

**JOSÉ LUIZ FERREIRA CINMAN**

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DINÂMICO PARA AVALIAÇÃO  
DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

**ASSIS**

**2014**

**JOSÉ LUIZ FERREIRA CINMAN**

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DINÂMICO PARA AVALIAÇÃO  
DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca da F.C.L. – Assis – UNESP

Cinman, José Luiz Ferreira  
C575d      Desenvolvimento de um novo sistema dinâmico para avaliação da liberação de fármacos / José Luiz Ferreira Cinman. - Assis, 2014  
59 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista.  
Orientador: Dr. Rondinelli Donizetti

1. Biotecnologia farmacêutica. 2. Polímeros na medicina.  
3. Membranas (Biologia). 4. Fármacos. 5. Látex. I. Título.

**CDD 615.19**

Dedico este trabalho primeiramente à minha família, hoje composta de irmão e irmãs, que sempre me apoiaram, de forma justa e adequada, para que não me faltasse nada do possível em minha jornada... Obrigado minha mãe Maria Irene Zanirato.

Faço questão de agradecer à presença importante em minha vida de alguns amigos que dia a dia fazem a grande diferença: Otávio H. Souza, Jacira Brugnolli, Beatriz de Souza, Leonardo Aurélio Bompani, Afonso A. Neto, Carmem Luiza da Silveira, André Luiz da Silveira e Felipe Azevedo Borges.

Agradeço aos professores pesquisadores que estiveram ao meu lado durante todo este projeto, em especial ao meu orientador Rondinelli Donizetti Herculano, pela competência, dedicação e paciência.

## **Agradecimentos**

Agradecer é o mesmo que dizer que me importo, que reconheço e que retribuo.

Assim, agradeço a todos que de alguma forma construtiva me trouxeram até aqui.

Agradeço à minha família e aos pais que já não tenho, por todo o bom exemplo de vida.

Agradeço meus amigos mais próximos, sem deixar de me importar e reconhecer a todos os amigos que tenho.

Agradeço aos professores, em especial ao meu amigo e orientador Rondi, mas também a todos os funcionários do campus com os quais convivi, que no dia a dia contribuem para o bom funcionamento da universidade, querida Amábile.

Agradeço aos novos amigos, que compartilharam comigo tantos momentos felizes de trabalho duro e intenso durante os dois anos curso. Agradeço ao irmão Projeto, alma ímpar num mundo tão complicado.

E agradeço a Deus, por permitir que hoje eu me sinta feliz. Desejo a todos a mesma felicidade.

**“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”**

Antoine de Saint-Exupéry

Cinman, José Luiz Ferreira. **DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DINÂMICO PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

### RESUMO

Sistemas de liberação de fármacos tornaram-se importantes no campo da farmacologia e da biomedicina, uma vez que podem reduzir a dose terapêutica através da liberação local e evitar possíveis efeitos da droga durante sua passagem pelo organismo. Biomembranas de látex natural extraído da *Hevea brasiliensis* têm mostrado interessantes resultados na área da biomedicina por apresentarem proteínas que estimulam a angiogênese, acelerararem processos de cicatrização, constituírem próteses e pelo bom desempenho como matriz para liberação de fármacos, extratos vegetais, nanopartículas e proteínas. Este trabalho apresenta a elaboração e a utilização de um novo sistema, dito dinâmico, onde a liberação se dá sob fluido circulante e utilizando biomembranas de látex natural como carreador da liberação. A fim de complementar as propriedades cicatrizantes do látex, foi escolhido o cetoprofeno como modelo de fármaco, devido à sua ação antiinflamatória, analgésica e antipirética, de uso veterinário e humano. As biomembranas foram produzidas misturando látex natural com uma solução de cetoprofeno pelo método de deposição, e secas à temperatura ambiente. Um novo sistema dinâmico para liberação de fármacos com fluxo circulante foi implementado, onde foram comparados resultados de liberações estáticas (sem fluxo) e dinâmicas, em mesmas condições, a fim de se obter a influência do fluxo na liberação. As biomembranas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e teste mecânico de tração. Os resultados de MEV mostram a existência de fármaco superficial nas membranas e os resultados de FTIR mostram que não há interação entre o biomaterial e o fármaco, porém o cetoprofeno torna a biomembra mais frágil com a redução do módulo de Young, da porcentagem de alongamento e tensão de ruptura, indicando que a droga está apenas intercalada na matriz polimérica. Resultados da liberação indicam diferença entre a liberação estática e dinâmica, de forma que a liberação dinâmica libera 30% mais fármaco que a estática. A modelagem matemática mostra que inicialmente a liberação é mais rápida, devido ao fármaco estar presente na superfície, conforme o MEV; e posteriormente mais lenta devido ao fármaco estar no interior da matriz.

Palavras-chaves: Liberação; dinâmico; estático; látex natural; membrana; cetoprofeno; comparação;

Cinman, José Luiz Ferreira. **DEVELOPMENT OF A NEW DYNAMIC SYSTEM FOR EVALUATION OF RELEASE OF DRUGS.** 2014. 59f. Dissertation (Masters in Bioscience) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

#### **ABSTRACT**

*Drug delivery systems have become important in the field of pharmacology and biomedicine, as they may reduce the therapeutic dose through the local release, avoiding possible effects during its passage through the body. Biomembranes made of natural latex extracted from *Hevea brasiliensis* has shown interesting results in biomedicine, by presenting proteins that stimulate angiogenesis, wound healing, constitute prostheses and good performance as a matrix for release of drugs, plant extracts, nanoparticles and proteins. This paper presents the development and use of a new system, said dynamic, where the release occurs from circulating fluid and using natural latex biomembranes as carrier for the releases. In order to supplement its healing properties, ketoprofen was chosen as model drug because of its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties, in the veterinary and human use. Biomembranes were produced by mixing natural rubber latex with a ketoprofen solution by the casting, and dried at room temperature. A new dynamic system for drug delivery with circulating flow was implemented and the static (no flow) and dynamic releases were compared in order to obtain the influence of the flow in the release. The biomembranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and mechanical testing. The SEM results showed the existence of the drug in the surface membranes. The FTIR results showed that there is no interaction between the drug and biomaterial, although the incorporation of ketoprofen makes the biomembranes more fragile by reducing the Young's modulus, elongation at break and tensile strength, indicating that the drug is only interleaved in the matrix polymer. These results indicate differences between static and dynamic release, since the dynamic released 30% more drug than static. Mathematical modeling showed that the initial release is faster due to the ketoprofen be present at the surface, as by SEM; and then is slower due to the ketoprofen be present in the bulk.*

Keywords: Release; dynamic; estatic; natural latex; membrane; ketoprofen; compare

## SUMÁRIO

Resumo .....	7
Abstract .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. Látex Natural como Biomaterial .....	11
1.2. Extração do Látex Natural .....	13
1.3. Cetoprofeno .....	14
1.3.1. Processos inflamatórios .....	14
1.3.2. Antiinflamatório Cetoprofeno .....	15
1.4. Sistema de Liberação Controlada (SLC) .....	16
2. OBJETIVOS .....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
3.1. Aquisição dos Materiais .....	17
3.2. Solução hidroetanólica de cetoprofeno .....	18
3.3. Confeção das Membranas .....	18
3.4. Sistema Estático de Liberação Controlada .....	19
3.5. Sistema Dinâmico de Liberação Controlada .....	19
3.6. Caracterização das Membranas de Látex Natural .....	20
3.6.1. Espectrofotômetro UV-VIS .....	20
3.6.2. Máquina de Ensaio Mecânico (Tração) .....	20
3.6.3. Espectro no Infravermelho (FTIR) .....	22
3.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1. Elaboração e construção de um novo sistema "dinâmico" de liberação de fármacos .....	22
4.2. Ensaio de Liberações Controladas de Fármacos .....	26
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	39
4.4. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) .....	41
4.5. Ensaio de Resistência Mecânica (Tração) .....	44
5. CONCLUSÕES .....	47
6. REFERÊNCIAS .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido quando verificamos que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos) [1-3].

Com o advento dos novos biomateriais surgem inúmeras possibilidades de carreadores para as mais diversas substâncias, com propriedades físico-químicas muitas vezes específicas que proporcionam maior eficácia e segurança nos processos medicamentosos, uma vez que possibilitam aplicações mais próximas aos sítios alvos [4-7].

A associação de fármacos, compostos naturais e nanopartículas às biomembranas poliméricas ressalta o quanto a liberação controlada de fármacos é um tópico importante para várias iniciativas em nanotecnologia, isto devido aos impactos para a sociedade, com a criação de sistemas otimizados que garantam a liberação num sítio específico a uma taxa controlada. Ressaltam-se ainda casos de aplicações guiadas, como as cicatrizações ósseas, onde a biomembrana também funciona como barreira mecânica contra agentes externos infecciosos [8]. Entretanto, existem limitações nos sistemas carreadores existentes, como por exemplo, o tempo de reabsorção do carreador.

Desta forma, surge a necessidade da confecção de um sistema de liberação controlada eficaz que provenha a liberação de fármacos no sítio a ser tratado por períodos prolongados de tempo com uma dose adequada. O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* ((Willd. ex Adr. de Juss) Muller – Agroviensis) foi utilizado como matriz para o “novo” sistema de liberação controlada (SLC) porque tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas [9-13]. Membranas feitas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese.

Trabalhos recentes demonstraram as excelentes propriedades tais como: resistência mecânica, elasticidade, fácil manuseio e baixo custo [13-15].

O grupo de pesquisa “Biomateriais” da FCLAs/UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano estuda a um bom tempo, a liberação prolongada em sistemas estáticos [16-21]. Entretanto, nestes sistemas não ocorre fluxo da solução simuladora de plasma sanguíneo (SBF) nas membranas, ou seja, não há renovação do fluido.

Esta abordagem levou à confecção de um novo sistema dinâmico de liberação que se adequasse melhor ao sistema real de absorção capilar sanguíneo, proporcionando desta forma um estudo com resultados mais reais da liberação controlada. Este sistema foi criado, reproduzido, de forma barata e sustentável, e submetido a inúmeros ensaios de liberação controlada (método UV-VIS), onde foi utilizado o fármaco cetroprofeno como material liberado e tendo a membrana natural de látex como carreador.

Os resultados foram comparados a testes análogos realizados em sistema estático de liberação controlada, sendo, posteriormente, as membranas utilizadas submetidas a testes estruturais, como resistência mecânica à tração, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FTIR) para aferição de possíveis alterações químicas e estruturas devidas à associação do látex natural com o cetoprofeno. Ao final, foram verificadas as vantagens contundentes do novo sistema dinâmico de liberação controlada, bem como as características comportamentais do cetoprofeno perante este sistema de liberação.

### **1.1. Látex Natural como Biomaterial**

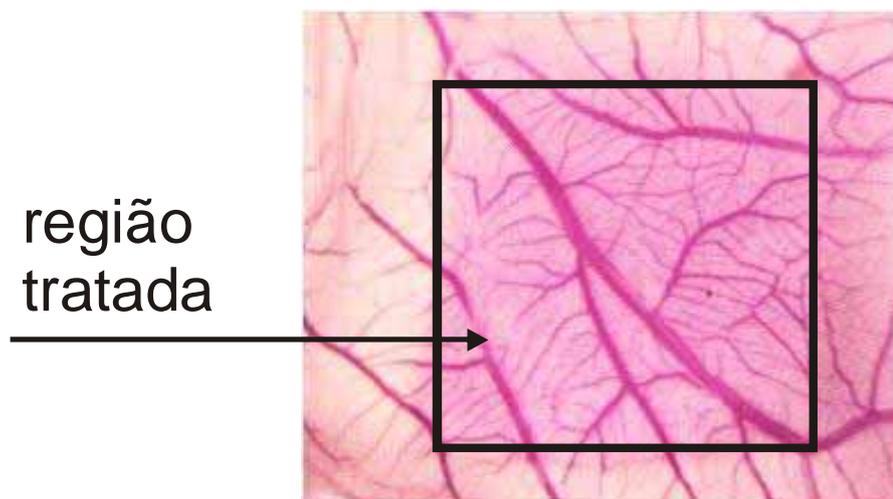
A utilização de biomateriais sintéticos ou naturais, em sua maioria composto por materiais poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos, cresce a cada dia, na confecção de próteses, enxertos e barreiras mecânicas ou de higienização, ocupando, desta forma, espaço significativo nos ambientes de pesquisa de empresas e universidades, onde cada biomaterial tem suas características particulares que o credencia como agente eficiente dentro de um determinado processo [22-25]. De acordo com Ratner et al 2004 [26], e Helmus & Tweden (1995) [27], estes biomateriais devem ser biocompatíveis, não tóxicos, não absorvíveis pelos organismos, de resistência mecânica adequada, de fácil manuseio [28] e, principalmente, sustentáveis, não se esquecendo dos impactos sociais e dos aspectos econômicos.

A utilização destes biomateriais como carreadores de fármacos mais eficientes, na forma de biomembranas aplicáveis em sítios específicos, tem grande importância em diversas áreas da biomedicina [19-21, 29-31]. Desta maneira, torna-se necessário e determinante o estudo detalhado da forma com a qual esta membrana, uma vez em contato com o sítio alvo, irá liberar este fármaco. Taxas de liberação baseadas em intervalos de tempos diferentes, liberação inicial, liberação final, liberação média, tempo de saturação, quantidade total de fármaco liberado, integridade da membrana durante o processo, são as principais variáveis a serem analisadas.

O látex natural (*Hevea brasiliensis*) como biomaterial tem sido bastante utilizado em estudos de biomedicina, devido as suas inúmeras propriedades regenerativas e de sua elevada flexibilidade mecânica, que o torna ideal no uso como barreira mecânica biológica bem como na confecção de diversas próteses flexíveis, tais como esôfagos e pericárdios [16-21, 32-37]. Diversos fármacos, com propósitos variados, passaram a ser agregados a estas membranas, que, além de suas propriedades naturais já citadas, tornaram-se um excelente carreador de fármacos. Estudos recentes apresentam a utilização de nanopartículas agregadas a estas membranas e as formas e taxas de sua liberação [19-21].

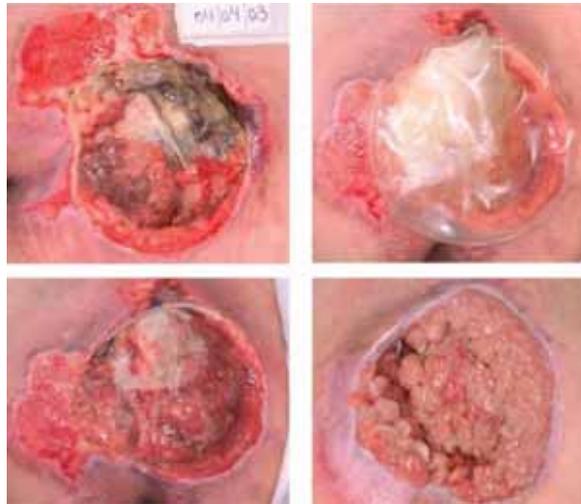
Em processos de regeneração cutânea e óssea [16-18], o látex natural é confeccionado no formato de membranas com boa adesão, excelente biocompatibilidade e pouca absorção pelo organismo. No tratamento de regeneração óssea, as membranas reduzem o tempo de tratamento e proporcionam uma melhor qualidade nos resultados, atuando como barreiras evitando a migração para as camadas ósseas dos fibroblastos que contribuem para uma má cicatrização, impedindo desta forma a criação de tecidos fibrosos não osteogênicos [11].

Estimulante natural da angiogênese [38], as membranas de látex natural aplicadas diretamente sobre os tecidos danificados promovem a sua regeneração. A Figura 1 permite uma boa visualização deste efeito, apresentando um tecido parcialmente tratado por aplicação de membrana de látex natural, onde se observa uma maior irrigação de vasos sanguíneos na região onde a membrana foi aplicada.



[Figura 1] Angiogênese promovida por tratamento com membrana de látex natural [39]

De acordo com Frade et al (2004, 2005 e 2006) [40-42], úlceras de pressão e cutâneas de diabetes (Figura 2) também foram tratadas com membranas de látex natural e apresentaram quadros de recuperação significativos.



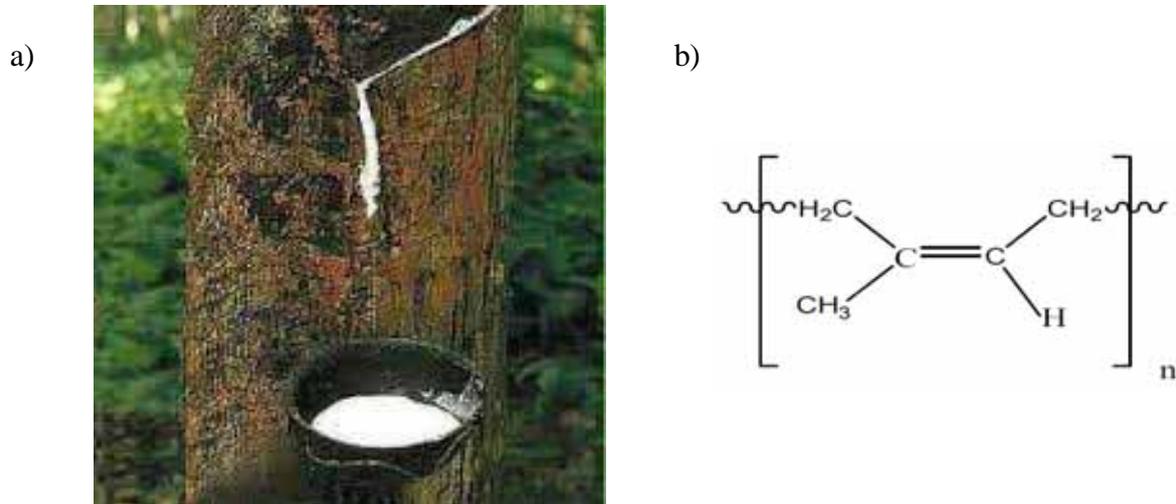
[Figura 2] Evolução da cicatrização da úlcera de pressão através da aplicação da biomembrana de látex [40].

## 1.2. Extração do Látex Natural

Historicamente, o uso da borracha de látex natural (NRL) na sociedade remonta o primeiro milênio, onde há registros da fabricação de bolas e utensílios de látex pelas antigas civilizações das América do Sul e Central, a partir de uma árvore nativa da região. Dotada de propriedades físicas particulares, a borracha de látex natural foi estudada e modificada durante os séculos, onde o isopreno é o monômero responsável pela sua elasticidade. Sua chegada à Europa no século XVI levou à modernização da indústria de polímeros. Em 1839, Nathaniel Hayward, Charles Goodyear e Thomas Hancock aqueceram a borracha natural com enxofre e chumbo branco dando origem a borracha natural vulcanizada, com propriedades superiores às da borracha natural (grande alongamento, alta dureza, alta impermeabilidade, resistência ao estiramento e retração rápida) .

O látex natural (NRL do inglês, *Natural Rubber Latex*) é extraído de uma grande variedade de espécies vegetais, sendo que a seringueira *Hevea brasiliensis*, nativa da região amazônica brasileira, é responsável por 99% do total extraído (Figura 3). Na atualidade, a produção no país (que já foi o primeiro do mundo) é baseada no extrativismo na Amazônia e no cultivo de plantas de alto rendimento adaptadas às regiões Sudeste e Centro-Oeste do País.

O látex natural *in natura* é constituído por moléculas poliméricas (cis-poliisopreno) que formam a borracha, mas também por proteínas, lipídios, açúcares, carboidratos e água [43-45].



[Figura 3] a) Extração do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*; b) Cis-poliisopreno de látex natural.

### 1.3. Cetoprofeno

#### 1.3.1. Processos inflamatórios

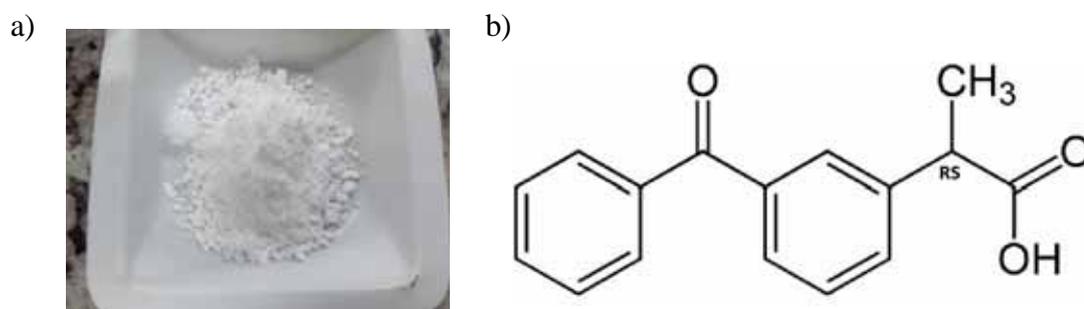
Vastas são as lesões que um determinado organismo pode sofrer, tais como cortes, traumas, queimaduras, disfunções do próprio organismo e aquelas provenientes de processos cirúrgicos. O processo inflamatório é uma resposta do organismo a estas lesões, promovendo uma série de reações em cascata que promovem o reparo de um tecido, no entanto, podem ser bastante prejudiciais atuando como agentes do desenvolvimento de doenças crônicas, como artrite, diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, além de gerarem dor, desconforto e mal estar [46-50]. Sem a inflamação as infecções e os processos deletérios dos tecidos não teriam fim. Surgem então os antiinflamatórios como forma de minimizar os efeitos deste processo, principalmente quando se manifestam de forma aguda. Porém, os efeitos colaterais, possivelmente indesejados, ainda são um tanto quanto desconhecidos e objetos de muitos estudos.

Os antiinflamatórios não esteróides são os mais difundidos no mundo, tanto no tratamento de seres humanos como no de animais. Caracterizados também por seus efeitos analgésicos e antipiréticos, atuam como inibidores das ciclooxigenases (responsáveis pelo

metabolismo do processo inflamatório), levando a diminuição da produção das prostaglandinas (hormônio vasodilatador, relacionado aos efeitos de calor e dor) e tromboxanos (vaso constritores) [46,49].

### 1.3.2. Antiinflamatório Cetoprofeno

O *Cetoprofeno* (*ketoprofenum*),  $C_{16}H_{14}O_3$ , é um fármaco antiinflamatório não-esteróide, derivado do ácido arilcarboxílico e pertencente ao grupo do ácido propiônico [46-50], que se apresenta na forma de um pó cristalino branco (Figura 4).



[Figura 4] a) Aparência cetoprofeno em pó; b) Estrutura química cetoprofeno.

É utilizado tanto na medicina humana como veterinária (animais de pequeno porte) no tratamento de sintomas inflamatórios [51-54], tais como fraturas, processos pré e pós-operatórios, artrites, artroses, lombalgias, contusões, torcicolos, lesões decorrentes de práticas esportivas, infecções de garganta e dismenorréia. Sintetizado como fármaco, tem também efeito analgésico e antitérmico, apresentando efeitos colaterais raros [53-55].

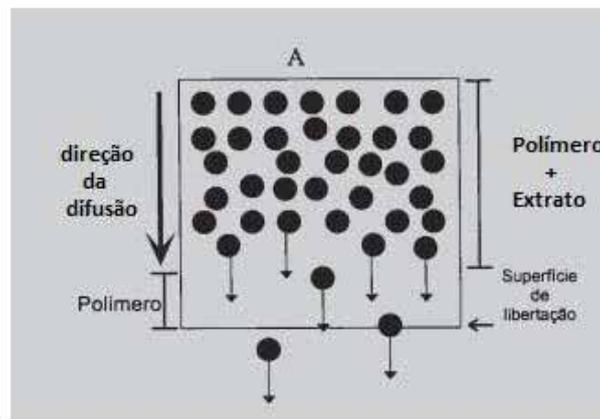
Inibe a atividade da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) para provocar uma diminuição da formação de precursores das prostaglandinas e de tromboxanos, a partir do ácido araquidônico. Os efeitos analgésicos podem implicar no bloqueio da geração do impulso doloroso mediante uma ação periférica por inibição da síntese das prostaglandinas. Como antidismenorréico, diminui as contrações e aumenta a perfusão uterina, alivia as dores isquêmicas e espasmódicas [56].

Em um adulto, a dose usual indicada é de cerca de 200mg ao dia, podendo ser inferior ou superior a este valor, mas nunca excedendo 300mg ao dia [57]. Ministrado nas formas de cápsulas, gotas, géis e injetáveis. Em doses elevadas, deve ser ministrado a cada 24 horas,

devido ao risco de disfunções renais e gastrointestinais, geradas por elevada inibição das prostaglandinas [51].

#### 1.4. Sistema de Liberação Controlada (SLC)

De acordo com Manadas *et al.* (2002) [58], os sistemas cuja liberação é controlada por erosão são preparados pela incorporação do fármaco em polímeros hidrossolúveis (hidrocolóides). De acordo com Trecco *et al* (2014) [59], o látex é hidrofóbico e a difusão é o processo característico nas membranas de látex natural. A liberação de fármacos a partir de membranas poliméricas deste tipo (degradação/erosão) envolve a difusão do meio para o interior da matriz com conseqüente dilatação (Figura 5).



[Figura 5] Processo de difusão em matriz polimérica. (Adaptado de Manadas et al. (2002) [58]).

O processo de liberação controlada de fármacos consiste incorporar uma quantidade conhecida de fármaco em membrana de látex natural, que estará submerso em uma solução liberadora. O contato da solução com a membrana libera gradativamente o fármaco, aumentando sua concentração na solução ao longo do tempo.

A principal função de um sistema de liberação controlada de fármacos é apresentar uma simulação adequada da real taxa de entrega do composto. Dentre os aspectos de relevância, se destaca a influência do sistema circulatório no processo regenerativo de tecidos, fator que é desconsiderado no sistema estático. A circulação leva à renovação do plasma sanguíneo em contato com a membrana, diminuindo os efeitos da saturação, potencializando os choques mecânicos, aumentando a penetrabilidade do plasma nas camadas internas da membrana e gerando um perfil de liberação de maior intensidade e duração [60,61].

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- A elaboração de um sistema funcional de liberação de fármacos, dito dinâmico, com base em fluido circulante.
- Avaliação da interação do cetoprofeno em membranas de látex natural, para entender o comportamento da liberação sustentada;
- Caracterização da taxa de liberação do cetoprofeno pelas membranas no sistema de liberação estático convencional e novo sistema de liberação dinâmico, utilizando-se as técnicas de espectrofotometria de ultravioleta, seguida de comparação dos resultados encontrados;
- Caracterização da forma química e estrutural das membranas, utilizando a microscopia eletrônica de varredura associada a técnica de energia dispersiva de raio-X (MEV-EDS), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e testes de resistência mecânica.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Aquisição dos Materiais

O látex natural utilizado neste projeto de pesquisa foi obtido da BDF Látex (Comércio de Produtos Agrícola Ltda), Guarantã/SP. Depois da extração, o látex foi mantido em fase líquida através da adição de amônia corrigindo a acidez, mantida na ordem de pH igual a 10. Após adição da amônia, o material foi centrifugado a 8000g visando à separação de proteínas alergênicas contidas no látex natural [4].

Foram utilizados para este trabalho os fármacos cetoprofeno em cápsulas (sem insipientes) e ciprofloxacina em pó, obtidos na Farmácia de Manipulação, **CALLITHEA** na cidade de Assis/SP.

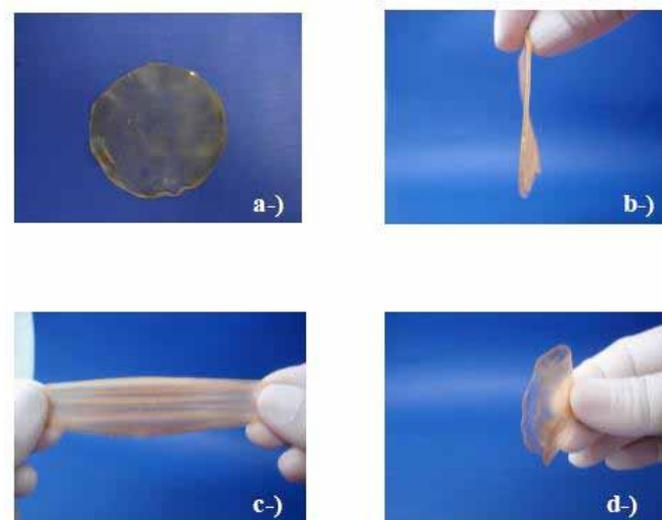
### 3.2. Solução hidroetanólica de cetoprofeno

A comparação entre os resultados encontrados nas liberações dinâmicas e estáticas, que deveria ser o único foco deste trabalho, acabou tendo de levar em conta os efeitos da insolubilidade do cetoprofeno em água.

Foi utilizada solução hidroetanólica contendo 90% de água destilada e 10% álcool (hidroetanólica 10%) em todos os processos de liberação e de confecção das membranas.

### 3.3. Confecção das Membranas

As membranas foram confeccionadas por “*casting*”, através de simples deposição, seguida de secagem, onde a temperatura deste processo influencia diretamente na porosidade do biomaterial, que é fator importante na liberação sustentada. Todas as membranas foram secas em temperatura controlada, a 22°C através da estufa de secagem, contribuindo para a padronização do biomaterial. Além disso, o padrão de confecção gerou membranas para liberação com espessura de  $(1,00 \pm 0,01)$ mm, em forma circular (Figura 8), pois foram depositadas para secagem em placas circulares com cerca de 5,0cm de diâmetro. Os volumes depositados nas placas foram de 6mL de látex natural líquido acrescido de 4mL de solução hidroetanólica 10% com cetoprofeno (5mg/mL ou 10mg/mL), totalizando 10mL por placa. Quantidades menores do que 6mL de látex geraram membranas de difícil acomodação no recipiente de liberação dinâmica, devido a forte perturbação imposta pelo fluido circulante.



[Figura 6] Forma (a); Espessura de 1,0mm (b); Elasticidade (c); Flexibilidade da membrana de látex natural (d). [13]

### 3.4. Sistema Estático de Liberação Controlada

No sistema estático de liberação controlada de fármacos, as membranas são colocadas sobre um volume de solução, que varia de acordo com os interesses da aplicação. Em estudos realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa, a solução liberadora utilizada é água destilada ou solução simuladora de fluido corporal (SBF), por constituir quase a totalidade do plasma sanguíneo. As membranas são menos densas que a água e, desta forma, ocupam a superfície do líquido, situação ideal para liberação. O contato da solução com a membrana promove a liberação gradativa do composto agregado a ela, processo denominado difusão.

Nos testes de liberação estática do nosso Grupo de Pesquisa, as membranas de látex natural são mergulhadas em béqueres com 200mL de solução aquosa ou SBF (Figura 07). Nos testes realizados neste trabalho este valor teve de ser corrigido para 1600mL, valor utilizado e necessário para os testes em sistema dinâmico.

a)



b)



[Figura 07] a) Membrana de Látex Natural, b) Sistema estático de liberação prolongada.

### 3.5. Sistema dinâmico de liberação controlada

As medições em sistema dinâmico de liberação foram feitas utilizando-se a mesma metodologia empregada no sistema estático de liberação, onde basicamente as diferenças se encontram no emprego de uma solução liberadora com fluxo circulante.

### **3.6. Caracterização das Membranas de Látex Natural**

#### **3.6.1. Espectrofotômetro UV-VIS**

No processo de liberação controlada de fármacos os resultados foram caracterizados por espectroscopia óptica (UV-VIS), onde alíquotas da solução liberadora foram coletadas em intervalos de tempos adequados e analisadas no espectrofotômetro LGS53, BEL Photonics. Após coleta dos dados, as informações foram compiladas e discutidas utilizando o software de estatística OriginPro 8 SR4®, da OriginLab Corporation.

As amostras foram colocadas no espectrofotômetro e submetidas à radiações ultravioletas (UV), ajustadas na faixa de 200 a 350nm de comprimento de ondas. Os compostos contidos nas amostras, ao serem irradiados, podem absorver, refletir e transmitir partes da energia incidente. A energia emitida pela amostra é coletada e comparada com a energia emitida pelo aparelho, caracterizando a transmitância (T) da amostra, ou, de através de cálculos, a sua absorbância (A). No processo de liberação controlada de fármacos aqui apresentado, a absorbância foi escolhida como valor a ser medido em todas as liberações realizadas, onde cada composto analisado apresenta pico de absorbância em um comprimento de onda característico.

#### **3.6.2. Máquina de Ensaio Mecânico (Tração)**

Os ensaios mecânicos foram realizados utilizando-se a máquina de ensaio mecânico – EMIC modelo DL 2000 (Figura 07). Membranas em formato diferenciado (halteres) tiveram suas extremidades presas pelas cargas de tração. Ao acionar a máquina o corpo da membrana se deforma, estica, passando pelas três etapas de deformação, até a sua ruptura. Os dados são adquiridos pelo computador que os interpreta gerando tabelas de valores, coeficientes e o gráfico Tensão (Força/Área) X Deformação específica (deformação/comprimento da membrana).

Como resultado de uma caracterização por testes de tração mecânica, é colhido o Módulo de Young, que representa a inclinação da fase linear (elástica) dos testes. Todos os ensaios realizados foram feitos em triplicata e, através do ORIGIN Pro® foi extraído a média e calculado o Módulo de Young para comparação posterior e análise dos resultados.

Nestes ensaios de tração, as membranas foram confeccionadas na forma de halteres com 8mL de látex natural acrescido com 3mL de solução hidroetanólica com ou sem cetoprofeno (5mg/mL).

a)



b)



[Figura 07] Máquina de Ensaio Mecânico EMIC DL 2000 utilizado nas amostras de látex natural.

A Figura 08 mostra um molde com 3 membranas já secas, confeccionadas na forma de halteres e destinadas aos ensaios de resistência mecânica acima citado. Todas elas apresentam mesmo comprimento, mesma largura, mas podendo variar suas espessuras de acordo com a quantidade de látex natural depositado. A temperatura da secagem é um fator que também pode alterar as espessuras das membranas, interferindo nos resultados dos ensaios (dependem da área transversal das membranas), mas, como já mencionado (Seção 3.4), todas as membranas foram secas a 22°C.



[Figura 08] Membranas confeccionadas na forma de halteres para testes de resistência mecânica à tração.

### **3.6.3. Espectro no Infravermelho (FTIR)**

Para realização dos ensaios contidos neste projeto e das análises desta técnica foi utilizado o espectro de FTIR Bruker T 27 do Laboratório de Física, Biofísica e Biomateriais da UNESP/Assis.

O procedimento consiste em pegar amostras de cetoprofeno em pó e membranas de látex natural com e sem cetoprofeno e comparar seus espectros no infravermelho, utilizando-se o modo ATR, a fim de se detectar de que forma o cetoprofeno se interou com o látex natural.

### **3.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica muito versátil usada rotineiramente para análise micro estrutural de materiais sólidos. A imagem vista com um MEV é formada por um feixe de elétrons que passa através da amostra. Os detalhes das características da microestrutura interna tornam-se acessíveis à observação; os contrastes na imagem são produzidos pelas diferenças na dispersão ou difração do feixe que são produzidas entre os vários elementos da microestrutura ou defeitos.

O uso deste procedimento é importante, pois poderemos observar a morfologia da membrana, e o tamanho e distribuição dos fármacos no biomaterial. Esta caracterização será realizada no Grupo de Fotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) coordenado pelo Prof. Dr. Cléber Renato Mendonça.

A interpretação dos resultados é voltada à comparação entre as superfícies de relevo das membranas de látex natural confeccionadas com e sem cetoprofeno, através de elevadas taxas de ampliação das imagens.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Elaboração e construção de um novo sistema "dinâmico" de liberação de fármacos**

Neste projeto, um novo sistema dinâmico de liberação de fármacos foi criado, onde ainda não há uma renovação da solução liberadora, mas que leva em consideração o fluxo sanguíneo dentro do sistema circulatório.

A concepção original do projeto foi baseada na construção de um equipamento constituído de dois vasos comunicantes e de uma bomba hidráulica, encarregada da circulação

do fluido liberador entre estes vasos. No início dos trabalhos, alguns protótipos desse equipamento já estavam prontos, tratando-se de dois recipientes plásticos, interligados por tubo e roscas de PVC (Figura 09), onde uma bomba de aquário, no vaso da direita, capta a solução e a despeja no tubo da esquerda através de uma pequena mangueira.



[Figura 09] Sistema dinâmico original formado por dois vasos unidos por tubo de PVC. A bomba localizada no vaso da direita e uma mangueira de comunicação entre os vasos.

Nesta etapa, o fármaco testado foi a ciprofloxacina, por apresentar resultados bastante conhecidos nos testes de liberação estática por nosso Grupo de Pesquisa [62,63]. Desta forma, foram realizadas liberações estáticas e dinâmicas (em triplicata), concomitantemente e nas mesmas condições, a fins de comparação.

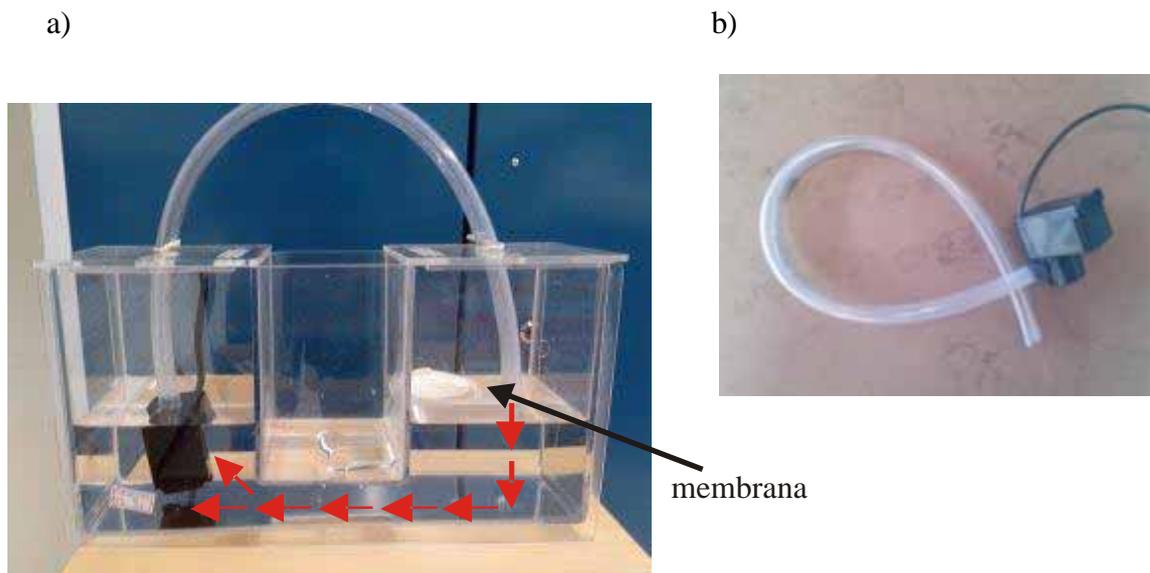
Os resultados obtidos no sistema dinâmico não foram satisfatórios, pois observamos muitas variações controversas nas absorvâncias das alíquotas coletadas. A explicação para este fato reside na retenção de fármaco pelas estruturas internas das bombas durante o processo circulatório, onde pequenas quantidades de ciprofloxacina (fármaco) foram encontradas depositadas em suas hélices. Ressaltamos ainda, que a tubulação de PVC, por apresentar quinas salientes, poderia levar ao mesmo problema de retenção apresentado pelas bombas.

Adicionalmente, com o intuito de analisarmos a homogeneidade do sistema, durante o processo de liberação das membranas de látex, alíquotas do fluido circulante foram coletadas em pontos e profundidades diferentes, no mesmo instante de tempo, nos dois recipientes. Assim, observamos que estas alíquotas apresentaram distintos valores de absorvância, alguns deles bem destoantes, comprometendo, desta forma, a análise correta dos resultados do processo.

Para explicar estas diferenças de valores, são analisados dois aspectos. O primeiro é a posição do tubo de PVC que interliga os vasos, que foi instalado, rigidamente, a alguns centímetros acima das bases dos recipientes. O segundo trata da proximidade inadequada entre a bomba (coleta) e o tubo e entre o tubo e a ponta livre da mangueira. A maior parte do líquido que saía do tubo era imediatamente coletada pela bomba, enquanto, que do outro lado, a maior parte do líquido que saía da mangueira era imediatamente coletada pelo tudo, restringindo o fluxo (Figura 11a) e gerando regiões menos agitadas, que se comportaram como depósitos involuntários do fármaco.

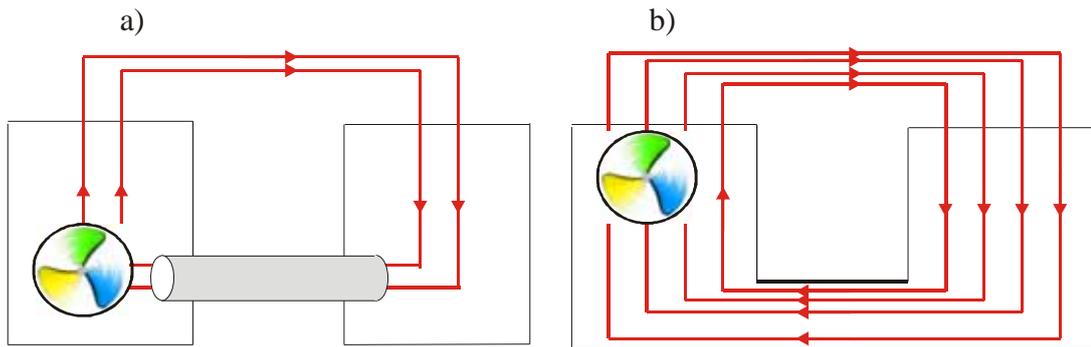
Desta forma, se tornaram necessárias a remodelagem do sistema de vasos comunicantes e a aquisição de bombas peristálticas, as quais não reteriam fármaco durante o processo.

Infelizmente, a aquisição das bombas peristálticas não foi possível, devido aos elevados valores de mercado. Entretanto, a sua utilização é prevista para projetos futuros. A remodelagem dos vasos é apresentada na Figura 10a e a bomba de aquário na Figura 10b.



[Figura 10] a) Sistema dinâmico remodelado em acrílico. b) Bomba sugadora de aquário.

Os vasos comunicantes, agora produzidos em acrílico, foram interligados pelo plano de suas bases. A comunicação das bases é ilustrada pelas setas vermelhas (Figura 10a), permitindo um fluxo mais abrangente e com concentrações uniformes por toda a solução (Figura 11b). Para garantir este resultado, a parte sugadora da bomba e a ponta livre da mangueira foram colocadas o mais próximo possível da superfície do líquido.



[Figura 11] a) Antigo sistema dinâmico, com fluxo restrito. b) Novo sistema dinâmico, com fluxo abrangente.

Devido ao fluxo, as membranas não têm posicionamento fixo, ficando a maior parte do tempo na superfície da solução.

As tampas foram modeladas fornecendo orifícios para respiro, caso sejam necessários, e duas entradas em posições diferentes para a mangueira, que possam servir, quando necessário, como pontos de coleta de solução (Figura 12).



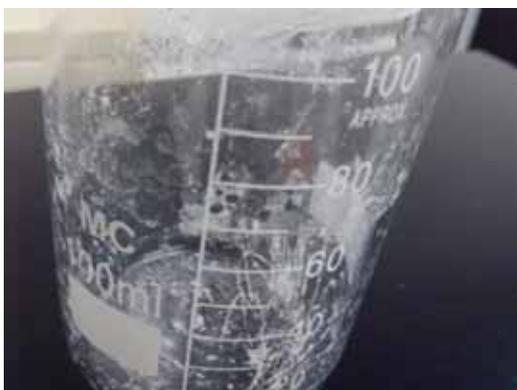
[Figura 12] Tampa com orifícios funcionais.

Foram produzidas 6 unidades deste sistema dinâmico, baixo custo, reproduzíveis e de fácil manuseio, permitindo até 6 liberações simultâneas.

## 4.2. Ensaios de liberações controladas de fármacos

As liberações do cetoprofeno foram realizadas no Laboratório de Física, Biofísica e Biomateriais da Faculdade de Ciências e Letras de Assis/UNESP, utilizando concentrações de 5mg/mL e 10mg/mL de cetoprofeno.

Durante o período do projeto no qual foi desenvolvido o novo sistema de vasos comunicantes para liberação dinâmica, foram feitas as primeiras soluções de cetoprofeno em água destilada. Entretanto, mesmo em baixas concentrações (0,5mg/mL) e com o auxílio de agitadores magnéticos, o fármaco não foi satisfatoriamente dissolvido em água (foram observadas aglutinações e precipitação do composto). Em concentrações mais elevadas, 10mg/mL ou superior, o quadro se agravou. A dissolução foi impossível, com aglutinações e precipitação imediatas (Figura 13), onde o cetoprofeno aderiu espontânea e rapidamente às paredes do recipiente, comprovando sua característica de fármaco insolúvel em água [64]. Todos estes aspectos contribuíram para que as membranas produzidas não fossem homogêneas quanto às quantidades e concentrações de cetoprofeno incorporado.

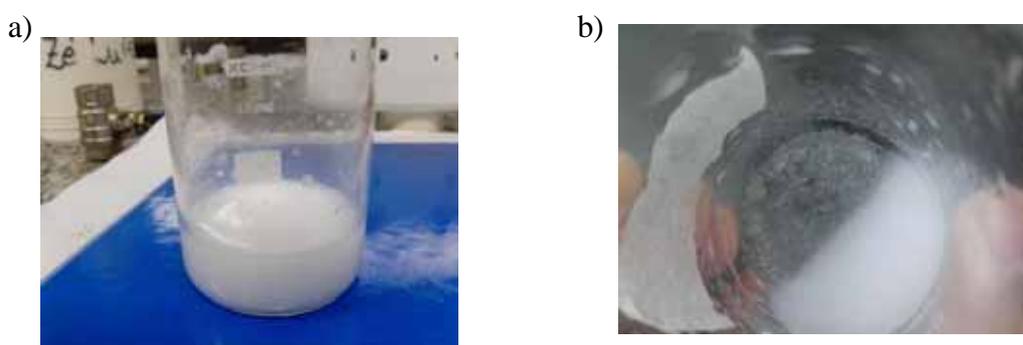


[Figura 13] Resíduos de cetoprofeno em grandes quantidades nas paredes do béquer

De acordo com Gauri [64], o cetoprofeno é insolúvel em água, porém solúvel em etanol, acetona e cloreto de metileno. O etanol foi escolhido, pois possui baixa toxicidade e é facilmente eliminado pela evaporação. Entretanto, observamos que a solução de látex natural em contato com soluções hidroetanólicas com taxas superiores a 50% de álcool vulcaniza (polimeriza) instantaneamente.

Desta forma, o estipulado foi utilizar uma solução hidroetanólica com o mínimo de álcool possível, limitado a 30% de álcool na solução por questão de segurança frente a polimerização.

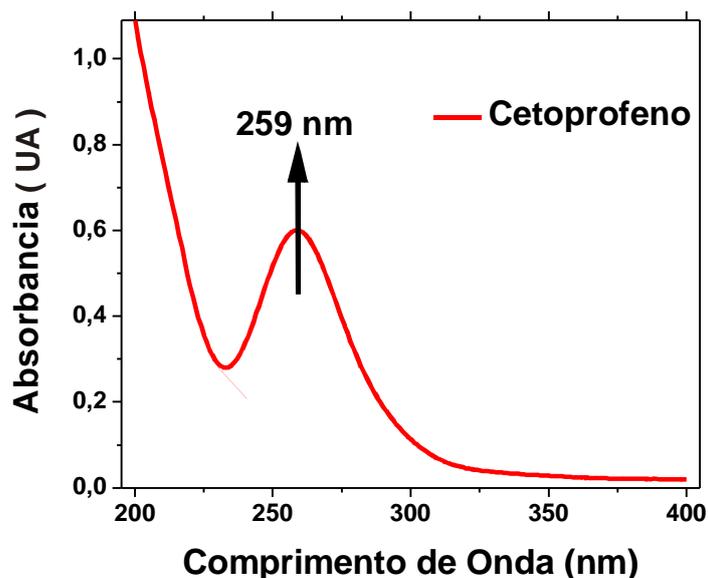
O cetoprofeno foi diluído em soluções hidroetanólicas prontas com 30%, 20% e 10% de álcool, entretanto, não obtivemos uma boa dissolução, assim, solucionamos o problema dissolvendo o cetoprofeno primeiramente em uma solução etanólica (100%) e completando o volume com água destilada, seguida de agitação imediata, obtendo uma solução hidroetanólica 10% com cetoprofeno. Porém, ressalta-se que esta eficácia é temporária, sendo necessária a imediata adição do látex natural à solução, pois, após alguns minutos, ocorrem os processos de precipitação, aglutinação e adesão do fármaco nas paredes do recipiente (Figura 14), principalmente na concentração de cetoprofeno 10mg/mL.



[Figura 14] a) Solução hidroetanólica (10%) de cetoprofeno (5mg/mL) temporariamente homogênea. b) Mesma solução após alguns minutos, apresentando precipitação do fármaco.

Cada membrana foi confeccionada adicionando-se 6mL de látex natural líquido a 4mL de solução hidroetanólica com cetoprofeno nas concentrações 5mg/mL ou 10mg/mL, totalizando 20mg ou 40mg de fármaco por membrana, respectivamente. Todas as liberações foram realizadas em triplicada, onde os resultados apresentados são a média destas triplicatas, obtidas com tratamentos matemáticos e estatísticos através do programa OriginPro8®. A Figura 25 mostra a liberação do cetoprofeno pelas membranas de látex natural.

Cada composto liberado apresenta um máximo de absorvância, ou pico de absorvância, em um característico comprimento de onda. No caso do cetoprofeno, o máximo de absorvância se dá em 260nm quando dissolvido em água destilada e em 255nm quando dissolvido em álcool. Na solução hidroetanólica 10% deste projeto o máximo de absorvância se deu em 259nm (Figura 15).



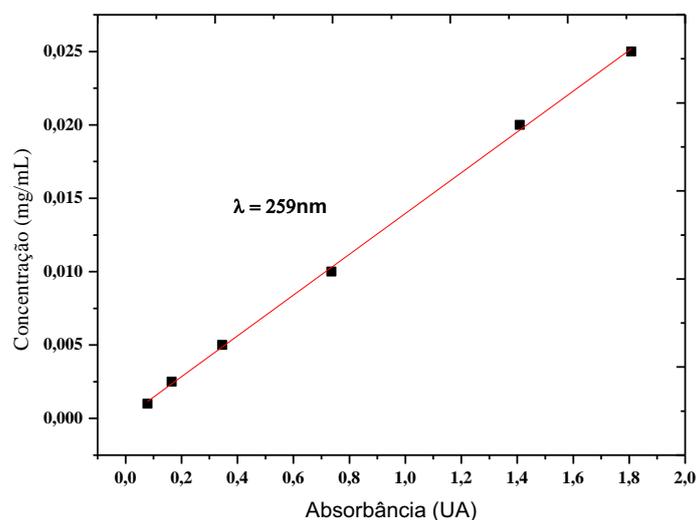
[Figura 15] Exemplo de curva de liberação de uma alíquota da solução com cetoprofeno, analisada no espectrofotômetro LGS53.

O primeiro passo do processo foi a confecção da curva analítica do cetoprofeno. Como já explicado, o fármaco foi dissolvido em álcool seguido de água, constituindo assim uma solução hidroetanólica 10%. Foram utilizadas quantidades moderadas de cetoprofeno devido ao fármaco, em quantidades maiores, atingir rapidamente os limites operacionais de absorbância do aparelho, cerca de 2,0UA (unidades de absorbância). A vantagem é que nessas baixas concentrações a solubilidade e a homogeneidade da solução foram totais, valores que podem ser vistos no Quadro 01, em mg/mL:

[Quadro 01] Valores de concentração de cetoprofeno e respectivos valores de absorbância

<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Absorbância (UA)</b>
0,0250	1,807265
0,0200	1,409036
0,0100	0,735993
0,0050	0,345438
0,0025	0,165049
0,0010	0,078862

Para cada uma dessas concentrações, alíquotas foram coletadas e analisadas pelo espectrofotômetro, onde foram anotados e tabelados os máximos de absorbância obtidos. A Figura 16 representa a curva de calibração obtida, onde no eixo-x (abscissas) temos a absorbância (UA) como variável independente e no eixo-y (ordenadas), a concentração (mg/mL) como variável dependente.



[Figura 16] Curva analítica do cetoprofeno em solução hidroetanólica

A Equação 1 é uma regressão linear, obtida através do software ORIGIN Pro<sup>®</sup>, onde **C** é a concentração de cetoprofeno em mg/mL e **A** é o máximo de absorbância para esta concentração.

$$C = (0,0139 A + 5,89 \cdot 10^{-5}) \text{ (mg/mL) (Equação 1)}$$

De forma que, conhecendo-se o máximo de absorbância de qualquer alíquota contendo uma solução hidroetanólica (10% álcool) de cetoprofeno, é possível calcular através da Equação 1, a quantidade do fármaco (em mg/mL) na solução. A quantidade absoluta (**Q**, em mL) de fármaco contido na solução é facilmente encontrada multiplicando a concentração calculada pelo volume total da solução utilizada na liberação, neste caso 1600mL, Equação 2.

$$Q = C \times 1600 \text{ (mg) (Equação 2)}$$

Nos testes de liberação controlada, foi utilizada a solução liberadora hidroetanólica padrão (10%), já citada, na qual introduzimos uma membrana de látex natural com a concentração desejada de cetoprofeno. Inicialmente, afere-se a absorbância da solução hidroetanólica pura, sem o fármaco, para que seja considerada como zero de absorbância para

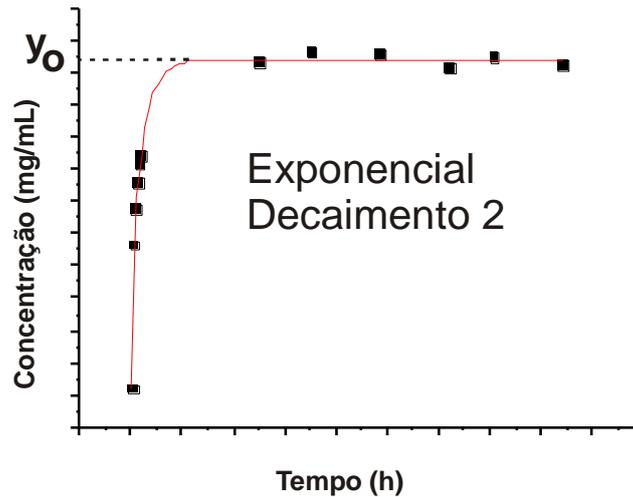
todos os comprimentos de onda (branco), uma forma de calibração. Como procedimento, coloca-se a membrana na solução e, de tempos e tempos, alíquotas são retiradas e analisadas pelo espectrofotômetro, onde são anotados os máximos de absorvância (em 259nm) e o tempo acumulado da liberação (Quadro 2). De 20min em 20min nas primeiras 4h e a cada 24h na sequência.

[Quadro 2] Valores coletados de máximos de Absorbância x Tempo de liberação

Tempo (h)	Absorb (UA)
<b>0</b>	<b>0,010911</b>
<b>0,73</b>	<b>0,234706</b>
<b>1,43</b>	<b>0,291435</b>
<b>2,13</b>	<b>0,330705</b>
<b>2,93</b>	<b>0,360356</b>
<b>3,5</b>	<b>0,373682</b>
49,5	0,516581
69,75	0,535402
96,25	0,529218
123,5	0,510085
141	0,524798
168	0,512474

Ao passar do tempo, há aumento da concentração do fármaco na solução e também dos máximos de absorvância. Após alguns dias, a liberação cessa, mesmo quando nem todo o fármaco agregado à membrana tenha sido liberado, caracterizando a saturação da liberação.

Utilizando o programa Origin Pro<sup>®</sup> foram realizados procedimentos matemáticos e estatísticos para cada triplicata. Obtendo-se assim a curva média de cada amostra, com estatística de erros, e uma função matemática que a representa (Figura 17), com seus respectivos valores de constantes.



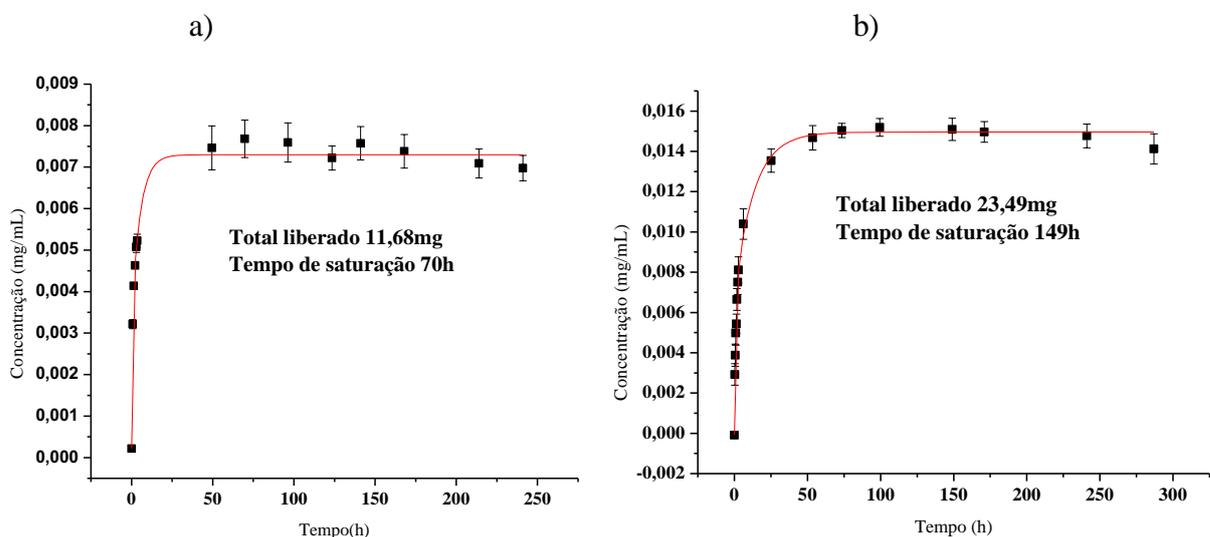
[Figura 17] Curva de liberação estática do cetoprofeno pela membrana de látex natural.

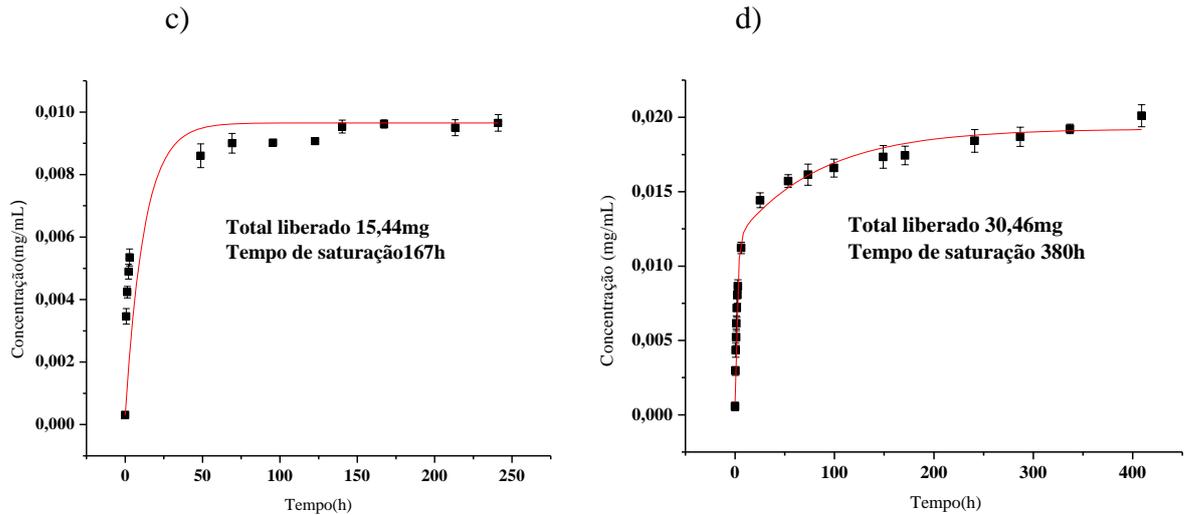
O modelo matemático que melhor se adaptou aos pontos plotados foi a exponencial dupla (ExpDec2 pelo Origin Pro<sup>®</sup>), mostrada pela Equação 3, onde  $A_1$  e  $A_2$  são as constantes e  $y_0$  representa o máximo de absorvância, dado pela saturação do processo.

$$C = (A_1 \cdot e^{-t/t_1} + A_2 \cdot e^{-t/t_2} + y_0) \text{ (mg/mL) (Equação 3)}$$

A Equação 3 permite a obtenção dos valores de liberação em qualquer instante de tempo, onde as quantidades de fármaco liberado são obtidas pela Equação 2.

Como já citado, as liberações foram realizadas nos dois sistemas de liberação, estático e dinâmico, em soluções hidroetanólicas 10%. Ressalta-se que cada membrana foi confeccionada com a adição de 4mL de solução hidroetanólica contendo cetoprofeno nas concentrações 5mg/mL ou 10mg/mL. Os resultados estão representados a seguir.





[Figura 18] Membranas de látex natural com: a) 5mg/mL de cetoprofeno, no sistema estático, b) 10mg/mL de cetoprofeno, no sistema estático, c) 5mg/mL de cetoprofeno, no sistema dinâmico, d) 10mg/mL de cetoprofeno, no sistema dinâmico

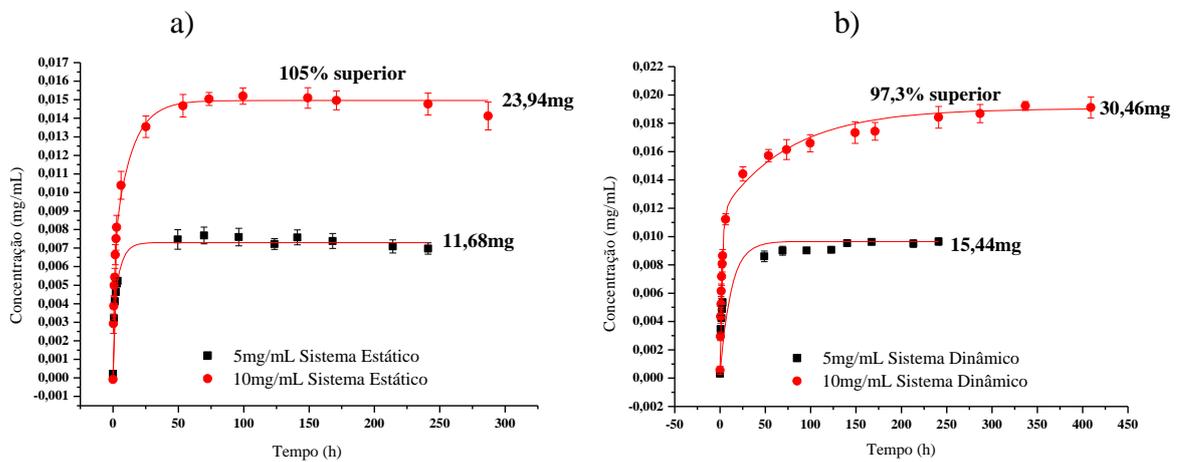
Na Figura 18, observa-se que o perfil de liberação obedece a uma exponencial dupla  $C = A_1 \cdot e^{-t/t_1} + A_2 \cdot e^{-t/t_2} + y_0$  (Equação 3) para as duas formas de liberação (estática e dinâmica), onde  $y_0$  é o máximo de liberação, e as amplitudes  $A_1$  e  $A_2$  e os tempos  $t_1$  e  $t_2$  são os tempos característicos dessa função. O Quadro 3 mostra os valores de  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $t_1$  e  $t_2$  das membranas de látex natural referente às liberações a esta figura.

[Quadro 3] Constantes e tempos característicos das membranas de látex natural colocadas nos sistemas estático e dinâmico, onde destacamos em negrito os valores de  $y_0$  de cada liberação:

	<b>5mg/mL</b> <b>(estático)</b>	<b>5mg/mL</b> <b>(dinâmico)</b>	<b>10mg/mL</b> <b>(estático)</b>	<b>10mg/mL</b> <b>(dinâmico)</b>
<b><math>y_0</math></b>	<b>0,0073</b>	<b>0,00965</b>	<b>0,01496</b>	<b>0,01904</b>
$A_1$	-0,00398	-0,00467	-0,00808	-0,01075
$t_1$	5,18408	12,30891	13,28968	2,09917
$A_2$	-0,00311	-0,00467	-0,00696	-0,00745
$t_2$	0,45936	12,30891	0,98266	76,41651

No sistema estático, observamos que a quantidade de fármaco incorporado na membrana de látex influencia no tempo de saturação, onde na membrana com 5mg/mL de cetoprofeno, o tempo de saturação foi de 70 horas, enquanto para a membrana com 10mg/mL do fármaco, obtivemos um tempo de saturação de 149 horas. Para o sistema dinâmico, o tempo de saturação, para a membrana com 5mg/mL de cetoprofeno foi de 167 horas e para a membrana com 10mg/mL foi de 380 horas.

Com o intuito de fazer uma análise individual entre os dois sistemas, a Figura 19a apresenta a liberação do fármaco para o sistema estático nas concentrações de 5mg/mL e 10mg/mL enquanto a Figura 19b, mostra a liberação do fármaco para o sistema dinâmico nas mesmas concentrações. A Tabela 1 mostra o rendimento da liberação no sistema estático e no dinâmico.



[Figura 19] a) Comparação das liberações estáticas; b) Comparação das liberações dinâmicas.

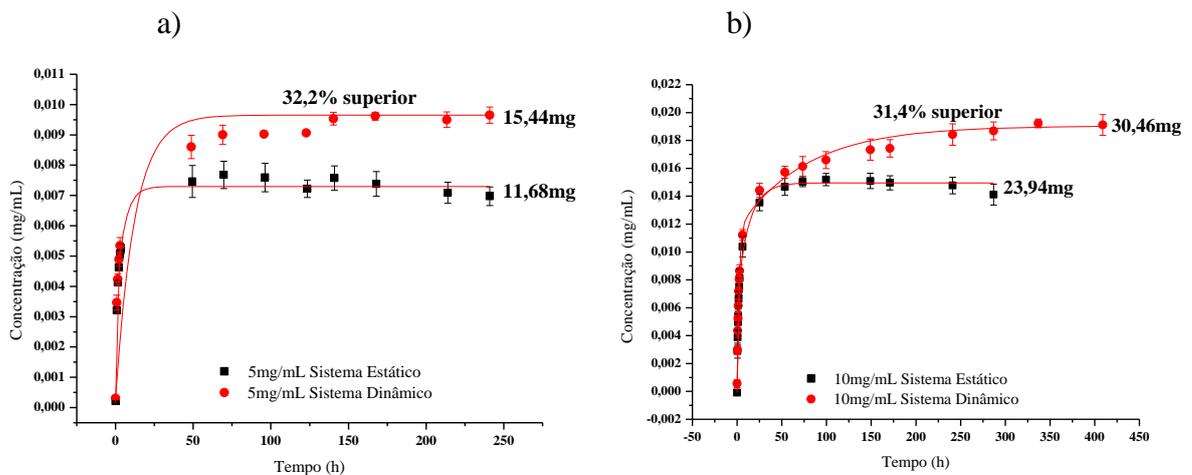
[Tabela 1] Rendimento dos sistemas (estático e dinâmico) perante o total de fármaco contido nas membranas.

Sistema de liberação	CONCENTRAÇÃO	QUANTIDADE FÁRMACO P/ MEMBRANA	TOTAL LIBERADO (12DIAS)	RENDIMENTO
Dinâmico	10mg/mL	40mg	30,46mg	<b>76,2%</b>
Estático	10mg/mL	40mg	23,94mg	60,0%
Dinâmico	5mg/mL	20mg	15,44mg	<b>72,2%</b>
Estático	5mg/mL	20mg	11,68mg	58,4%

De acordo com Borges *et al* (2014) [65], Romeira *et al* (2012) [66], e Aiello *et al* (2014) [67], a membrana de látex funciona como um reservatório, onde quanto maior a quantidade de substâncias presente nas membranas, maior a quantidade total de substância liberada. Além da quantidade, observamos em testes preliminares, que a espessura e dimensão são parâmetros importantes que influenciam na liberação, assim, estas grandezas foram padronizadas.

Na Figura 19 observa-se que as liberações de cetoprofeno nos dois sistemas (estático e dinâmico), nas duas concentrações, apresentaram-se equivalentes, sendo que os valores apresentados pelas liberações estáticas foram praticamente o dobro dos apresentados pelas liberações dinâmicas.

A Figura 20 apresenta os resultados de maior interesse deste projeto de pesquisa, ou seja, a comparação entre as liberações dadas pelos sistemas estático e dinâmico. Trata-se de um resultado importante, pois identificamos a influência do fluxo contínuo e uniforme na solução, em uma liberação sustentada de fármacos.

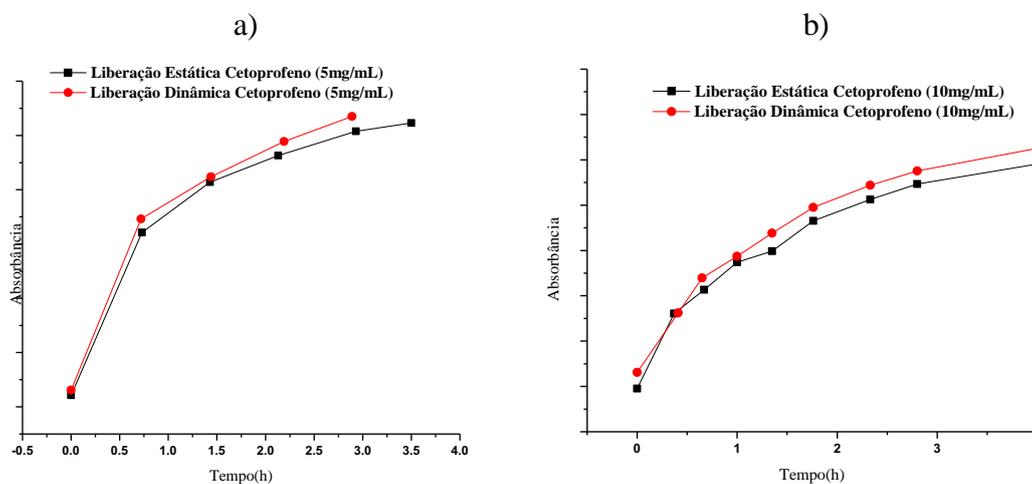


[Figura 20] Comparações entre liberações estáticas e dinâmicas: a) 5mg/mL b) 10mg/mL

Ainda a Figura 20, mostra que no sistema dinâmico, onde a agitação da solução leva a uma maior solubilidade, as membranas de látex natural com fármaco apresentam em média valores 30% superiores de liberação em comparação aos resultados obtidos pelo sistema estático equivalente. Uma forma de caracterização mais condizente com os efeitos de liberação gerados por um sistema circulatório (corrente sanguínea).

Como as liberações do fármaco depositado na superfície da membrana e do fármaco contido nas camadas mais internas se dão de forma diferenciada, a Figura 21 apresenta a primeira etapa da liberação, até 4h para o cetoprofeno, conhecida como “burst release”, onde

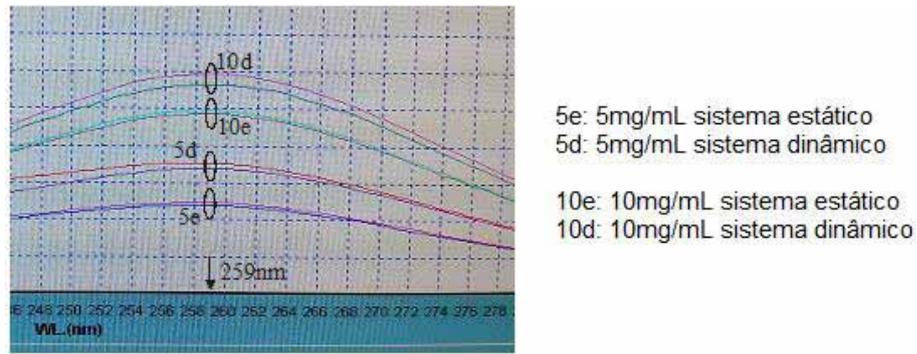
ocorre a liberação de todo o fármaco contido na superfície da membrana. Observa-se que nesta fase não houve diferença entre as duas formas de liberação nos dois sistemas, estático e dinâmico.



[Figura 21] Liberações estáticas e dinâmicas do cetoprofeno nas 4h primeiras horas.

Observou-se que fármaco presente na superfície do material foi facilmente removido pela solução hidroetanólica 10%. Assim, os choques mecânicos mais intensos proveniente do sistema dinâmico não influenciaram na eficiência do processo de liberação.

Após estas 4 horas iniciais, inicia-se a segunda etapa da liberação, onde o fármaco presente nas camadas internas da membrana (*bulk*) é removido. Assim, quanto mais internas forem estas camadas, mais difícil será a sua remoção. A Figura 22 apresenta curvas dos dois sistemas de liberação, obtidas por imagem da tela do computador ligado ao espectrofotômetro, onde são observadas as absorbâncias das alíquotas provenientes das liberações estáticas e dinâmicas nas duas concentrações, 5mg/mL e 10mg/mL, no mesmo instante de tempo. É possível notar, que as curvas de liberação dinâmicas, após 5 dias (120h) do início do processo de liberação, não se distanciaram satisfatoriamente das curvas de liberação estáticas. Isto vem demonstrar que, no caso do cetoprofeno, a maior eficiência do sistema de liberação dinâmico se inicia após o “burst release”, aumentando gradativamente diariamente.



[Figura 22] Curvas de absorvância obtidas após 5 dias de liberações, apresentando duplicatas para cada sistema em duas concentrações de cetoprofeno.

Ainda na Figura 22, vemos um distanciamento entre as liberações que compõem uma mesma duplicata (duplicatas 10d e 5d). Este comportamento se justifica por pequenas diferenças de volume de fármaco em membranas de mesma concentração, aspecto comum no processo de fabricação manual, mas também por diferenças de vazão apresentadas pelas bombas de aquário. O Quadro 4 apresenta valores para cada bomba na transferência de 1L de água entre dois recipientes.

[Quadro 4] Diferentes valores de vazão para as 6 bombas de aquário utilizadas nas liberações

<b>Bomba</b>	<b>Tempo (s)</b>
B1	22,28
B2	39,51
B3	26,21
B4	20,78
B5	23,89
B6	22,03

Em tratamentos médicos que utilizam liberação de fármacos através de membranas poliméricas [13], os tempos de liberação e saturação são importantes para se determinar quanto de fármaco será liberado e em quais instantes. Nota-se que as membranas no sistema dinâmico liberaram uma maior quantidade de cetoprofeno por um intervalo de tempo maior, atingindo a saturação 97 dias e 231 dias nas concentrações 5mg/mL e 10mg/mL, respectivamente, após a saturação do sistema estático nas mesmas concentrações. Desta

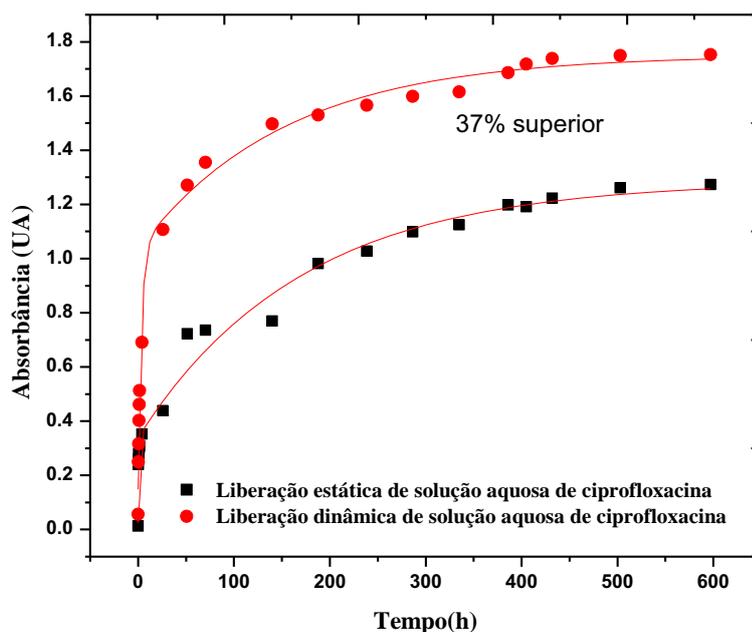
forma, tem-se uma avaliação mais realista a respeito da dosagem inicial do tratamento e do tempo pelo qual ele se prolonga de forma eficaz.

Uma análise mais detalhada dos tempos finais das liberações estáticas demonstra decaimento da concentração de cetoprofeno. Isto ocorre porque a natureza insolúvel em água do fármaco, o faz se depositar nas paredes do recipiente. Este efeito não foi observado no sistema dinâmico, pois foi minimizado pelo fluxo circulante, sendo observado somente após alguns dias depois da saturação.

Em nosso Grupo de Pesquisa, a ciprofloxacina é um fármaco comumente estudado, além de ser solúvel em água. Assim, neste projeto, decidimos comparar os resultados do cetoprofeno com este fármaco solúvel nos sistemas dinâmico e estático.

A ciprofloxacina, fármaco solúvel em água, é uma fluoroquinolona, derivada do grupo das quinolonas. Este composto tem uma grande atividade antimicrobiana contra enterobactérias e pseudomonas, com relevante atuação em infecções em tecidos moles (infecções de tecidos profundos em diabéticos, infecções em úlceras de decúbito), prostatites, infecções do trato respiratório e urinário [68-70].

As membranas de látex natural incorporadas com ciprofloxacina (com concentração 10mg/mL) foram confeccionadas e submetidas a ensaios de liberação da mesma forma que o cetoprofeno, porém com a substituição da solução hidroetanólica por solução aquosa. A Figura 23 mostra das liberações estáticas e dinâmicas da ciprofloxacina.

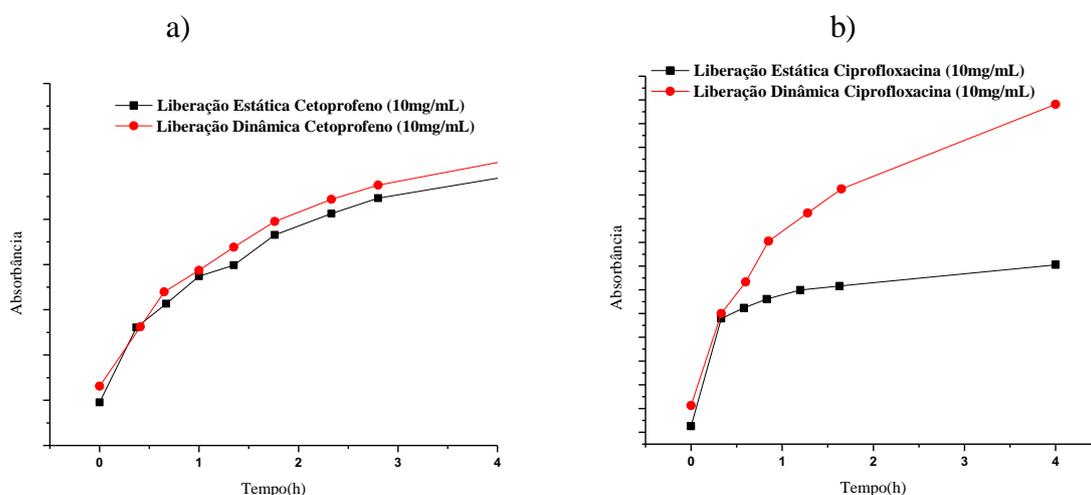


[Figura 23] Perfil comparativo das liberações (estática e dinâmica) da membrana de látex natural com (ciprofloxacina diluída em solução aquosa).

Os resultados obtidos no sistema estático para a ciprofloxacina estão de acordo com Herculano *et al.* 2009[71], Guidelli *et al.* 2013[72] e Aiello *et al.* 2014 [67]. A comparação dos resultados nos dois sistemas mostra a eficácia deste novo sistema dinâmico de liberação controlada de fármacos, evidenciando a importância das características de cada fármaco na liberação sustentada pela membrana de látex natural.

O ensaio de liberação dinâmica para membranas de látex com ciprofloxacina liberou 37% mais fármaco do que em sistema estático, enquanto que nos ensaios de liberação com membranas de látex com cetoprofeno, esta diferença entre os dois sistemas foi de aproximadamente 30%.

Nas primeiras 4h do processo de liberação, os ensaios em sistema dinâmico para membranas com ciprofloxacina apresentaram resultados distintos aos do sistema estático. Para o cetoprofeno, como já visto, o perfil de liberação nas primeiras horas do processo nos dois sistemas (estático e dinâmico) foram similares (Figura 24a), constatando com o que foi observado nas membranas de látex com ciprofloxacina, onde a liberação do sistema dinâmico foi superior ao estático, desde as primeiras horas de liberação ( $t=0$  horas em diante) (Figura 24b).



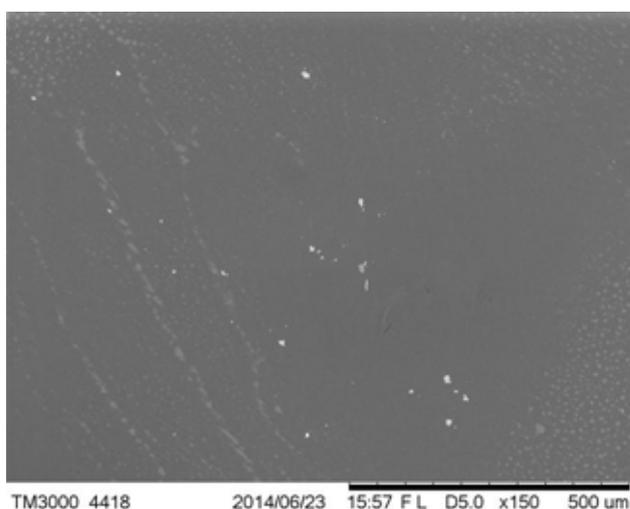
[Figura 24] Comparativo entre liberações estáticas e dinâmicas nas 4 primeiras horas: a) membranas com 10mg/mL cetoprofeno (insolúvel em água; b) membranas com 10mg/mL ciprofloxacina (perfeitamente solúvel em água).

Observamos que o tempo de saturação da liberação estática da membrana com ciprofloxacina foi cerca de 600h, e se aproxima do tempo de saturação (650h) de sua liberação dinâmica, constituindo outro comportamento contrário as liberações de cetoprofeno.

Finalmente, observamos que os tempos de liberação e saturação dependem do sistema adotado (estático ou dinâmico), mas as características intrínsecas do fármaco-alvo também influenciam diretamente nos resultados.

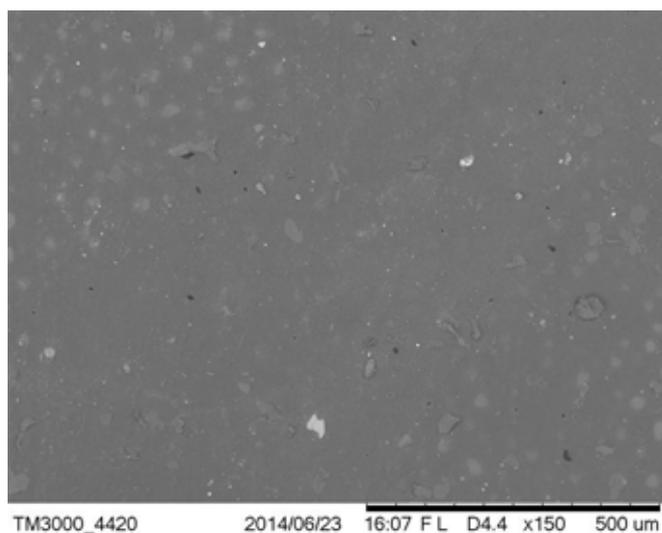
### 4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O principal motivo de empregar esta técnica foi analisar a morfologia da membrana de látex natural, ou seja, a incorporação do cetoprofeno na superfície da membrana. A Figura 25 mostra a imagem de MEV da membrana de látex natural. Note que temos uma superfície plana e sem poros deste biopolímero.



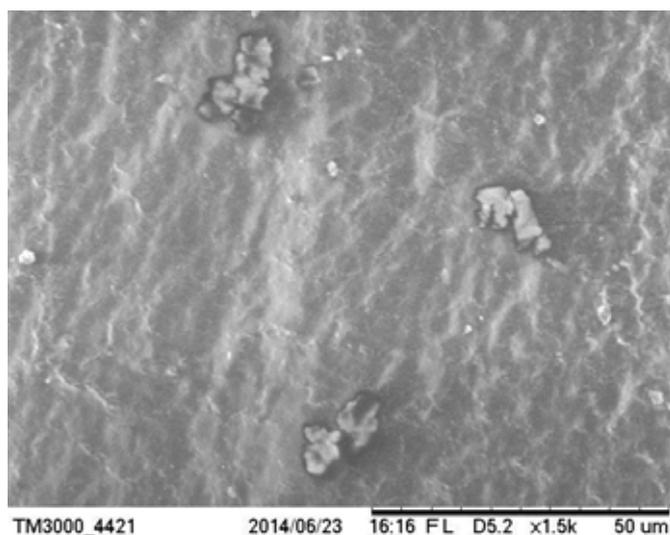
[Figura 25] Imagem de MEV da membrana de látex natural sem fármaco (ampliação de 150 vezes).

A imagem obtida através da técnica de MEV mostra a morfologia da superfície do sistema fármaco-membrana (Figura 26). É possível observar a adsorção do fármaco à membrana, espalhado pela superfície em retículos. A Figura 26 reforça o padrão apresentado nos testes de liberação, onde a liberação mais rápida ocorre devido à presença do cetoprofeno à superfície, posteriormente essa liberação tem sua velocidade reduzida, pois nesse momento a água está carreando o fármaco das camadas internas (*bulk*) da membrana. Desta forma, concluímos que a interação entre a membrana e o fármaco é mais fraca.



[Figura 26] Imagem de MEV da membrana de látex natural + cetoprofeno (10mg) (ampliação de 150 vezes).

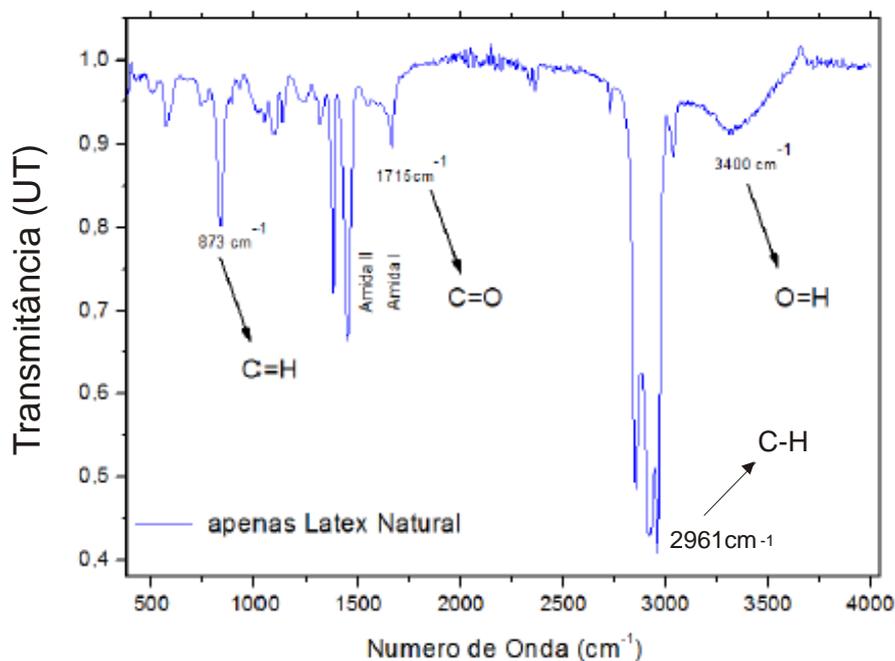
A Figura 27 apresenta a imagem de MEV da membrana de látex com cetoprofeno com ampliação de 1500 vezes, onde observamos que a cristalinidade do fármaco é preservada, mostrando, sem afirmar, que possivelmente não houve mudança do princípio ativo do antiinflamatório. Além disso, observamos que o fármaco está distribuído por toda a superfície da membrana, com tamanhos de partícula entre de 5 $\mu$ m a 10 $\mu$ m.



[Figura 27] Imagem de MEV da membrana de látex natural + cetoprofeno (10mg) (ampliação de 1.500 vezes).

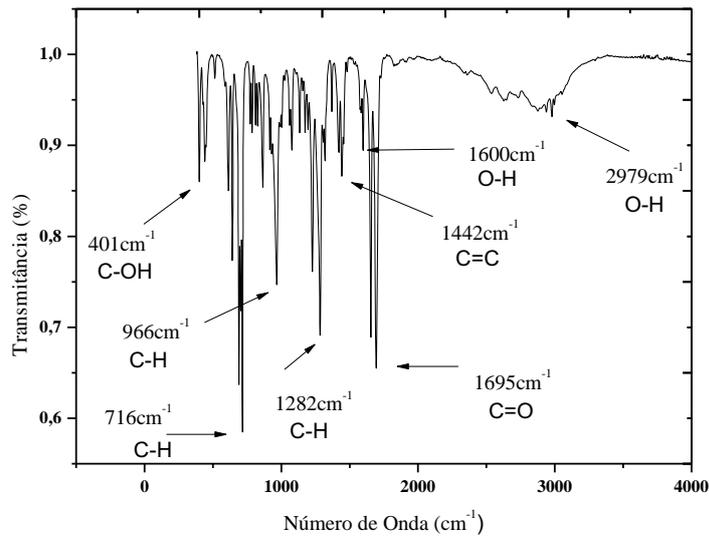
#### 4.4. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A Figura 28 mostra o espectro de FTIR da membrana de látex natural (NRL), que apresenta absorções características do cis 1,4-poli-isopreno, sendo as mais significativas em 873, 1375, 1432, 1715 e 3400 $\text{cm}^{-1}$ , sendo de maior interesse as bandas 3280-3400  $\text{cm}^{-1}$  e de 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$  [73-75]. A banda de absorção do cis-1,4-poli-isopreno de grande amplitude corresponde a C=H observado em 873  $\text{cm}^{-1}$ . Uma inspeção mais detalhada do espectro de infravermelho do látex natural revela que as bandas de absorção a 1240  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento assimétrico O-P-O de fosfolípidos indicando a presença de fosfolípidos associados à cadeia da borracha.

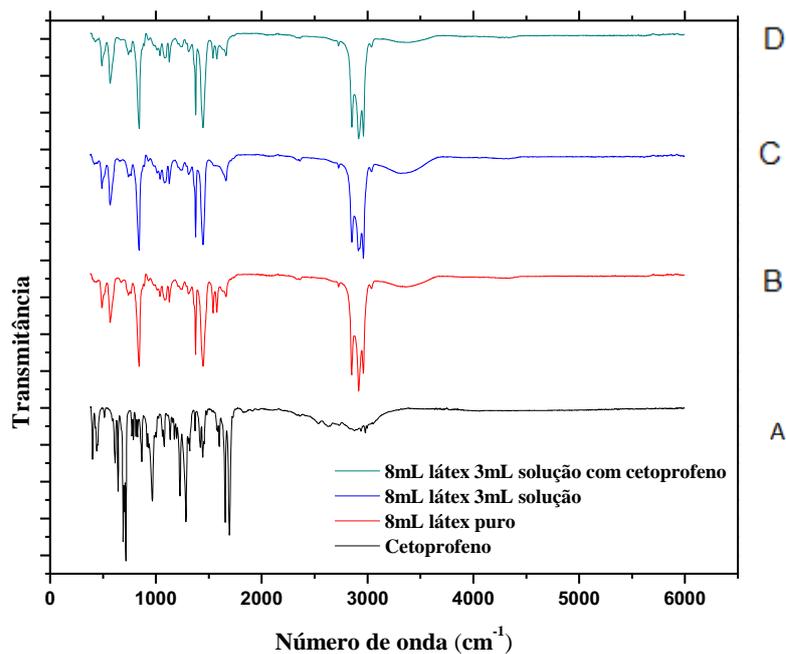


[Figura 28] Espectros de FTIR da membrana pura de látex natural

A Figura 29 apresenta o FTIR do cetorprofeno em pó e seus principais grupos funcionais que o caracterizam. Banda 401 $\text{cm}^{-1}$  (C-O-H deformação), banda 716 $\text{cm}^{-1}$  (C-H deformação), banda 966 $\text{cm}^{-1}$  ( $\sigma'$ ,  $\sigma''$  C-H deformação), banda 1282 $\text{cm}^{-1}$  (CH aromático no plano de curvatura), banda 1442 $\text{cm}^{-1}$  (O-H ácido carboxílico em flexão), banda 1600 $\text{cm}^{-1}$  (C=C alongamento aromático), banda 1695 $\text{cm}^{-1}$  (C=O em alongação), e finalmente a banda 2979 $\text{cm}^{-1}$  (C-H em alongação) [76-79].



[Figura 29] Espectros de FTIR do cetoprofeno

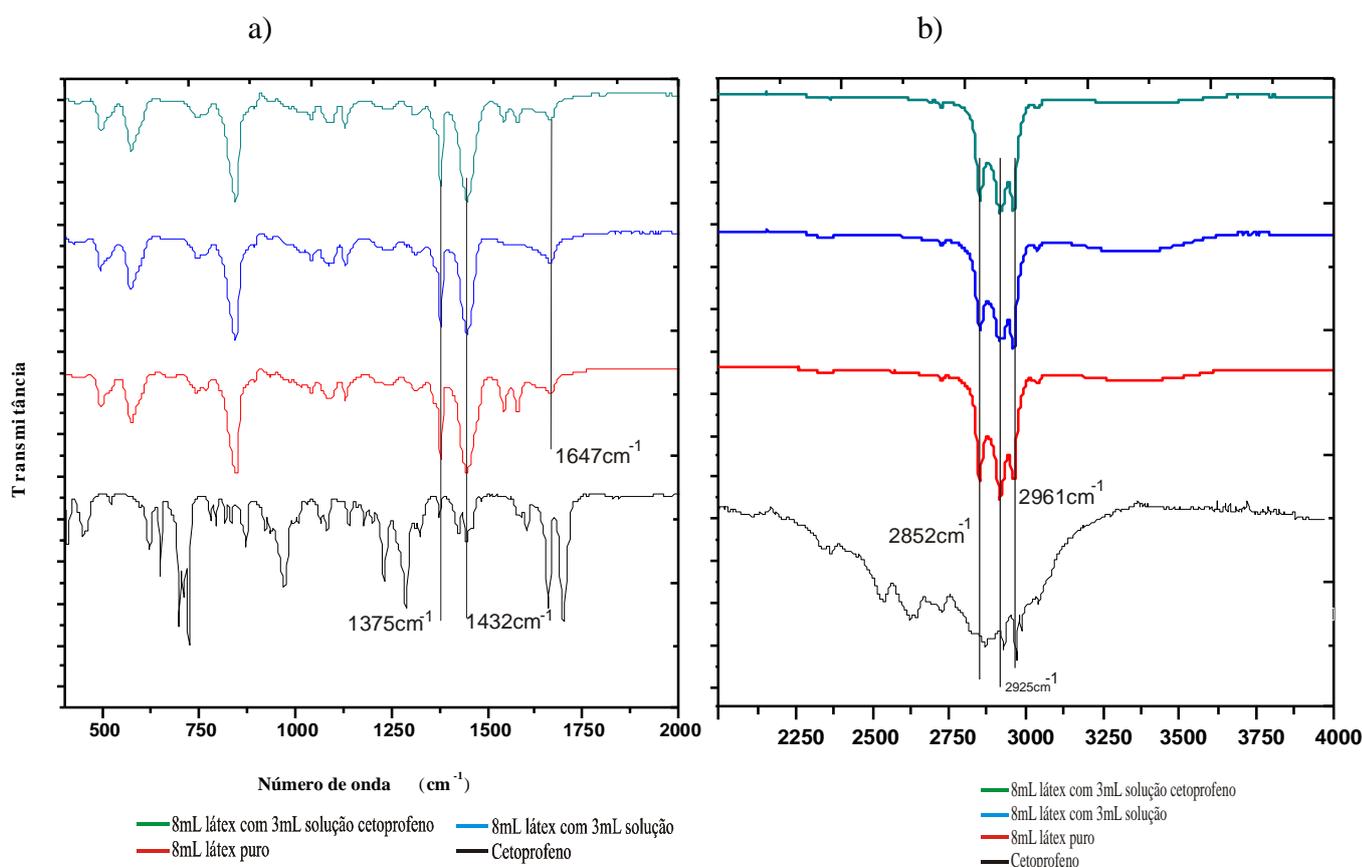


[Figura 30] Espectro de FTIR docetoprofeno em pó (A), membranas de látex(B), membrana com a solução hidroetanólica (C) e membrana com 3mL de solução hidroetanólica com cetoprofeno (D).

Ao comparar o FTIR da membrana de látex, cetoprofeno, membrana de látex + cetoprofeno e membrana de látex confeccionada com solução hidro-alcoolica (10%) (Figura 30), podemos verificar pequenas diminuições/aumentos na banda absorção em  $3400\text{cm}^{-1}$ , que

pode ser explicado pela encapsulamento do cetoprofeno na matriz polimérica ou variações experimentais. Assim, podemos inferir que o cetoprofeno não perde sua atividade quando incorporado à membrana, pois seus grupos funcionais foram mantidos. Da mesma forma, não foi detectado nenhum novo grupo que não estava presente tanto o espectro da membrana de látex pura como no espectro do cetoprofeno em pó, o que salienta o aspecto de encapsulamento

Com o propósito de verificar em detalhes as bandas de absorção das amostras, a Figura 31, detalha as bandas de absorção entre  $400\text{-}2000\text{cm}^{-1}$  e de  $2000\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção em  $1375\text{ cm}^{-1}$  mostra a deformação em  $\text{CH}_2$ ,  $1394\text{ cm}^{-1}$ ,  $1432\text{ cm}^{-1}$ ,  $1494\text{ cm}^{-1}$  são devidas a deformação em  $\text{CH}_2$ . A banda da absorção em  $1647\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$  no cis-1,4-poli-isopreno (linha C, vermelho). Os estiramentos simétricos  $\text{CH}_2$  são observados na região  $2852\text{ cm}^{-1}\text{-}2925\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento assimétrico  $\text{CH}_3$  nas membranas de látex natural é observado em  $2961\text{ cm}^{-1}$ . A presença do grupo hidroxil [80] é observada na banda em  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ .



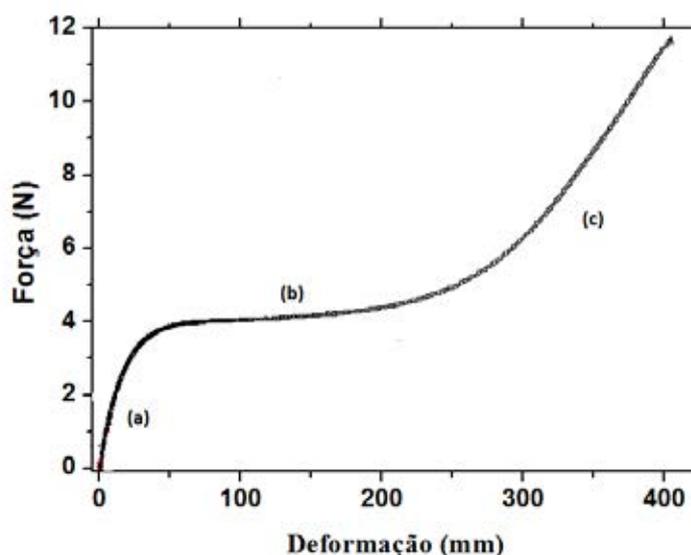
[Figura 31] FTIR apresentando amostras de cetoprofeno em pó e três membranas de látex (puro, com a solução hicroetanólica e com 3mL de cetoprofenodiluído em solução hicroetanólica), de: a-)  $400\text{cm}^{-1}$  a  $2000\text{cm}^{-1}$ , b-) de  $2000\text{cm}^{-1}$  a  $4000\text{cm}^{-1}$

#### 4.5. Ensaios de Resistência Mecânica (Tração)

Os três principais modos pelos quais os sistemas sofrem deformação são tração, cisalhamento e compressão. Neste projeto utilizamos a tração, que consiste na aplicação de força nas extremidades da amostra [81-84].

Quando uma tensão é exercida em um corpo sólido, este tende a se deformar. A razão entre a tensão aplicada e a deformação ocorrida define o módulo de elasticidade do material, que corresponde a uma característica intrínseca sua, não importando suas dimensões, além de determinar sua resistência mecânica a este tipo de esforço. Quanto menor forem as dimensões do corpo de prova, menor será a força necessária para deformá-lo. Testes de resistência mecânica do látex natural moldado são de extrema importância na biomedicina, haja vista que na literatura [32-34] é possível observar o emprego de membranas de látex natural na regeneração de diafragma, esôfago e ossos.

Uma curva característica de Tensão x Deformação (Figura 32) apresenta comportamentos diferenciados para os níveis de força aplicados. A primeira fase (a) é a elástica, onde após a retirada da tensão a membrana volta a adquirir suas dimensões iniciais, sendo caracterizada pelo Módulo de Young, que relaciona a intensidade de esforço a ser aplicado (Tensão) *versus* deformação. A segunda fase (b) é plástica, onde a membrana, conforme a tensão aplicada perde gradativamente sua capacidade de retornar às suas dimensões iniciais. Ao final (c) as deformações são todas definitivas, onde a membrana não resiste mais a tensão, culminando na ruptura do material.



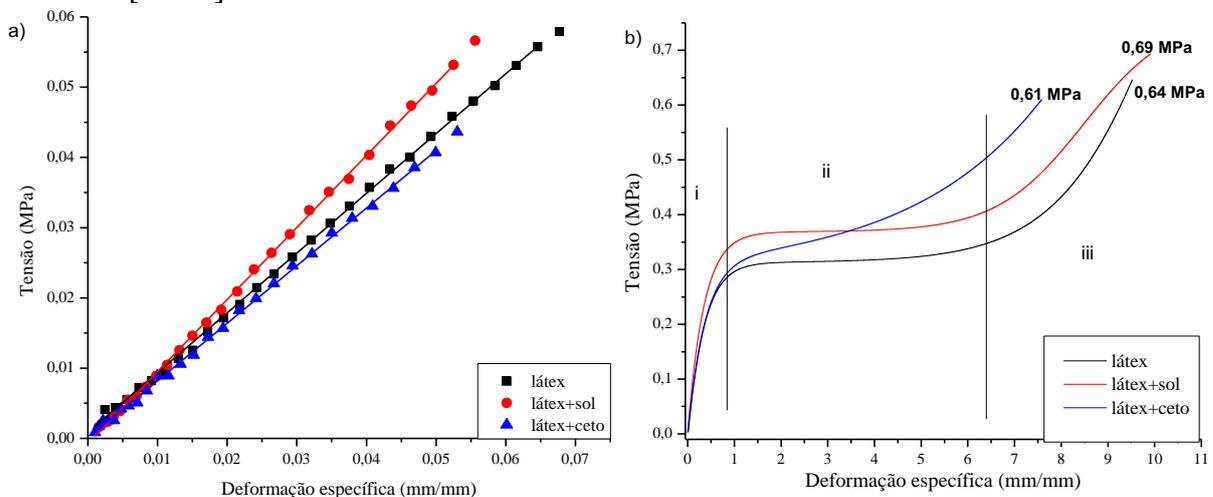
[Figura 32] Curva Tensão X Deformação para uma amostra de látex natural: (a) fase elástica, (b) início da fase plástica e (c) o material não resiste à tração caminhando para ruptura.

A fase elástica é a região operacional de um biomaterial. Em qualquer aplicação, as intensidades dos esforços mecânicos as quais a membrana deverá ser submetida têm de ser previstas, de modo a garantir que o tempo total do tratamento seja concluído sem se ultrapassar os limites desta fase, garantindo assim a integridade do material e resultados comprovadamente satisfatórios.

Ensaio de tração foram realizados com membranas de látex natural pura (sem adição da solução), membranas de látex natural como solução hidroetanólica 10% com cetoprofeno (5mg/mL) e membranas de látex com solução hidroetanólica (10%) sem cetoprofeno.

Neste trabalho, analisamos a influência do cetoprofeno em membranas de látex natural. Análises da resistência mecânica (tração-deformação) mostraram que a incorporação do cetoprofeno à membrana de látex natural diminui a tensão de ruptura e o módulo de Young, podendo parte de este efeito ser devida à presença de álcool na solução no preparo. A Figura 33 mostra as curvas de Força *versus* deformação para as três amostras (média das triplicatas). Note o efeito do cetoprofeno nas propriedades mecânicas do biomaterial.

Nesta figura, também é possível perceber que a “membrana de látex”, “membrana de látex com cetoprofeno” e a “membrana com a solução hidroetanólica”, apresentaram três fases de deformação, a primeira (i) é responsável pela deformação elástica do material; a segunda (ii) é a região de formação e alongamento do “pescoço” (empescoçamento), em que a variação da tensão é praticamente nula, porém a falha se propaga pela amostra, tornando a membrana mais estreita; a terceira fase (iii) apresenta um grande aumento da tensão, isso porque acima de 300% de alongamento os elastômeros apresentam cristalinidade induzida pela deformação, o que reduz a flexibilidade das moléculas, exigindo uma força maior para deformar [85-87].



[Figura 33] a) Representação gráfica dos Módulos de Young das três amostras; b) Gráfico de Força vs. deformação para as três amostras.

Observamos que com a incorporação do cetoprofeno em membranas de látex natural a força de ruptura foi de 0,61MPa, ou seja, um valor 10% menor à membrana de látex natural. Isto ocorreu porque o fármaco ficou intercalado à cadeia polimérica.

O Módulo de Young é uma indicação da dureza (rigidez) do material, quando este é submetido a uma tensão externa de tração, sendo a máxima tensão que o material suporta sem sofrer deformação permanente. Imaginando-se uma borracha e um metal, e aplicando-se a mesma tensão em ambos, verificaremos uma deformação elástica muito maior por parte da borracha comparada ao metal [87]. Isto mostra que o Módulo de Young do metal é mais alto que o da borracha e, portanto, é necessário aplicar uma tensão maior para que ele sofra a mesma deformação verificada na borracha.

Desta forma, a adição de cetoprofeno aumenta levemente o Módulo de Young da membrana, porém a deixa mais frágil, reduzindo a tensão de ruptura e seu alongamento máximo, pois o cetoprofeno por não ser solúvel funciona com um preenchimento (defeito) na membrana.

A elaboração da membrana com a solução hidroetanólica (10% de álcool) funciona como um agente reticulante (ligação cruzada), pois aumenta a resistência elástica e a tensão de ruptura, porém a porcentagem de alongamento não sofre tanta influencia em relação ao látex natural. Além de ser um agente reticulante, o álcool funciona como um agente desnaturante (desestabilização das proteínas), precipitando as proteínas e removendo os lipídeos, agindo na coagulação do látex. Esta rápida coagulação pode alterar a morfologia da secção transversal da membrana, responsável pela maior ou não elasticidade do material em termos de alongação. Desta forma, todas foram confeccionadas com solução hidroetanólica para que o padrão minimizasse ao máximo este efeito.

Olátex é um sistema coloidal estabilizado, em que as proteínas e lipídios circundam/estabilizam a partícula de isopreno [88], e também são responsáveis pela repulsão. A Tabela 2 mostra o Módulo de Young, Tensão de Ruptura e Alongamento das três amostras.

Os resultados encontrados com as análises de resistência mecânica são interessantes, pois a incorporação do fármaco não diminuiu significativamente a resistência mecânica do polímero, sendo que na literatura [32-34] é possível observar o emprego de membranas de látex natural na regeneração de diafragma, esôfago e ossos.

[Tabela 2] mostra o Módulo de Young, Tensão de Ruptura e Alongamento das três amostras.

	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Alongamento de Ruptura (%)
Látex	$0,8503 \pm 0,0054$	$0,6466 \pm 0,050$	$952,29 \pm 0,7$
Látex + Sol	$1,0254 \pm 0,0054$	$0,69374 \pm 0,040$	$991,587 \pm 5,7$
Látex + Ceto	$0,8195 \pm 0,0054$	$0,61065 \pm 0,037$	$758,526 \pm 16,0$

## 5. CONCLUSÕES

A necessidade de desenvolver metodologias alternativas que simulem com maior precisão a influência do fluxo sanguíneo sobre a liberação de carreadores na forma de membranas levou ao desenvolvimento de um novo sistema dinâmico de liberação, seguido da comparação estático *versus* o dinâmico.

Com base no perfil de liberação *in vitro* foi possível observar que o sistema estático apresentou diferenças em relação ao dinâmico. Quanto ao cetoprofeno (modelo de fármaco pouco solúvel em água), tanto para 5mg/mL quanto para 10 mg/mL, a liberação em sistema dinâmico se apresentou 30% superior às liberações em sistema estático, inclusive com prolongamento do tempo de liberação (saturação). O mesmo resultado foi observado com o uso de ciprofloxacina (modelo de droga hidrossolúvel), apresentando resultados de liberação dinâmica 37% superior sobre resultados de liberação estática.

O emprego de modelos matemáticos possibilitou a caracterização da cinética e mecanismos de liberação, importante para determinação do tempo de liberação e saturação. Todas liberações apresentaram cinéticas semelhantes com literatura, sendo que a liberação é inicialmente rápida devido ao fármaco na superfície, e posteriormente lento devido ao fármaco estar no interior na matriz polimérica.

Devido à baixa solubilidade do cetoprofeno em água, a partir do MEV é possível observar agrupamentos do fármaco na superfície da biomembrana.

A análise por FTIR não mostrou interação entre o fármaco e a biomembrana, esta funcionando apenas como carreadora. O agrupamento do fármaco na superfície e falta de interação entre os materiais justificam a liberação inicial mais rápida, assim como a maior liberação pelo modelo dinâmico devido ao atrito da solução sobre a biomembrana.

Porém análises mecânicas do material demonstram que a incorporação do cetoprofeno influencia nas propriedades da biomembrana. Devido aos materiais não apresentarem interações, é inferido que o cetoprofeno esteja apenas intercalado entre as moléculas da biomembrana (com papel de preenchimento), o que acarreta na redução do Módulo de Young, da força de ruptura e da porcentagem de alongamento, tornando o material mais frágil.

As liberações das membranas com ciprofloxacina, para fins comparativos, apresentaram resultados iniciais e finais distintos. Desta forma, a escolha da metodologia empregada na liberação e as características do fármaco a ser liberado podem influenciar nos resultados, levando a subestimar o potencial de liberação de que fármacos incorporados no sistema matricial apresentariam *in vivo*.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] FOLKMAN J, LANGER R. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*. 1976; 263(5580):797-800.
- [2] WOO BH, FINK BF, PAGE R, SCHRIER JA, WOO JO Y, JIANG G et al. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharmaceutical Research*. 2001; 18(12):1747-1753.
- [3] WANG LY, MA GH, SU ZG. Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*. 2005; 106(1-2):62-75.
- [4] OLIVEIRA LSAF, OLIVEIRA CS, MACHADO APL, ROSA FP. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. Artigo de Revisão, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2010. pp. 37-42
- [5] TAKAMORI ER. Avaliação de matrizes tridimensionais colagênicas como carreadores celulares para bioengenharia óssea. USP Odontologia, Bauru. 2008. pp. 35-44
- [6] CHIANG YT, LO CL. pH-responsive polymer-liposomes for intracellular drug delivery and tumor extracellular matrix switched-on targeted cancer therapy. *Biomaterials*. 2014 Jul;35(20):5414-24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.046. Epub 2014 Apr 4 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709521>)
- [7] ANIRUDHAN TS, REJEENA B, REJEENA SR. Synthesis and Characterization of Chitosan Based Multilayer and pH Sensitive Co-Polymeric System for the Targeted Delivery of 5-Fluorouracil, an In Vitro Study. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2013.
- [8] TAKAMORI ER. Avaliação de matrizes tridimensionais colagênicas como carreadores celulares para bioengenharia óssea. USP Odontologia, Bauru. 2008. pp. 35-44

- [9] OLIVEIRA JAA, HYPPOLITO MA, COUTINHO-NETTO J, MRUÉ F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia*. 2003. 69(5). pp. 649-655.
- [10] THOMAZINI JA, MRUÉ F, COUTINHO-NETTO J, LACHAT JJ, CENEVIVA R, ZBOROWSKI AC. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. *Acta Microscópica*. 6. 1997. pp. 798-799.
- [11] MRUÉ F, COUTINHO-NETTO J, CENEVIVA R, LACHAT JJ, THOMAZINI JA AND TAMBELINI H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Materials Research*. 7(2). 2004. pp. 277-283.
- [12] FRADE MAC, VALVERDE RV, ASSIS RVC, COUTINHO-NETTO J, FOSS NT 2001. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *International Journal of Dermatology*. 40(3). 2001. pp. 237-240.
- [13] HERCULANO RD. Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas. *Universidade de São Paulo - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto*. 2009. pp. 129.
- [14] DALL' ANTONIA AC, MARTINS MA, MORENO RMB, MATTOSO LHC, GONÇALVES PS, JOB AE. Caracterização Mecânica e Térmica da Borracha Natural. Formulada e Vulcanizada dos Clones: GT 1, IAN 873, PB 235 e RRIM 600. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2009. vol. 19, nº 1, p. 63-71.
- [15] SOUSA LH, CENEVIVA R, COUTINHO-NETTO J, MRUÉ F, SOUSA-FILHO LH, CASTRO E SILVA O. Morphologic evaluation of the use of a látex prosthesis in videolaparoscopicinguinoplasty- An experimental study in dogs. 2011, pp. 84-91.
- [16] HERCULANO RD, SILVA CP, ERENO C, CATANZARO-GUIMARÃES AS, KINHOSHITA A, GRAEFF CFO. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). *Materials Research*. 12(2). (2009). pp. 253-256.

- [17] HERCULANO RD, GUIMARÃES SAC, ORCINI W, MORAIS RCN, DUARTE MAH, KINHOSHITA A, GRAEFF CFO. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. *Materials Research*. (2010). 13(1) pp. 13(1) 57-61.
- [18] HERCULANO RD, BRUNELLO CA, GRAEFF CFO. Solid State Nitric Oxide Sensor Using a Latex Rubber Matrix. *Macromolecular Symposia*. 245-246. (2006). pp. 529-532.
- [19] ROMEIRA KM, DRAGO BC, SILVA RMG, HERCULANO RD. Liberação controlada do extrato de *stryphnodendronsp* utilizando membrana de látex natural como suporte. In: *11º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2011, Campos do Jordão/SP. Anais do 11º CBPoL*. 2011.
- [20] BORGES FA, ROMEIRA KM, BOLOGNESI LFC, PERRI EG, ANDRÉ GS, HERCULANO RD. Influência da temperatura na liberação de fenóis totais de *c. sylvestris* usando biomembrana de látex natural como carreador. In: *12. Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013, Florianópolis/SC. Anais do 12. CBPOL*. 2013
- [21] BOLOGNESI LFC, BORGES FA, PERRI EG, ANDRÉ GS, SATO NC, HERCULANO RD. Caracterização da liberação sustentada do extrato de *casearia sylvestris swartz* associado à ciprofloxacina empregando películas de látex natural como carreador. In: *12. Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013, Florianópolis/SC. Anais do 12. CBPOL*. 2013.
- [22] DANTAS TS, LELIS ER, NAVES LZ, FERNANDES-NETO AJ, MAGALHÃES D. Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia - MG, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 29 de Março de 2011. pp. 131-133.
- [23] KUNITA MH. Enxertia de metacrilato de glicidila em filmes poliméricos por processo com fluidos supercríticos. UEM-PR, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química. (2005). pp. 20-21.
- [24] AMARAL MB. Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada. USP, Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia. (2013). Pp. 16-37.

- [25] MITSUKA M. Correlações entre estrutura química, super-estrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Setor de Tecnologia. (2007). pp. 5-11.
- [26] RATNER B, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor, In: Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine. *Elsevier Academic Press, ISBN: 0-12-582463-7, San Diego, California, USA.* 2004. pp. 1-9.
- [27] HELMUS MN, TWEDENK. Materials selection. In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A, vol .* 1995. PP. 27-59.
- [28] COLOMBO LRC, CALDERONI DR, ROSIM ET, PASSERI LA. Biomateriais para reconstrução da órbita: revisão da literatura, artigo de revisão. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica.* Vol. 26, no 2- Abr/Mai/Jun de 2011. Pp 337-344.
- [29] ERENO C, CATARANZO-GUIMARÃES AS, PASSETO S, HERCULANO RD, PEREIRA-SILVA C, GRAEFF CFO, TAVANO O, BAFFA O, KINOSHITA A. Latex use as na oclusivemembrane for guided boné regeneration. *Journal of Biomedical Materials Researc.* Dec 2010. Vol 95A. pp. 932-939.
- [30] MORAES RCN, MARQUES L, HOLGADO LA, FLORIANO JF, SARAIVA PP, GRAEFF CFOG, KINOSHITA A. Estudo comparativo de desempenho de diferentes membranas oclusivas de látex natural no reparo ósseo. USC, Bauru, SP. UNESP Bauru-SP. 2013. pp 213-228.
- [31] SADER SL, COUTINHO NETTO J, BARBIERI NETO J, MAZZETTO SA, ALVES JR P, VANNI JC, SADER AA. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular, v.15.* 2000. pp.338-344.

- [32] MRUÉ F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. 2000. 112f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2000. 112f.
- [33] MRUÉ F. Substituição do esôfago cervical por prótese biosintética de látex. Estudo experimental em cães. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 1996. 86f.
- [34] ZIMMERMANN M, RAISER AG, BARBOSA ALT; NOVASAD D, STEFFEM RPB; RAFAEL LR, SILVA MS, LINDINGER R; PASTORE JF. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. *Ciência Rural*. 2007, 37 (6), pp. 1719-1723.
- [35] RABELO ER, SANT'ANA FJF, PAULO NM, ROMANI AF, SILVA LAF, VIU MAO, ALVES CB, LIMA CRO, SILVA OC. Emprego do compósito látex, polimida e polilisina a 01% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. *Acta Scientiae*, v.33, n.2, (2005). pp.169–175.
- [36] MAZOCCO F. Látex extraído da seringueira é utilizado com sucesso na medicina. *Univerciência (UFSCAR)*. Jan/Abr 2002.
- [37] SILVA EBS. Análises macro e microscópica de enxertos cutâneos por sementeira após laserterapia de baixa intensidade. UNESP – Jaboticabal/SP. 2009. pp 4.
- [38] ALVES, MCO. Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural. Dissertação de Mestrado, FFCLRP - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP. 2003. pp.70.
- [39] ALVES COM, NEVES JUNIOR WFP, PELEGRINA MG, MULATO M, GRAEFF CFO, NETTO JC, BERNARDES MS. Látex Natural da *Hevea Brasiliensis*: Um Biomaterial de Múltiplas Aplicações. In: *VIII Congresso Brasileiro de Física Médica*. 2003. Porto Alegre - RS. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Física Médica*. 2003.

- [40] SOARES SC, CURSI IB, ANDRADE FF, CAMPOS EM, CARVALHO MTF, FOSS NT, FRADE MAC. Úlceras de perna: Tratamento e cicatrização. *HU Revista (Juiz de Fora), Juiz de Fora*, v. 30, n.2. (2004). pp. 16-19.
- [41] FRADE MAC, CURSI IB, ANDRADE FF, SOARESSC, RIBEIRO WS, SANTOS SV, FOSS NT. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região. *Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro*, v. 80, n.1. 2005. pp. 41-46.
- [42] CIPRIANI-FRADE MA; COUTINHO-NETTO J, MARTINELLI A, TIRABOSCHI FN. .A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. *Medicina Cutânea Ibero- Latino- Americana*. 2006. 34; 137-142.
- [43] ROTA BRASIL OESTE. Brasil responde apenas por 1,3% da produção mundial de borracha. *Website. Estatística*. (<http://www.brasiloste.com.br/noticia/1038/2004>)
- [44] BORRACHA NATURAL BRASILEIRA. *Estatística. Web site*. ([www.barrachanatural.agr.br.2009](http://www.barrachanatural.agr.br.2009))
- [45] GALIANI PD. Avaliação e caracterização da borracha natural de diferentes clones de seringueira cultivados nos estados de Mato Grosso e Bahia. UFSCAR, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Departamento de Química. 2010. pp. 7-155.
- [46] LUENGO MB. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. Faculdade de Farmácia-Universidade São Judas Tadeu. São Paulo. *Revista Eletrônica de Farmácia Vol 2 (2)*, 64-72, 2005. ISSN 1808-0804.
- [47] COUTINHO MAS, MUZITANO MF, COSTA SS. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev. Virtual Quim*. 2009. 1 (3), PP. 241-256.
- [48] SILVA PCS. Efeito da dexametasona e do cetoprofeno na osteogênese e na resistência óssea em ratos. Dissertação de Mestrado, UNFENAS-MG. 2010. pp. 24-27.

- [49] CUNHA AS. Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP. 2013. pp. 25-29.
- [50] PEZZINI RB, GOMES FH. Dissolution profiles in Bio-Dis of ketoprofen pellets obtained by extrusion-spheronization and fluid bed coating. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26(4). 2007. pp. 490-498.
- [51] MARTINS TL. Estudo comparativo do emprego de tramadol, codeína e cetoprofeno no controle da dor pós-operatória e nos níveis de glicose, cortisol e interleucina-6 em cães submetidos à maxilectomia ou mandibulectomia. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da USP. 2009. pp. 19.
- [52] MATSUDA EI et al. Estudo comparativo entre o cetoprofeno e o flunixinmeoglumine no tratamento da dor pós-operatória de cães submetidos a cirurgia ortopédica. *Clínica Veterinária, São Paulo, a. IV, n. 19*. Mar/abr 1999. pp. 19-22.
- [53] CATARINA F, NICOLETTA C, ANTONIOVG, GIANNI A. Photodermatitis caused by oral ketoprofen: two case reports. *Contact Dermatitis*.64(3). 2011. pp. 181-183.
- [54] FERREIRA RC. Efeitos analgésico, antiinflamatório e neuroendócrino da Arnica montana 12CH comparativamente ao cetoprofeno em cães. Dissertação de Mestrado, UNOESTE, Presidente Prudente-SP. 2010. pp. 20-21.
- [55] FARMACOPEIA PORTUGUESA 7.ed. Capítulos Gerais, *Comissão da Farmacopeia Portuguesa, Lisboa*, 2002. 297-461.
- [56] SILVA PCS. Efeito da dexametasona e do cetoprofeno na osteogênese e na resistência óssea em ratos. Dissertação de Mestrado, UNFENAS-MG. 2010. pp. 24-27.
- [57] BULAS DE MEDICAMENTOS. Bula do remédio genérico cetoprofeno. *BULÁRIO*. (<http://bulario.net/cetoprofeno>)

- [58] MANADAS R, PINA ME, VEIGA F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas*, vol.38, no.4, São Paulo. Oct./Dec 2002. Fonte Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal.
- [59] TRECCO A, BORGES FA, MAN CC, PERRI EG, ANDRÉ GS, HERCULANO RD . Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35. 2014. pp. 89-95.
- [60] D'ANGELO C, ZUNINO P. A Numerical Study of the Interaction of Blood Flow and Drug Release from Cardiovascular Stents. *Numerical Mathematics and Advanced Applications* 2008. pp. 75-82 ([http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69777-0\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69777-0_8))
- [61] UMASHANKAR PR, HARI PR, SREENIVASAN K. Effect of blood flow on drug release from DES: an experimental study. *Int J Cardiol*. 2009 Jan 24;131(3):415-7. Epub 2007 Nov 14.
- [62] BOLOGNESI LFC, ROMEIRA KM, ANDRÉ AG, PIERRI EG, BORGES FA, SATO NC, HERCULANO RD. Characterization of the sustained release for the *C. sylvestris* Swartz extract associated with ciprofloxacin employing natural latex films as a carrier. UNESP/Assis-SP. UNESP/Araraquara-SP.  
([http://www.eventweb.com.br/xiisbpmat/specific-files/manuscripts/index.php?file=xiisbpmat/18949\\_1369089480.pdf](http://www.eventweb.com.br/xiisbpmat/specific-files/manuscripts/index.php?file=xiisbpmat/18949_1369089480.pdf))
- [63] GIULIANO CB, HERCULANO RD. Evaluation of ciprofloxacin and magnetic nanoparticles delivery system employing natural latex membranes as carrier. UNESP/Assis-SP.  
([http://www.eventweb.com.br/xiisbpmat/specific-files/manuscripts/index.php?file=xiisbpmat/18185\\_1372093074.pdf](http://www.eventweb.com.br/xiisbpmat/specific-files/manuscripts/index.php?file=xiisbpmat/18185_1372093074.pdf))
- [64] GAURI N, ADITI L, AGRAWAL SA. Solubility enhancement of a poorly aqueous soluble drug ketoprofen using solid dispersion technique. *PelagiaResearch Library*. 2011, 2 (4). pp. 67-73.

- [65] BORGES FA, BOLOGNESI LFC, TRECCO A, DRAGO BC, ARRUDA LB, LISBOA FILHO PN, MIRANDA MC, PIERRI EG, GRAEFF CFO, ANDRÉ GS, HERCULANO RD. Natural Rubber Latex: Study of a Novel Carrier for *Casearia sylvestris Swartz* Delivery. *ISRN Polymer Science*, v. 2014. 2014. pp. 1-5.
- [66] ROMEIRA KM, DRAGO BC, MURBACH HD, AIELO PB; SILVA RMG, BRUNELL AC, HERCULANO RD. Evaluation of *Stryphnodendron sp.* Release Using Natural Rubber Latex Membrane as Carrier. *Journal of Applied Sciences (Faisalabad. Print)*, v. 12. 2012. pp. 693-697.
- [67] AIELO PB, ROMEIRA KM, BORGES FA, DRAGO BC, HERCULANO RD. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. *Materials Research*. (2014). In press.
- [68] SILVA GCM. Penetração do moxifloxacino, ofloxacino e ciprofloxacino na córnea e no humor aquoso de olhos humanos enucleados. USP Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2012. pp. 7-27.
- [69] SILVA RG. Farmacocinética e Determinação de Resíduos de Enrofloxacina e seu Metabólico em Tecidos de Frangos. UNICAMP Instituto de Química. 2004. pp. 1-14.
- [70] OGAWA CA, PLEBIS AMG. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. Instituto de Química de São Carlos, USP. *Publicação SCIELO Brasil, Polímeros* vol. 12, no.2 São Carlos. 2002.
- [71] HERCULANO RD, QUEIROZ AAA, KINOSHITA A, OLIVEIRA-Jr ON, GRAEFF CFO. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. *Materials Science and Engineering: C.31(2)*. 2011. pp.272-27.
- [72] GUIDELLI EJ, KINOSHITA A, RAMOS AP, BAFFA O. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. *Journal of Nanoparticle research*, Fev 2013. pp. 1-9.

- [73] ANGULO-SANCHEZ JL AND CABOLLERO-MATO P. Long chain branching in natural Hevea rubber - determination by gel permeation chromatography. *Rubber Chemistry and Technology*. 1981. 54:34-43.
- [74] TARACHIWIN L, SAKDAPIPANICH J, UTE K, KITAYAMA T AND TANAKA Y. Structural characterization of  $\alpha$ -terminal group of natural rubber: 2. decomposition of branch-points by phospholipase and chemical treatments. *Biomacromolecules*. 2005. 6:1858-1863.
- [75] TATA SJ. Distribution of proteins between the fractions of Hevea latex separated by ultracentrifugation. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*. 1980. 28:77-83.
- [76] ZHU JJ, HE J, HE H, TAN SS, XIAO MH, CHUONG HH, LI Li. Study on the interaction between ketoprofen and bovine serum albumin by molecular simulation and spectroscopic methods. *Spectroscopy* 26 (2011) 337–348.
- [77] PEZZINI RB, GOMES FHH. Dissolution profiles in Bio-Dis of ketoprofen pellets obtained by extrusion-spheronization and fluid bed coating. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26(4). 2007. pp. 490-498.
- [78] CATERINA F, NICOLETTA C, ANTONIO VG, GIANNI A. Photodermatitis caused by oral ketoprofen: two case reports. *Contact Dermatitis*. 64(3). 2011. pp. 181-183.
- [79] MOHAN K. Safety evaluation of certain NSAIDs in birds. Department of Pharmacology and Toxicology Veterinary College, Bangalore Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. (2013)
- [80] SAHOO S, CHAKRABORTI CK, BEHERA PK. Spectroscopic investigations of a ciprofloxacin / hpmcmucoadhesive suspension. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 4(3). 2012. pp.1-8.

- [81] RAUKER J, MOSHTAGH PR, WEINANS H, ZADPOOR AA. Analytical relationships for nanoindentation-based estimation of mechanical properties of biomaterials. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. Volume: 14 Edição: 3 Número do artigo: 1430004 DOI: 10.1142/S021951941430004X Publicado: JUN 2014
- [82] HUERTA E, CORONO JE, OLIVA AI. Universal testing machine for mechanical properties of thin materials. *Revista Mexicana de Física*. 2010. 56 (4) pp. 317–322. (<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v56n4/v56n4a8.pdf>)
- [83] RAUKER J, MOSHTAGH PR, WEINANS H, ZADPOOR AA. Analytical relationships for nanoindentation-based estimation of mechanical properties of biomaterials. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. 14(3). 2014. pp. 1-44.
- [84] HARDWICK DA. The mechanical properties of thin films: a review. *Thin Solid Films*. 154(1-2). 1987. pp. 109-124.
- [85] DALL'ANTONIA AS, MARTINS MA, MORENO RMB, MOTTOSO LHC, GONÇALVES PSG, JOB AE. Caracterização mecânica e térmica da borracha natural formulada e vulcanizada dos clones: GT 1, IAN 873, PB 235 e RRIM 600. *SciElo Brasil : Polímeros* V.19 No 1, São Carlos. 2009. ISSN 0104-1428
- [86] DIAS FWR. Comportamento mecânico do polímero PTFE sujeito a diferentes taxas de deformação. Dissertação de mestrado: Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2011. pp. 35-56
- [87] G'SELLC, HIVERJM, DAHOUNA, SOUAHIA. Video-controlled tensile testing of polymers and metals beyond the necking point. *Journal of Materials Science*. 27(18). 1992. pp. 5031-5039.
- [88] TARACHIWIN L, SAKDAPIPANICH J, UTE K, KITAYAMA T, TANAKA Y. Structural characterization of alpha-terminal group of natural rubber. 2. Decomposition of branch-points by phospholipase and chemical treatments. *Biomacromolecules* 6(4). 2005. pp. 1858-1863.