. Já o núcleo que contém o fármaco pode ser um comprimido ou minicomprimido, um grânulo ou um pélete (BRUSCHI et al., 2006; PEZZINI et al., 2007; LYRA et al., 2007). A Figura 6 ilustra a liberação de um fármaco a partir de um sistema matricial reservatório.

Figura 6. Liberação de um fármaco de uma forma farmacêutica matricial do tipo reservatório.



Fonte: PEZZINI et al., 2007.

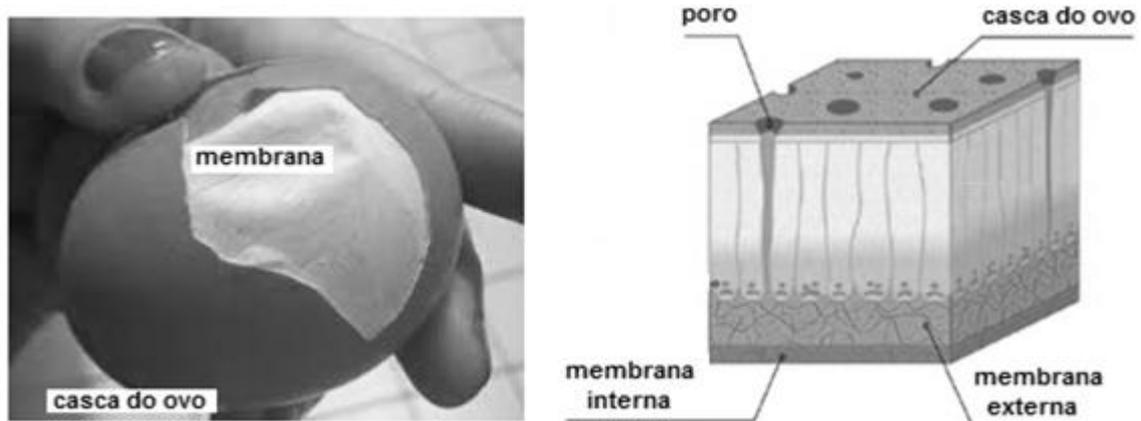
O requisito fundamental para que um determinado material polimérico possa ser utilizado como uma matriz em um sistema modificado de liberação de fármaco é que o mesmo, assim como seus produtos de degradação, caso existam, não sejam tóxicos, e que apresentem uma boa biocompatibilidade com os tecidos do organismo os quais terão contato direto. Também é recomendável que tais agentes poliméricos devam ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e não provoquem qualquer resposta inflamatória. Diante disto, os polímeros naturais vêm recebendo grande atenção no ramo de biomateriais, pois suas similaridades estruturais com as macromoléculas biológicas os tornam facilmente reconhecidos pelo organismo, além de serem metabolizados a resíduos atóxicos e naturalmente eliminados (SILVA et al., 2016; BIZERRA; SILVA, 2016).

Os polímeros usados como matrizes em sistemas modificados de liberação de fármacos podem ter origem natural, semissintética ou sintética. Dentre os polímeros naturais já estudados como matrizes citam-se: amido, celulose, quitina, quitosana, alginato, goma xantana, ciclodextrinas etc. Dentre os semissintéticos, citam-se: hipromelose, carboximetilcelulose, acetato de celulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose etc. E, dentre os polímeros sintéticos citam-se: polióxido de etileno, copolímeros de metilmetacrilato e etilacrilato, poliuretano, cloreto de polivinila etc. (PEZZINI et al., 2007).

3.3. Membrana da casca do ovo de galinha

A membrana da casca do ovo (MCO) é uma parte do ovo que contém alguns nutrientes essenciais (WU et al., 2004), Sendo constituída principalmente de proteínas e ficando localizada entre a casca e a clara do ovo. O componente primário da MCO é o colágeno (tipos I, V e X), com componentes secundários como osteopoetina, queratina, proteoglicanos e glicoproteínas (NAKANO; IKAWA; OZIMEK, 2003). A Figura 7 mostra a estrutura macroscópica da MCO junto à casca do ovo.

Figura 7. Estrutura macroscópica da MCO junto à casca do ovo.



Fonte: Adaptado de HINCKE et al. (2012) e LEE et al. (2009).

Existem muitas propriedades associadas com a MCO, tais como: alta porosidade, propriedade antibacteriana e anti-inflamatória. Além disso, a MCO é um material que apresenta majoritariamente cargas negativas em sua superfície, as quais são resultantes da ionização de grupos ácidos carboxílicos dos aminoácidos que a constituem (PUNDIR; BHAMBI; CHAUHAN, 2009). A MCO já foi amplamente estudada devido às suas diversas propriedades, como por exemplo a presença de substâncias como o sulfato de queratana e dermatana, que são glicosaminoglicanos usados na produção de queratina e quitina, e também o ácido siálico, que também possui propriedades terapêuticas e pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos (BORON, 2004). A análise morfológica da MCO feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que a membrana da casca do ovo de galinha é uma estrutura bastante fibrosa e porosa, fato que a torna semipermeável à água. A MCO também é bastante insolúvel em água e apresenta uma área superficial bem elevada (BALÁŽ, 2014).

A MCO, em conjunto com a casca do ovo, forma um biomaterial que durante anos foi tratado como resíduo, sem grandes expectativas de aplicações em quaisquer ramos da ciência (AHMAD; KUMAR; HASEEB, 2012). Com passar dos anos, a comunidade científica tem feito progressos significativos ao estudar este biomaterial, fato que levou a uma variedade de aplicações, tais como suplementos nutracêuticos, biorremediação, processos adsorptivos e terapêutica de feridas e queimaduras (PUNDIR; BHAMBI; CHAUHAN, 2009; BALÁŽ, 2014).

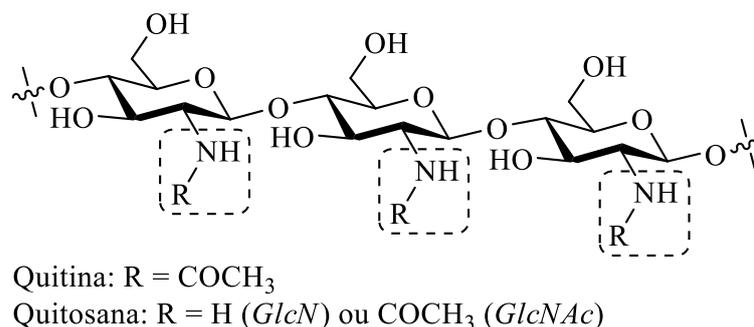
Em estudo realizado por Ray e Roy (2016), sobre a estrutura morfológica da MCO, foi visto que as características da MCO possibilitam que esta membrana seja usada como uma nova plataforma para imobilização de biomoléculas, o que pode ser de grande aplicabilidade em estudos de incorporação/liberação de fármacos.

3.4. Quitosana

A quitosana (QTS) é um heteropolissacarídeo preparado a partir da reação de N-desacetilação da quitina, presente nas carapaças de crustáceos, no exoesqueleto de insetos e nas paredes celulares de alguns fungos. A quitosana é um dos biopolímeros mais abundantes depois da celulose (GUIBAL, 2004).

Quimicamente, a quitosana (Figura 8) se apresenta na forma de um copolímero composto por unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), porém, com a unidade de glicosamina (GlcN) sempre em maior proporção (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Figura 8. Estrutura química da quitosana.



Fonte: GONSALVES et al. (2011).

Na obtenção da quitosana via *N*-desacetilação da quitina, o grau de desacetilação (GD) da quitina é necessário para identificar a conversão da mesma em quitosana. Quando o grau de desacetilação da quitina chega aos 60% já é possível dizer que a quitina se converteu em quitosana e, desta maneira, quanto maior o grau de desacetilação melhor será a qualidade da quitosana, além disso, quando esse GD atinge valores iguais ou superiores a 60% o biopolímero torna-se solúvel em soluções

ácidas diluídas. No processo de desacetilação, os grupos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) das unidades de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) remanescentes da quitina são convertidos em grupos aminos ($-\text{NH}_2$), em taxas variadas, para originar o heteropolissacarídeo contendo unidades de *N*-glicosamina (GlcN) (GONSALVES et al., 2011).

A quitosana atua como uma base fraca, apresentando pKa dos grupos aminos nas unidades de GlcN variando entre 6,3 e 7,2, o qual é influenciado pelo GD e pela densidade de carga (VAN-KREVELEN, 2009; PIVSA-ART et al, 2013). Assim, o valor do pKa tende a diminuir com o aumento do GD e, como consequência, alguns processos de reticulação tendem a alterar levemente o valor da constante de acidez (LIU et al, 2013).

Em meio ácido, como em soluções de ácido acético, a quitosana torna-se solúvel em razão da protonação dos grupos aminos ($-\text{NH}_3^+$) e a presença de grupos hidroxila, fato que leva a este biomaterial apresentar majoritariamente cargas positivas (caráter policatiónico) em sua superfície. A alta hidrofiliçidade da quitosana, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais etc. (TONHI; PEPLIS, 2002).

Uma característica singular da quitosana reside no fato desse heteropolissacarídeo apresentar, dentre todos os biopolímeros naturais, o maior caráter catiónico, uma vez que a maioria dos polissacarídeos animais ou vegetais apresenta caráter neutro (celulose, dextrana, amido) ou aniônico (alginato, carragenina, xantana) (BRADY; DÜRIG; SHANG, 2009; VAN-KREVELEN, 2009).

Cada vez mais o número de publicações vem aumentando acerca do uso da quitosana pura, na forma de compósito, ou ainda na composição de blendas poliméricas, principalmente na área de engenharia de tecidos, sistemas de liberação de fármacos e biossensores para diagnósticos clínicos (PRABAHARAN, 2008). Este interesse na pesquisa deve-se ao fato da quitosana não ser tóxica e apresentar boa biocompatibilidade e biodegradabilidade (KIM et al, 2001).

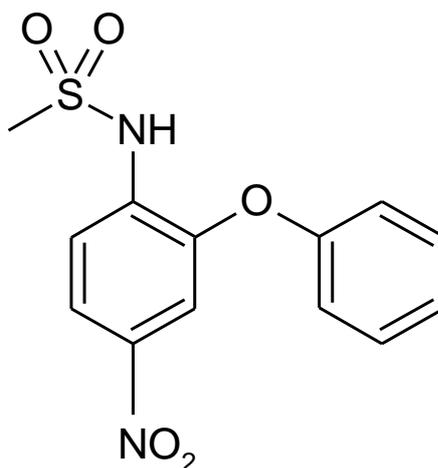
Em razão de suas características, a quitosana foi escolhida como o segundo biopolímero (o polímero com carga superficial positiva) para a formação da blenda proposta neste trabalho.

3.5. Nimesulida

A nimesulida é um anti-inflamatório não esteroideal (AINE), com efeito analgésico, antitérmico e anti-inflamatório, e atua como um inibidor da síntese de prostaglandinas relacionadas à inflamação com seletividade preferencial para COX-2 (GONSALVES et al., 2011; AUGUSTO, 2015).

A nimesulida (Figura 9) possui nome científico *N*-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanossulfonamida, apresentando-se como um pó cristalino de coloração amarelo pálido, sendo praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol e metanol, muito solúvel em acetona, clorofórmio, acetonitrila e dimetilformamida, solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos e insolúvel em soluções ácidas (LEVAL et al., 2000). Do ponto de vista químico, a nimesulida apresenta uma baixa acidez ($pK_a = 6,9$), sendo a presença do grupo metanossulfonamida (doador de próton) o responsável por sua ionização. (RABASSEDA, 1997).

Figura 8. Estrutura química da nimesulida.



Fonte: autoria própria, 2017.

O sistema brasileiro de classificação biofarmacêutica (SCB) coloca a nimesulida como um fármaco de classe II, fato que o caracteriza como de baixa solubilidade e alta permeabilidade (AUGUSTO, 2015). A literatura relata que fármacos com características de baixa hidrossolubilidade e/ou tempo de meia vida biológica curto são candidatos ideais para a incorporação em sistemas modificados de liberação de ativos (BARBOZA, 2010). Desta forma, esta característica da nimesulida levou à

escolha deste fármaco para atuar como molécula modelo nos estudos de incorporação e liberação de fármaco usando os biopolímeros de interesse neste trabalho como sistemas matriciais.

3.6. Modelos cinéticos de liberação de fármacos

O perfil de liberação de um fármaco a partir de uma matriz polimérica é variável e dependente de diversos fatores, dentre os quais, os principais são: a natureza do fármaco, a taxa de degradação do polímero, a permeabilidade da água na matriz, as interações fármaco-polímero e os processos de difusão, erosão e intumescimento (MOURA, 2010).

Os ensaios de dissolução, usados para formas farmacêuticas de liberação imediata, e os ensaios de liberação *in vitro*, usados para formas farmacêuticas de liberação modificada, são os procedimentos experimentais de avaliação da liberação de um fármaco contido em formulações para uso oral. Nestes ensaios, diferentes procedimentos, aparatos e técnicas podem ser usados. A Farmacopeia Americana (USP) discrimina 7 aparatos para estudos de dissolução/liberação *in vitro*, sendo eles: i) cesta rotatória (aparato 1); ii) pá agitadora (aparato 2); iii) cilindros recíprocos (aparato 3); iv) célula de fluxo contínuo (aparato 4); v) pá sobre disco (aparato 5); vi) cilindro rotatório (aparato 6); e iv) disco recíproco (aparato 7) (MOURA, 2010).

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos em processos de liberação de fármacos, alguns modelos cinéticos teóricos que representam a liberação de ativos a partir de matrizes e em meios líquidos de liberação (fluidos estomacal e intestinal simulados) podem ser usados para prever o comportamento mais próximo daquele que seria observado em ensaios de biodisponibilidade *in vivo* (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; SALAZAR, 2015).

Dentre os vários modelos cinéticos teóricos de previsão, os mais aplicados em publicações científicas que versam sobre sistemas modificados de liberação de fármacos são os modelos dependentes de ordem zero, o de primeira ordem e o de Higuchi.

3.6.1. Modelo dependente de ordem zero

Este modelo descreve a liberação lenta de um fármaco a partir de formas farmacêuticas que não sofrem degradação no meio, assumindo que a área da matriz não muda e que é estabelecida uma condição de equilíbrio em um dado momento do ensaio de liberação. Este modelo se adequa muitas vezes ao perfil de liberação de sistemas modificados dos tipos prolongado e controlado, uma vez que se assume que é constante a quantidade liberada do ativo por unidade de tempo. A função expressa na Equação 1 descreve este modelo (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RODRIGUES; SILVA, 2005).

$$1 - (Q_t/Q_0) = K_0.t \quad \text{Eq. 1}$$

Na Equação 1, Q_t refere-se à quantidade de fármaco dissolvido no meio (em mg) no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco (em mg) presente na forma farmacêutica; K_0 é a constante de liberação de ordem zero; e t o tempo decorrido no ensaio de liberação. Portanto, um gráfico de $1 - (Q_t/Q_0)$ em função de t produz uma reta cujo coeficiente angular é K_0 e coeficiente linear deve ser idealmente nulo.

3.6.2. Modelo dependente de primeira ordem

Este modelo descreve que a velocidade de dissolução de um fármaco em um meio líquido depende da relação entre a quantidade dissolvida do fármaco e a quantidade remanescente deste na matriz. Assim, as formas farmacêuticas que seguem este modelo liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade remanescente deste em seu interior, resultando que a quantidade de fármaco liberado vai diminuindo ao longo do tempo. Nesta aplicação teórica, considera-se que a forma farmacêutica possui uma área constante, sendo constituída de matrizes porosas contendo fármacos hidrofílicos incorporados. A função linearizada de Noyes-Whitney descreve este modelo, sendo expressa pela Equação 2 (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RODRIGUES; SILVA, 2005).

$$\log Q_t = \log Q_0 + (K_1/2,303).t \quad \text{Eq. 2}$$

Na Equação 2, Q_t refere-se à quantidade de fármaco (em mg) na forma farmacêutica no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco (em mg) na forma farmacêutica; K_1 é a constante de liberação de primeira-ordem; e t o tempo decorrido no ensaio de liberação. Portanto, um gráfico de $\log Q_t$ em função de t produz uma reta cujo coeficiente angular é $K_1/2,303$ e coeficiente linear é $\log Q_0$.

3.6.3. Modelo dependente de Higuchi

Este modelo descreve o perfil de liberação de fármacos hidrossolúveis ou pouco solúveis incorporados em matrizes planares heterogêneas semi-sólidas e sólidas. Nesta condição, a concentração do fármaco na matriz será inferior à sua solubilidade e sua liberação ocorrerá por entre os poros do material. Na aplicação deste modelo, considera-se também que os sistemas matriciais não sofrem alterações estruturais significativas na presença de água. Assim, o perfil de liberação é descrito como um processo de difusão baseado na lei de Fick, a qual considera que o fluxo de difusão de um soluto será proporcional ao gradiente de concentração existente entre dois lados de uma interface. A função simplificada de Higuchi pode descrever este modelo, sendo expressa pela Equação 3 (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RODRIGUES; SILVA, 2005).

$$f_t = K_H \cdot t^{1/2} \quad \text{Eq. 3}$$

Na Equação 3, f_t refere-se à quantidade de fármaco dissolvido no meio (em mg) no tempo t ; K_H a constante de Higuchi; e $t^{1/2}$ a raiz quadrada do tempo decorrido no ensaio de liberação. Portanto, um gráfico de f_t em função de $t^{1/2}$ produz uma reta cujo coeficiente angular é K_H e o coeficiente linear deve ser idealmente nulo.

METODOLOGIAS

4. METODOLOGIAS

4.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes usados neste trabalho seguem listados a seguir.

- Ácido acético glacial (Proquímios®);
- Ácido clorídrico (Dinâmica®);
- Tampão fosfato (pH = 7,4);
- Hidróxido de sódio (Proquímios®);
- Acetona (Proquímios®);
- Álcool 92° G.L (Jopeso®);
- Comprimidos de nimesulida (EMS®);
- Polissorbato 80;
- Cloreto de cálcio dihidratdo ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica®);
- Metanol (Isofar®).

Os equipamentos usados neste trabalho seguem listados a seguir.

- Espectrofotômetro UV-Vis, modelo NI-1600 UV (Nova Instruments®);
- Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Vega 3 (Tescan®).

4.2. Obtenção da membrana da casca do ovo (MCO)

A obtenção da MCO foi realizada através de processo químico. Neste procedimento foram usados 30 ovos brancos inteiros, classificados como grandes, oriundos de galinhas poedeiras da linhagem lohmann LSL – clássica de raça local e adquiridos no comércio local. Os ovos foram imersos em uma solução aquosa de ácido acético a 10,0 % (v/v) por três dias. Passado este tempo, os ovos túrgidos foram removidos da solução, lavados em água corrente e estourados, sendo seus conteúdos internos descartados, e as membranas novamente lavadas em água corrente e

reservadas. Em seguida, as membranas foram imersas em água deionizada por 24 h e, passado este período, foram filtradas em usando peneira e novamente imersas em etanol comercial 92,8 °GL. Logo em seguida, as membranas foram trituradas no meio etanólico com auxílio de liquidificador doméstico e filtradas. As membranas particuladas e retidas no papel de filtro foram colocadas para secar por 48 h à temperatura do laboratório.

4.3. Preparação de blendas membrana da casca do ovo-quitosana (MCO-QTS)

A preparação das blendas seguiu a metodologia de Tonhi e Peplis (2002) com algumas modificações. Foram preparadas blendas de MCO-QTS nas proporções em massa de 3:1, 1:1 e 1:3, visando avaliar aspectos de morfologia para estudos posteriores de incorporação e liberação do fármaco nimesulida.

Na preparação das blendas a massa de QTS foi inicialmente dissolvida em 20,0 mL de uma solução aquosa de ácido acético 0,10 mol/L sob agitação vigorosa durante 1 h. Em seguida, foi adicionada lentamente a massa de MCO sobre a solução de QTS. A mistura resultante permaneceu sob agitação por 2 h. Passado este tempo, adicionou-se lentamente e sob gotejamento 10,0 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,25 mol/L. Após este procedimento, as blendas foram submetidas a uma filtração simples, seguida de uma lavagem com água deionizada em abundância, e postas para secar à temperatura ambiente (27 ± 3 °C) por 48 h. Por fim, as blendas foram trituradas com almofariz e pistilo, e posteriormente tamizadas (peneira 18 Mesh e 1,0 mm) para obter a forma de flocos médios. A massa obtida foi pesada em balança analítica. A Tabela 1 mostra as proporções em massa na preparação das blendas.

Tabela 1. Proporções em massa na preparação das blendas.

Blenda	Massa de MCO (g)	Massa de QTS (g)
MCO-QTS 1:3	0,25	0,75
MCO-QTS 1:1	0,50	0,50
MCO-QTS 3:1	0,75	0,25

Fonte: Autoria própria.

4.4. Caracterização da MCO e das blendas MCO-QTS

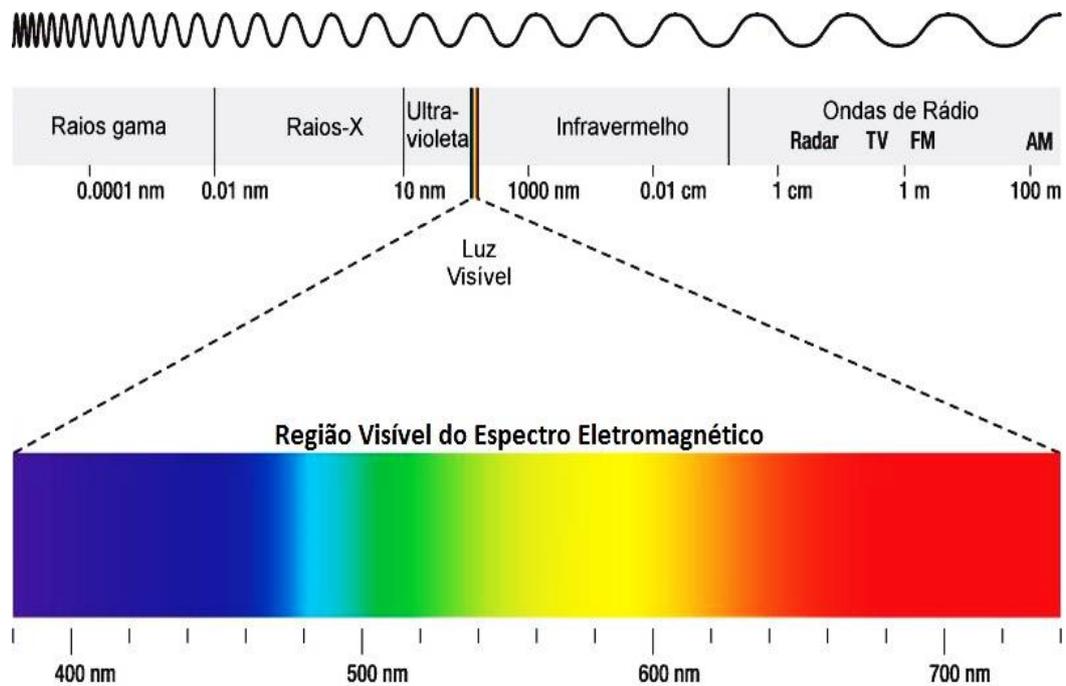
A caracterização da MCO e das blendas MCO-QTS foi realizada pelos métodos instrumentais de análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Um princípio básico da microscopia é tornar visível ao homem o que não é possível que o mesmo possa enxergar a olho nu. Uma ordem cronológica dos microscópicos mais primitivos aos mais atuais pode ser dada aparecendo nessa ordem cronológica pode ser citada a lupa como um dos primeiros e mais usuais, em seguida o microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. O limite máximo de resolução dos microscópicos óticos são estabelecidos pelos fenômenos de difração devido ao comprimento de onda da radiação incidente. A grande maioria dos microscópios óticos convencionais, ficam limitados a uma resolução de no máximo de vezes de aumento, acima desse valor não possível perceber-se detalhes muito pequenos.

Para a percepção de detalhes muito pequenos como a morfologia de certos materiais utiliza-se com bastante frequência a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um microscópio eletrônico de varredura (MEV), no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, utiliza um feixe de elétrons, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Espectroscopia é o estudo da interação da matéria com radiação eletromagnética. A radiação eletromagnética é a energia radiante que possui propriedades tanto de partículas quanto ondas. Uma série de diferentes tipos de radiação eletromagnética - cada tipo associado a uma faixa particular de energia constituiu o espectro eletromagnético (Figura 10) (BRUICE, 2006).

Figura 10. Representação do Espectro eletromagnético.

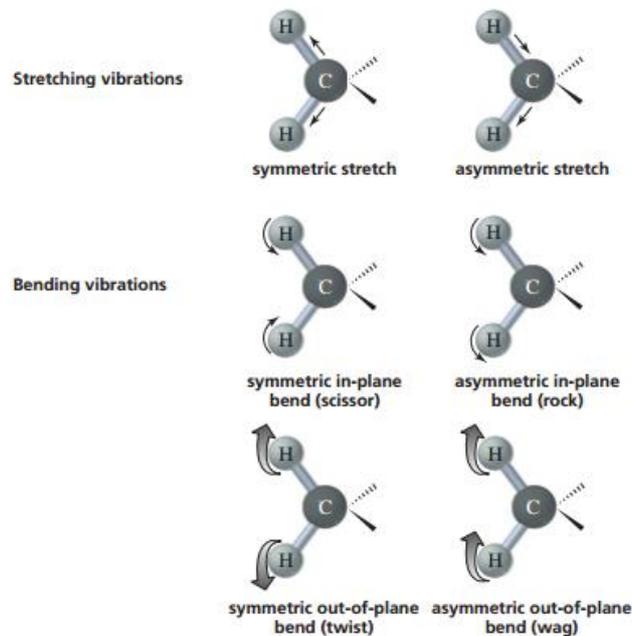


Fonte: BRUICE, 2006.

Na técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de fourrier (FTIR), a energia que incide sobre a amostra que apresenta comprimento de onda abaixo do comprimento de onda da luz vermelha, essa energia consegue fazer com que as ligações covalentes presentes nas moléculas que compõem o material passem a vibrar mais. A moléculas pode vibrar de maneira axial, que quando a vibração ocorre ao logo da linha de ligação covalente da molécula alterando o comprimento da ligação, pode vibrar de forma angular que nesse caso a vibração modifica o ângulo da molécula (BRUICE, 2006).

Moléculas que contém três ou mais átomos podem vibrar , tanto de maneira axial quanto angular simétrica ou assimétrica, as deformações angulares podem ser tanto balanço (*rock*), tesoura (*scissor*), abano (*wag*), torção (*twist*) (Figura 11) (BRUICE, 2006).

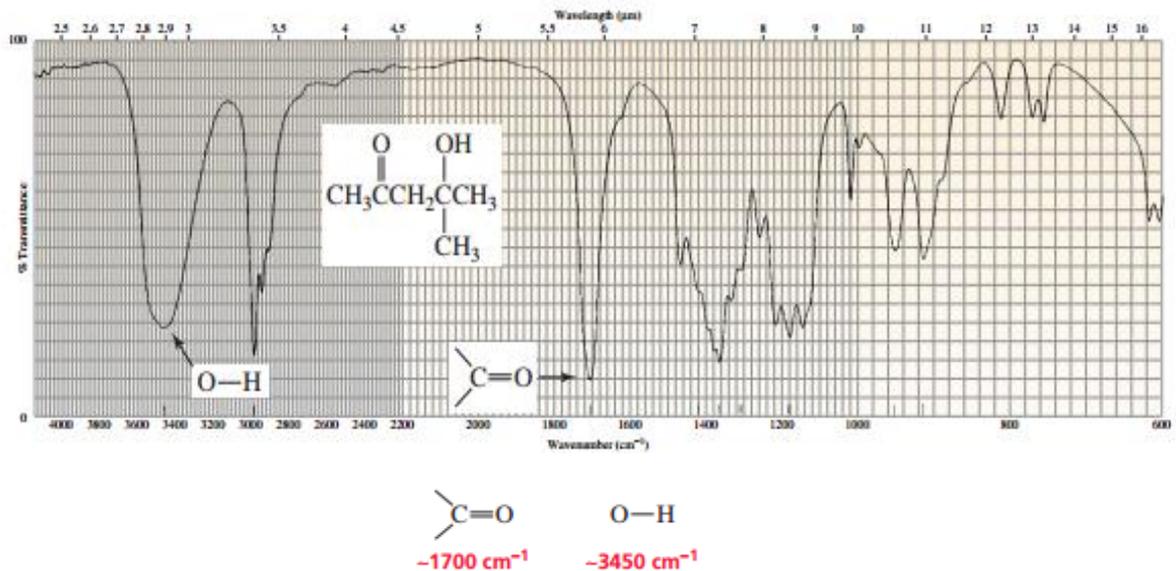
Figura 11. Representação das vibrações angulares.



Fonte: BRUICE, 2006.

Cada vibração de deformação axial e angular de uma ligação molecular ocorre com frequência específica. Quando as moléculas de uma substância são bombardeadas com radiação com frequência que antige a freqüência exat de suas deformações, a molécula absorverá energia. Isso faz com que as moléculas vibrem masi de forma axial e angular. É possível determinar exatamente os números de onda absorvido na vibração, com isso é possível identificar o tipo de ligação existente entre os átomos da molécula. Por exemplo, a deformação axial da ligação C=O absorve energia de número de onda próximo de 1700 cm⁻¹, enquanto que a deformação axial de uma ligação O – H, absorve energia de número de onda próximo de 3450 cm⁻¹ (Figura 12) (BRUICE, 2006).

Figura 12. Espectro no infravermelho da 4-hidroxi-4-metilpentanona.



Fonte: BRUICE, 2006.

Observe que o uso de técnicas como a espectroscopia no infravermelho com transformada de fourrier (FTIR), concede informações sobre a estrutura das moléculas do material. Assim, com o uso dessas técnicas foi possível obter informações detalhadas da morfologia dos materiais bem como dos grupos funcionais característicos das substâncias que fazem parte da composição dos materiais.

4.5. Extração e purificação da nimesulida a partir de comprimidos

Para obter-se o fármaco nimesulida, sem elevar consideravelmente os custos da pesquisa, optou-se em utilizar uma metodologia de extração e purificação deste fármaco a partir de comprimidos comercialmente disponíveis do medicamento genérico Nimesulida de 100 mg (marca EMS), segundo o método descrito por Gonsalves et al. (2013) com modificações.

Neste procedimento foram triturados 12 comprimidos de nimesulida de 100 mg usando almofariz e pistilo. O pó obtido foi inicialmente disperso em 50 mL de acetona e depois a suspensão foi submetida a uma filtração simples, sendo o filtrado gotejado diretamente para um béquer contendo 100 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 0,05 mol/L. A solução do béquer foi deixada em repouso por 24 h à

temperatura ambiente (27 ± 3 °C) e, após a evaporação lenta da acetona da solução, foram obtidos cristais do fármaco nimesulida, os quais foram novamente submetidos a uma filtração simples e postos para secar à temperatura ambiente (27 ± 3 °C) por 48 h. Após seca, a massa de nimesulida pura obtida foi pesada em balança analítica.

4.6. Caracterização da nimesulida extraída e purificada

O fármaco nimesulida extraído e purificado foi caracterizado pelas técnicas de determinação de ponto de fusão (PF), espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis, microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C .

Foi obtido um espectro de absorção molecular UV-Vis de nimesulida a 20,0 mg/L, na faixa de 300 a 500 nm, com variação de 10 nm em 10 nm, em um meio aquoso básico sem enzimas para mimetizar simplificada o fluido intestinal ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4, com polissorbato 80 a 2,0 % (v/v) e concentração dos constituintes próxima a 0,05 mol/L). A partir deste espectro foi obtido o comprimento de onda (λ) de máxima absorção para direcionar a construção da curva analítica visando a determinação espectrofotométrica de nimesulida.

4.7. Construção da curva analítica para a determinação da nimesulida

Para a construção da curva analítica, usando um método desenvolvido pelos autores, foi preparada inicialmente uma solução estoque de 1000,0 mg/L de nimesulida no tampão básico $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4). Em seguida, por diluição simples, preparou-se uma solução estoque intermediária de 100,0 mg/L de nimesulida no mesmo tampão. Por fim, os padrões de nimesulida nas concentrações de: 0,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 mg/L, foram preparadas misturando-se uma alíquota adequada da solução estoque de nimesulida a 100,0 mg/L, junto com 1,0 mL do tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4) e 0,20 mL de polissorbato 80. O volume final de 10,0 mL foi devidamente ajustado em balões volumétricos usando água deionizada. A solução do branco foi preparada da mesma forma, substituindo-se a alíquota da

solução estoque de nimesulida pelo mesmo volume de solução tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7,4).

A leitura de absorvância dos padrões preparados foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) foram obtidos através do software Microcal Origin 6.0®, utilizando o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados.

4.8. Incorporação da nimesulida nas matrizes poliméricas

A incorporação da nimesulida na MCO e na blenda polimérica MCO-QTS (1:1) foi feita através da técnica de banho finito de líquido (adsorção). Neste procedimento, massas de 400,0 mg de MCO e blenda MCO-QTS (1:1) foram inseridas em erlenmeyers distintos contendo 50,0 mL de uma solução hidroalcolica de nimesulida na concentração de 10,0 g/L. As suspensões preparadas ficaram em repouso, sem agitação constante, por 48 h. Passado este período, a MCO e a blenda MCO-QTS foram filtradas da solução, lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente (27 ± 3 °C) por 48 h. Estas matrizes foram então caracterizadas por MEV, EDS e FTIR.

Cabe salientar que as blendas poliméricas MCO-QTS (1:3) e (3:1) não foram usadas nestes ensaios por opção dos autores do trabalho e baseando-se em resultados obtidos nos estudos de caracterização destas matrizes realizados anteriormente.

4.9. Reticulação das matrizes poliméricas

As blendas poliméricas MCO-QTS e a MCO foram reticuladas usando uma solução aquosa ácida de cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) e usando a estratégia de calcificação proposta por Wu e Colaboradores (1995) com algumas modificações. Este procedimento teve como objetivo interligar as cadeias poliméricas das matrizes visando prolongar a liberação do fármaco nimesulida incorporado em seu interior.

Neste procedimento, massas de 200,0 mg de MCO ou de blenda MCO-QTS (1:1) já contendo nimesulida incorporada foram inseridas em erlenmeyers distintos

contendo 100,0 mL de uma solução aquosa de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 10,0%(m/v) em HCl a 0,10 mol/L. As suspensões preparadas ficaram em repouso, sem agitação constante, por 24 h. Passado este período, a MCO e a blenda MCO-QTS reticuladas e contendo nimesulida incorporadas foram filtradas da solução, lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente ($27 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) por 48 h. Estas matrizes foram então caracterizadas por MEV, EDS e FTIR.

4.10. Determinação do teor de nimesulida nas matrizes poliméricas

A quantificação de nimesulida incorporada nas matrizes poliméricas foi realizada fazendo-se extrações sucessivas do fármaco a partir da MCO e blenda MCO-QTS (1:1) tanto na forma não reticulada quanto na reticulada. Neste procedimento, 25,0 mg de cada matriz foi inserida em um erlenmeyer de 50 mL e adicionado 8,0 mL de uma mistura 1:1 de metanol P.A. e tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4) no frasco. Esta suspensão foi agitada manualmente e o frasco fechado foi deixado em repouso por 24 h. Passado este período, a fase hidroalcoólica sobrenadante foi extraída com auxílio de uma pipeta de Pasteur, evitando-se aspirar o sólido, e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, o qual foi em seguida tampado.

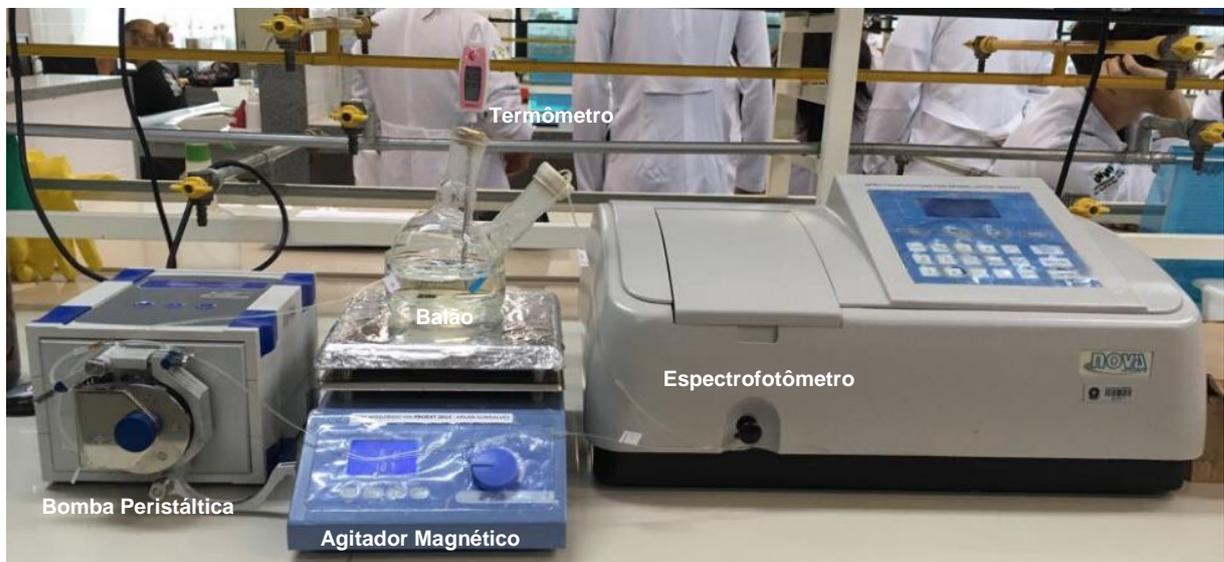
Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, sempre adicionando uma nova alíquota de 8,0 mL da solução hidroalcoólica 1:1 em cada etapa de extração. As três fases hidroalcoólicas foram reunidas no mesmo balão volumétrico, sendo o volume final deste ajustado com água deionizada para, em seguida, proceder com a análise espectrofotométrica. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada matriz sob estudo.

Para as análises espectrofotométricas, uma alíquota de 1,0 mL da solução extratora hidroalcoólica foi misturada com 1,0 mL do tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4) e 0,20 mL de polissorbato 80 em um balão volumétrico de 10,0 mL, sendo o volume final devidamente ajustado usando água deionizada. A solução do branco foi preparada da mesma forma, substituindo-se a alíquota da solução extratora por 1,0 mL da mistura 1:1 de metanol P.A. e tampão (pH 7,4). A leitura de absorvância destas amostras foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm.

4.11. Montagem do sistema para os ensaios de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes poliméricas

Para a realização do ensaio de liberação *in vitro* do fármaco nimesulida a partir das matrizes poliméricas sob estudo foi criado um sistema em fluxo fechado de monitoramento de absorvância em função do tempo, de forma a mimetizar o funcionamento do aparelho dissolutor conhecido como aparato 4 da USP ("*Flow-Through Dissolution System*"), o qual é normalmente utilizado para formulações de liberação prolongada de fármacos e para volumes de meio de liberação que podem ser ajustados entre 50 mL e 2,0 L. A Figura 13 mostra o sistema montado.

Figura 13. Sistema em fluxo fechado montado para os ensaios de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes poliméricas sob estudo.



Fonte: Autoria própria.

O sistema proposto foi montado usando-se um espectrofotômetro (modelo 1600 UV, marca Nova Instruments), uma bomba peristáltica (modelo DMC-100, marca MS Tecnopon), um agitador magnético (modelo NI 1103-E, marca Nova Instruments), uma cuba de vidro para banho-maria, um balão de reação de 250 mL de 2 bocas, tubos de bombeamento de silicone ($di = 0,20$ mm), tubos de condução de silicone transparente ($di = 0,10$ mm) e um cronômetro manual para o registro do tempo. A bomba peristáltica foi programada para operar na vazão de 5,0 mL/minuto. O agitador magnético foi ajustado para aquecer a água do banho-maria o suficiente para aquecer

e manter o meio interno de liberação na temperatura de 37 ± 1 °C. Este agitador também foi ajustado para manter a taxa de agitação em 150 ± 20 rpm. Uma barra magnética revestida de teflon de 1,0 cm ($d_i = 0,30$ mm) foi inserida no balão para promover a agitação. Um termômetro do tipo espeto foi inserido no meio de liberação durante todo o ensaio para o registro da temperatura.

4.12. Ensaio de liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas

Os ensaios de liberação de nimesulida a partir das matrizes poliméricas sob estudo foram feitos empregando-se o sistema em fluxo fechado proposto (Figura 9). Neste procedimento foi inserido inicialmente no balão 100,0 mL da solução tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7,4) e 0,20 mL de polissorbat 80. O agitador magnético com aquecimento foi ligado para homogeneizar a solução e ajustar a temperatura interna do meio de liberação até o termômetro registrar o valor de 37 ± 1 °C. Após estas condições serem alcançadas, a bomba peristáltica foi ligada para iniciar o fluxo contínuo do meio de liberação em direção ao espectrofotômetro, onde o mesmo foi zerado com esta solução no comprimento de onda de 400 nm. Somente após estes procedimentos é que a massa de 25,0 mg da matriz polimérica sob estudo foi inserida no balão para iniciar os ensaios de liberação.

A leitura de absorvância pelo espectrofotômetro iniciou desde o tempo de 10 s indo até o tempo de 2 h em alguns estudos, com registro de absorvância a intervalos de tempo pré-determinados e, desde o tempo de 10 s até o tempo de 12 h em outros estudos, também com registro de absorvância a intervalos de tempo pré-determinados.

4.13. Aplicação de modelos teóricos para explicar os perfis de liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas

Os modelos teóricos dependentes de ordem zero, primeira ordem e Higuchi foram aplicados aos resultados dos ensaios de liberação, usando-se as recomendações dos modelos, sendo as equações linearizadas obtidas com auxílio do

software Microcal Origin 6.0[®]. Os parâmetros de cada modelo foram calculados manualmente através dos coeficientes angulares e lineares das equações obtidas.

4.14. Análise estatística

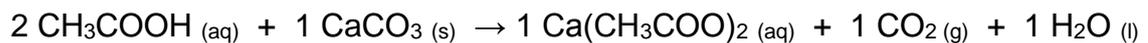
Os dados experimentais, quando necessários, foram submetidos a análises estatísticas com auxílio do software GraphPad Prism 6.0[®], e considerando um nível de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção da membrana da casca do ovo

A membrana foi extraída por processo químico, a partir da reação entre o ácido acético (CH_3COOH) e o carbonato de cálcio (CaCO_3) presente na casca do ovo, provocando a dissolução total de sua casca, segundo a reação ácido-base abaixo.



Ao término da reação o carbonato de cálcio foi consumido, restando apenas a membrana da casca do ovo, o qual encontrava-se turgido, envolvendo o conteúdo interno (clara e gema), fato que pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 14. Ovos antes da remoção da casca (calcificado) e após três dias imersos em solução aquosa de ácido acético (descalcificado).



(a) ovo calcificado



(b) ovo descalcificado

Fonte: Autoria própria.

A membrana depois de separada de seu conteúdo interno foi lavada com água em abundância e seca à temperatura ambiente, sendo então triturada em meio etanólico, para minimizar o excesso de hidratação e remover eventuais substâncias orgânicas adsorvidas, resultando no material mostrado na Figura 15.

Figura 15. Membrana da casca do ovo.



(a) antes da trituração



(b) após a trituração

Fonte: Autoria própria.

A partir do procedimento de extração da membrana adotado foi possível obter cerca de 7,0 g de MCO *in natura*, ou seja, 0,23 g de membrana/ovo.

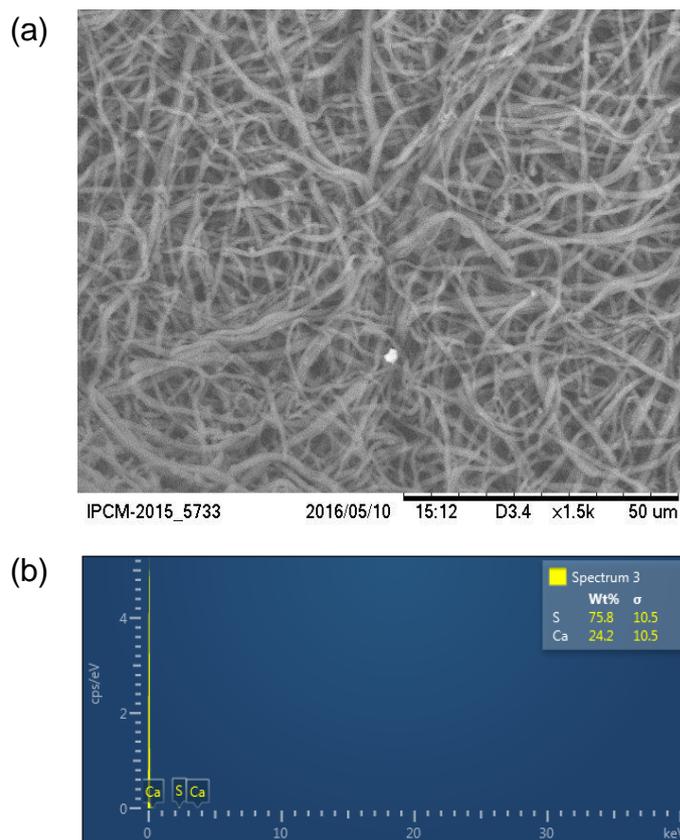
5.2. Preparação e caracterização das blendas poliméricas

A preparação das blendas entre a MCO e a QTS seguiu o método clássico de união polimérica por intermédio de atração eletrostática. Assim, os grupos aminos da quitosana em meio ácido encontram-se protonados, produzindo uma carga superficial positiva que atrai eletrostaticamente os grupos ácidos carboxílicos ionizados e, portanto, carregados negativamente, na superfície da membrana da casca do ovo. Portanto, a mistura acima envolve um processo físico que ocorre em meio heterogêneo. Além disso, as blendas de MCO-QTS preparadas, na proporção em massa de 1:3, 1:1 e 3:1 respeitam o fato de que na mistura, um componente polimérico deve ter concentração acima de 2% em massa do segundo componente (LUNA et al., 2015).

Uma vez preparadas, as blendas MCO-QTS foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para ser avaliada a morfologia do material preparado e a presença de alguns

elementos químicos. As Figuras 16 e 17 mostram, respectivamente, imagens de MEV/EDS da MCO *in natura* e da QTS sólida *in natura* para fins de comparação com as blendas. Cabe salientar que durante todo o processo de preparação das blendas, a MCO mantém-se em fase sólida, já que é insolúvel no meio aquoso ácido do ensaio, atuando portanto como um suporte para a ancoragem da QTS, a qual encontra-se inicialmente solubilizada neste meio e sofre lenta precipitação e adsorção sobre a MCO à medida que o pH do meio é elevado vagarosamente com a adição de base.

Figura 16. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da MCO *in natura*.



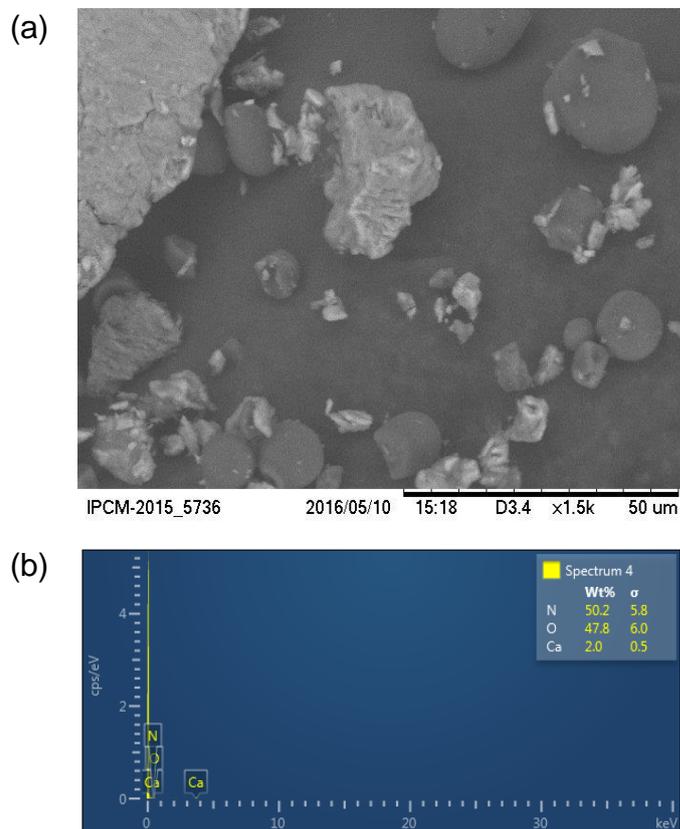
Fonte: Autoria própria.

Na Figura 16 observa-se a estrutura morfológica da MCO, com ampliação de 1500 vezes, a qual demonstra ser bastante fibrosa e porosa, apresentando desta forma características compatíveis com a membrana descrita por Baláz (2014). Ainda de acordo com este autor, as fibras individuais da MCO estão dispostas aleatoriamente, entrelaçadas entre si e com pontos de coalescência, com distâncias entre elas de aproximadamente 25 μm e diâmetros variando entre 1,5 e 5,0 μm . Essa

morfologia da MCO influencia diretamente as suas propriedades físicas e mecânicas. O EDS da MCO mostrou a presença de uma pequena quantidade de cálcio na membrana, o que pode ser explicado tendo em vista que a MCO está disposta na forma de camadas (interna e externa) aderidas à casca do ovo, de modo que é provável a presença de resquícios deste elemento no biopolímero em estudo. A presença de enxofre também se justifica, uma vez que a MCO é um material proteico e possui aminoácidos contendo o grupo tiol ($-SH$), tal como a cisteína.

Na Figura 17 observa-se a estrutura morfológica da QTS sólida *in natura*, com ampliação de 1500 vezes.

Figura 17. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da QTS sólida *in natura*.



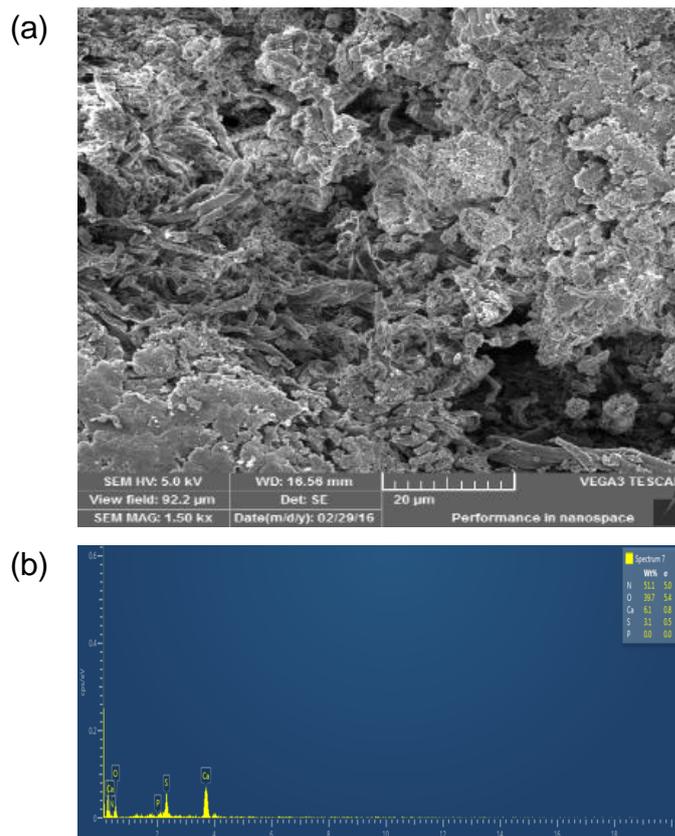
Fonte: Autoria própria.

A quitosana (QTS) em fase sólida apresenta-se como uma estrutura amorfa, de característica irregular e não homogêneas com relação ao tamanho de partículas. Já o EDS mostra uma composição variável, sendo os elementos predominantes na estrutura, o nitrogênio (N) e oxigênio (O), em razão dos grupos aminos ($-NH_2$) e

álcoois ($-OH$) presentes nos monômeros do polímero. Também foi detectada a presença de traços do elemento cálcio (Ca), o qual, segundo Panith et al. (2016), pode vir da estrutura óssea dos crustáceos a qual a quitina foi extraída para a preparação da QTS.

A Figura 18 mostra o MEV/EDS da blenda MCO-QTS 1:3 (25% de MCO e 75% de QTS), com ampliação de 1500 vezes. Neste é possível verificar uma massa amorfa, que corresponde à QTS, recobrindo quase a totalidade da superfície fibrosa da MCO.

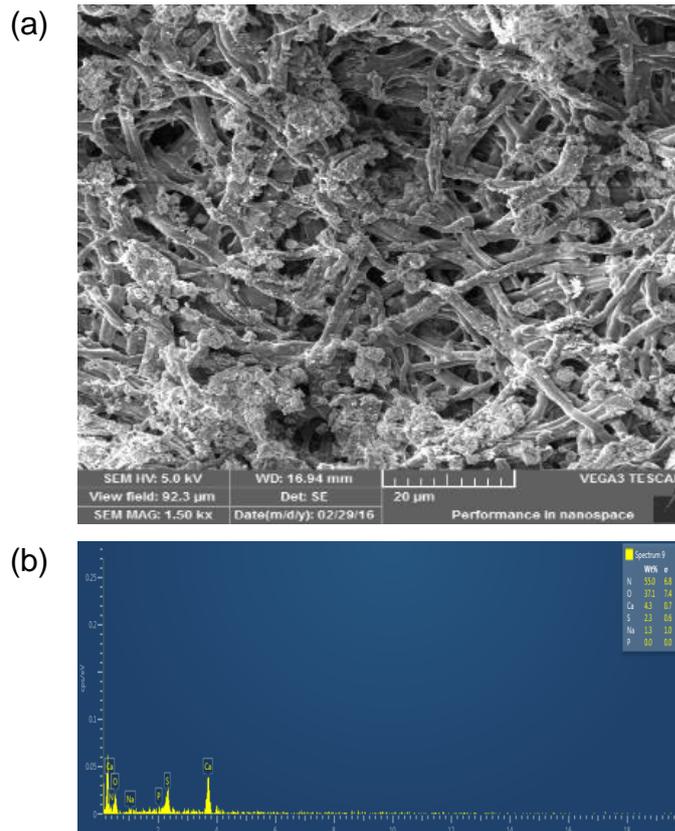
Figura 18. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO-QTS 1:3.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 19 mostra o MEV/EDS da blenda MCO-QTS 1:1 (50% de MCO e 50% de QTS), também com ampliação de 1500 vezes. Nesta é possível verificar que existe uma maior homogeneidade de dispersão da QTS sobre a superfície da MCO. Isto se justifica uma vez que ambos os polímeros estão na mesma proporção em massa.

Figura 19. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO-QTS 1:1.



Fonte: Autoria própria

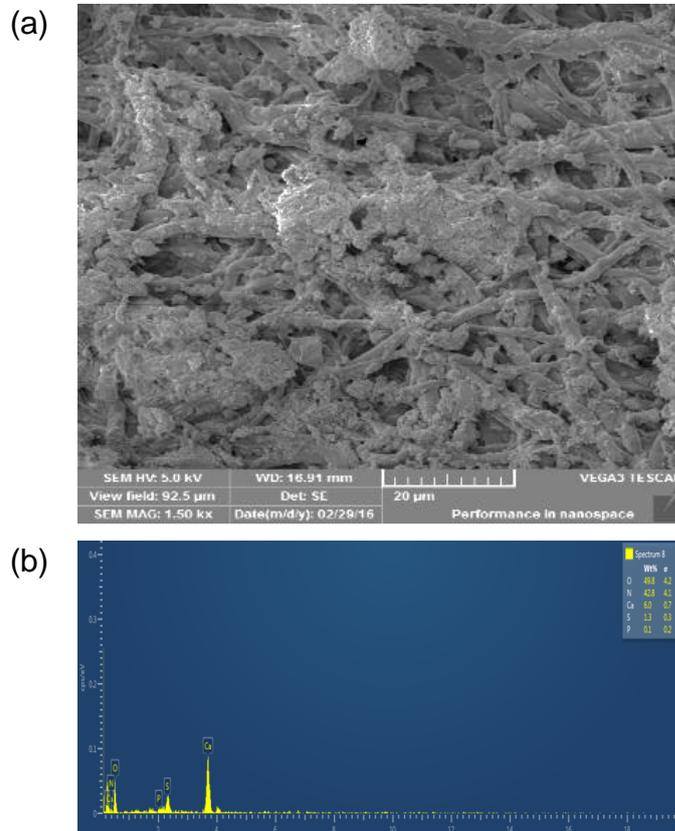
Por fim, a Figura 20 mostra o MEV/EDS da blenda MCO-QTS 3:1 (75% de MCO e 25% de QTS), com ampliação igual às das análises anteriores. Neste é possível verificar a presença de massas amorfas mais densas de QTS, porém com grande dispersão entre si, sobre a superfície das fibras da MCO.

Para as análises de EDS, foi observado que as três blendas preparadas apresentaram em sua composição a presença majoritária dos elementos oxigênio (O) e nitrogênio (N), além da presença em traços de cálcio (Ca) e enxofre (S), observando-se quantidades variáveis destes elementos a depender da proporção de MCO e QTS nas amostras.

Neste ponto do projeto, diante dos resultados de MEV mostrados nas Figuras 18 e 20, correspondente às imagens das blendas MCO-QTS 1:3 e 3:1, foi feita uma exclusão de estudo de incorporação/liberação de nimesulida para estas blendas, baseando-se no seguinte aspecto: as superfícies mais irregulares de tais blendas podem comprometer a reprodução da incorporação do fármaco nimesulida, pois,

segundo Catoni e Colaboradores (2010), a variabilidade e a redução de porosidade na superfície, observando-se claramente duas fases, pode indicar menor adesão das cadeias poliméricas na blenda e dificultar a incorporação do fármaco em testes posteriores.

Figura 20. Imagens de MEV (a) e análise de EDS (b) da blenda MCO-QTS 3:1.



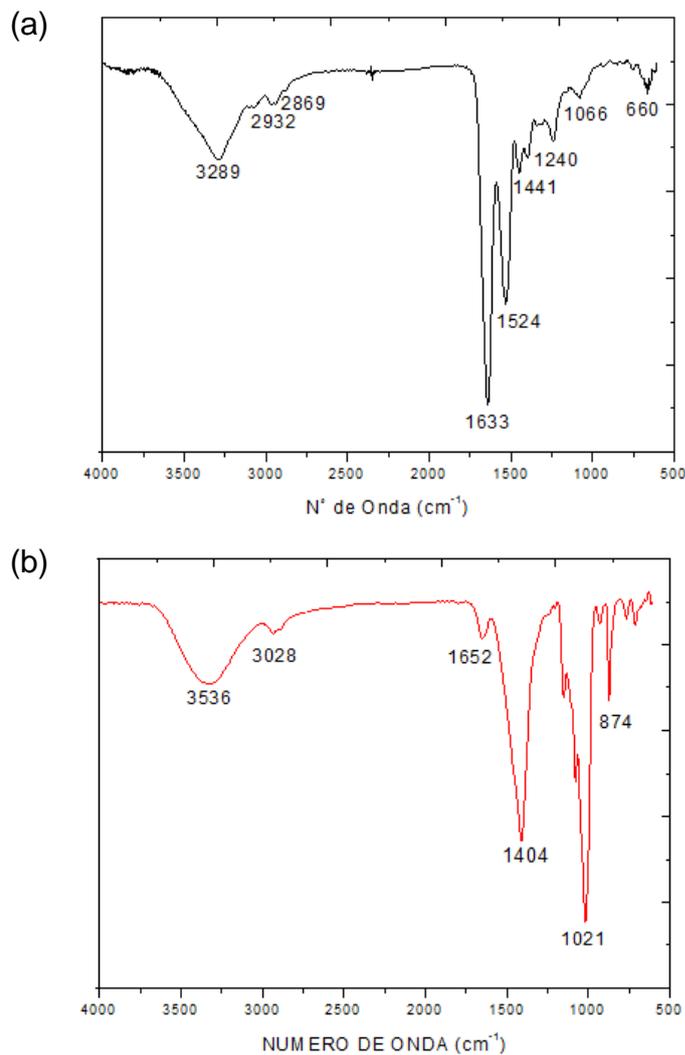
Fonte: Autoria própria.

Assim, a partir deste estudo de caracterização, observou-se que a blenda que apresentou uma melhor organização morfológica superficial, com uma distribuição mais uniforme, foi a preparada na proporção de 1:1 dos constituintes (50% de MCO e 50% de QTS), sendo esta a escolhida para ser utilizada nos estudos posteriores.

Outro tipo de caracterização das matrizes poliméricas em estudo foi a análise por infravermelho (FTIR). O espectro de absorção de infravermelho (FTIR) da MCO *in natura* (Figura 21a) apresenta duas regiões importantes, a primeira, com picos de grupos funcionais em comprimentos de onda que variam de 3750 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} , e a segunda região, com picos em comprimentos de onda de absorção entre 1700 cm^{-1}

¹ e 600 cm⁻¹. Na região com os comprimentos de onda de valores mais elevados o pico de maior intensidade é evidenciado exatamente no valor de 3289 cm⁻¹ que corresponde ao modo de deformação axial dos grupos O–H e N–H. Os outros picos em 2932 cm⁻¹ e 2869 cm⁻¹ correspondem às deformações axiais assimétricas C–H das ligações presentes nos grupos =C–H e =CH₂.

Figura 21. Espectros de FTIR da MCO *in natura* (a) e QTS *in natura* (b).



Fonte: Autoria própria.

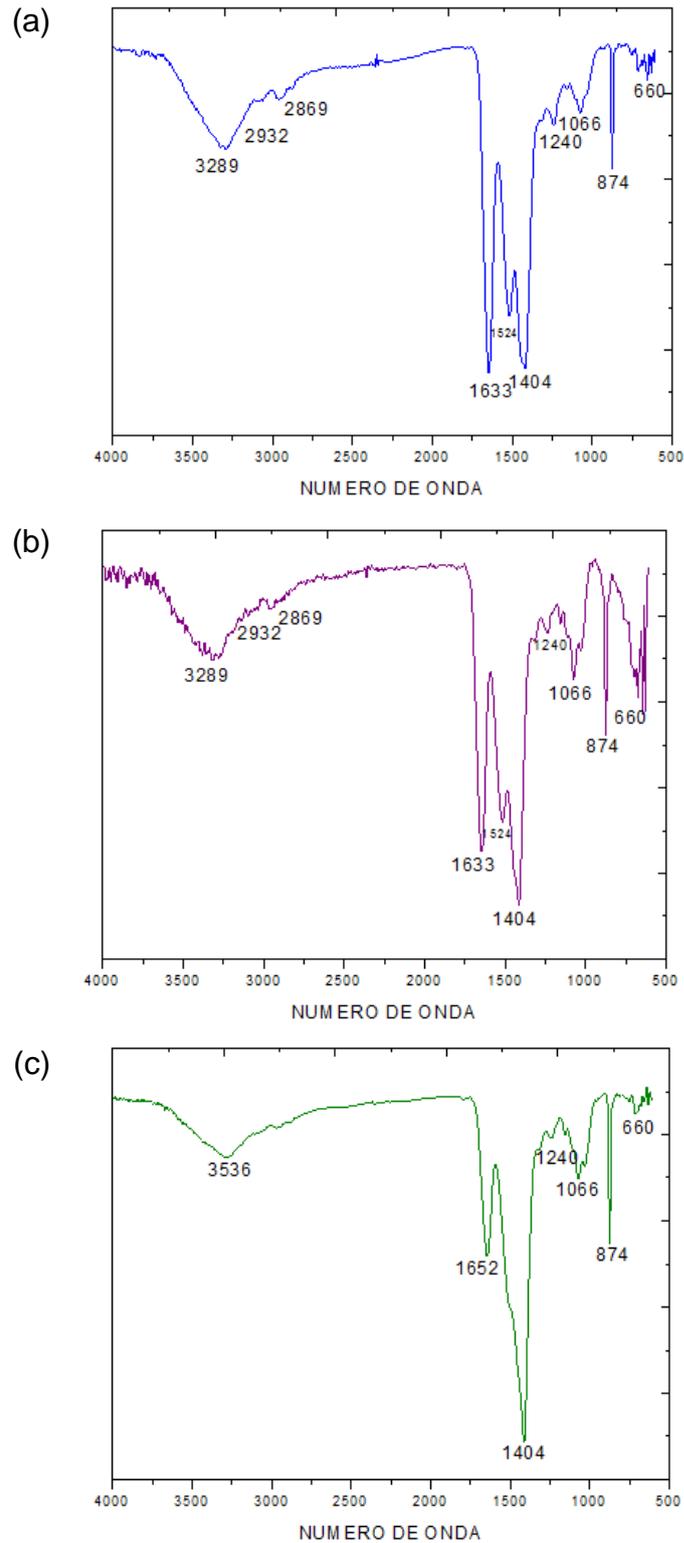
Nos espectros da Figura 21a, na região onde os picos têm comprimentos de onda menores, os picos de maior intensidade surgiram em 1633 cm⁻¹, que corresponde ao modo de vibração axial C=O, em 1524 cm⁻¹, que corresponde ao modo de vibração de estiramento CN/NH. O pico em 1240 cm⁻¹ confirma o modo de vibração em estiramento das ligações dos grupos CN/NH, que caracterizam a função

amida presente nas glicoproteínas das fibras da MCO (BRUICE, 2006). Os picos em 1441 cm^{-1} , 1066 cm^{-1} e 660 cm^{-1} , correspondem ao modo de vibração em estiramento das ligações dos grupos C=C, C–O e C–S, respectivamente. A caracterização da MCO feita no trabalho de Baláž (2014) traz uma grande proximidade entre os valores de comprimentos de onda obtidos na caracterização desse trabalho, comprovando a presença dos grupos funcionais mostrados anteriormente.

A Figura 21b mostra os espectros de FTIR da quitosana *in natura*. O espectro também apresenta duas regiões de absorção relevantes. Na região de absorção de alta frequência, o pico estreito em 3028 cm^{-1} é típico de vibrações axiais das ligações presentes nos grupos O–H livres. O pico largo e intenso em 3536 cm^{-1} é característico do grupo O–H não livre, ou seja, que formam ligação de hidrogênio (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Os picos em 3028 cm^{-1} e 3536 cm^{-1} estão relacionados também ao modo de vibração axial presentes em amins primárias e secundárias livres. Ainda na primeira região é possível atribuir picos característicos dos grupos C–H de ligação CH_2 (2930 cm^{-1}) e C–H de ligação CH_3 (2869 cm^{-1}). No estudo realizado por Paluszkiwicz (2011) os picos correspondentes aos grupos foram observados em comprimentos de onda muitos próximos aos obtidos no FTIR realizado para a QTS *in natura* desta pesquisa. O FTIR apresentou também uma segunda região de absorção com picos em 1633 cm^{-1} e 1404 cm^{-1} , correspondentes às vibrações do grupo C=O de amida. O pico em 1524 cm^{-1} , correspondente às vibrações angulares do grupo N–H de amina primária. Os picos em 874 cm^{-1} e 1021 cm^{-1} , correspondentes às vibrações axiais do grupo C–O na ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$, a qual está presente na quitosana, sendo resultado da desacetilação da quitina (LI et al., 2014).

O FTIR das blendas poliméricas produzidas pela mistura de MCO e QTS nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, respectivamente, podem ser vistas na Figura 22.

Figura 22. Espectros de FTIR das blendas MCO-QTS 3:1 (a), 1:1 (b) e 1:3 (c).



Fonte: Autoria própria.

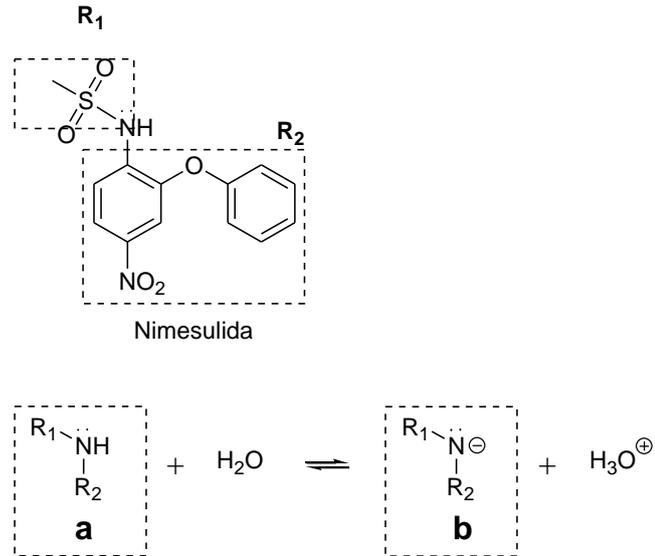
Observando os espectros da Figura 22, os picos de absorção entre 3289 cm^{-1} e 2869 cm^{-1} se mantiveram, sendo esses sinais relacionados ao modo de deformação axial dos grupos O–H e N–H. Os picos em 2932 cm^{-1} e 2869 cm^{-1} , correspondem às deformações axiais assimétricas C–H das ligações presentes nos grupos =C–H e =CH₂. Todos esses picos correspondem aos grupos presentes na MCO. Alguns picos da quitosana também aparecem no FTIR das blendas poliméricas, como as absorções entre 1633 cm^{-1} e 1404 cm^{-1} , que correspondem às vibrações do grupo C=O de amida, e o pico em 1524 cm^{-1} , que corresponde às vibrações angulares do grupo N–H de amina primária. Alguns picos característicos das duas substâncias foram mantidos, e outros se sobrepuseram, demonstrando interação entre as substâncias (BROMAN; KHOO; TAYLOR, 2001). À medida que a proporção de MCO e QTS muda, são observadas mudanças nos picos característicos de FTIR de cada blenda, mostrando que houve interação entre os polímeros que compõem tais materiais. O FTIR da blenda MCO-QTS 1:1 também foi a que mostrou a melhor divisão entre as proporções dos polímeros constituintes, esse fato reforça a escolha desta blenda para a realização do estudo de incorporação e liberação de nimesulida.

5.3. Extração, purificação e caracterização da nimesulida a partir de comprimidos

A nimesulida, de nome químico *N*-(4-Nitro-2-fenoxifenil)-metanossulfonamida, apresenta baixa solubilidade em água, contudo, este fármaco apresenta o grupo metanossulfonamida, que lhe confere um caráter de ácido fraco pela teoria ácido-base de Brösted-Lowry (Figura 23). Assim, quando ionizada, esta substância dá origem a uma base solúvel em fase aquosa. Essa teoria é muito usada para explicar reações ácido-base que ocorrem em meio aquoso, onde o ácido é qualquer espécie química capaz de doar prótons (H⁺) e base é a espécie capaz de receber prótons. Desta maneira, cada ácido possuirá sua base conjugada, assim como toda base terá seu ácido conjugado, sendo a presença ou não do próton H⁺, a única diferença entre ambas as espécies (SARKER; NAHAR, 2007).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), esta substância apresenta uma massa molar de 308,31 g/mol, fórmula química C₁₃H₁₂N₂O₅S, é um aspecto de pó amarelo pálido, cristalino, levemente untuoso ao tato, inodoro e não higroscópico.

Figura 23. Par ácido-base conjugado da nimesulida em meio aquoso.



Fonte: Adaptado de Gonsalves e Colaboradores (2013).

Considerando o procedimento de extração da nimesulida a partir dos comprimidos, uma caixa contendo 12 comprimidos de 100 mg cada deu origem a cerca de 953,0 mg de fármaco purificado por cristalização, conferindo um rendimento de extração de 79,4%. O produto obtido após a purificação apresentou-se como um pó cristalino de cor amarelo pálido, conforme descrição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) (Figura 24).

Figura 24. Fármaco nimesulida obtido após purificação por cristalização.



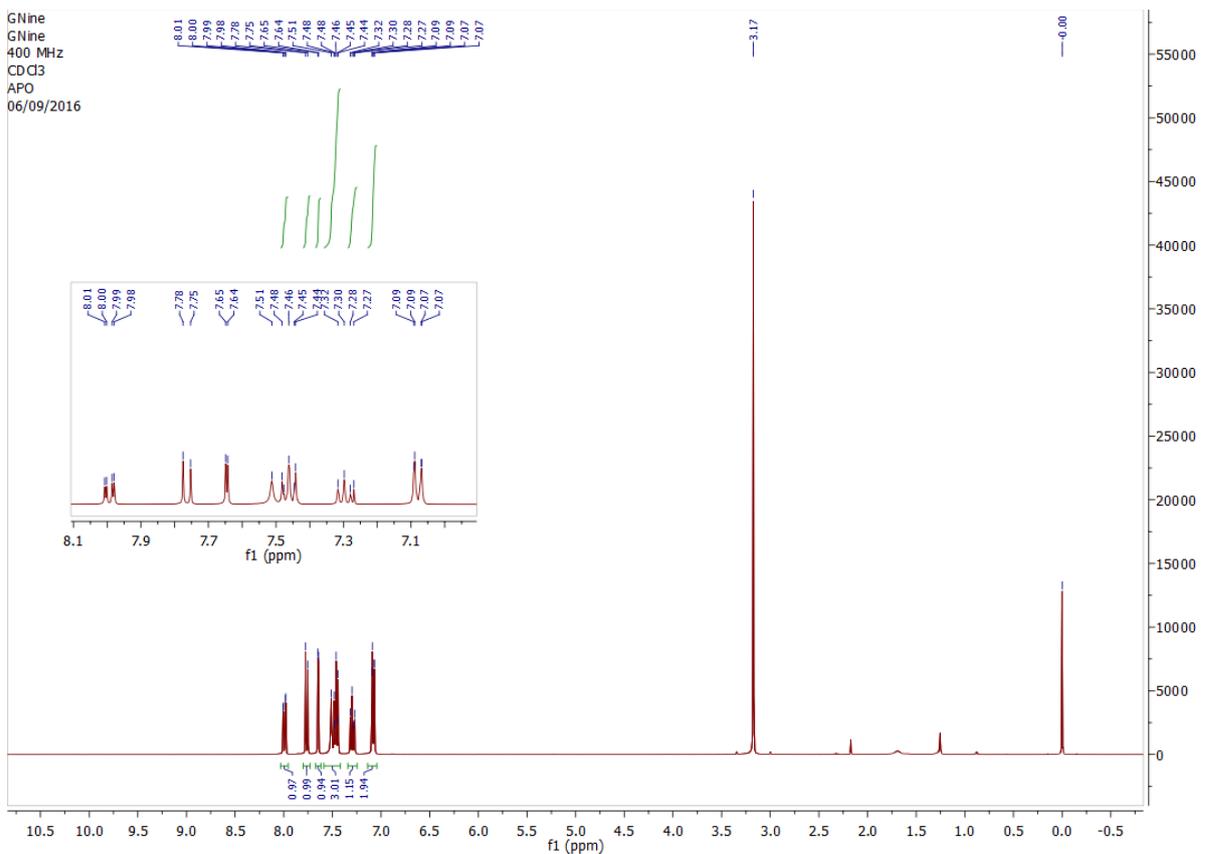
Fonte: Autoria própria.

Desta forma, como a pretensão era usar o fármaco extraído e purificado nos estudos de incorporação e liberação de nimesulida, e também como padrão analítico para a construção da curva de referência, optou-se em caracterizar o produto obtido por ponto de fusão (PF) e Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono.

A média do ponto de fusão obtido em análise em triplicata, utilizando a técnica de capilar imerso em banho de glicerina, revelou o PF de $147\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa estreita faixa de fusão revelou que o fármaco nimesulida extraído possuía alta pureza. Além disso, a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010) relata que o PF da nimesulida esta na faixa de $143,3\text{ a }144,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que Shoukri e Colaboradores (2009) relatam um PF de $147\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Continuando com a caracterização do fármaco, as Figuras 25 e 26 mostram os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da nimesulida extraída e purificada.

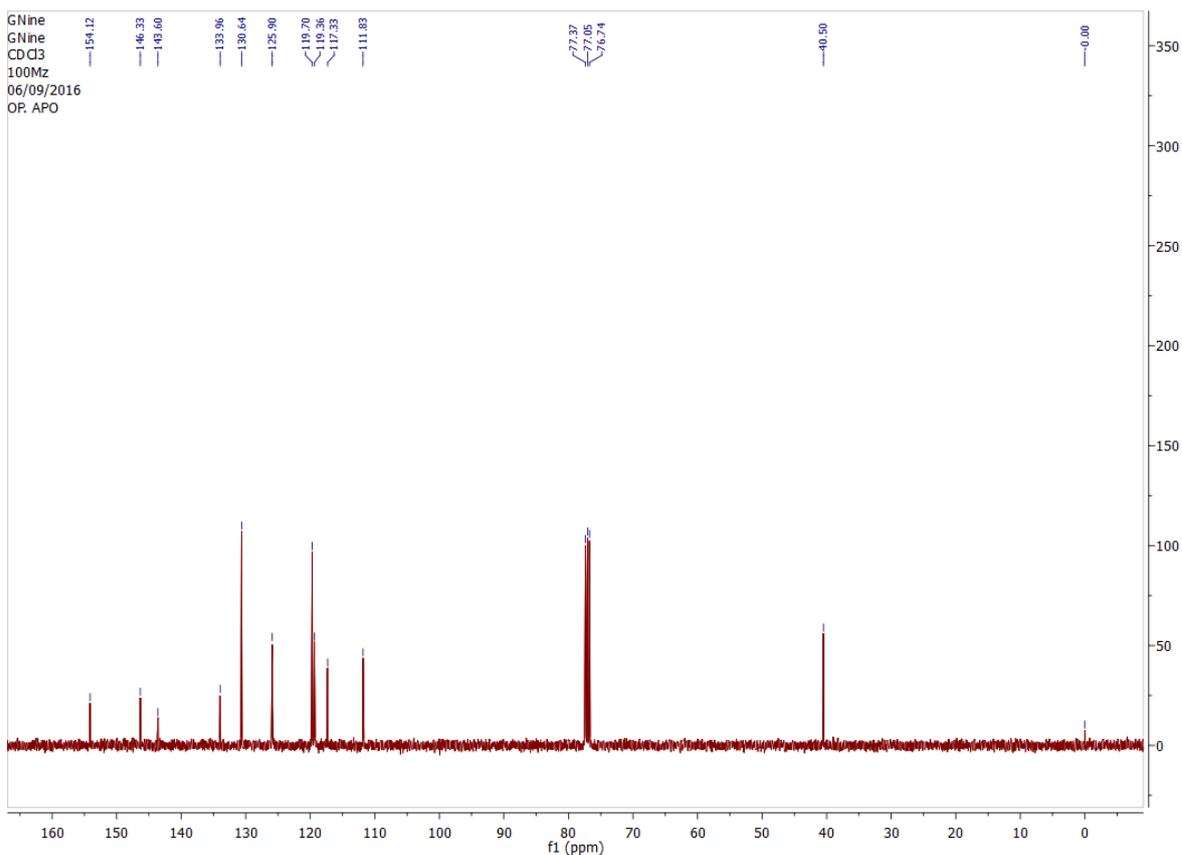
Figura 21. Espectro de RMN- ^1H da nimesulida em CDCl_3 em 400 MHz.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN-¹H (Figura 25) revelou 11 sinais de hidrogênio, com os seguintes deslocamentos químicos (δ): 7,1-8,0 ppm (8 H aromáticos) e 3,2 ppm (3H metílicos). O sinal de hidrogênio do grupo sulfonamida foi ausente devido ao fenômeno de troca rápida. O sinal em δ 7,3 ppm refere-se ao solvente (CDCl₃). Os pequenos sinais com deslocamentos químicos em 2,1 ppm e 1,3 ppm são de impurezas incorporadas.

Figura 22. Espectro de RMN-¹³C da nimesulida em CDCl₃ em 400 MHz.



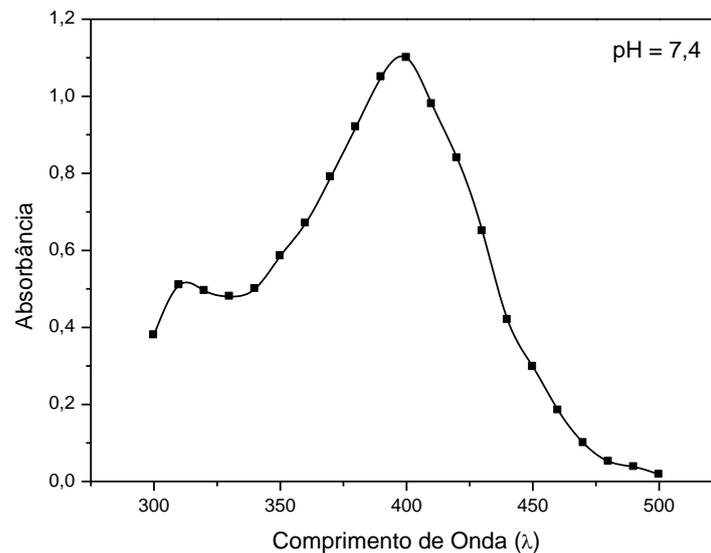
Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN-¹³C (Figura 26) revelou 11 sinais de carbono, com os seguintes deslocamentos químicos (δ) 154,1 ppm, 146,3 ppm, 143,6 ppm, 134,0 ppm, 130,6 ppm, 125,9 ppm, 119,7 ppm, 119,4 ppm, 117,3 ppm, 111,8 ppm e 40,5 ppm. O sinal em δ 77,1 ppm refere-se ao solvente (CDCl₃). Cabe salientar que a molécula apresenta 13 carbonos, contudo, 4 carbonos do anel aromático monossustituído são magneticamente iguais, revelando dois pares de carbono com deslocamentos químicos idênticos.

Pelos espectros de RMN obtidos para o fármaco nimesulida extraído e purificado pode-se dizer que esta substância está em alto grau de pureza e, em razão disto, será utilizada nos estudos posteriores, inclusive como padrão analítico para a construção da curva de referência indispensável para os estudos de incorporação e liberação.

O fármaco nimesulida foi caracterizado através de espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis em meio aquoso básico que mimetiza simplificada o fluido intestinal ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - pH 7,4). A Figura 27 mostra o espectro obtido. O resultado desta análise mostrou que o comprimento de onda (λ) de absorção molecular máxima no meio aquoso básico avaliado é em 400 nm. A espécie absorvedora neste pH é provavelmente o ânion resultante da ionização em pH básico do grupo ácido metanossulfonamida presente no fármaco nimesulida.

Figura 27. Espectro de absorção molecular do fármaco nimesulida.

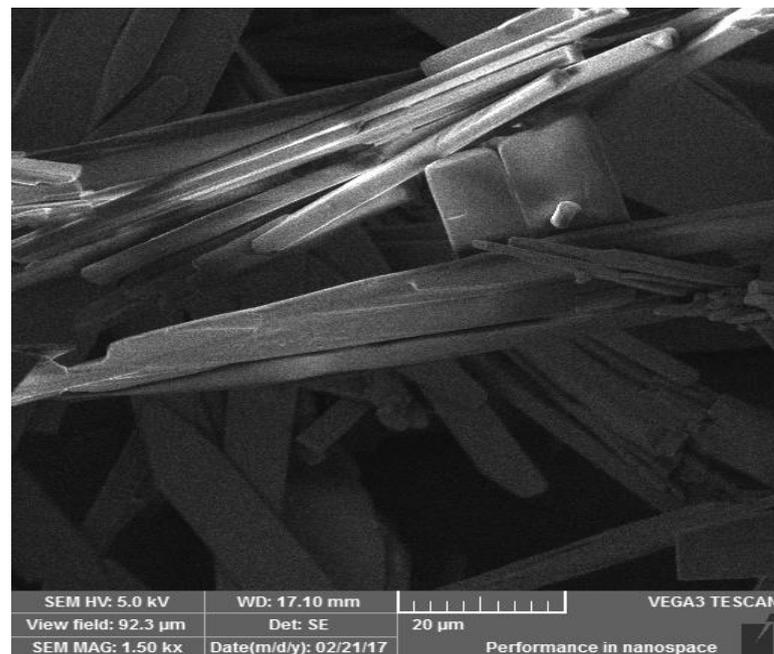


Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a provável morfologia da nimesulida incorporada nas matrizes poliméricas MCO e blenda MCO-QTS 1:1, uma micrografia por MEV do pó cristalizado obtido foi obtida na ampliação de 1500 vezes (Figura 28). Segundo Nalluri e Colaboradores (2003), a MEV de amostras comerciais de nimesulida revelou partículas com formato tabular e superfícies lisas. Já Sanphui, Sarma e Nangia (2011) obtiveram morfologia tabular e acidular dos cristais de nimesulida obtidos. Estas

diferenças devem-se ao polimorfismo deste fármaco, onde suas moléculas podem adotar mais de um arranjo cristalino no estado sólido. No MEV da amostra de nimesulida extraída e purificada neste trabalho são observados cristais tanto com formato tabular como acidular.

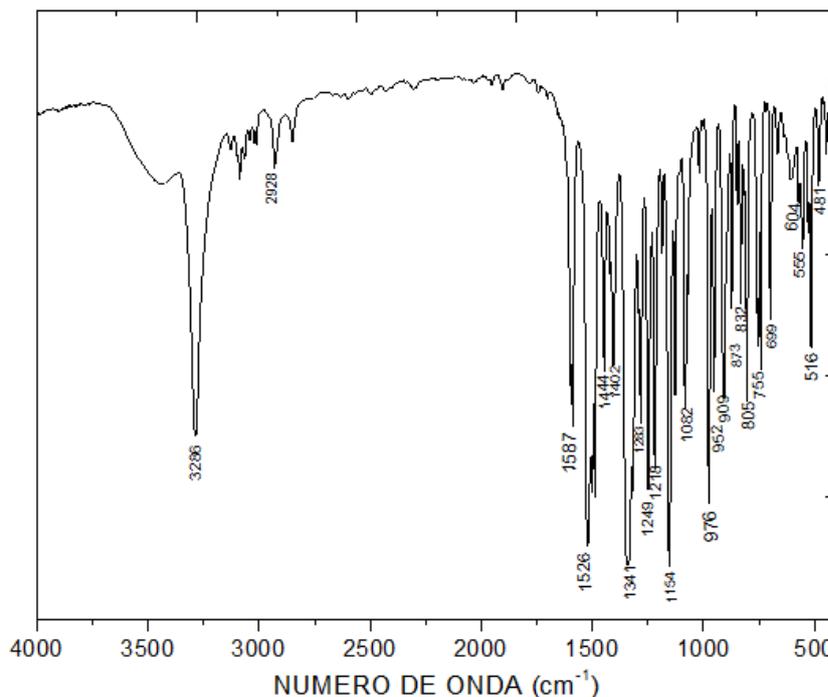
Figura 28. Imagem de MEV dos cristais de nimesulida extraída e purificada.



Fonte: Autoria própria.

Por fim, a nimesulida também foi caracterizada por FTIR. O espectro de infravermelho da Figura 29 mostra este resultado.

Figura 29. Espectro de FTIR da nimesulida extraída e purificada.



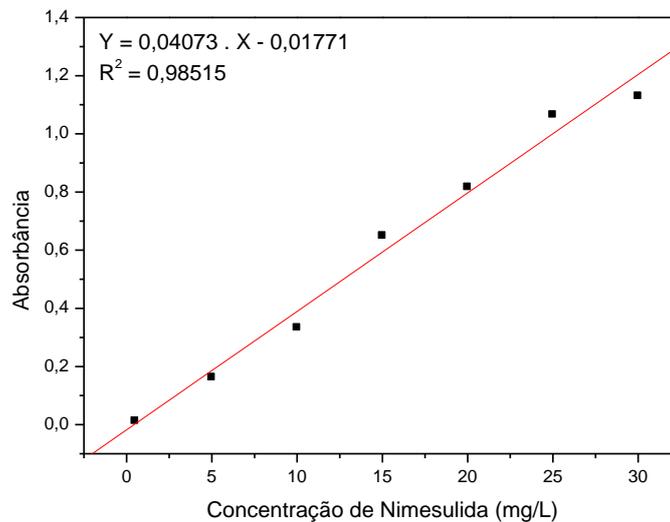
Fonte: Autoria própria.

No espectro da Figura 29, são observados picos característicos da nimesulida, sendo os picos de absorção em 1526 cm^{-1} e 1341 cm^{-1} relacionados à deformação assimétrica do grupo NO_2 . O pico em 1082 cm^{-1} refere-se à deformação da ligação $\text{S}=\text{O}$. O pico em 3286 cm^{-1} refere-se à deformação da ligação $\text{N}-\text{H}$. Os picos em 1154 cm^{-1} e 1077 cm^{-1} referem-se à ligação éter $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ e à ligação $\text{C}-\text{H}$ da metila (CH_3), respectivamente. Diversos picos na região entre 640 e 906 cm^{-1} referem-se às deformações das ligações $\text{C}-\text{H}$ de aromáticos (KHAN et al., 2010).

5.4. Curva analítica para a determinação do fármaco nimesulida

O método espectrofotométrico utilizado para a determinação do fármaco nimesulida baseou-se na ionização desta substância em meio tamponando em pH 7,4, fato que produz um ânion de coloração amarelo bastante solúvel neste meio e que absorve intensamente em 400 nm segundo o espectro de absorção UV-Vis mostrado na Figura 27. A Figura 30 mostra a curva de referência para a determinação espectrofotométrica de nimesulida.

Figura 30. Curva de referência para a determinação espectrofotométrica de nimesulida.



Fonte: Autoria própria.

Observando a curva de referência da Figura 30 pode-se perceber uma linearidade adequada ($R^2 > 0,98$), indicando obediência à lei de Beer na faixa de trabalho considerada (0,5 a 30,0 mg/L), com coeficiente de determinação próximo da unidade ($R^2 = 0,98515$). O R^2 obtido foi ligeiramente superior ao mínimo exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para validação parcial de métodos analíticos, o qual corresponde ao valor de 0,98 segundo a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

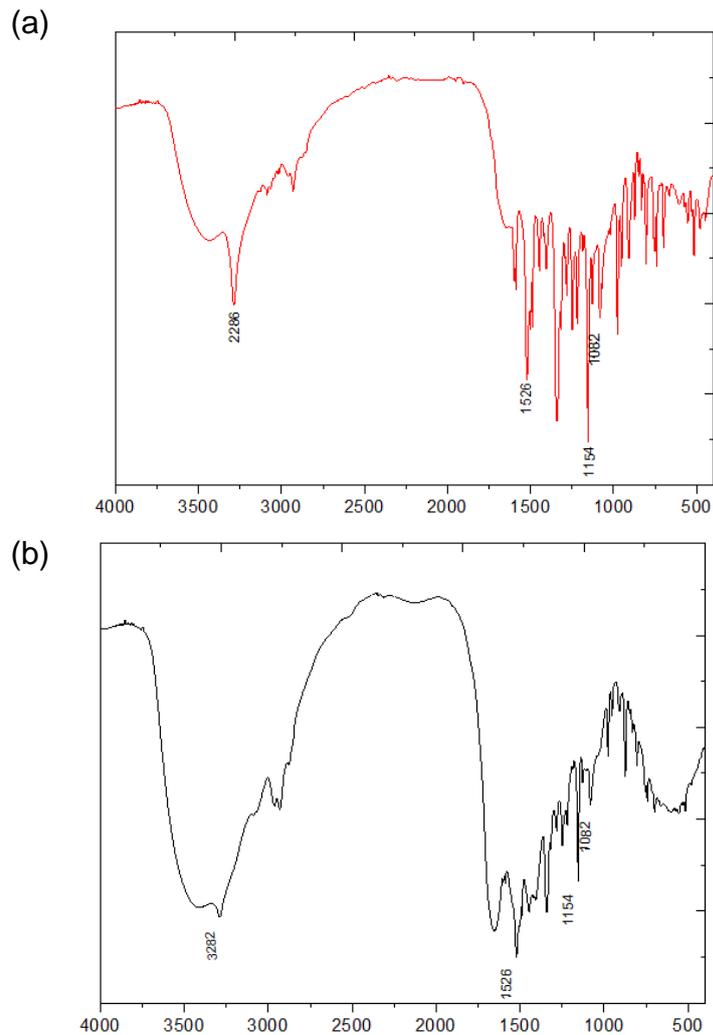
A equação da reta obtida foi equivalente a $Y = 0,04073 \cdot X - 0,01771$, onde Y representa a absorbância medida espectrofotometricamente e X a concentração do fármaco nimesulida (mg/L). Esta curva foi considerada com linearidade aceitável tendo em vista que não foi usado um padrão analítico comercial de nimesulida para a construção da mesma, sendo usado o próprio fármaco extraído e purificado a partir dos comprimidos comercialmente disponíveis do medicamento genérico Nimesulida de 100 mg (marca EMS). Esta equação foi usada para a conversão de absorbância em concentração nos estudos de incorporação e liberação de nimesulida nas matrizes poliméricas sob estudo.

5.5. Incorporação da nimesulida nas matrizes poliméricas

Para avaliar uma possível aplicação farmacêutica dos materiais poliméricos preparados e sob estudo, ensaios de incorporação e liberação do fármaco nimesulida nas matrizes foram realizados. A incorporação da nimesulida na MCO e na blenda MCO-QTS (1:1) foi feita aproveitando-se do comportamento adsorptivo que estes materiais demonstraram frente ao fármaco modelo observado pelos autores após realizar um ensaio de adsorção química, puramente qualitativo, envolvendo tais matrizes e o fármaco. Este procedimento de incorporação foi realizado sobre as matrizes originais, ou seja, antes de proceder com a reticulação usando CaCl_2 .

O espectro de infravermelho da Figura 31 mostra o resultado da incorporação do fármaco nas matrizes sob estudo. Nos espectros de FTIR é possível observar a presença dos picos mais característicos do fármaco nimesulida nestas matrizes, que são: 1526 cm^{-1} (grupo NO_2), 1154 cm^{-1} (ligação éter C–O–C) e 1082 cm^{-1} (ligação S=O). A presença destes sinais nos espectros comprova desta maneira a incorporação do fármaco modelo nas matrizes MCO e blenda MCO-QTS (1:1) antes da reticulação com CaCl_2 .

Figura 31. Espectros de FTIR da MCO-nimesulida (a) e blenda MCO-QTS-nimesulida (b)

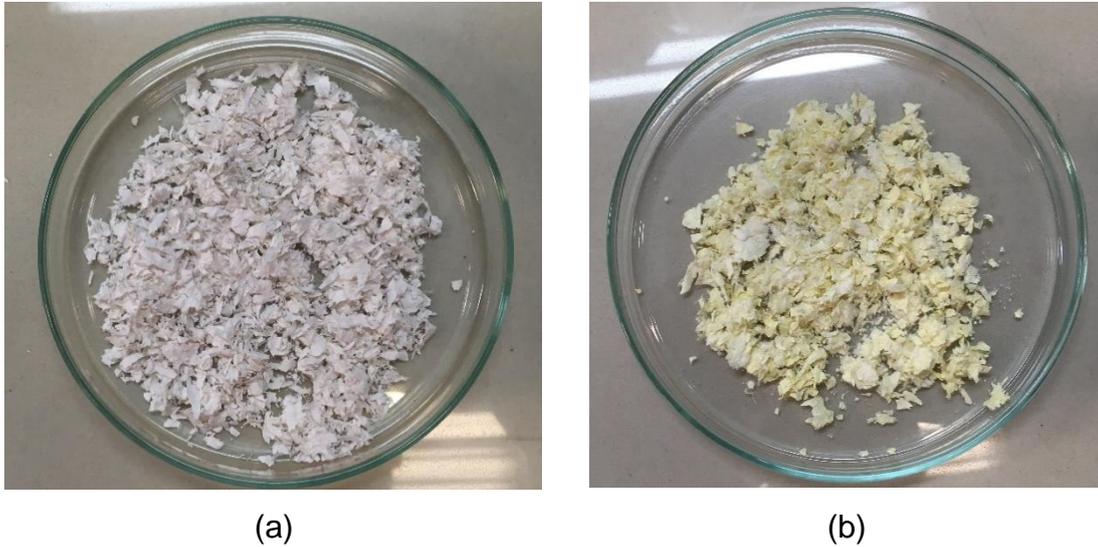


Fonte: Autoria própria.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram as aparências das matrizes MCO e blenda MCO-QTS (1:1) sem e com nimesulida incorporada, além de antes (originais) e após sofrerem reticulação com CaCl_2 . Observando os aspectos das matrizes após ter a nimesulida incorporada, verifica-se que as mesmas adquiriram a coloração do fármaco modelo, ou seja, um amarelo pálido (Figuras 32 e 33). Esta é uma evidência do sucesso da incorporação empregando-se o método adsortivo. Os processos adsortivos são normalmente governados por diversos fatores, sendo as interações intermoleculares fármaco-polímero as forças de atração que mantém tais substâncias unidas. A porosidade do material também contribui para melhorar a eficiência da

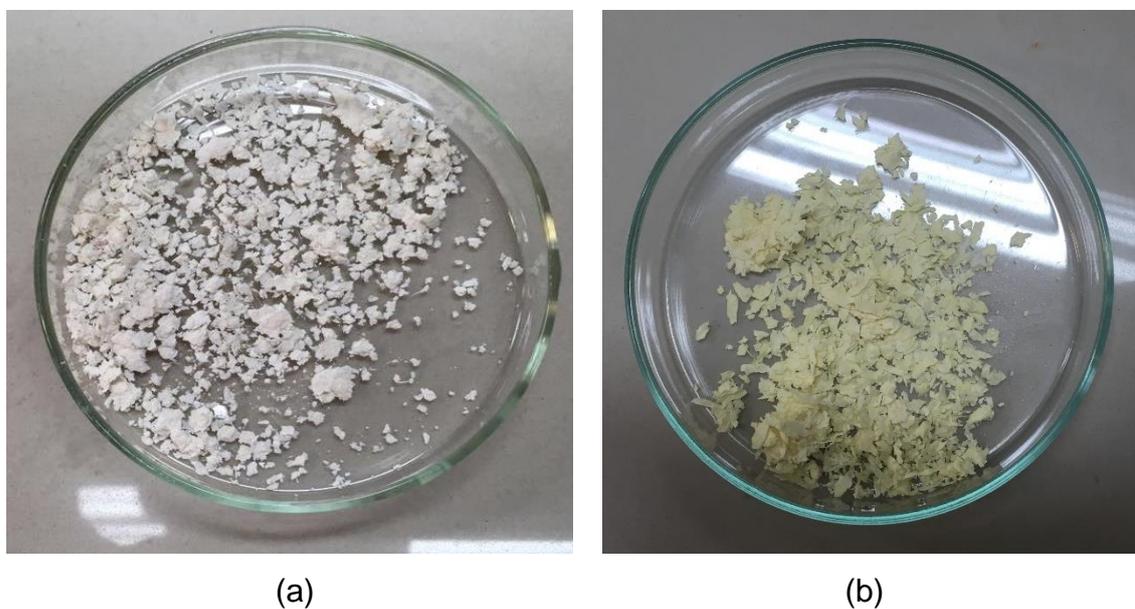
adsorção, uma vez que aumenta a área superficial do polímero, ampliando tais interações, e permite a manutenção do fármaco dentro das cavidades da matriz polimérica.

Figura 32. Aparência da MCO original sem nimesulida incorporada (a) e com nimesulida incorporada (b).



Fonte: Autoria própria.

Figura 33. Aparência da blenda MCO-QTS (1:1) original sem nimesulida incorporada (a) e com nimesulida incorporada (b).



Fonte: Autoria própria.

Observando os aspectos das matrizes com a nimesulida incorporada e após terem sido reticuladas em meio ácido de CaCl_2 , verifica-se que as mesmas adquiriram uma coloração esbranquiçada (Figura 34). Tal fato reflete que o processo de calcificação das matrizes teve êxito. Neste experimento, as soluções ácidas de CaCl_2 utilizadas mantiveram-se incolores durante todo o tempo de reticulação, evidenciando-se que neste processo a nimesulida não foi liberada no meio. Isso era esperado tendo em vista que o fármaco modelo não é solúvel em meio aquoso ácido.

Figura 34. Aparência da MCO com nimesulida incorporada e reticulada (a) e blenda MCO-QTS (1:1) com nimesulida incorporada e reticulada (b).



(a)

(b)

Fonte: Autoria própria.

5.6. Teor da nimesulida nas matrizes poliméricas

Antes de iniciar os estudos de liberação faz-se necessário conhecer o teor de nimesulida incorporada nas matrizes e, para isto, foram realizadas extrações sucessivas do fármaco a partir da MCO original e reticulada e da blenda MCO-QTS (1:1) original e reticulada usando uma mistura hidroalcoólica tamponada (pH 7,4) (metanol:tampão 1:1). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na quantificação do fármaco nos biopolímeros.

Tabela 2. Teor médio de nimesulida incorporada nas matrizes poliméricas sob estudo.

Matriz polimérica	Teor médio (mg/g)*	Percentual médio %(m/m)*
MCO original	176,83 ± 13,72	17,68 ± 1,37
MCO-QTS (1:1) original	145,03 ± 10,42	14,50 ± 1,04
MCO reticulada	122,69 ± 14,86	12,27 ± 1,49
MCO-QTS (1:1) reticulada	116,67 ± 17,12	11,68 ± 1,71

* média ± desvio padrão ($n = 3$)

Fonte: Autoria própria.

Os resultados expressos na Tabela 2 mostram que o fármaco nimesulida foi incorporado nas matrizes sob estudo. Aplicando-se ANOVA *One-Way* com pós-teste de Tukey e um nível de confiança de 95% observou-se que existe diferença significativa ($F_{cal} > F_{tab}$ e $p < 0,05$) apenas entre os valores de teor médio e percentual médio entre a MCO original e a reticulada e entre a MCO original e a MCO-QTS (1:1) reticulada.

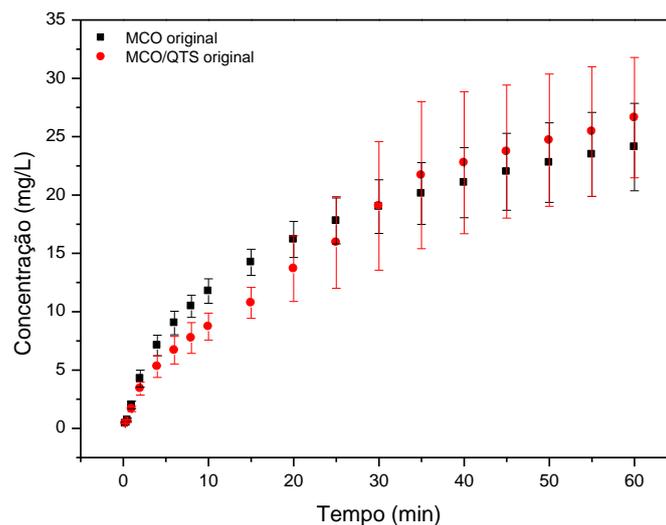
Em geral, as taxas de incorporação de nimesulida nas matrizes sob estudo foram baixas, ficando entre 11,68 ± 1,71% e 17,68 ± 1,37% em massa. Em 2005, Freitas e Marchetti prepararam microesferas de poliácido láctico (PLA) com nimesulida incorporada usando o método de emulsão e evaporação de solvente. Os autores conseguiram uma elevada taxa de incorporação deste fármaco, a qual atingiu cerca de 70% em massa. O método adsortivo usado no presente trabalho normalmente revela baixas taxas de incorporação. Este método foi usado tendo em vista que a MCO é uma matriz insolúvel e, portanto, dificulta a obtenção de um sistema monolítico com o fármaco disperso na matriz de forma mais concentrada e homogênea.

Huerta, Aberturas e Molpeceres (2015) prepararam nanopartículas de PLGA (poliácido láctico-co-ácido glicólico) e PLGA/Quitossana contendo nimesulida incorporada usando o método de emulsão e evaporação de solvente. Estes também conseguiram elevadas taxas de incorporação deste fármaco, atingindo cerca de 88% e 83% em massa para as nanopartículas de PLGA e PLGA/Quitossana, respectivamente.

5.7. Liberação da nimesulida a partir das matrizes poliméricas

Os estudos de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes foram realizados usando o sistema de fluxo fechado proposto neste trabalho, o qual mimetiza o funcionamento do aparelho dissolutor conhecido como aparato 4 da USP ("*Flow-Through Dissolution System*"). O dissolutor de fluxo contínuo (aparato 4) é considerado um instrumento para avaliar o perfil de liberação de fármacos a partir de formulações modificadas de liberação prolongada, e seu uso vem crescendo em termos de aceitação e aplicação pela indústria farmacêutica. As formas farmacêuticas que podem ser avaliadas usando este tipo de dissolutor são diversas, podendo-se citar: supositórios, semi-sólidos, pós, grânulos, micropartículas etc. (MOURA, 2010). A Figura 35 mostra o perfil de liberação de nimesulida expressa como concentração cumulativa a partir das matrizes originais sob estudo.

Figura 35. Perfil de liberação de nimesulida em termos de concentração cumulativa a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) originais.



Fonte: Autoria própria.

Analisando o perfil de liberação de nimesulida a partir da MCO original e da blenda MCO-QTS (1:1) original (Figura 31) pode-se notar uma grande semelhança entre ambos. Fazendo uma comparação estatística dos valores médios de concentração cumulativa, empregando-se o teste ANOVA *One-Way* com pós-teste de Tukey e um nível de confiança de 95%, constatou-se que não existe diferença

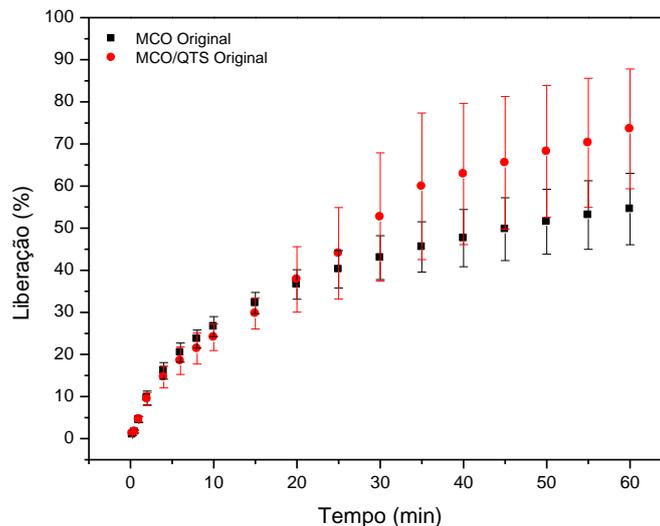
significativa entre os mesmos. Assim, poderíamos dizer que ambas as matrizes não reticuladas se comportam de maneira semelhante frente à liberação de nimesulida incorporada em meio aquoso que mimetiza o pH intestinal (pH 7,4).

Na Figura 35 é possível perceber que o processo ocorre em duas etapas, sendo uma fase inicial de liberação rápida (início da curva), que pode estar associada à liberação do fármaco adsorvido na superfície das matrizes, e uma fase de liberação lenta (região mediana e terminal da curva), que pode ser resultante da saída da nimesulida que estava aprisionada nas cavidades dos biomateriais através da passagem por entre os poros. Este comportamento é conhecido como "efeito *burst*", sendo comumente observado em estudos de liberação de fármacos aprisionados em sistemas matriciais monolíticos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). O tempo de exposição das matrizes no meio aquoso em pH 7,4 é um fator que contribui para a liberação do fármaco aprisionado mais internamente nas matrizes, uma vez que tais condições podem favorecer um relaxamento das cadeias poliméricas, elevar a permeabilidade do solvente e expandir os poros dos biomateriais.

A Figura 36 mostra o perfil de liberação de nimesulida expressa como liberação cumulativa percentual a partir das matrizes originais sob estudo. Cabe salientar que neste tipo de gráfico deve-se considerar o teor médio de nimesulida em cada matriz. Assim, considerando que nos estudos de liberação foi utilizada a massa de 25,0 mg de MCO e blenda MCO-QTS (1:1) originais, é válido informar que nestes sólidos a massa total de nimesulida incorporada obtida experimentalmente foi de 4,42 mg e 3,62 mg, respectivamente. Assim, a obtenção destas massas do fármaco modelo no fluido intestinal simulado irá refletir a condição de 100% de liberação.

Observando as características das curvas da Figura 36, observa-se que os estudos de liberação de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) originais demonstraram, em termos de liberação cumulativa percentual, valores estatisticamente diferentes somente após 30 minutos de liberação, considerando o teste ANOVA *One-Way* com pós-teste de Tukey e um nível de confiança de 95%.

Figura 36. Liberação cumulativa percentual de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) originais.



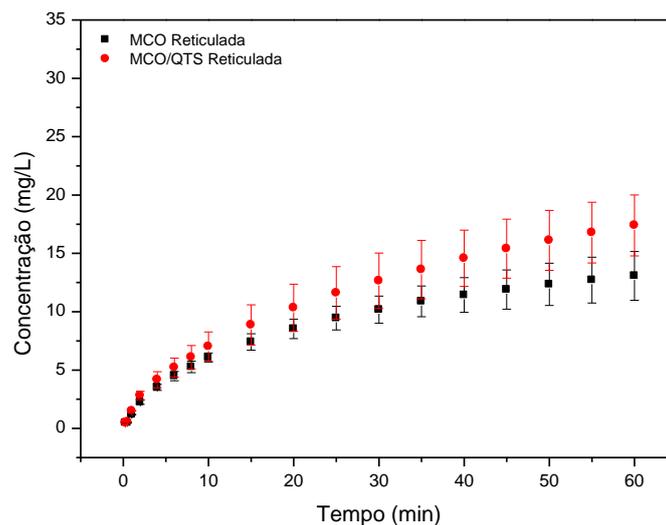
Fonte: Autoria própria.

Ainda considerando a Figura 36, a liberação do fármaco a partir destas matrizes não reticuladas atingiu, após o tempo de 1 h, valores de $54,55 \pm 8,48\%$ e $73,57 \pm 14,24\%$ para a MCO e blenda MCO-QTS (1:1), respectivamente. Considerando o tempo de 1 h e o percentual de liberação alcançado, tais matrizes não reticuladas podem comportar-se como sistemas de liberação prolongada. Segundo a FDA ("*Food and Drug Administration*"), um sistema de liberação imediata deve servir apenas de suporte da substância ativa, pouco interferindo nas características de liberação do fármaco, devendo liberar 85% do fármaco entre 15 e 60 minutos (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Desta maneira, as matrizes poliméricas sob estudo poderiam atuar como veículos sólidos de nimesulida, conseguindo prolongar a liberação deste fármaco.

Para fins de comparação, Ruela, Araújo e Pereira (2009) realizaram um estudo do perfil de dissolução de comprimidos convencionais de nimesulida de 100 mg empregando-se o mesmo meio de liberação que o do presente estudo (tampão fosfato pH 7,4 com polissorbato 80). No trabalho destes autores, onde foi usado o aparato 2 da USP (pá agitadora) como sistema de liberação, foi obtido um percentual de liberação do fármaco em torno de 95% com 1 h de ensaio, uma taxa esperada para formas farmacêuticas de liberação imediata.

Diante destes resultados, e visando reduzir a velocidade de liberação e obter matrizes com comportamento semelhante a sistemas de liberação prolongada de fármacos, optou-se em reticular as cadeias poliméricas usando uma solução ácida de CaCl_2 , um processo *in vitro* de calcificação da MCO estudado por Wu e colaboradores (1995). O objetivo prático desta reticulação é promover um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas por intermédio dos íons cálcio (Ca^{2+}), uma vez que a composição proteica da MCO favorece a formação de interações iônicas entre estes cátions e grupos de ácidos carboxílicos existentes nas cadeias de aminoácidos da membrana. Esse maior entrelaçamento de cadeias ajuda a reduzir a porosidade do material, fato que pode dificultar a permeabilidade do solvente e do fármaco nas matrizes. A Figura 37 mostra o perfil de liberação de nimesulida expressa como concentração cumulativa a partir das matrizes reticuladas sob estudo.

Figura 37. Perfil de liberação de nimesulida em termos de concentração cumulativa a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) reticuladas.



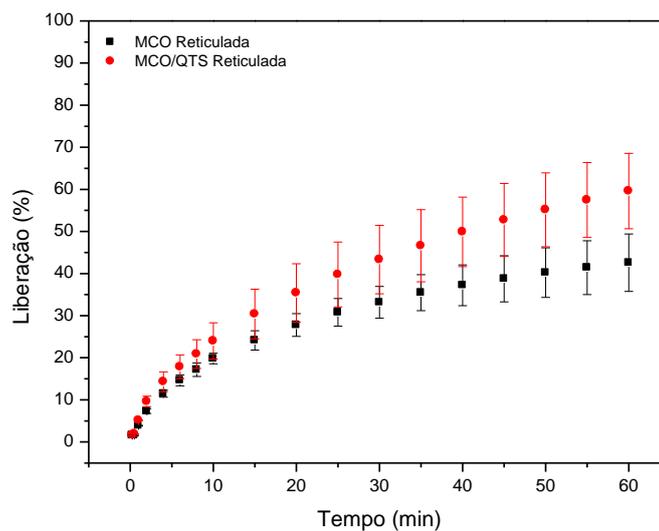
Fonte: Autoria própria.

Analisando o perfil de liberação de nimesulida a partir da MCO reticulada e da blenda MCO-QTS (1:1) reticulada (Figura 37), novamente percebe-se uma grande semelhança entre ambos, fato comprovado estatisticamente empregando-se o teste ANOVA *One-Way* com pós-teste de Tukey e um nível de confiança de 95%. O teste estatístico revelou que não existe diferença significativa entre os perfis de liberação

expresso em termos de concentração cumulativa. Assim, ambas as matrizes reticuladas se comportam de maneira semelhante frente à liberação de nimesulida incorporada em meio aquoso que mimetiza o pH intestinal (pH 7,4).

Neste estudo foi observada uma redução da concentração de nimesulida liberada ao longo de 1 h a partir das matrizes reticuladas e tomando-se como referência estas mesmas matrizes não reticuladas. Este comportamento pode ter sido decorrente da redução do teor médio de fármaco em cada matriz. É válido informar que em 25,0 mg de MCO e blenda MCO-QTS (1:1) reticuladas, a massa total de nimesulida incorporada foi de 3,07 mg e 2,92 mg, respectivamente. Desta maneira, o gráfico de perfil de liberação de nimesulida expresso como liberação cumulativa percentual a partir das matrizes reticuladas sob estudo pode demonstrar melhor o perfil de liberação. A Figura 38 exibe a liberação cumulativa percentual de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) reticuladas.

Figura 38. Liberação cumulativa percentual de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) reticuladas.



Fonte: Autoria própria.

Observando as características das curvas da Figura 38, ver-se que os estudos de liberação de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS (1:1) originais demonstraram, em termos de liberação cumulativa percentual, valores

estatisticamente diferentes somente após 45 min de liberação, considerando o teste ANOVA *One-Way* com pós-teste de Tukey e um nível de confiança de 95%.

Na Figura 38 percebe-se que a liberação do fármaco a partir destas matrizes reticuladas atingiu, após o tempo de 1 h, valores de $42,57 \pm 6,81\%$ e $59,60 \pm 8,96\%$ para a MCO e blenda MCO-QTS (1:1), respectivamente. Considerando o tempo de 1 h e o percentual de liberação alcançado, assim como o preconizado pela FDA, tais matrizes reticuladas também podem comportar-se como sistemas de liberação prolongada uma vez que exibiram uma taxa de liberação menor que 85% ao longo de 1 h de experimento *in vitro*.

Comparando-se o percentual de liberação de nimesulida ao longo de 1 h a partir da MCO original ($54,55 \pm 8,48\%$) e reticulada ($42,57 \pm 6,81\%$), assim como, da blenda MCO-QTS (1:1) original ($73,57 \pm 14,24\%$) e reticulada ($59,60 \pm 8,96$), observa-se que tais valores são estatisticamente iguais diante do teste *t* não pareado e considerando 95% de nível de confiança. Desta maneira, pode-se dizer que o procedimento de reticulação das matrizes usando CaCl_2 não conseguiu interferir de forma significativa na liberação do fármaco nimesulida e, conseqüentemente, não conseguiu prolongar a liberação do ativo.

5.8. Aplicação de modelos teóricos aos resultados de liberação

Os modelos cinéticos teóricos dependentes de ordem zero, primeira ordem e Higuchi foram aplicados aos resultados dos ensaios de liberação do fármaco nimesulida a partir das matrizes poliméricas sob estudo, usando as recomendações dos modelos. Os parâmetros dos modelos teóricos calculados seguem dispostos na Tabela 3.

Observando os dados da Tabela 3 pode-se perceber que os dados de liberação foram melhor ajustados ao modelo cinético teórico dependente de Higuchi. Tal afirmação é feita baseando-se nos valores de coeficiente de determinação (R^2) obtidos, os quais tiveram maior proximidade da unidade. O modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos hidrossolúveis ou pouco solúveis a partir das matrizes como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser aplicado para descrever a liberação de ativos a partir de diversas formulações farmacêuticas, mas considera que as matrizes devem ser planares, heterogêneas,

semi-sólidas ou sólidas, e que não sofrem alterações estruturais significativas na presença de água. Considerando ainda este modelo, o tipo de fármaco, sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Tabela 3. Parâmetros dos modelos cinéticos teóricos da liberação de nimesulida a partir da MCO e da blenda MCO-QTS originais e reticuladas.

Modelo dependente de ordem zero			
Matriz polimérica	R²		
MCO original	0,8775		
MCO-QTS (1:1) original	0,9784		
MCO reticulada	0,8986		
MCO-QTS (1:1) reticulada	0,9332		
Modelo dependente de primeira ordem			
Matriz polimérica	R²	K₁	Q_ocal*
MCO original	0,9352	-0,0127	3,92
MCO-QTS (1:1) original	0,9929	-0,0222	3,45
MCO reticulada	0,9358	-0,0039	2,81
MCO-QTS (1:1) reticulada	0,9782	-0,0064	2,67
Modelo dependente de Higuchi			
Matriz polimérica	R²	K_H	
MCO original	0,9824	0,3330	
MCO-QTS (1:1) original	0,9925	0,3806	
MCO reticulada	0,9949	0,1808	
MCO-QTS (1:1) reticulada	0,9992	0,2392	

* **MCO original (Q_oexp = 4,42 mg)**, MCO-QTS (1:1) original (Q_oexp = 3,62 mg), MCO reticulada (Q_oexp = 3,07 mg) e MCO-QTS (1:1) reticulada (Q_oexp = 2,92 mg).

Fonte: Autoria própria.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção e caracterização da membrana da casca do ovo (MCO).

A mesma foi incorporada a quitosana para obtenção de uma blenda nas concentrações 1:3, 1:1, 3:1. Após análise dos resultados dos testes de MEV e FTIR foi possível identificar a aplicação da blenda MCO-QTS 1:1 como sendo a mais adequada para uso nos ensaios de liberação.

Os estudos de incorporação foram realizados com a MCO, individualmente, e da blenda MCO:QTS (1:1).

Tendo em vista os estudos de liberação, pôde-se observar que os dois materiais usados obtiveram resultados promissores no uso da liberação prolongada do fármaco.

O trabalho mostrou a possibilidade de se obter um sistema de liberação prolongada de boa eficiência e baixo custo/benefício.

PERSPECTIVAS FUTURAS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados obtidos no trabalho é possível vislumbrar o uso de outros fármacos de baixa solubilidade nos ensaios de liberação, além do uso de outras técnicas, como por exemplo testar outros agentes reticulantes para avaliar se há uma melhoria nos resultados, podendo ainda expandir o número de técnicas de caracterização dos materiais.

Testes com percentuais diferentes das matrizes poliméricas e/ou dos fármacos modelo podem ser realizados com o intuito de averiguar os melhores resultados frente a liberação prolongada de um fármaco.

Considerando-se os resultados obtidos até o presente, os mesmos serão escritos e enviados para publicação em periódicos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; KUMAR, R.; HASEEB, S. Adsorption of Cu^{2+} from aqueous solution onto iron oxide coated eggshell powder: Evaluation of equilibrium, isotherms, kinetics, and regeneration capacity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 353-359, 2012.

ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos** - 9.Ed. Editora: Artmed, Cap. 9., pág. 263, 2013.

ALVES, L. D. S.; LYRA, M. A. M.; ROLIM, L. A.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM-NETO, P. J. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicada**, 33(1), 17-25, 2012.

ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9^o ed., Porto Alegre: Artmed, 2013.

AUGUSTO, R. S. 2015. **Caracterização do insumo nimesulida e desenvolvimento de uma formulação de comprimidos de liberação imediata**. Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; PEREIRA, A. V.; STULZR, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química nova**, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

BALÁŽ, M. Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 9, p. 3827-3843, 2014.

BIZERRA, AL.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BORON, L. 2004. **Citrato de cálcio da casca do ovo: biodisponibilidade e uso como suplemento alimentar**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BRADY, J. E; DÜRIG, T.; SHANG, S. Chapter 9 - **Polymer Properties and Characterization**. In: (Ed.). Developing Solid Oral Dosage Forms. San Diego: Academic Press, p.187-217, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 852 p., 2 v/il., 2010.

BRASIL. Resolução N. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, p. 104, 02 jun 2003.

BROMAN, E.; KHOO, C.; TAYLOR, L.S. A comparison of alternative polymer excipients and processing methods for making solid dispersions of a poorly water soluble drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n.1, p. 139-51, 2001.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica**. V 1. 4ª Ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BRUSCHI, M. L.; PANZERI, H.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G.; GREMIÃO, M. P. D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 29-47, 2006.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciências dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber Editora. 2ª ed. São Paulo, 2002.

CATONI, S.E.M.; GOMES, C.A.T.; TRINDADE, K.N.S.; SCHNEIDER, A.L.S.; SOLDI, V.; PEZZIN, A.P.T. Obtenção de blendas de PHB/PEG para matrizes de sistemas micro- e nanoestruturados visando aplicação em liberação controlada de fármacos. **Anais de evento**: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2010.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico]. Porto Alegre: EDIPUCRS, 60 p, 2007.

DE PAOLI, M.A. **Degradação e estabilização de polímeros**. Editado por João Carlos de Andrade. Chemkeys, 2ª versão on-line (revisada). 2008.

FREITAS, M. N.; MARCHETTI, J. M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 201–211, 2005.

GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; LEITE FILHO, C.A.; MEDEIROS, F.S. Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de Brønsted Lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1236-1241, 2013.

GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43-74, 2004.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

HINCKE, M.T.; NYS, Y.; GAUTRON, J.; MANN, K.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A.B.; MCKEE, M.D. The eggshell: Structure, composition and mineralization. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 4, p. 1266-1280, 2012.

HUERTA, C.; ABERTURAS, M. R.; MOLPECERES, J. Nimesulide-loaded nanoparticles for the potential adjuvant treatment of prostate cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, p. 152–160, 2015.

KHAN, S. A.; AHMAD, M.; MURTAZA, G.; AAMIR, M. N.; REHMAN, N.; KOUSAR, R.; RASOOL, F.; AKHTAR, M. Formulation of Nimesulide Floating Microparticles Using Low-viscosity Hydroxypropyl Methylcellulose. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 293-299, 2010.

KIM, S. K.; PARK, P. J.; YANG, H. P.; HAN, S. S. Subacute toxicity of chitosan oligosaccharide in Sprague-Dawley rats. **Arzneimittelforschung/Drug Research**, v. 51, n. 9, p. 769-774, 2001.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, S. M.; GRASS, G.; KIM, G. M.; DRESBACH, C.; ZHANG, L.; GÖSELE, U.; KNEZ, M. Low-temperature ZnO atomic layer deposition on biotemplates: Flexible photocatalytic ZnO structures from eggshell membranes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 19, p. 3608-3614, 2009.

LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNE, J. Recent Advances in Inducible Cyclooxygenase (COX-2) Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1041-1062, 2000.

LI, Y.; WANG, L.; WU, L.; ZHANG, X.; LI, X.; GUO, Z.; LI, H.; IORQUE, P.; SHUANGYING, G.; ZHANG, J. Bio-mimetic drug delivery systems designed to help the senior population reconstruct melatonin plasma profiles similar to those of the healthy younger population. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 60-66, 2014.

LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, 1, 149–173, 2010.

LIU, J.; CAO, F.; ZHANG, C.; PINGA, Q. Use of polymer combinations in the preparation of solid dispersions of a thermally unstable drug by hot-melt extrusion. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 4, p. 263-272, 2013.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LUNA, C. B. B.; SILVA, D. F.; BASÍLIO, S. K. T.; ARAÚJO, E. M.; SILVA, A. L.; BEZERRA, A. F. C. Desenvolvimento de Blendas Poliméricas visando a Tenacificação dos Polímeros: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 67-80, 2015.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L. S.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MALCOLM, S. *Polymer Chemistry: An Introduction*. 3ª ed. New York, 1999. In ANJOS, D. S. C. 2006. **Blendas de PDMS-PMMA: Preparação e Compatibilização com organosilano**. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MOURA, R. K. P. 2010. **Avaliação in vitro das características de liberação de indometacina a partir de dispositivos oculares implantáveis**. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2010.

NAKANO, T.; IKAWA, N. L.; OZIMEK, L. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. **Poultry Science**, v. 81, p. 510-514, 2003.

NALLURI, B. N.; CHOWDARY, K. P. R.; MURTHY, K. V. R.; HAYMAN, A. R.; BECKET, G. Physicochemical characterization and dissolution properties of nimesulide-cyclodextrin binary systems. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2003.

NICOLETTI, C. D.; FRASSON, A. P. Z. Formas de liberação controlada: revisão bibliográfica e avaliação comparativa da qualidade de comprimidos retard de nifedipina 20 mg de referência e similar. **Revista Contexto e Saúde**, v. 5, n. 10, p. 65-74, 2006.

NUNES, E. C. D.; LOPES, F. R. S. **Polímeros: Conceitos, estrutura molecular, classificação e propriedades**. 1 ed. São Paulo: Editora Érica/Saraiva, 2014.

PALUSZKIEWICZ, C.; STODOLAK, E.; HASIK, M. BLAZEWICZ, M. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 4, p. 784-8, 2011.

PANITH, N.; WICHAPHON, J.; LERTSIRI, S.; NIAMSIRI, N. Effect of physical and physicochemical characteristics of chitosan on fat-binding capacities under in vitro gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 25-32, 2016.

PARAMESWARANPILLAI, J.; THOMAS, S.; GROHENS, Y. **Polymer Blends: State of the Art, New Challenges, and Opportunities**. 1 ed. Wiley-VCH Verlag, p. 1-6, 2015.

PEZZINI, B. R.; SEGATTO SILVA, M. A.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 492-501, 2007.

PIVSA-ART, W.; CHAIYASAT, A.; PIVSA-ART, S.; YAMANE, H.; OHARA, H. Preparation of Polymer Blends between Poly(Lactic Acid) and Poly(Butylene adipate-co-terephthalate) and Biodegradable Polymers as Compatibilizers. **Energy Procedia**, v. 34, p. 549-554, 2013.

PRABAHARAN, M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal Biomaterials Applications**, v. 23, n. 1, p. 5-36, 2008.

PUNDIR, C.S.; BHAMBI, M.; CHAUHAN, N. S. Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination, **Talanta**, v. 77, p. 1688-1693, 2009.

RABASSEDA, X. Safety profile of nimesulide: Ten years of clinical experience. **Drugs Today**, v. 33, p. 41-50, 1997.

RAY, P. G.; ROY, S. Eggshell membrane: A natural substrate for immobilization and detection of DNA. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 404-410, 2016.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação *in vitro* de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 34, n. 1, p. 13-23, 2005.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

SALAZAR, M. J. C. 2015. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos. Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos. 2015.

SANPHUI, P.; SARMA, B.; NANGIA, A. Phase transformation in conformational polymorphs of nimesulide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2287-2299, 2011.

SARKER, S.D., NAHAR, L. **Chemistry for pharmacy students: general, organic, and natural product chemistry**. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

SILVA, P. L.; GOMES, A. M. M.; RICARDO, N. M. P. S.; MACHADO, T. F. Elaboração e caracterização de blendas de amido fosforilado com quitosana e PVA. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 450-455, 2016.

SILVERSTEIN, M.; WEBSTER, R.; KIEMLE, D. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª edição. VitalBook file. LTC. 2006.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, v. 6, n. 9, p. 1254-1276, 2011.

SRIVASTAVA, A.; MATTIASSON, B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 10, p. 1205-1237, 2007.

TONHI, E.; PEPLIS, A. M. G.; Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

VAN KREVELEN, D. W. Capítulo 1 - Polymer Properties. In: (Ed.). **Properties of Polymers**, 4ª edição, p.3-5, revisado por K. Te Nijenhuis. Amsterdam: Elsevier, 2009.

VIEIRA, V. M. M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **E&G: Economia e Gestão**, v. 6, n. 13, 2006.

WU, B.; ZHANG, G.; SHUANG, S.; CHOI, M. M. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 546-553, 2004.

WU, T. M.; RODRIGUEZ, J. P.; FINK, D. J.; CARRINO, D. A.; BLACKWELL, J.; CAPLAN, A. I. Crystallization studies on avian eggshell membranes - Implications for the molecular factors controlling eggshell formation. **Matrix Biology**, v. 14, p. 507-513, 1995.