

**UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE  
FÁRMACO E NANOPARTÍCULA UTILIZANDO  
MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL COMO  
CARREADOR**

**Bruno de Camargo Drago**

**Dissertação de Mestrado**

**2014**

**BRUNO DE CAMARGO DRAGO**

**Avaliação da liberação controlada de fármaco e nanopartícula utilizando membranas de látex natural como carreador.**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, com parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano**

**Co-orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff**

**Araraquara**

**2014**

## **Agradecimentos**

À energia suprema que ao dividir, se multiplica e habita a cada irmão neste plano, frutificando o amor e todos os sentimentos que são concebidos à partir deste.

Ao privilégio em ser a mim permitido conviver, aprender e sentir com pessoas tão abençoadas, meu Pai Carlos, minha Mãe Marlene e Irmã Natália, alicerces de minha alma.

À Jéssica, aquela que resolveu, por um imenso prazer do destino, entrelaçar seu caminho ao meu, me abrindo os olhos a cada gesto para o quanto a vida pode ser maravilhosa.

Ao grande irmão, orientador e amigo, Rondinelli por acreditar e me fazer acreditar em meu potencial, mas principalmente por mostrar como a humildade é um dom dos verdadeiros vencedores.

Ao respeitável Prof. Carlos Frederico de Oliveira Greaff, pela honra de sua co-orientação e grande gentileza em possibilitar o desenvolvimento do presente trabalho em seu laboratório.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À todas as almas boas e espíritos de luz.

Meus sinceros agradecimentos.

## ABSTRACT

Drug delivery system is an important subject to several initiatives in nanotechnology, such as the development of optimized systems that ensure the release of these drugs to specific sites in a controlled rate, to treatment of specific diseases. Besides drugs, gold nanoparticles can be used in diagnostic and therapeutic of diseases. Therefore, the aim of this project were incorporate a drug (metronidazole) and gold nanoparticle in natural rubber latex membrane; evaluate the interaction with the membrane; and quantify the release rate from membrane. Natural rubber latex membranes were prepared with metronidazole and gold nanoparticle, composing the Drug Delivery System (DDS). The release rate from nanocomplex composed of drug/nanoparticles were monitored and quantified by optical spectroscopic technique (UV-Vis), which the release from nanocomplex (NpAu + drug) correspond to the function  $y(t) = y_0 + A_1 * e^{-t/\tau_1} + A_2 * e^{-t/\tau_2}$ . Infrared analysis (FTIR) did not show interaction between metronidazole and natural rubber latex. From X-ray diffraction (XRD) results showed that the crystallinity was preserved when they were incorporated in the membrane. As of scanning electron microscope (SEM), metronidazole was observed at membrane surface; and by evaluating the mechanical strength, an increase in the properties was observed. These results corroborates that natural rubber latex membrane is relevant and applicable device to be used as delivery system.

**Keywords:** natural rubber latex, gold nanoparticles, metronidazole, controlled release, biomaterials.

## RESUMO

A liberação controlada de fármacos é um tópico importante para várias iniciativas em nanotecnologia, como por exemplo, a criação de sistemas otimizados que garantam a liberação desses fármacos num sítio específico a uma taxa controlada, para o tratamento de determinadas doenças. Além dos fármacos, nanopartículas de ouro podem ser utilizadas no auxílio a diagnósticos e na terapêutica de afecções. Diante disso, objetivou-se neste projeto de pesquisa: incorporar fármaco e nanopartículas de ouro em membranas de látex natural; avaliar a interação do mesmo nessas membranas; e analisar a taxa de liberação controlada desses sistemas. Para tanto, foram confeccionadas membranas de látex, com o fármaco metronidazol e nanopartícula de ouro, formando o Sistema de Liberação Controlada (SLC). A taxa de liberação deste nanocomplexo constituído de fármaco/nanopartículas foi monitorada e quantificada utilizando o método de espectroscopia óptica (UV-VIS) e observamos que a liberação do complexo (NpAu + fármaco) obedece a uma função  $y(t) = y_0 + A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2}$ . Análises de infra-vermelho (FTIR) mostraram que não houve interação entre o metronidazol e o látex naturalcos. Já análises de difração de raio-X (DRX) mostraram que a cristalinidade é preservada quando incorporados à membrana. À partir da análise via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi possível observar que o metronidazol estava presente na superfície da membrana de látex e, através da avaliação da resistência mecânica, constatamos que a houve um acréscimo desta propriedade, o que corrobora para que o este material seja considerado uma ótima alternativa como um sistema de liberação controlada.

**Palavras-Chaves:** látex natural, nanopartículas de ouro, metronidazol, liberação controlada, biomateriais

## Sumário

1. Introdução.....	9
1.1. Látex natural .....	10
1.2. Metronidazol (MET) .....	16
1.3. Nanopartículas metálicas .....	17
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Obtenção do látex para a preparação das membranas .....	23
3.2 Confeção das Membranas .....	23
3.3 Obtenção do fármaco Metronidazol .....	24
3.4 Produção das nanopartículas de ouro.....	24
3.4.1 Produção de nanopartículas via Quitosana.....	24
3.4.2. Produção das nanopartículas de ouro via membrana de Látex. ....	25
3.4.3 Produção das nanopartículas de ouro via citrato de sódio. ....	26
3.5 Látex natural como sistema de liberação de fármaco/nanopartículas .....	28
3.6. Avaliação da liberação e caracterização das Membranas de Látex Natural.....	29
3.6.1. Espectrofotômetro UV-VIS.....	29
3.6.2. Espectro no Infravermelho (FTIR) .....	30
3.6.3. Máquina de Ensaio Mecânico (Tração) .....	31
3.6.4 Difração de Raio-X .....	34
3.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	35
3.6.6 Avaliação de Citotoxicidade .....	36
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1 Caracterização das nanopartículas produzidas via quitosana. ....	39
4.2 Caracterização das nanopartículas produzidas via látex natural.....	40
4.3 Caracterização das nanopartículas de ouro: via citrato.....	41
4.4 Caracterização do Metronidazol .....	42
4.5 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol incorporado à membrana de látex natural. .....	43
4.6 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol via membrana de látex com nanopartículas agregadas via adsorção. ....	45
4.7 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol via membrana de látex com nanopartículas produzidas via citrato. ....	47

4.8 Caracterização das membranas de látex com nanopartículas e metronidazol via espectroscopia por Infra-Vermelho (FTIR) .....	50
4.9 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura .....	55
4.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	59
4.11 Difração de Raio-X .....	65
4.12 Teste de tensão deformação .....	69
4.13 Avaliação de Citotoxicidade .....	72
5. Conclusão.....	75
6. Referências Bibliográficas .....	78

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

O estudo dos sistemas de liberação de princípios ativos constitui-se em uma área de crescente interesse em biotecnologia. Por apresentar uma maior eficácia terapêutica, promovendo a liberação progressiva e controlada do fármaco, tais sistemas representam uma alternativa plausível à administração de medicamentos, uma vez que raramente um fármaco veiculado sob formas convencionais consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito desejado [1]. Geralmente, apenas uma parte em dez mil de um fármaco injetado intravenosamente alcança seu alvo final quando este está localizado em sítios profundos. Isso é evidenciado claramente quando verificamos a quantidade de barreiras de naturezas variadas (anatômicas, químicas e biológicas) que se interpõem ao local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo.

A liberação controlada de fármacos se faz um tópico relevante para a pesquisa e o uso de polímeros como matriz carreadora merece destaque. Tais compostos constituem-se numa das classes mais versáteis de materiais e têm mudado nosso cotidiano por várias décadas [2] com uma ampla gama de aplicações na área médica, agrícola [3] e de engenharia [4].

O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* pertence a esta classe de compostos e tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas [5]. Membranas feitas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido às suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese [6]. Trabalhos recentes [7-10] demonstraram excelentes propriedades tais como: resistência mecânica, elasticidade, fácil manuseio e baixo custo. Desta forma, pode-se considerar um material com grande potencial ao emprego como matriz liberadora.

Com o intuito de aumentar a assepsia e tornar mais eficaz o controle da liberação, nanopartículas metálicas serão empregadas à membrana de látex natural. O emprego destas é notável como imunossensores nos campos alimentício, ambiental, farmacêutico, químico e de diagnósticos clínicos. As

nanopartículas também são utilizadas para melhorar o sinal analítico ou a imobilização dos imunocompostos [11-12].

Porém, a associação destas a fármacos é algo novo e dotado de profunda relevância à pesquisa, pois o mecanismo de interação droga/nanopartícula incorporados à membrana ainda requer maiores esclarecimentos.

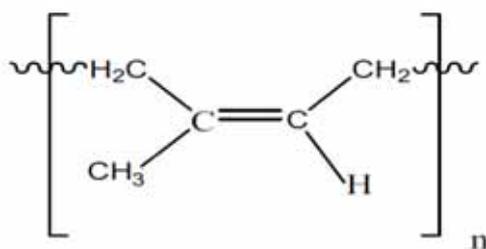
Deste modo, se fez necessária a confecção de um sistema de liberação controlada eficaz que proporcionasse à liberação de fármacos no sítio a ser tratado por períodos prolongados de tempo, bem como o estudo das interações das substâncias incorporadas em dose apropriada.

### **1.1. Látex natural**

O látex natural é uma substância obtida a partir da seringueira *Hevea brasiliensis*, uma árvore nativa da bacia do rio Amazonas no Brasil. O seu nome químico oficial é cis-poliisopreno e possui como características marcantes, em regime elástico, a alta deformação e a capacidade de retomar a sua forma após sua deformação [13,14]. A borracha natural é um material muito utilizado pelas indústrias para a fabricação de pneus, luvas, balões, peças para equipamentos médicos e odontológicos. Esse material é bem aceito devido às suas características físicas como elasticidade, plasticidade, resistência e propriedade de isolamento elétrico.

O látex é constituído de 40 a 45% em peso de moléculas poliméricas que formam a borracha (cis-poliisopreno) (Figura 1), 4 a 5% em peso de outros constituintes orgânicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e açúcares, e 50% de água [15].

**Figura 1-** Monômero de cis-poliisopreno.



**Fonte:** Neves (2006) [15].

As reações alérgicas, inconvenientemente encontradas em alguns produtos deste material, estão relacionadas a proteínas específicas presentes no látex natural [15-17] e/ou ao uso de produtos químicos para a polimerização.

Para a elaboração das membranas centrifuga-se o látex para a remoção das proteínas e a polimerização ocorre à temperatura ambiente sem o uso de aditivos químicos [1, 18]. A Figura 2 mostra a sangria e a coleta do látex natural na seringueira *Hevea Brasiliensis*.

**Figura 2 -** Sangria realizada na seringueira para coleta do látex.

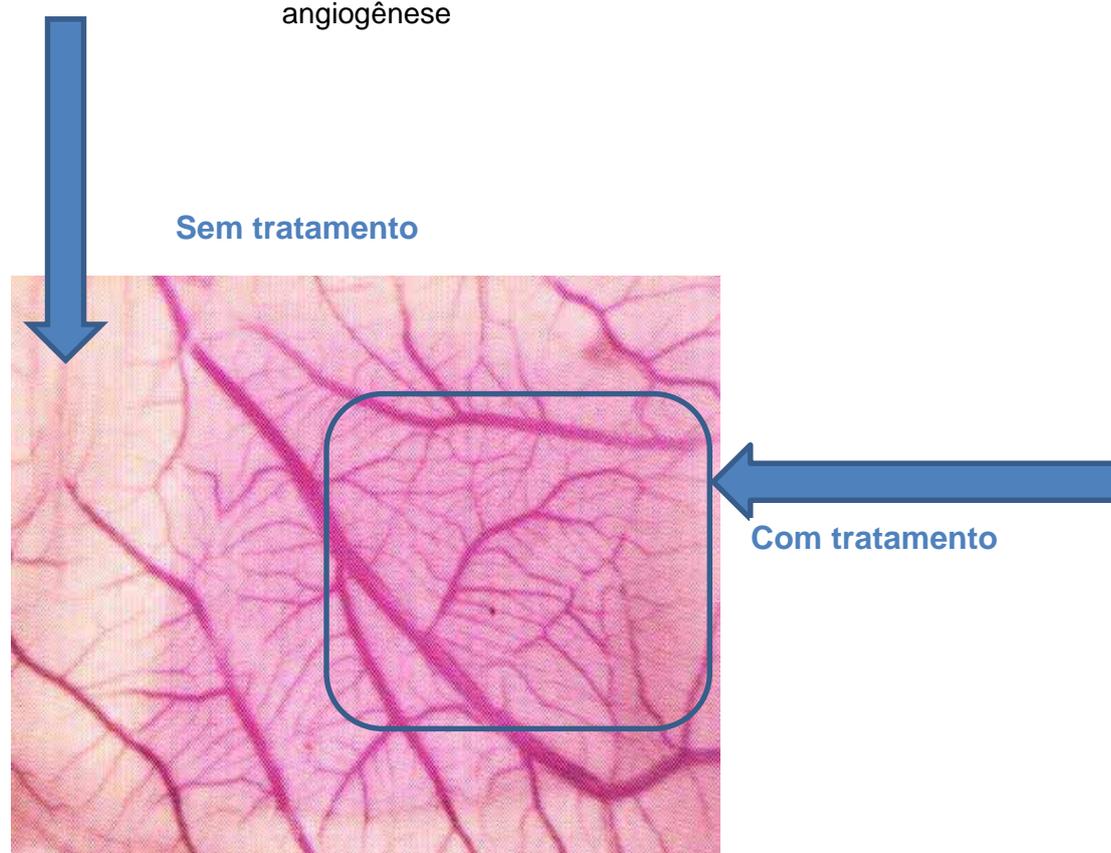


**Fonte:** Herculano (2009) [1].

A membrana de látex foi utilizada pela primeira vez na área médica como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães por Mrué *et al* (1996) [19], na qual demonstrou propriedade indutora de regeneração tecidual, sem ser incorporado ao tecido do hospedeiro, e após 10 dias da operação, o látex foi eliminado nas fezes havendo a formação no local de um novo esôfago.

Posteriormente, em estudo feito por Sader *et al.* (2000) [20] a biomembrana apresentou resultados satisfatórios para a substituição parcial do pericárdio de cães. Além disso, a biomembrana apresentou atividade de angiogênese em um teste biológico da membrana cório-alantóide de embriões de galinha (Figura 3) realizado por Alves (2003) [21].

**Figura 3-** O tratamento com biomembranas de látex natural com estímulo da angiogênese

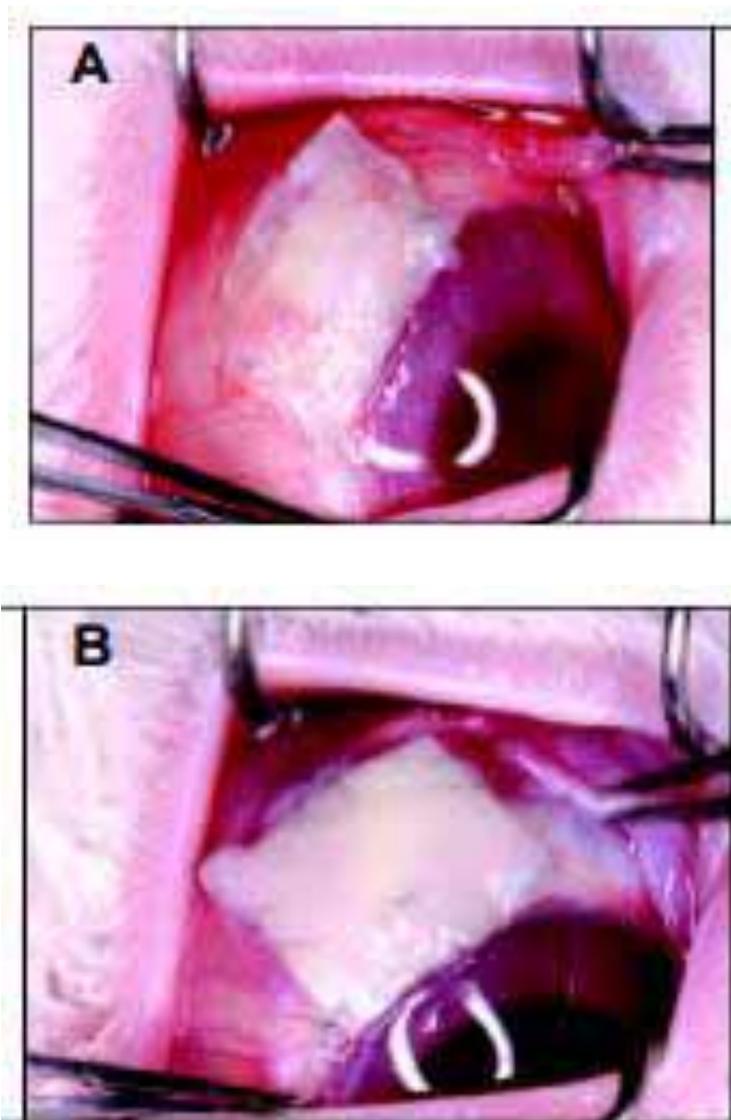


**Fonte:** Alves (2003) [21].

Pinho *et al.* (2004) [22] pesquisaram o uso da biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% na reconstrução conjuntiva em coelhos neo-zelandeses adultos. Foram analisados um grupo controle (sem membrana) e um experimental (com membrana). Após análises histológicas, observaram que a recuperação foi satisfatória em 60% dos olhos com biomembrana enquanto que, nos olhos do grupo sem membrana, ela foi satisfatória em apenas 20%. O número médio de vasos por campo óptico na ferida cirúrgica dos olhos com biomembrana foi o dobro

desse mesmo número nos olhos com esclera nua (grupo controle). Esses dados sugeriram que a biomembrana de látex favorece a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese (Figura 4).

**Figura 4-** Seguimento pós-operatório dos olhos do coelho com a biomembrana de látex. Em A-) observa o olho no sétimo dia. Em B, observa-se o olho no décimo quarto dia .

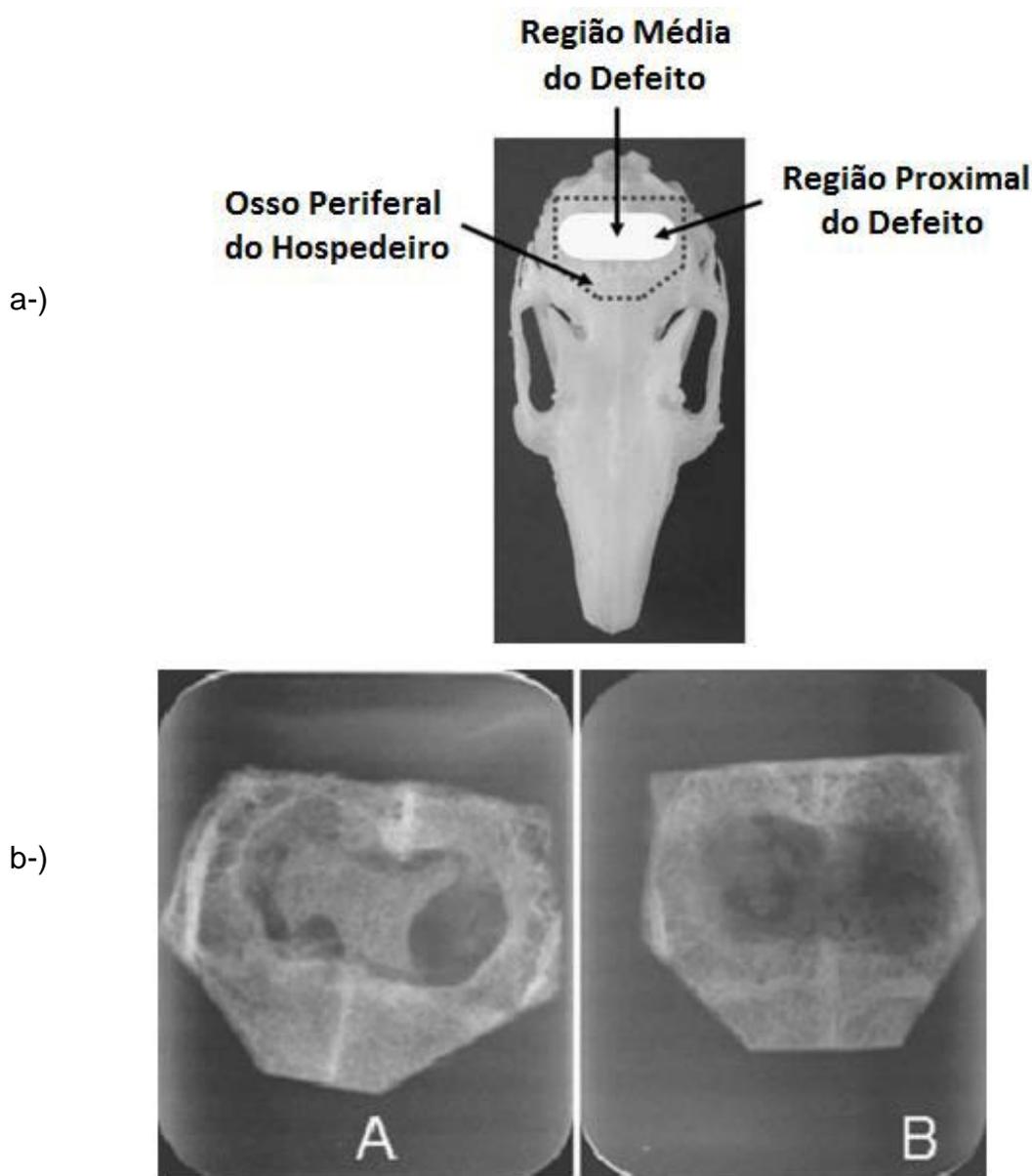


**Fonte:** Pinho (2004) [22]

Ereno et al. (2010) [23] utilizaram biomembranas de látex natural na regeneração óssea. Neste experimento, as biomembranas de látex foram aplicadas

sobre a fratura óssea, impedindo a migração do tecido epitelial e conjuntivo, facilitando a migração de células regenerativas. A Figura 5a, mostra o esquema da cirurgia e suas regiões, e a Figura 5.b mostra as radiografias digitais do grupo tratado (A) e do grupo controle (B) após 120 dias da cirurgia.

**Figura 5** - Membrana de látex natural utilizada como barreira mecânica. Em a-) apresenta um esquema com o local da cirurgia e as regiões. Em b-) são as radiografias digitais do grupo tratado (A) e grupo controle (B)

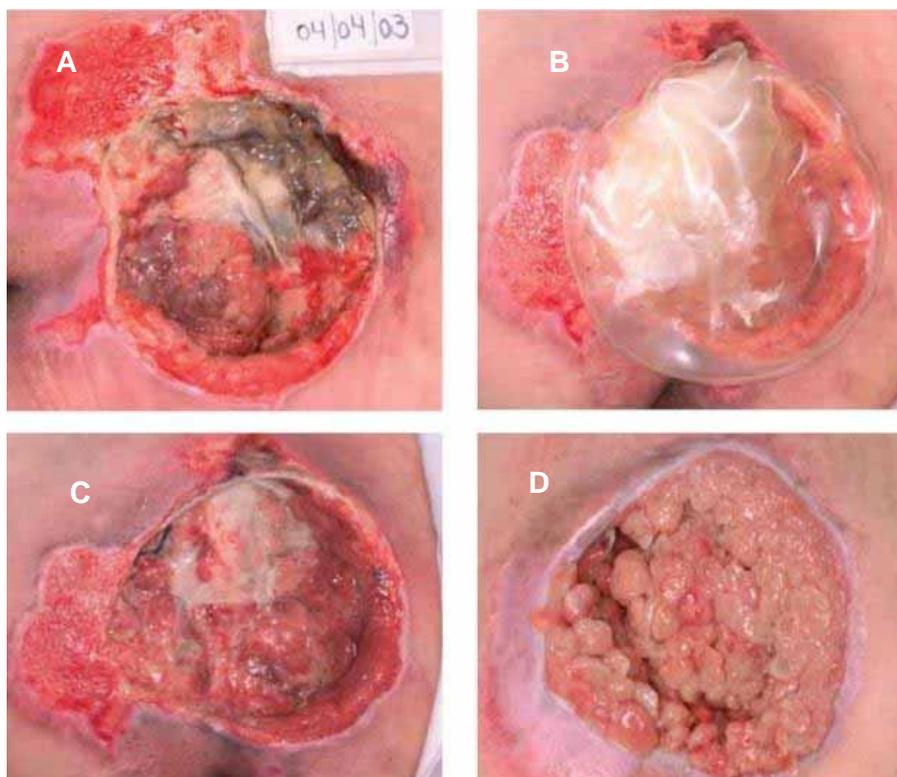


**Fonte:** Ereno (2010) [23].

Já em outro estudo, feito por Balabarian *et al* (2006) [24] com grânulos de látex implantados na cavidades ósseas alveolares após extração dental em ratos, a biomembrana de látex demonstrou biocompatibilidade, progressiva integração com o osso alveolar, simultânea aceleração de neoformação óssea e importante atuação no processo de cicatrização.

Devido a propriedades como resistência mecânica, biocompatibilidade, fácil manuseio, flexibilidade, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e promoção da regeneração óssea de forma previsível [7], a biomembrana de látex natural foi utilizada como uma nova proposta de tratamento de úlceras de pressão (Figura 6) e úlceras cutâneas diabéticas [25].

**Figura 6** - Evolução da cicatrização da úlcera através da aplicação da biomembrana de látex.



**Fonte:** Frade (2004) [25].

Estudos recentes [1, 7, 18] têm demonstrado a utilização do látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* como matriz para um sistema de liberação sustentada, mostrando resultados promissores em aplicações biomédicas.

Devido às características citadas anteriormente, o látex da seringueira apresenta-se como um excelente candidato a matriz sólida de sistemas de liberação sustentada. Na literatura é possível encontrar liberação de alguns fármacos, extratos, nanopartículas e compostos bioativos, tais como:

- Metronidazol [18]
- Ciprofloxacina [7]
- Diclofenaco de sódio [26]
- Diclofenaco de potássio [27]
- Proteínas, como a albumina de soro bovina - BSA [28]
- Extrato vegetal de *Casearia Sylvestris* Sw [29]
- Extrato vegetal de *Stryphnodendron sp* [30]
- Nanopartículas magnéticas [31]
- Peptídeos Bioativos [32]

## 1.2. Metronidazol (MET)

O metronidazol (MET, 2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol,  $C_6H_9N_3O_3$ ) é um antibiótico usado para tratamento de infecções na pele, tecidos e ossos. Ele é um derivado nitroimidazol com atividade antiprotozoária da família dos nitro-5-imidazóis [33-34]. Este composto também possui atividade antibacteriana contra os microorganismos anaeróbios. Está indicado no tratamento de giardíase, amebíase, tricomoníase, vaginites por *Gardnerella vaginalis* e infecções causadas por bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis* e outras bactérias, *Fusobacterium sp*, *Clostridium sp*, *Eubacterium sp* [35]. Propomos a agregação do MET em membranas artificiais porque ele é usado para tratamento de doenças periodontais, tratando as bactérias anaeróbicas da cavidade oral. Além disso, o MET é utilizado para reduzir o processo inflamatório em casos de rejeição e inflamação. Ao penetrar na célula, o MET é degradado por ação de nitrorredutases,

gerando compostos polares citotóxicos. Estes determinam perda da estrutura helicoidal do DNA bacteriano, quebra de filamentos e comprometimento concomitante de sua função, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos; isso é explicado por Seymour *et al.* (1995) [36]. Com a ruptura da estrutura helicoidal do DNA, a célula bacteriana morre.

O metronidazol afeta as células independentemente de estarem se dividindo ou não. A Figura 7 demonstra a estrutura do metronidazol e a ilustração do fármaco comercial.

**Figura 7** - a-) Estrutura do metronidazol para tratamento de infecções na pele, tecidos e ossos; b-) Ilustração do Flagyl que possui o metronidazol como princípio ativo.



**Fonte:** Metronidazol – Wikipedia (2014) [37]

### 1.3. Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas são empregadas na produção de imunossensores, sinalizadores analíticos, imobilização de imunocompostos [38], biossensores DNA/RNA nanoestruturados, purificação de água e resíduos, e para diagnósticos clínicos [39-43].

O nosso interesse em particular pelas nanopartículas de ouro se dá pela sua afinidade com moléculas biológicas e por sua potencialidade em intensificar o sinal de fluorescência de fluoróforos. Além disso, vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as nanopartículas de ouro [44]. A água será escolhida como meio de suspensão das nanopartículas por ser o principal constituinte do meio biológico.

Apesar dos diversos métodos de fabricação de nanopartículas citados na literatura [45-48], escolhemos apenas alguns, levando em conta aspectos tais como facilidade de execução, tempo de fabricação, reprodutibilidade, eficiência do método e estabilidade das nanopartículas de ouro. Dentre as aplicações descritas anteriormente, destacamos:

**1) Sensores:** O uso de nanopartículas como sensores baseia-se na mudança de propriedades ópticas quando estas se ligam a certas moléculas, o que permite a detecção e a quantificação da molécula. Os sensores apresentam uma grande variedade de aplicações, como o diagnóstico de doenças, como o câncer, hipertensão arterial, diabetes tipo 2, leishmaniose e doença de Chagas. O uso da nanotecnologia permite um diagnóstico com uma menor quantidade de amostra garantindo um diagnóstico mais rápido e em estágios iniciais da doença. Estes sensores também apresentam a capacidade de monitoramento, sendo possível um acompanhamento constante de indicadores, como o controle de glicose em um diabético [46].

**2) Carreador:** As nanopartículas também apresentam capacidade de carrear diferentes compostos como fármacos, vacinas e genes. O uso das nanopartículas na administração de fármacos apresentam resultados satisfatórios por diminuir os seus efeitos colaterais, permitindo um melhor direcionamento e controle de liberação do fármaco no alvo do tratamento.

O sistema de liberação controlada (*drug delivery system*) possibilita que drogas descartadas no passado, devido ao seu alto grau de toxicidade ou pela baixa biodisponibilidade possam ser utilizadas novamente, pois estas drogas terão um direcionamento mais específico e serão protegidas da degradação por estas nanoestruturas.

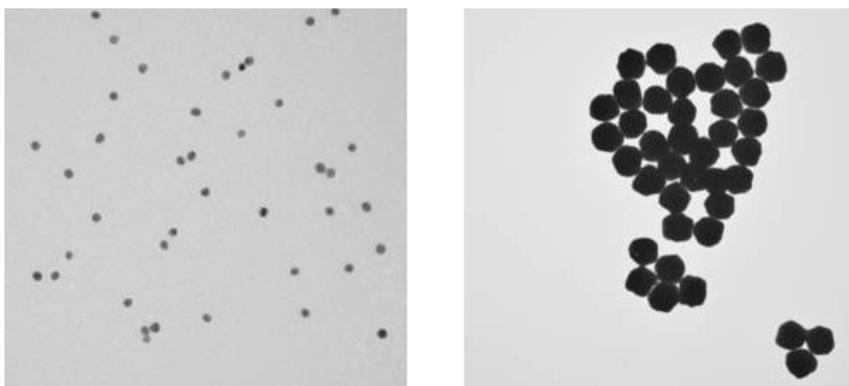
As nanopartículas também podem ser utilizadas na terapia gênica, como um vírus artificial, que transporta nucleotídeos para dentro da célula que vão suprimir a expressão de algum gene, como o da diabetes tipo 1 [39, 43].

**3) Tratamento e detecção do câncer:** Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer representa a segunda maior causa de morte no mundo, e as nanopartículas são a grande esperança para o tratamento da doença [43]. As

nanopartículas possuem um grande potencial de detecção/tratamento do câncer. Os métodos existentes, como a quimioterapia e radioterapia, geram muitos efeitos colaterais por destruir células saudáveis no tratamento, entretanto os métodos que empregam as nanopartículas, agem de modo mais específico sobre o tumor. As nanopartículas se aderem ao tumor, seja utilizando anticorpos que possuem afinidade com proteínas existentes na superfície neoplásica ou pela simples injeção de nanopartículas na corrente sanguínea que se acumulam sobre o tumor [43] e, devido ao rápido crescimento tumoral, os vasos sanguíneos são mal formados de modo a permitir a deposição das nanoesferas [43].

Adicionalmente, as nanopartículas possuem a característica de serem estimuladas por um feixe luminoso a um determinado comprimento de onda, sendo este comprimento de onda determinado pelo formato e tamanho das mesmas, e é nessa sistemática que funcionam os métodos de tratamento. Um laser sob um determinado comprimento de onda incide nas nanopartículas quando estas já estão aderidas ao tumor. O estímulo das nanopartículas (Figura 8) pelo laser, acarreta um aquecimento das mesmas, levando a morte das células cancerígenas sem que células saudáveis sejam afetadas [43].

**Figura 8** - a-) Imagens de Microscopia Eletrônica e Transmissão (TEM) de nanopartículas de ouro produzidas pela Sigma-Aldrich: a-) 5nm e b-) 400nm .



**Fonte:** SIGMA-ALDRICH (2014) [49]

## **2. OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Desenvolver um novo sistema empregando o látex natural como liberador de metronidazol associado a nanopartículas de ouro
- Avaliar a interação das nanopartículas de ouro com membranas de látex natural, para entender o comportamento da liberação sustentada;
- Caracterizar a taxa de liberação das nanopartículas de ouro, utilizando as técnicas de espectrofotometria ótica e microscopia;
- Caracterizar de forma química e estrutural as membranas, utilizando difração de Raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura associada a técnica de energia dispersiva de raio-X (MEV-EDS), análise de resistência mecânica e espectroscopia por infra-vermelho (FTIR).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. Materiais e Métodos

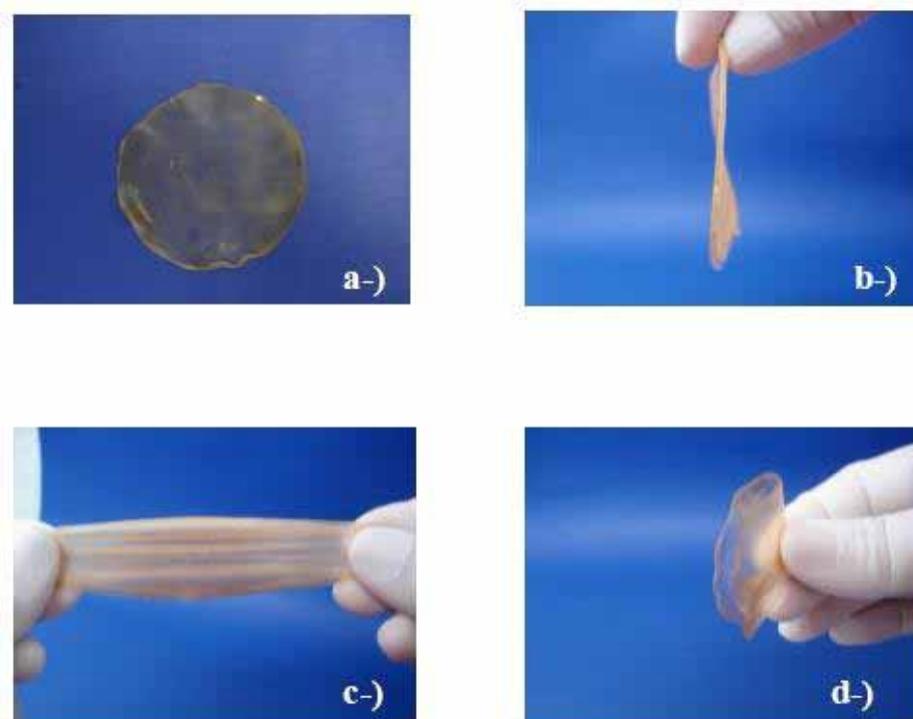
#### 3.1 Obtenção do látex para a preparação das membranas

O látex natural utilizado neste projeto de pesquisa foi obtido da Fazenda Experimental da ESALQ-USP, Piracicaba/SP. Depois da extração, o látex foi mantido em fase líquida através da adição da amônia corrigindo a acidez, com pH igual a 10. Após adição da amônia, o material foi centrifugado a 8000g visando à separação de proteínas alergênicas contidas no látex natural.

#### 3.2 Confeção 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. A espessura das membranas empregadas foi de  $(1,00 \pm 0,01)$ mm, em forma circular (Figura 9), pois foram depositadas em placas circulares de 5,0cm de diâmetro. Foram produzidas membranas de látex natural, membranas de látex natural incorporado com o metronidazol (MET) e membranas de látex com metronidazol reforçado com nanopartículas de ouro. Para as **membranas de látex + metronidazol**, os volumes depositados nas placas foram de 3mL de látex natural líquido acrescido de 3mL de metronidazol (1mg/mL). Já para as **membranas de látex + metronidazol + nanopartículas de ouro**, os volumes depositados foram 3mL de látex natural líquido + de 3mL de metronidazol (1mg/mL) + 1mL de nanopartícula de ouro.

**Figura 9-** Forma (a); Espessura de 1,0mm (b); Elasticidade (c); Flexibilidade da membrana de látex natural (d).



**Fonte:** Herculano (2009)[1].

### 3.3 Obtenção do fármaco Metronidazol

Este fármaco foi obtido através de manipulação feita pela farmácia “Callithea Farmácia de Manipulação”, localizada na cidade de Assis,SP, atendendo as normas e exigências de qualidade da ANVISA. Foram utilizadas 20 cápsulas de 100mg de MET, **sem excipientes**

### 3.4 Produção das nanopartículas de ouro

#### 3.4.1 Produção de nanopartículas via Quitosana

As nanopartículas de ouro foram obtidas através da mistura de uma solução de quitosana (2% no ácido acético) com concentração de 5,5 mg/mL adicionada à

solução de 8.1mM de  $\text{KAuCl}_4$ . As soluções obtidas foram aquecidas em banho maria durante 3 horas [51]. Assim, formaram-se as soluções com nanopartículas de ouro (Figura 10). Neste método de síntese, não é necessário o uso de estabilizadores [52], pois a quitosana consegue reduzir e estabilizar o ouro.

**Figura 10** - Solução de nanopartículas de ouro via quitosana.



Fonte: Arquivo próprio.

### 3.4.2. Produção das nanopartículas de ouro via membrana de Látex.

Partiu-se então para novo processo de incorporação (agregação) das nanopartículas às membranas através de adsorção [53], o qual propõe que as membranas de borracha natural, obtidas por casting, como já apresentado, sejam inseridas em um béquer com água destilada, processada no modelo Millipore - Progard®, por 30 min. para que seus poros possam se expandir. Após, dilui-se o sal de cloreto de ouro ( $\text{KAuCl}_4$ ) numa proporção de 0,0228 g para 240 mL de água Millipore, o que equivale a uma concentração de  $3.1 \times 10^{-4}$  M, concentração escolhida em função de métodos de preparação de colóides por meio de redução química [53], eleva-se a uma temperatura de 80°C. As membranas foram colocadas na solução onde ocorre a redução do ouro (Au) e retiradas em 30 minutos apresentando aspecto similar ao da Figura 11.

**Figura 11** - Membrana de látex com nanopartículas de ouro agregadas via adsorção.



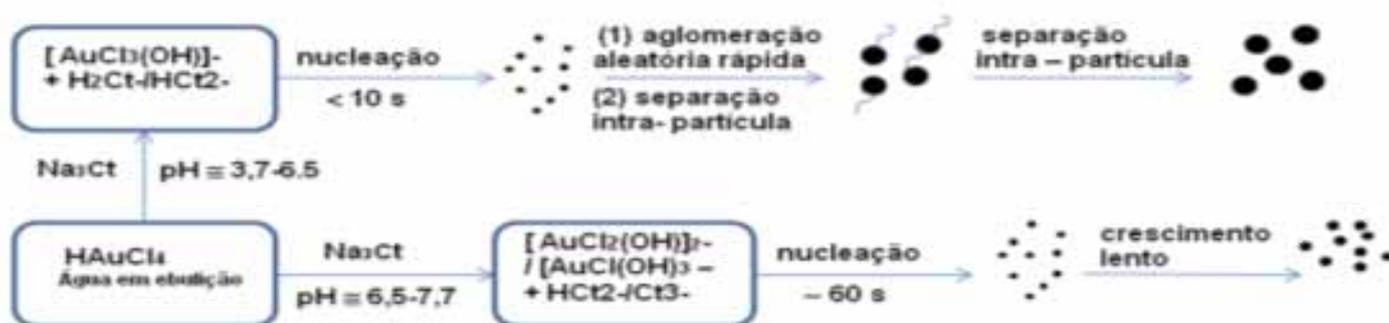
**Fonte:** Arquivo pessoal

### **3.4.3 Produção das nanopartículas de ouro via citrato de sódio.**

Este método proposto, inicialmente, por Turkevich *et al.* (1951) [41] e posteriormente aperfeiçoado por G. Frens na década de 1970 [42] é mais simples disponível e ainda o mais utilizado no meio científico. As partículas produzidas por esta metodologia, geralmente, possuem formato esférico e diâmetro variando de 10 a 20 nm [41,42].

À partir de tal metodologia, aproximadamente 9,6 mg de  $\text{KAuCl}_4$  (originalmente  $\text{HAuCl}_4$ , substituído por economicidade) foram diluídos em 95 mL de água destilada com posterior aquecimento. Ao atingir o ponto de ebulição, 5 mL de solução de citrato de sódio 1% foi adicionada. O mecanismo de formação das nanopartículas pode ser entendido sucintamente através da Figura 12.

**Figura 12** - Formação de NpAu por citrato.



Fonte: Popielski (2011) [54].

Alguns minutos depois, a solução, que inicialmente é incolor, passa por azul escuro, vinho, vermelho claro, atingindo finalmente a cor rosa como pode ser observado na Figura 13.

**Figura 13**- Solução de nanopartículas obtidas via citrato.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5 Látex natural como sistema de liberação de fármaco/nanopartículas

No sistema estático de liberação controlada de fármacos, as membranas foram 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.

As membranas de látex natural com metronidazol (MET) e nanopartículas foram fabricadas depositando 3mL de látex natural acrescidos de 3mL de uma solução de metronidazol (1mg/mL).

Além disso, foram produzidas membranas de látex, nas quais foram agregadas as nanopartículas metálicas com 3mL de látex + 3mL do fármaco (1mg/mL) + 1mL da solução de nanopartícula de ouro (NP). Em seguida as membranas foram secadas à temperatura de 22°C. Estas membranas incorporadas com os fármacos e nanopartículas de ouro (NP) foram colocadas em 200 mL de solução aquosa (Figura 14).

**Figura 14-** Membrana de látex natural com nanopartículas/fármaco agregados, imersa em solução aquosa.



Fonte: Arquivo Pessoal.

O comportamento da liberação foi observado através da técnica de Espectroscopia por UV-VIS, mensurando alíquotas retiradas da solução na qual a membrana estava presente por período não inferior a 300 horas.

### **3.6. Avaliação da liberação e caracterização das Membranas de Látex Natural**

Para a avaliação da liberação das substâncias agregadas ao látex e caracterização das membranas de látex natural foram empregadas, algumas das técnicas clássicas mais utilizadas, que envolvem a espectroscopia UV-Vis, microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raio-X e Teste de Resistência Mecânica.

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

No processo de liberação controlada de fármacos, os resultados foram caracterizados por espectroscopia óptica (UV-VIS), em que 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 às radiações ultravioletas (UV) e visível (VIS), ajustadas na faixa de 200 a 800nm de comprimento de onda. Os compostos contidos nas amostras, ao serem irradiados, podem absorver, refletir e transmitir partes da energia incidente. A energia refletida pela amostra é coletada e comparada com a energia emitida pelo aparelho, caracterizando a transmitância (T) da amostra, ou de, através de cálculos, 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 uma banda de absorbância em um comprimento de onda característico.

### 3.6.2. Espectro no Infravermelho (FTIR)

Para realização dos ensaios contidos neste projeto e das análises desta técnica foi utilizado o espectrômetro de infravermelho (FTIR) Bruker Vertex 70 dos Laboratórios Multi-Usuários da Faculdade de Ciências, Unesp Bauru.

O procedimento consistiu em colocar amostras de metronidazol em pó, solução de nanopartículas de ouro (NP), membranas de látex natural, membranas de látex natural com metronidazol, membranas de látex com NP, membranas de látex com metronidazol e NP no espectrômetro de infravermelho e comparar seus espectros utilizando o modo Refletância Total Atenuada (ATR), a fim de se detectar as interações intermoleculares entre os compostos e o látex natural.

A espectroscopia de Reflexão Interna ou Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica utilizada para se obter espectros no infravermelho de amostras como: pastas, adesivos e pós que não podem ser analisados pelos métodos convencionais, como pastilhas ou filmes.

O princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão [55]. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado valor crítico ( $\theta_c$ ) a reflexão é completa. No ponto de reflexão (de acordo com observações experimentais) o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra. A profundidade de penetração ( $d_p$ ) é dada pela Equação 1:

$$d_p = \frac{\lambda}{\{2\pi n_1 \sqrt{[\text{sen}^2(\theta) - (\frac{n_2}{n_1})^2]}\}} \quad \text{Equação 1}$$

Na qual,

$n_1$  = índice de refração (cristal ATR);

$n_2$  = índice de refração (amostra);

$\theta$  = o ângulo de incidência;

$\lambda$  = o comprimento de onda da radiação.

A radiação de penetração é chamada onda evanescente. Se a amostra absorve em certo comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho, originando o espectro. A técnica ATR tem grande utilidade para examinar materiais densos ou com alta absorção, como é o caso da gasolina, e também de soluções aquosas. Neste projeto, esta técnica foi empregada para estudar as bandas de ligação entre os fármacos/nanopartículas e as membranas de látex natural.

### 3.6.3. Máquina de Ensaio Mecânico (Tração)

Os ensaios mecânicos foram realizados utilizando-se a máquina de ensaio mecânico – **EMIC modelo DL 2000** (Figura 15) da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP Assis. Membranas em formato de 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 por computador que os interpreta gerando tabelas de valores, coeficientes e o gráfico Tensão (Força/Área) X Deformação específica (deformação/comprimento da membrana).

Os três principais modos pelos quais os sistemas sofrem deformação são tração, cisalhamento e compressão. 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 do material, não importando suas dimensões [56,57]. Quanto maior for este módulo maior será a resistência do material à deformação. E, obviamente, para uma mesma tensão, quanto menor forem as dimensões do corpo de prova, menor será a força necessária para deformá-lo.

Porém, para os polímeros, a tensão e a deformação não são relacionadas através de simples constantes de proporcionalidade, como o módulo de

elasticidade. As respostas dos polímeros às solicitações mecânicas são acentuadamente dependentes de fatores estruturais e de variáveis externas [58]. Para materiais de baixa massa molecular, o comportamento mecânico é descrito em termos de dois tipos de material ideal: o sólido elástico e o líquido viscoso. O sólido elástico retorna a sua forma inicial depois de removido o esforço, e a deformação do líquido viscoso é irreversível na ausência de forças externas [56-58].

Os polímeros se caracterizam por apresentar um comportamento intermediário entre o sólido elástico e o líquido viscoso, dependendo da temperatura e da escala de tempo do experimento. Esta característica é denominada viscoelasticidade.

Neste projeto foi utilizado o teste de tração, que consiste na aplicação de força nas extremidades da amostra, em direções opostas, até sua ruptura.

Como resultado de uma caracterização por testes de tração mecânica, é obtido 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<sup>®</sup> foi obtida 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 5mL de látex natural acrescidos de 3mL de metronidazol (1mg/mL). Também foram produzidas membranas com 5mL de látex natural acrescidos de 2mL de metronidazol (1mg/mL) e 1mL de solução de nanopartículas de ouro (NP).

**Figura 15** - Máquina de Ensaio Mecânico EMIC DL 2000 utilizado nas amostras de látex natural.



**Fonte:** Arquivo Pessoal.

A Figura 16 mostra um molde com 3 membranas já secas, confeccionadas na forma de halteres e destinadas aos ensaios de resistência mecânica. Todas as amostras apresentam mesmo comprimento, mesma largura e mesma espessura. A temperatura da secagem para todas as amostra foi de 22°C em estufa.

**Figura 16-** Membranas confeccionadas na forma de halteres para testes de resistência mecânica à tração.



**Fonte:** Arquivo Pessoal.

### 3.6.4 Difração de Raio-X

Em 1913, Max Von Laue sugeriu que o arranjo regular dos átomos de um cristal, com espaçamento da ordem de 0,1nm, agiria como uma rede de difração tridimensional de raios X. É conhecido da teoria eletromagnética que o raio refletido por uma superfície regular forma um plano no qual, o ângulo de incidência é o mesmo da reflexão. Segundo Bragg, para haver interferência construtiva entre raios incidentes paralelos em planos sucessivos, a diferença de caminho óptico AB + BC deve ser igual a um número inteiro de comprimentos de onda (Equação 2), ou seja.

$$m \lambda = 2 d \sin \theta$$

**Equação 2**

em que “d” é a distância interplanar. Esta expressão é conhecida como Lei de Bragg e “m” define a ordem de reflexão, sendo o máximo de difração de 1ª ordem normalmente o mais intenso [59,60]. Assim, conhecendo-se os ângulos de reflexão e o comprimento de onda da radiação incidente, é possível conhecer a distância entre os vários planos do cristal, permitindo caracterizá-lo.

Esta técnica corresponde a uma das principais formas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente nas engenharias de materiais, metalúrgica, química e de minas.

Neste projeto, a Difractometria de Raios X foi utilizada com a intenção de determinar a presença de corpos cristalinos, especificamente o fármaco metronidazol e as nanopartículas de ouro em meio à estrutura amorfa das membranas de látex natural.

### 3.6.5. 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.

O primeiro microscópio eletrônico de varredura (MEV) surgiu em 1932, desenvolvido por Max Knoll e Ernest Renka Rusca, na Alemanha, já o primeiro protótipo com capacidade de analisar amostras espessas, no entanto, foi construído por Zworykin, em 1942 [61]. Desde então, esta técnica se tornou de uso fundamental em praticamente todos os ramos da química, da análise estrutural de microrganismos à definição de porosidade em cerâmicas. É um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra, na qual, ocorrendo uma interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE - imagem de elétrons retroespalhados - ou nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários) [62]. Este equipamento, apresenta intervalo bastante abrangente na sua escala de observação, variando da ordem de grandeza de milímetro (mm) ao nanômetro (nm), o que possibilita verificar, por exemplo, estruturas anatômicas de uma planta. Aliando a Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) com a Microscopia Eletrônica de Varredura conseguimos, além da determinação qualitativa, a determinação quantitativa da composição de uma amostra [61-63].

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 compostos no biomaterial. Esta caracterização foi realizada no equipamento **Zeiss® EVO 50 (20 KV)** do Laboratório Multi-Usuário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP e no Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

### 3.6.5.1 MEV das amostras fraturadas

Primeiramente as amostras foram fraturadas criogenicamente e, após receberam um recobrimento de ouro (ou carbono) para melhor conduzir os elétrons, a observação foi realizada na superfície da região fraturada. O equipamento utilizado foi o Zeiss® EVO 50 (20 KV e os diâmetros das fases foram medidos utilizando-se o software livre UTHSCSA **Image Tool**.

### 3.6.6 Avaliação de Citotoxicidade

#### 3.6.6.1 Cultura celular

A linhagem MC3T3-E1 subclone 14 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para expansão as células são mantidas em garrafas de cultura (BD Falcon™, New Jersey, EUA) em Meio Mínimo Essencial Alfa ( $\alpha$ -MEM, modificado com ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos da LGCBio, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal da Gibco®, New York, EUA), 2 mM de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina e 0,25  $\mu$ g/mL de fungizona, da Gibco®, New York, EUA), a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. As trocas de meio ocorrem três vezes por semana. Ao atingirem confluência de 80-90%, as células foram dissociadas com TrypLe™ (Gibco®, New York, EUA) e expandidas em outras garrafas na concentração de 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. A contagem das células é feita em microscópio óptico em câmara de Neubauer com 10  $\mu$ L de azul de tripan e 10  $\mu$ L de suspensão celular.

#### 3.6.6.2 Citotoxicidade por metabolismo de MTT

Consiste na avaliação colorimétrica pela quantificação da redução metabólica, por células sadias, do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica associadas ao NADPH e ao NADH, resultando em cristais de Formazan (de cor azul-púrpura). DMSO é utilizado para sua remoção de dentro das células e solubilização, permitindo sua quantificação por espectroscopia.

Após o teste, o meio de cultura foi removido e foi adicionado meio de cultura novo (sem soro nem vermelho fenol) com 10% v/v de MTT (5 mg/mL em PBS) e incubado por 4h a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio é descartado e é adicionado DMSO (dimetil sulfóxido) para dissolver os cristais, no mesmo volume do meio de cultura utilizado. O volume de 100 µL das amostras foram coletados e transferidos para placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi medida no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer a 570 nm. A viabilidade foi calculada em relação ao controle negativo.

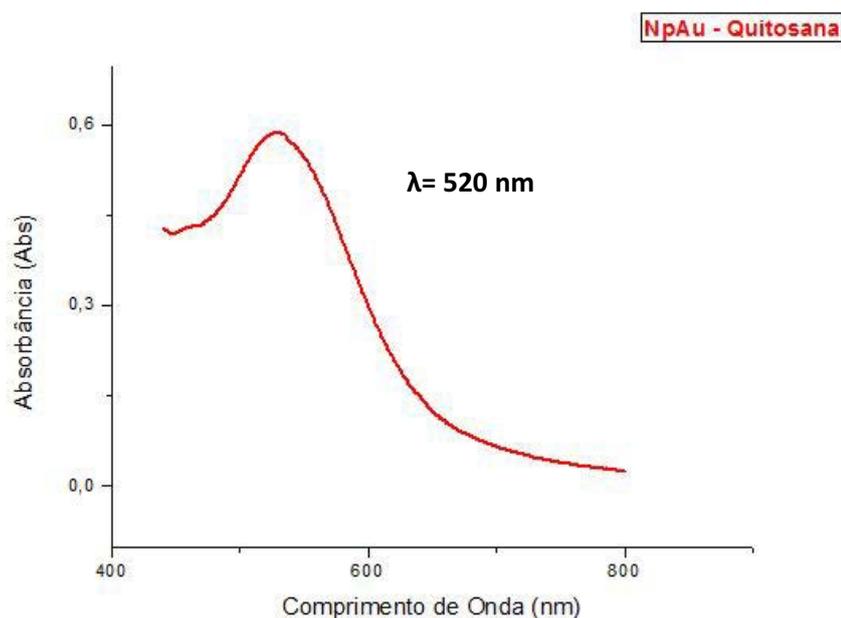
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização das nanopartículas produzidas via quitosana.

Foram produzidas nanopartículas de ouro através de soluções de  $\text{KAuCl}_4$  e quitosana (2% no ácido acético). A caracterização foi realizada por espectroscopia ótica (UV-VIS) com solução de concentração de 8.1mM  $\text{HAuCl}_4$ , adotando o comprimento de onda de **520 nm**. Diferentes comprimentos de onda da síntese de nanopartículas de ouro foram encontrados na literatura, porém vale ressaltar que cada instrumento de análise possui suas peculiaridades e desvios. Após a definição do comprimento de onda, o espectro de absorção em função do comprimento de onda foi feito como pode ser observado (Figura 17).

**Figura 17** - Espectro de absorção da solução de nanopartículas de ouro obtida pelo método de estabilização e redução com quitosana.

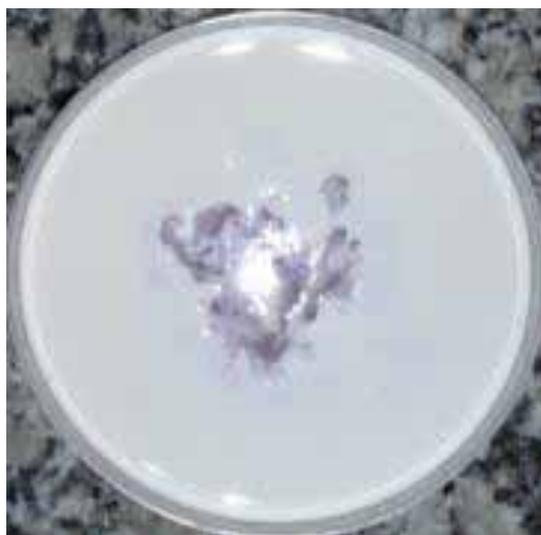


**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Com o objetivo de agregar a solução de nanopartículas de ouro à solução de látex, produzindo membranas via "casting", foram misturados 3 mL de látex à 1 mL

de nanopartículas de ouro. Porém, ao expor ao contato as soluções dos dois polímeros, ocorreu uma separação de fases devido a diferença de pHs com o surgimento de um componente borrachoso denso e uma solução aquosa (Figura 18).

**Figura 18-** Tentativa de solubilização da solução de nanopartículas de ouro via quitosana em látex.



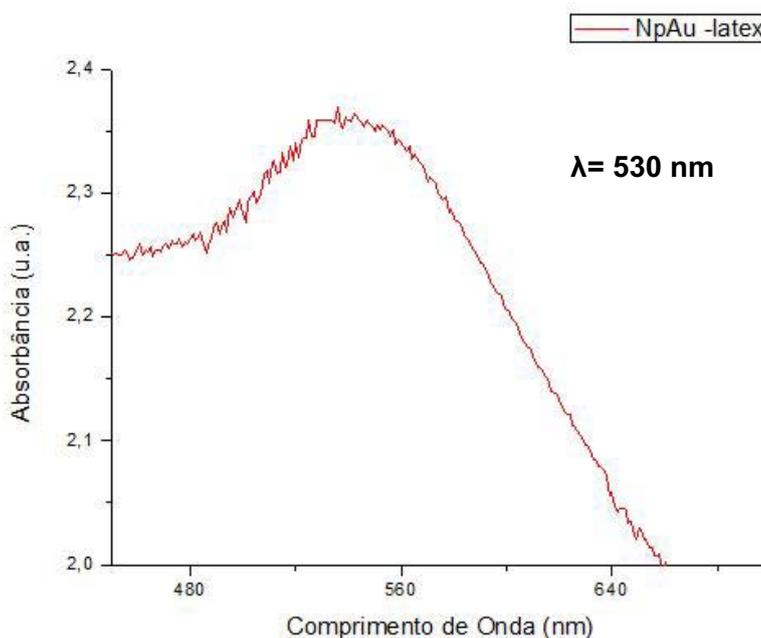
**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Deste modo, descartou-se o uso da quitosana para a síntese, estabilização e redução das nanopartículas, pois a imiscibilidade dos dois biopolímeros impossibilitou a formação de uma membrana homogênea e adequada ao tratamento em seres vivos.

#### **4.2 Caracterização das nanopartículas produzidas via látex natural.**

As nanopartículas estabilizadas e reduzidas diretamente na membrana de látex foram caracterizadas através de espectroscopia UV-Vis e o espectro de absorção está plotado na Figura 19. O gráfico permite confirmar a presença de nanopartículas.

**Figura 19** - Espectro UV-Vis de absorção das nanopartículas produzidas via adsorção.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

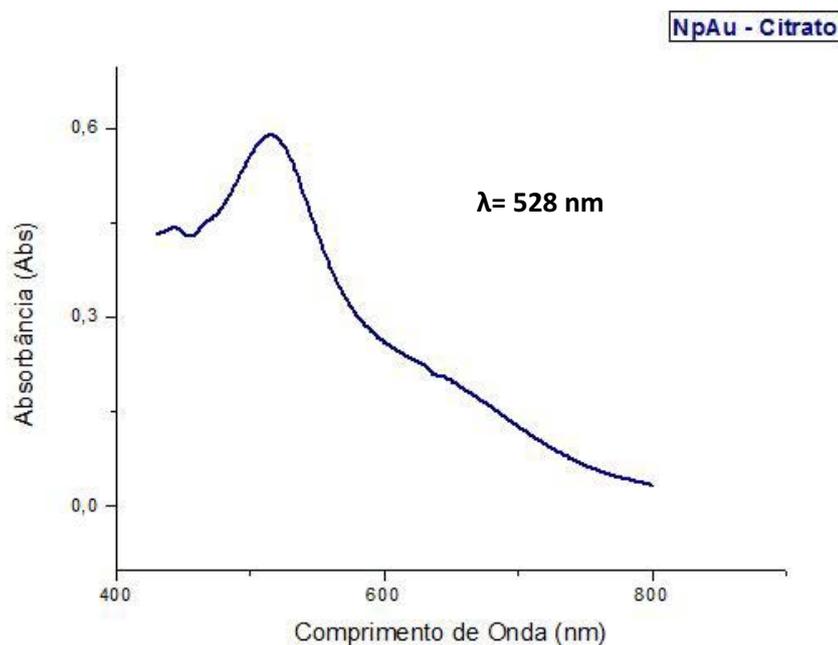
### 4.3 Caracterização das nanopartículas de ouro: via citrato.

Pioneiro e com grande empregabilidade, o método proposto por Turkevich em 1951 utiliza citrato de sódio para estabilização e redução das partículas em escala nano.

O citrato de sódio tem ampla gama de aplicações na indústria alimentícia, como flavorizante e conservante, e farmacêutica, empregado como anticoagulante, constituindo-se assim em uma boa escolha para o projeto.

As soluções de nanopartículas de ouro foram analisadas via espectroscopia ótica (UV-VIS), adotando o comprimento de onda de **528 nm** e o resultado encontra-se plotado no gráfico apresentado na Figura 20. Vale ressaltar que há a variação no comprimento de onda encontrado devido às especificidades de cada instrumento.

**Figura 20** - Espectro de absorção da solução de nanopartículas de ouro obtida pelo método de estabilização e redução com citrato.



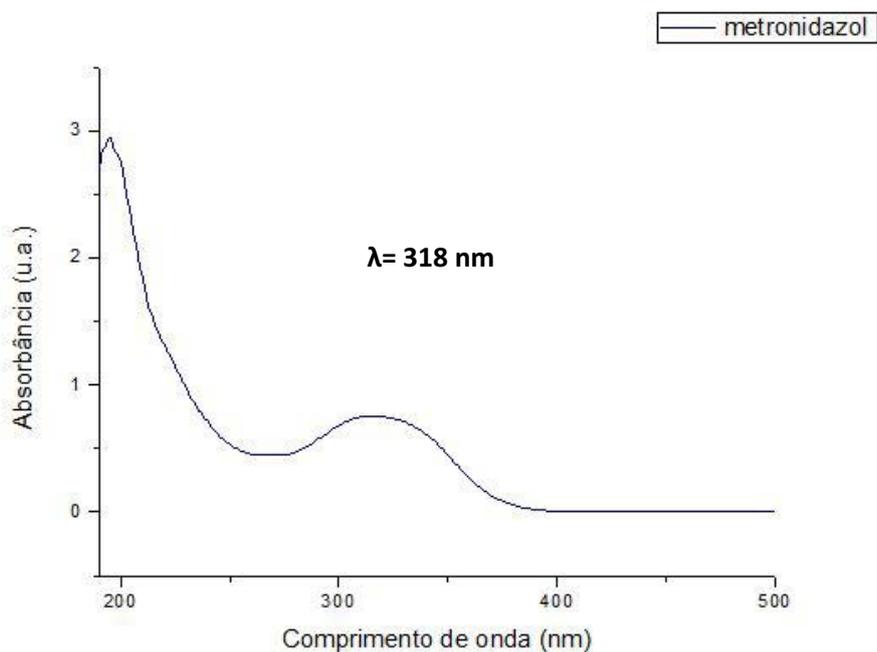
**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Diferentemente da síntese de nanopartículas de ouro via quitosana, as nanopartículas via citrato de sódio apresentaram boa solubilização ao serem adicionadas à solução de látex e à solução de látex com Metronidazol resultando em membranas homogêneas. Desta forma, esta metodologia de síntese foi escolhida para o restante do projeto.

#### 4.4 Caracterização do Metronidazol

A espectroscopia ótica (UV-VIS) foi empregada para obter o comportamento óptico do fármaco Metronidazol e sua banda de absorção foi avaliada na faixa de **318 nm** de comprimento de onda (Figura 21). A concentração do fármaco empregada foi 1 mg/mL.

**Figura 21** - Espectro UV-Vis do metronidazol em meio aquoso, concentração 1 mg/mL.

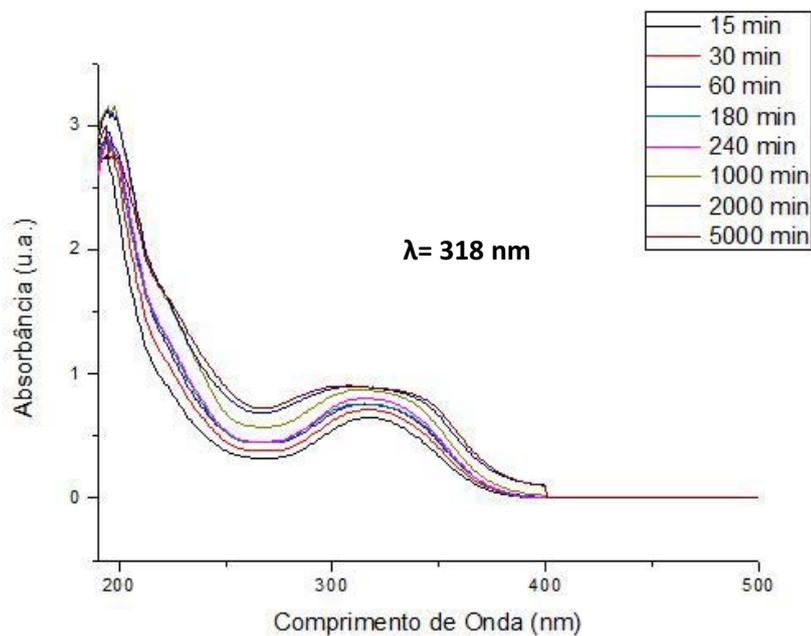


**Fonte:** Arquivo Pessoal

#### **4.5 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol incorporado à membrana de látex natural.**

Para os estudos das taxas de liberação do metronidazol (MET), membranas de látex natural com o fármaco (1000 µg/mL) foram colocadas em 200 mL de água e alíquotas foram retiradas durante 5000 minutos (Figura 22).

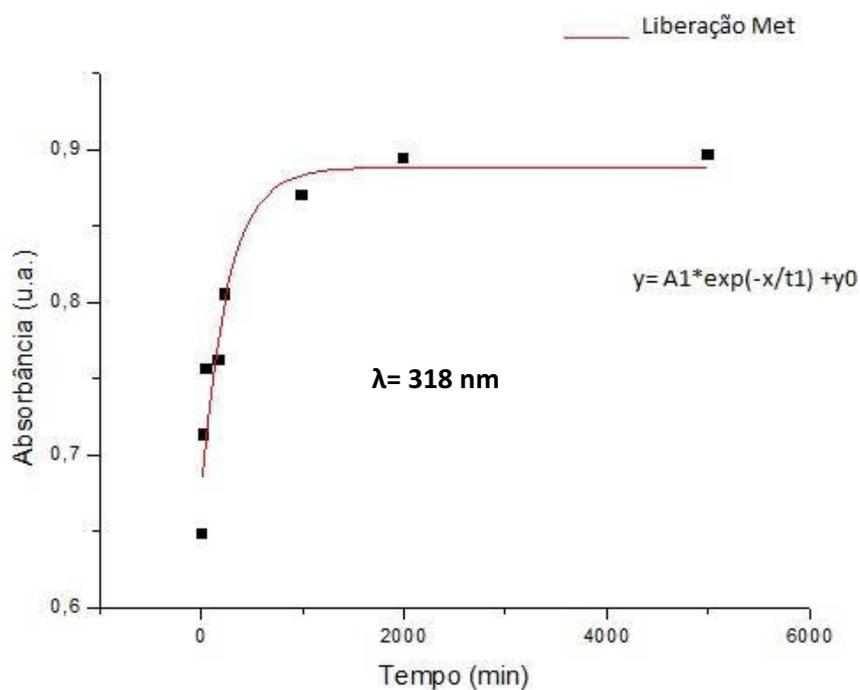
**Figura 22** - Espectro UV-Vis de liberação do metronidazol em meio aquoso.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Com a relação entre absorbância e tempo, é possível apresentar a curva de liberação do Metronidazol. A liberação do MET obedece a uma função bi-exponencial (Figura 23), onde a liberação mais rápida ocorre devido à presença do fármaco adsorvido na superfície da membrana, enquanto que liberação mais lenta ocorre pelo fato do fármaco estar presente em regiões mais internas da membrana (bulk).

**Figura 23** - Curva de liberação da absorbância em função do tempo da liberação de metronidazol em meio aquoso.

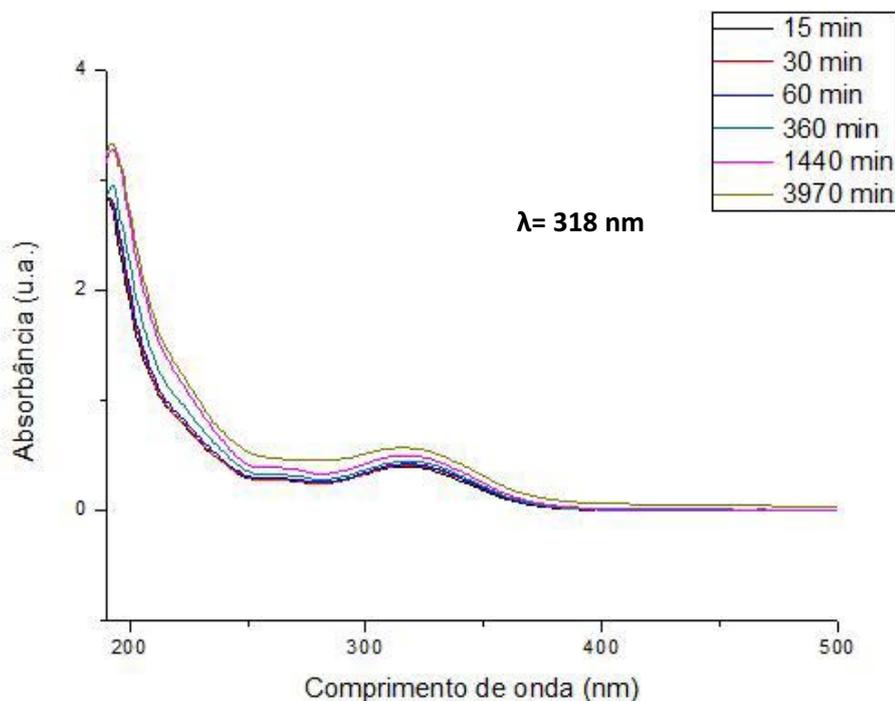


Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 4.6 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol via membrana de látex com nanopartículas agregadas via adsorção.

Após a verificação da viabilidade de estabilização e redução das nanopartículas por adsorção, o passo seguinte foi realizar a incorporação do fármaco via casting com a diluição de 3 mL de solução de metronidazol (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) em 3 mL de látex. Em seguida foi feita a agregação das nanopartículas de ouro via adsorção. A liberação do metronidazol pode ser observada segundo o gráfico de absorbância X comprimento de onda abaixo (Figura 24).

**Figura 24** - Espectro de liberação do metronidazol em membrana com nanopartículas agregadas via adsorção.

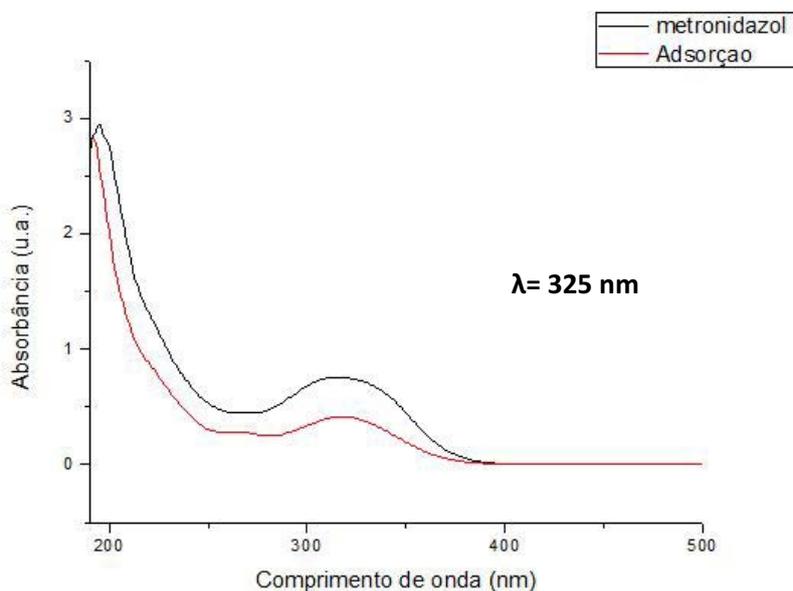


**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os níveis de absorvância foram menores, quando comparados à liberação do metronidazol não submetido ao método de adsorção. Isso se deve ao fato da membrana com o fármaco incorporado iniciar liberação durante o processo de redução e estabilização das nanopartículas, o que faz com que a concentração destas nanopartículas menor quando submetido à análise de liberação controlada.

Na Figura 25 foi plotado os dados relativos à liberação do fármaco de membranas submetidas à estabilização de nanopartículas de ouro via adsorção e não expostas ao mesmo processo.

**Figura 25** - Espectro UV-Vis comparativo entre as liberações de membrana de látex com metronidazol e membrana de látex com metronidazol submetida à adsorção.



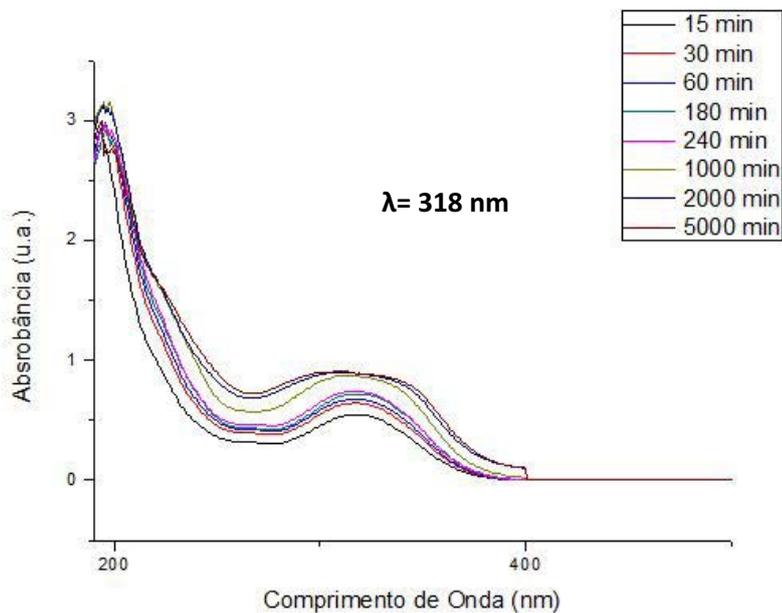
**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Deste modo, descartou-se tal método de síntese de nanopartículas devido à perda de fármaco durante o processo.

#### **4.7 Estudo das taxas de liberação do Metronidazol via membrana de látex com nanopartículas produzidas via citrato.**

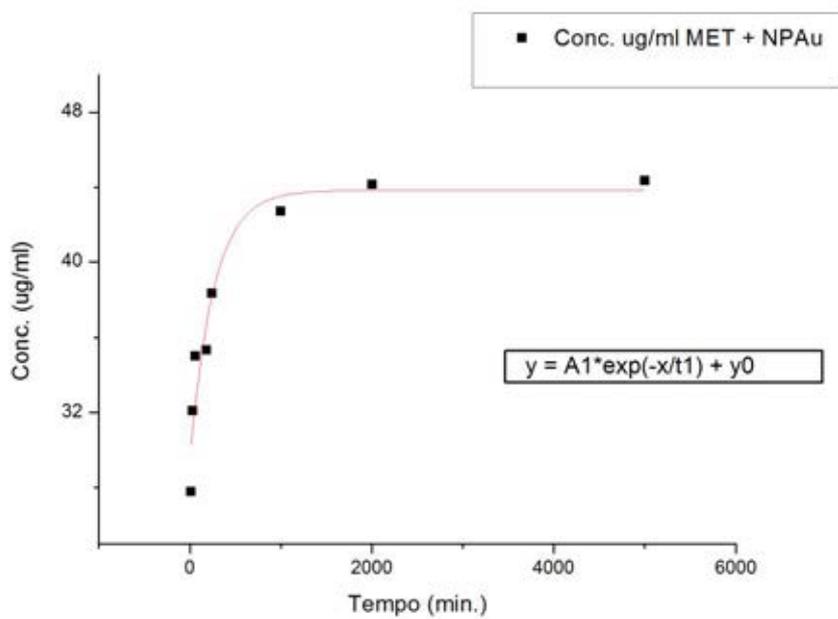
Para os estudos das taxas de liberação do metronidazol (MET), membranas de látex natural com 1mL de fármaco (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e solução de 1mL de nanopartículas de ouro foram colocadas em 200 mL de água e alíquotas foram retiradas durante 5000 minutos e os espectros de absorção estão plotados na Figura 26 e na Figura 27 encontra-se a curva de liberação.

**Figura 26** - Espectro UV-Vis de liberação do fármaco metronidazol em membrana de látex com nanopartículas agregadas.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 27** - Curva de liberação do fármaco metronidazol em membrana de látex com nanopartículas agregadas.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Ao analisar a Figura 26, não foi possível verificar-se a existência da banda de absorção referente às nanopartículas. A banda relativa ao metronidazol ocorreu na mesma região, denotando pouca ou nenhuma interação estrutural entre as soluções que foram incorporadas ao látex. Porém, ao analisar comparativamente as liberações de metronidazol e metronidazol + NPAu, não foi possível observar diferenças na concentração liberada do fármaco.

Apesar de o látex centrifugado ser constituído prevalentemente de biopolímeros (36% poli-isopreno), em sua fase aquosa há um número indefinido de proteínas [1,7,10].

Estudos mostraram que nanopartículas de ouro apresentam forte interação com moléculas proteicas. A proteína do soro bovino (BSA), a ubiquitina humana e a topoisomerase humana I são alguns exemplos, os quais apresentaram modificações conformacionais formando um invólucro em torno das nanoesferas.

Este complexo de alta capacidade de ligação abre um caminho conveniente para a fabricação de vários materiais compósitos nanobiotecnológicos que podem ser explorados, incluindo, por exemplo, os sistemas de liberação de drogas, e desenvolvimento de biossensores [39,43,46].

Por outro lado, o látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas [5-10], como próteses e enxertos médicos devido às suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese [36].

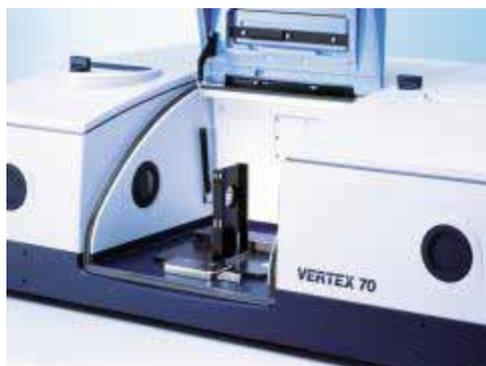
De acordo com Barbosa-Filho *et al.* (2012) [39], membranas de látex com nanopartículas de ouro agregadas foram capazes de reduzir o número de promastigotas de *Leishmania brasiliensis* em cultura, através da interação entre as mesmas e o glicocalix do parasita por contato.

Desta forma, conclui-se que há uma interação em competição do fármaco com a estrutura polar do látex o que, de certo modo, faz com que este último seja liberado com maior facilidade em meio aquoso, porém são necessários maiores estudos para elucidação e confirmação.

#### 4.8 Caracterização das membranas de látex com nanopartículas e metronidazol via espectroscopia por Infra-Vermelho (FTIR)

Após o estudo da taxa de liberação, procedeu-se com a caracterização via FTIR das membranas agregadas com nanopartículas e o fármaco metronidazol, numa proporção de 3:1 mL entre látex e os outros agentes. As amostras foram caracterizadas por FT-IR utilizando o equipamento VERTEX 70 fabricado pela BRUKER Corporation (Figura 28). Os espectros foram obtidos das membranas preparadas após a secagem das amostras. Foi utilizado o módulo de espectroscopia de reflexão totalmente atenuada, Attenuated Total Reflectance (ATR) na região  $350\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Cada espectro foi obtido acumulando 32 varreduras, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 28** - Equipamento Vertex 70 da Bruker®.

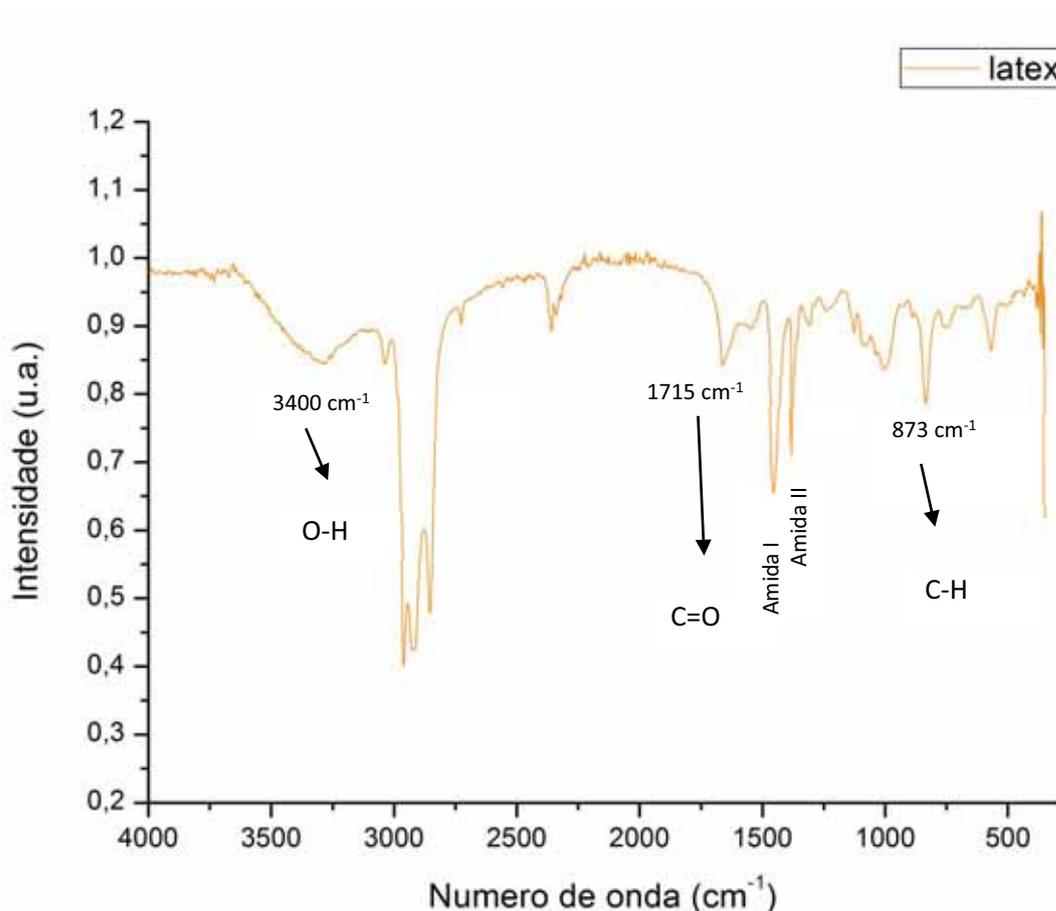


**Fonte:** BRUKER – FTIR [64].

O objetivo da espectroscopia de absorção no infravermelho é a determinação dos grupos funcionais de um dado material. Cada grupo absorve em uma determinada frequência característica de radiação na região do infravermelho. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais de um material padrão ou de uma substância desconhecida.

A Figura 29 apresenta os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) usando o modo de refletância total atenuada (ATR) obtidos do látex natural na região de 350-4000  $\text{cm}^{-1}$ , onde é possível observar as bandas de transmitância da amida I, amida II e C=O.

**Figura 29** - Espectro FTIR da membrana de látex produzida via casting.



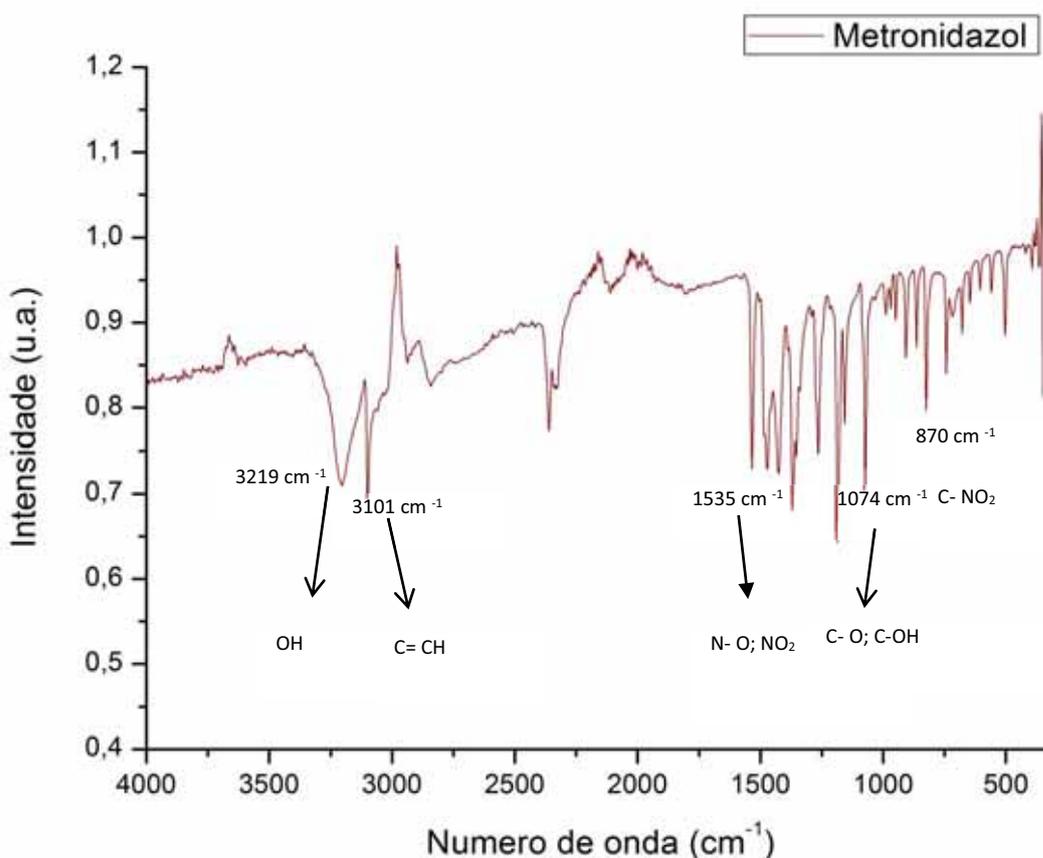
**Fonte:** Arquivo pessoal.

As bandas de absorção mais significativas são: 873, 1375, 1400, 1715 e 3400 $\text{cm}^{-1}$ . Duas regiões apresentam-se com maior relevância, são elas 3280-3400  $\text{cm}^{-1}$  e principalmente 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Na primeira, pode-se obter informação sobre a existência de material protéico e/ou contendo grupos oxigenados capazes de formar pontes de hidrogênio através de ligações N-H e O-H. Na segunda há

absorbâncias que permitem avaliar a presença de grupos funcionais devido à presença de grupos carbonílicos como ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas [65-69].

A interação entre o fármaco e o suporte carreador, muitas vezes leva a alterações identificáveis no perfil de FTIR dos sistemas sólidos. O espectro FTIR do MET está representado na Figura 30, a partir da qual as bandas de transmissão características de MET estavam claramente distinguíveis. Para MET, as bandas foram designados para os grupos OH ( $3219\text{ cm}^{-1}$ ), C = CH ( $3101\text{ cm}^{-1}$ ), NO<sub>2</sub>, N-O ( $1535\text{ cm}^{-1}$ ), C-OH, C=O ( $1074\text{ cm}^{-1}$ ), C- NO<sub>2</sub>( $870\text{ cm}^{-1}$ )[33, 70, 71].

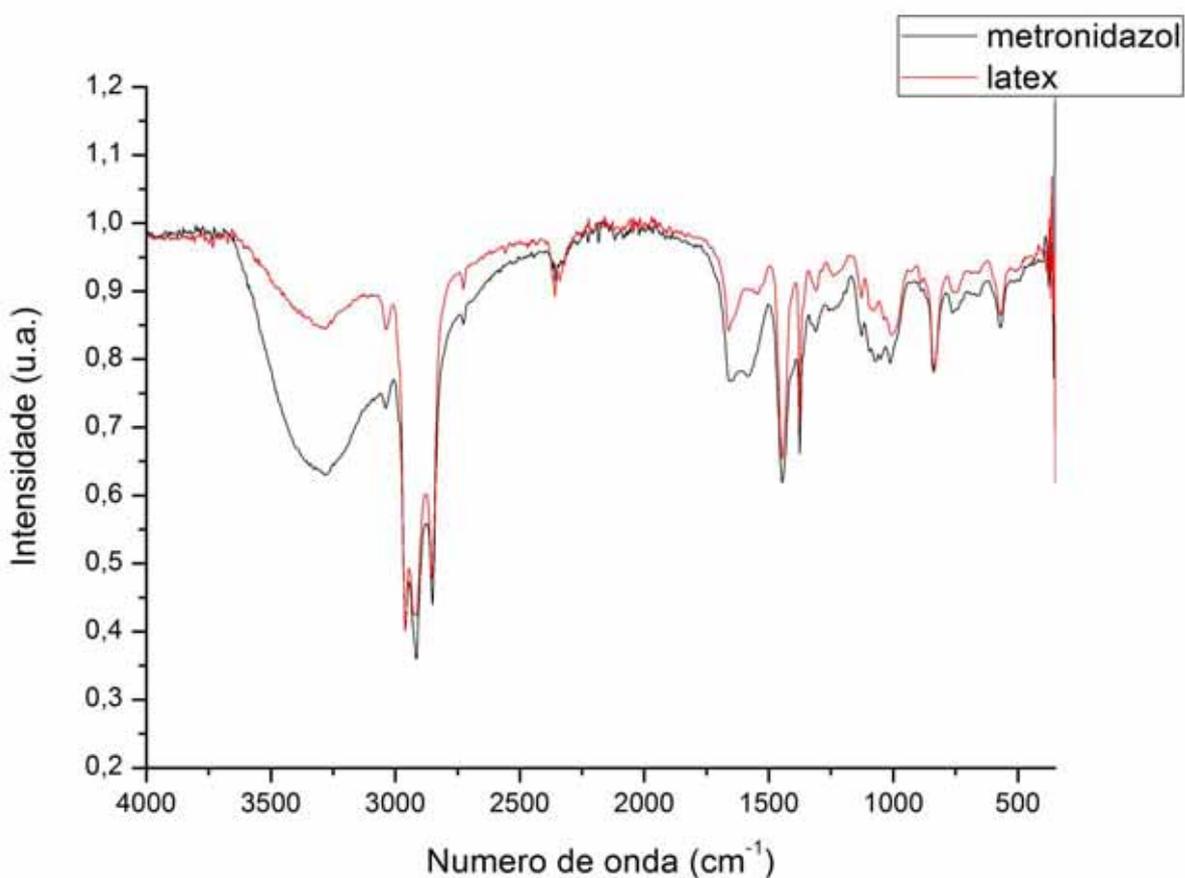
**Figura 30** - Espectro FTIR do fármaco metronidazol em pó.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

O espectro MET + Latex não foi alterado após a imobilização na membrana de látex, indicando que não há interação química entre o fármaco e o polímero, como mostra a Figura 31.

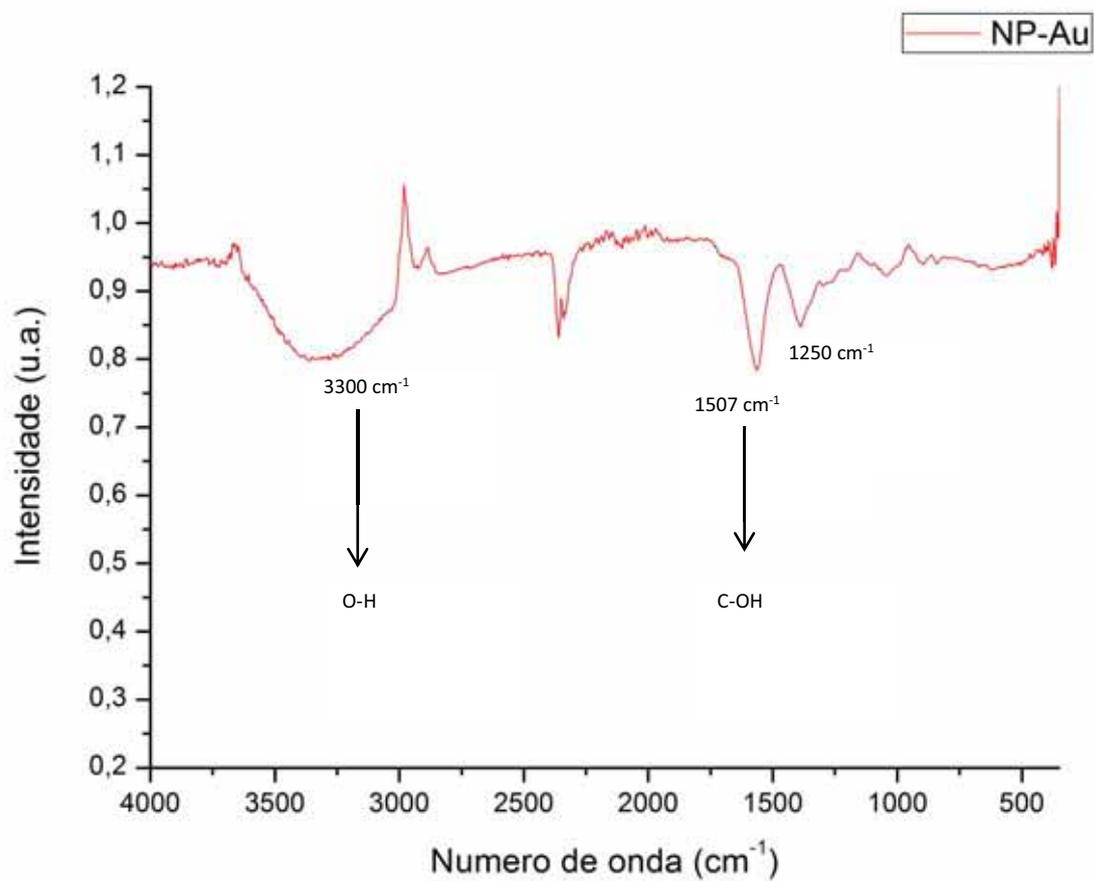
**Figura 31** - Espectro FTIR comparativo entre a membrana de látex e membrana de látex e metronidazol agregado.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

A Figura 32 apresenta vários grupos de linhas associadas às moléculas de citrato em ligações com a superfície de nanopartículas de ouro. O pico relativo ao número de onda 1250 cm<sup>-1</sup> é característico para a amostra investigada enquanto que o número de onda de 1507 cm<sup>-1</sup> refere-se a ligação C-OH. Também se pode concluir que há uma banda a 3300 cm<sup>-1</sup> que se relaciona ao grupo -OH [72, 73].

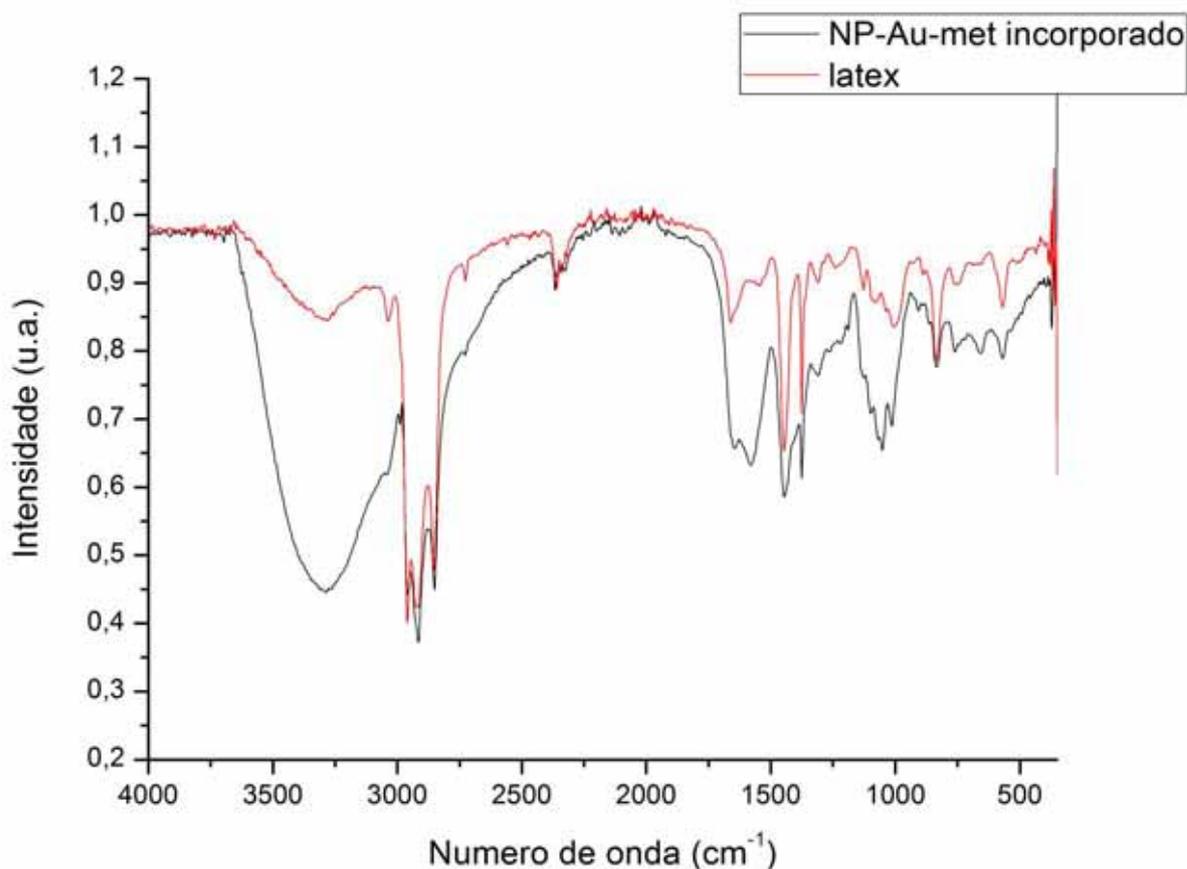
**Figura 32** – Espectro FTIR do pó de nanopartículas de ouro produzidas via Citrato.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

A Figura 33 mostra que ao incorporar as nanopartículas e o fármaco às membranas, não houve alteração estrutural.

**Figura 33** - Espectro FTIR de membrana de látex e membrana de látex com nanopartículas de ouro e metronidazol agregados.

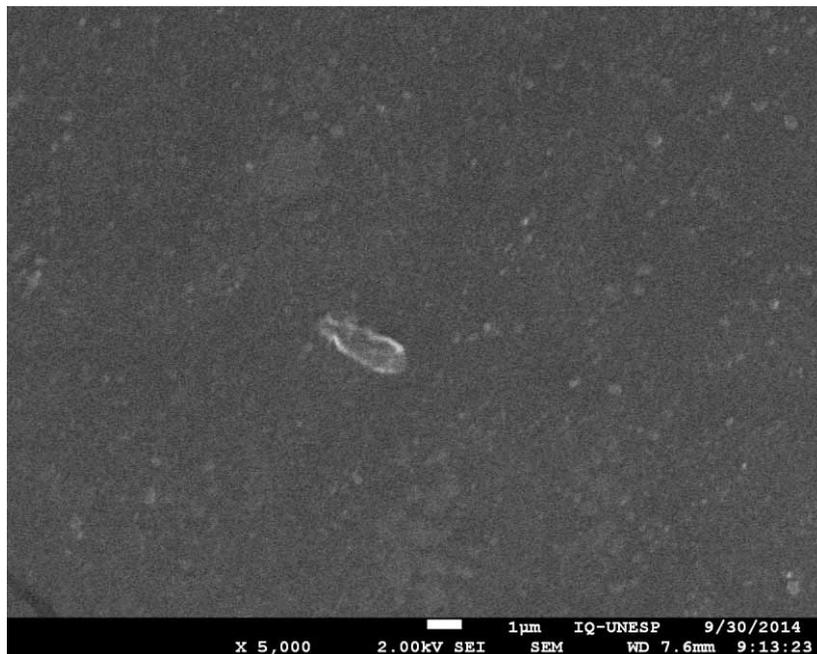


Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.9 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

O principal motivo de empregar esta técnica foi analisar a morfologia da membrana de látex natural, ou seja, a incorporação do fármaco (metronidazol) e das nanopartículas de ouro na superfície da membrana. A Figura 34 mostra a imagem de MEV da membrana de látex natural. Note que temos uma superfície plana e sem poros.

**Figura 34** - Micrografias obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura com ampliação de 2000 vezes da membrana de látex.

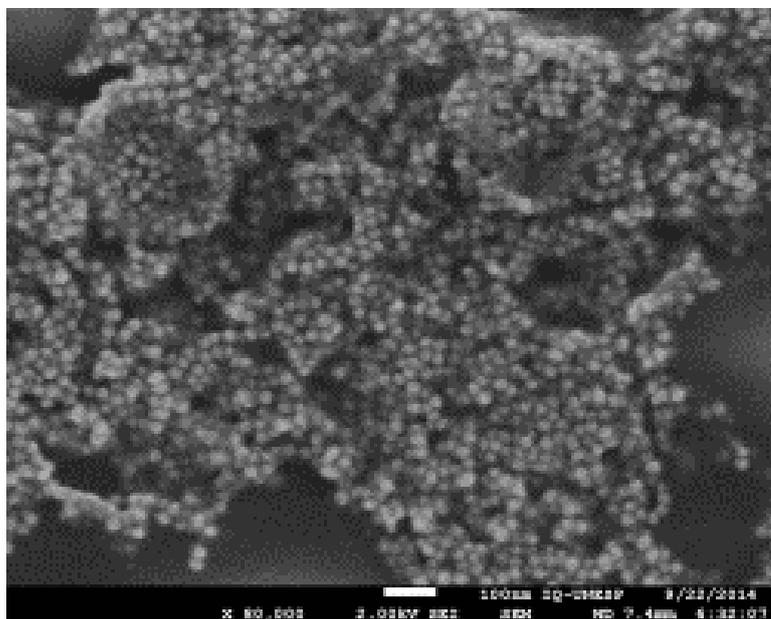


**Fonte:** Arquivo pessoal.

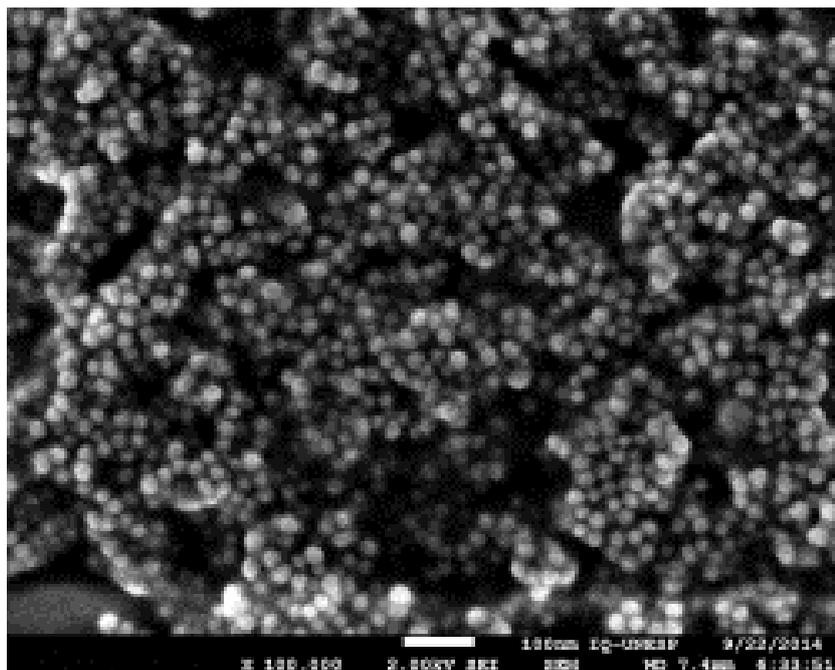
A Figura 35 mostra as micrografias representativas obtidas por MEV das nanopartículas de ouro, demonstrando a eficácia da síntese deste composto. Pode-se verificar que o diâmetro deste composto está na ordem de 25 a 30nm.

**Figura 35-** Micrografias obtidas por MEV das nanopartículas de ouro: 80.000 vezes (a) e 100.000 vezes (b).

a-)



b-)

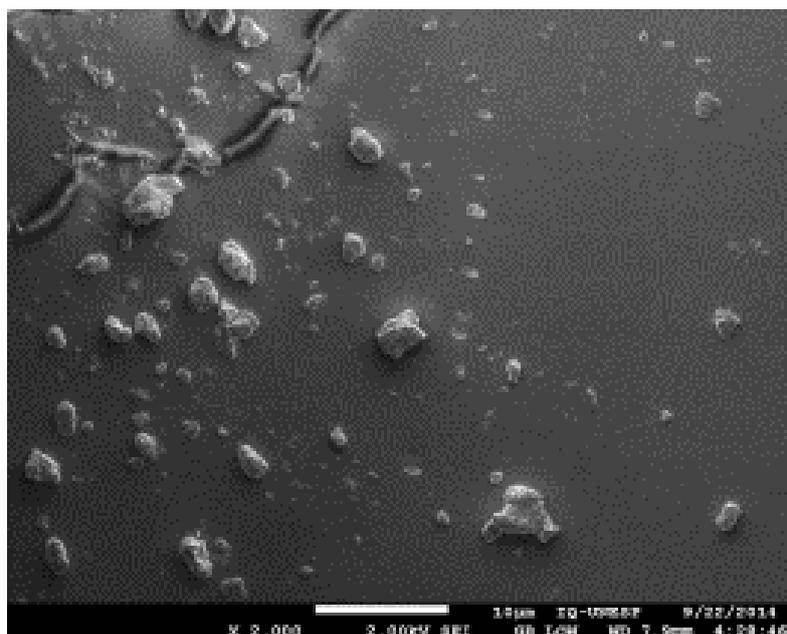


Fonte: Arquivo pessoal.

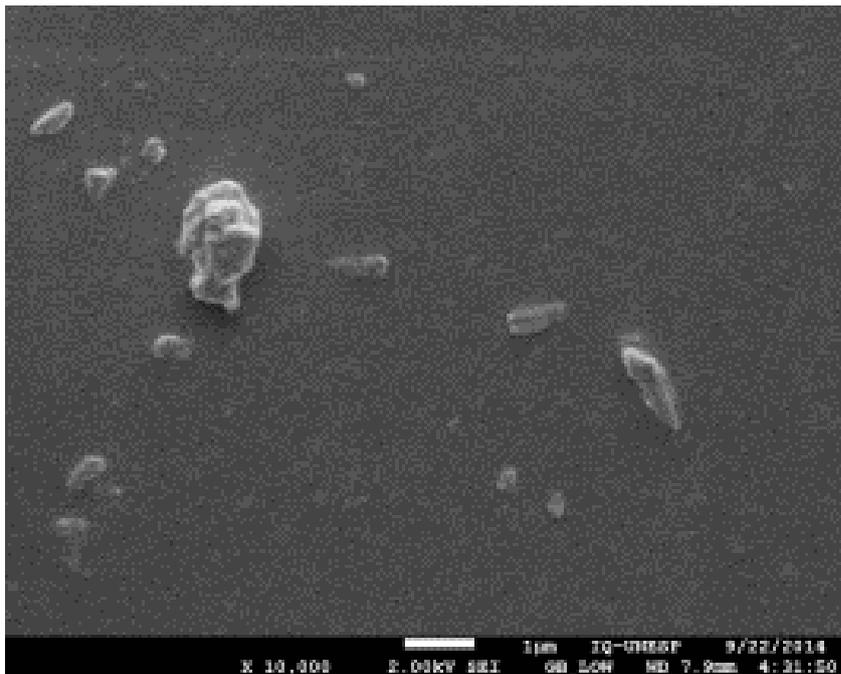
Dando continuidade, a Figura 36 mostra a morfologia da membrana de látex natural com metronidazol (fármaco). É possível observar que a cristalinidade do fármaco preservada, mostrando que possivelmente não houve mudança do princípio ativo do antibiótico.

**Figura 36** - MEV por da membrana de látex com metronidazol: 2.000 vezes (a) e 10.000 vezes (b).

a-)



b-)



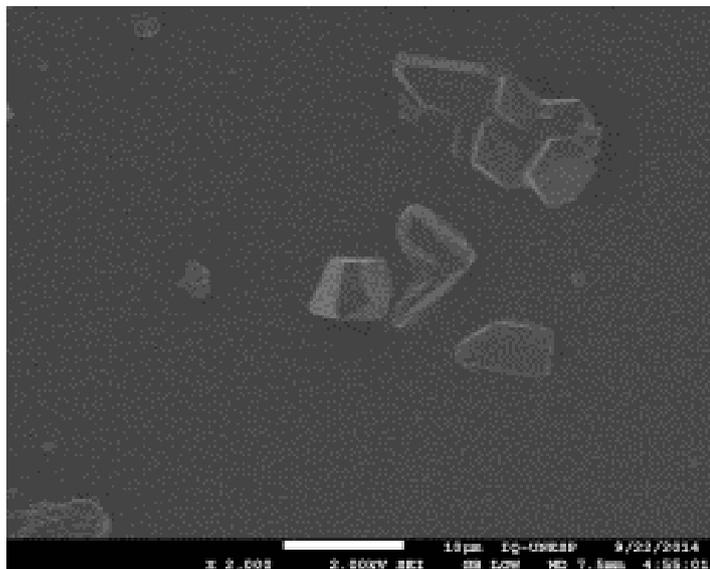
Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 37 mostra também que os compostos estão distribuídos por toda a superfície da membrana. É possível observar de uma forma clara a incorporação do fármaco na membrana polimérica, entretanto, não foi possível observar as partículas de ouro, mesmo com o aumento da magnitude da imagem 2000 para 10.000 vezes.

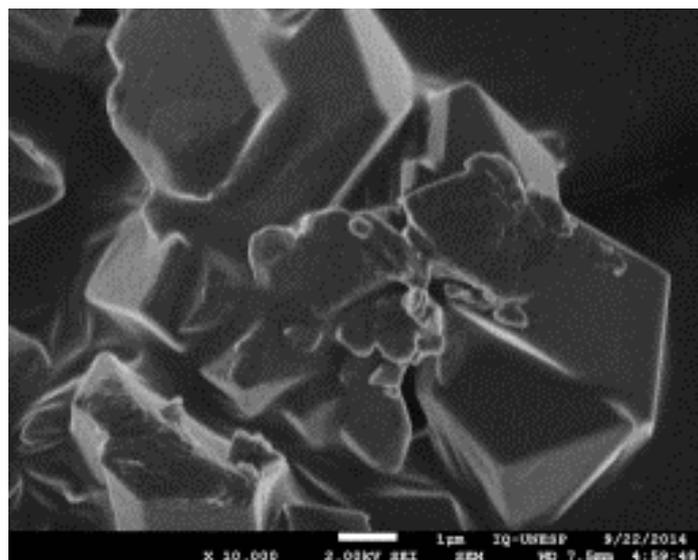
Vale ressaltar novamente que a solução que contém as nanopartículas, obtida através do método proposto por Turkevich [41], possui coloração rósea e ao ser misturada ao látex resulta em uma membrana de mesma cor, evidenciando a incorporação das nanopartículas. Entretanto, não foi possível observar tal presença pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), uma vez que as nanopartículas de ouro possuem em média diâmetro variando entre 25 e 30 nm e necessitariam de ampliações de 80.000 a 100.000 vezes para serem visualizadas. O látex permite ampliações máximas de 40.000 vezes, sofrendo danos estruturais devido à alta carga energética do feixe eletrônico em ampliações maiores. Desta forma, foi utilizada a técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para analisar se o compósito está na superfície polimérica.

**Figura 37** - Micrografia obtida por MEV da membrana de látex com metronidazol + nanopartícula de ouro: 2.000 vezes (a) e 10.000 vezes (b).

a-)



b-)



**Fonte:** Arquivo pessoal.

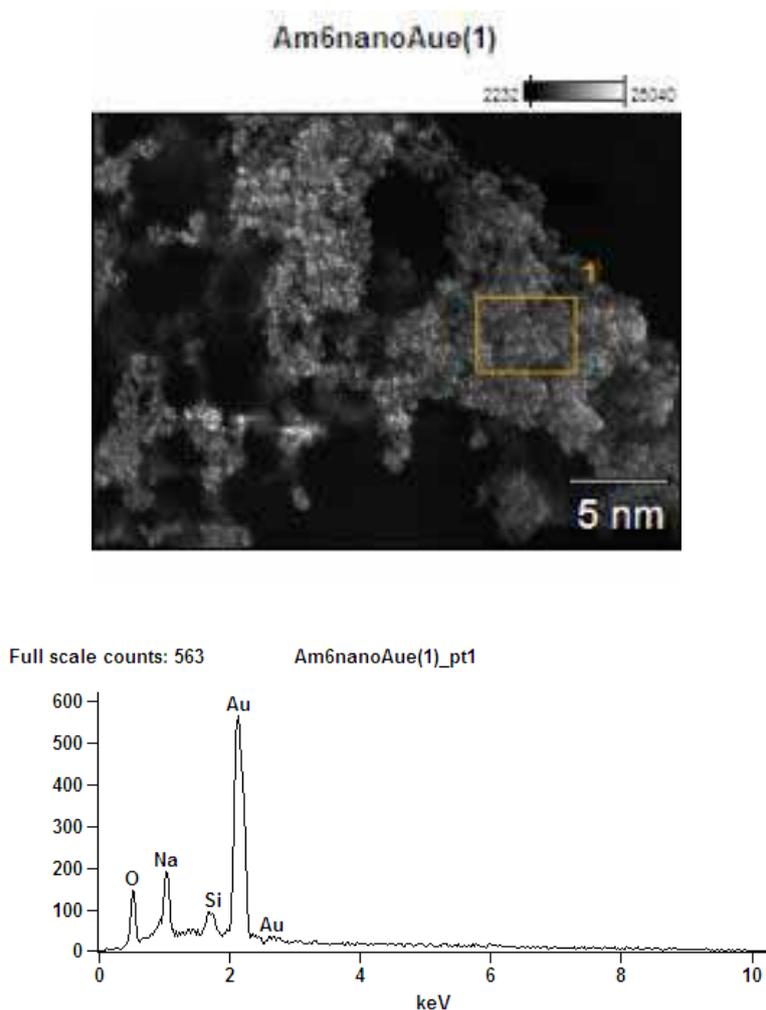
Também não foi possível observar as nanopartículas por esta técnica.

#### 4.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A técnica EDS é usualmente apresentada acoplada à microscopia eletrônica de varredura, permitindo a obtenção de informações químicas em áreas da ordem de micrometros. As informações, qualitativas e quantitativas, sobre os elementos

presentes são obtidas pela captação dos raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário com a amostra. Neste trabalho, utilizamos esta técnica para obtermos informações estruturais e para avaliar a composição química das partículas de ouro e das membranas de látex natural modificadas. A Figura 38 mostra o espectro de EDS das partículas de ouro, onde foi detectado o elemento químico “Au” (ouro).

**Figura 38** - Espectro de EDS das partículas de ouro.

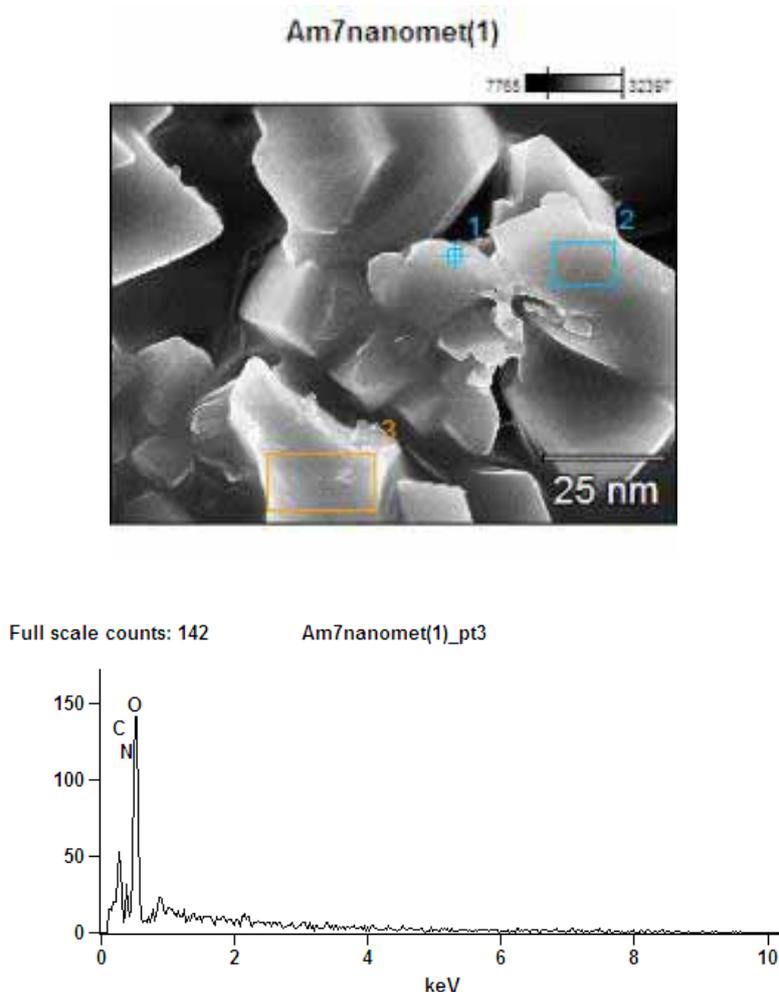


**Fonte:** Arquivo pessoal.

A técnica de EDS foi importante para comprovar que a síntese das nanopartículas de ouro foi eficaz, assim utilizamos este método de caracterização

para analisar a distribuição das nanopartículas de ouro e do fármaco (metronidazol) na membrana de látex natural. A Figura 39 mostra o espectro de EDS em um grão na superfície da membrana incorporada com metronidazol e NpAu. Como esperado, foi detectado o elemento químico **nitrogênio** (N) comprovando que o **metronidazol**,  $C_6H_9N_3O_3$  está presente no biomaterial.

**Figura 39** - Espectro de EDS na superfície da membrana de látex natural com os compostos incorporados.

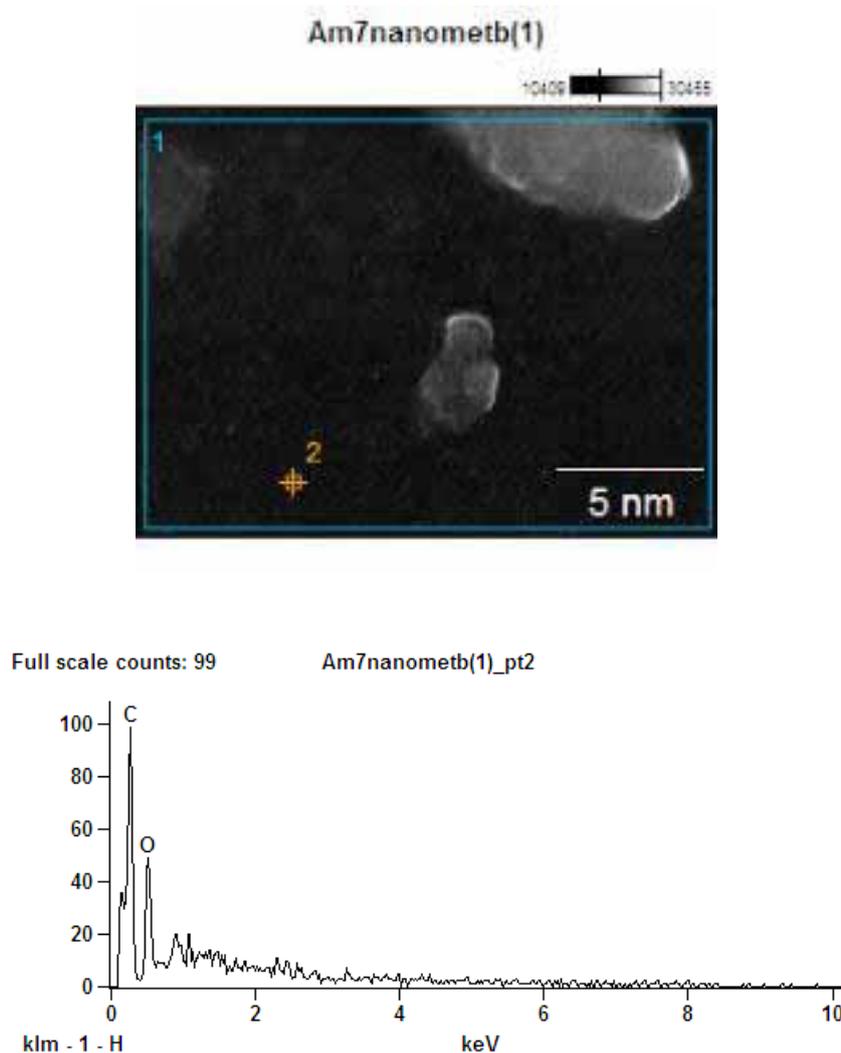


Fonte: Arquivo pessoal.

Com o propósito de analisar a distribuição das nanopartículas de ouro na superfície do biopolímero, a técnica de EDS foi empregada em uma membrana de látex + MET + NpAu. Como pode ser visto na Figura 40, foram avaliadas as partículas pequenas, pois os grãos maiores são provenientes do metronidazol.

Entretanto, não foi detectado o elemento químico **ouro** (Au) na superfície do material. Foram analisadas outras regiões da amostra e também não foi detectado o ouro.

**Figura 40** - Espectro de EDS nas substâncias incorporadas na superfície da membrana de látex natural.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Desta forma, decidimos comprar nanopartículas de ouro com 30nm de diâmetro da Sigma-Aldrich (Figura 41) para avaliar como seria a interação destas

Np com a membrana de látex natural. A Tabela 1 mostra as especificações do composto adquirido.

**Figura 41** - Representação Colorimétrica de vários tamanhos de nanopartículas de ouro monodispersas da Sigma-Aldrich.



**Fonte:** SIGMA-ALDRICH NANOPARTICLES [74].

**Tabela 1** - Propriedades da nanopartícula de ouro (Sigma-Aldrich).

Diâmetro	Nanopartículas/MI	Comprimento de Onda	Concentração ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
30 nm	$1.79 \times 10^{11}$	526 nm	$3.36 \times 10^9$

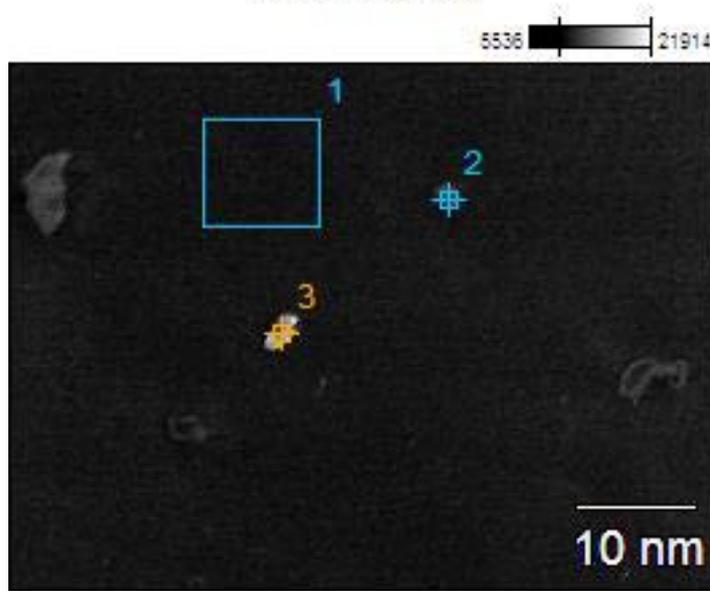
**Fonte:** Arquivo pessoal.

Entretanto, caracterizando esta membrana com a técnica de EDS, não foi possível observar novamente as nanopartículas de ouro, pois a quantidade de nanopartículas é muito baixa e a técnica não é sensível. Além disso, fizemos uma imagem de MEV de fratura criogênica (cross-section) do polimérico (Figura 42) e não foram observadas nanopartículas no material. Seguramente estes compostos estão mergulhados na cadeia polimérica do polimérico, o que dificulta a sua detecção.

**Figura 42** - a-) Imagens de EDS da membrana de látex natural + solução de nanopartícula de ouro adquirida pela Sigma-Aldrich; b-) espectro de EDS dos 3 pontos para análise

a-)

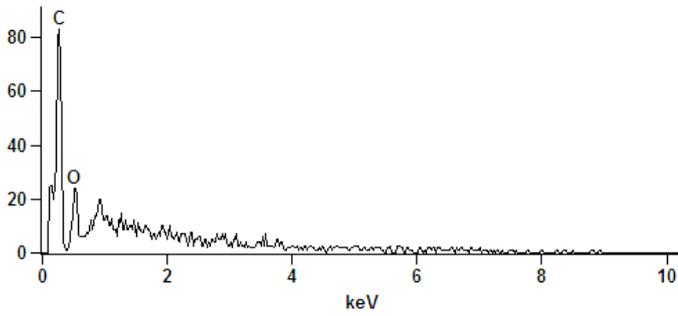
latex-nano(1)



b-)

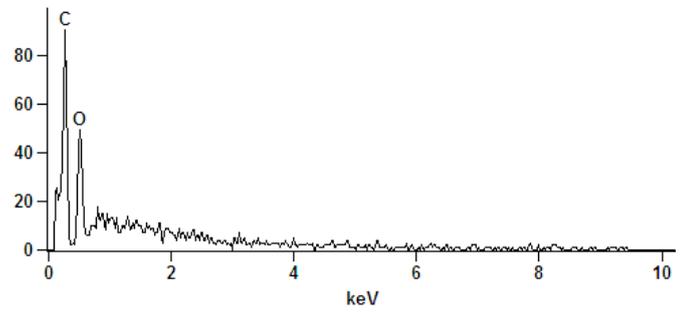
Full scale counts: 83

latex-nano(1)\_pt1



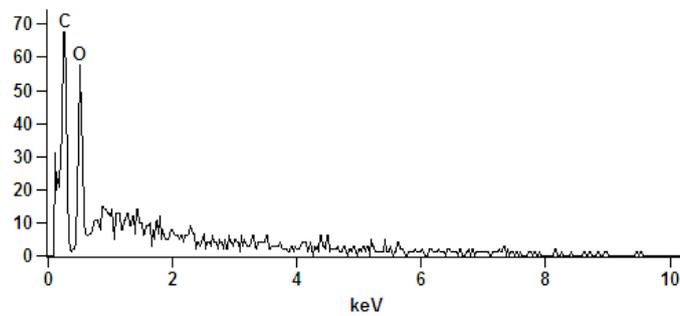
Full scale counts: 91

latex-nano(1)\_pt2



Full scale counts: 68

latex-nano(1)\_pt3



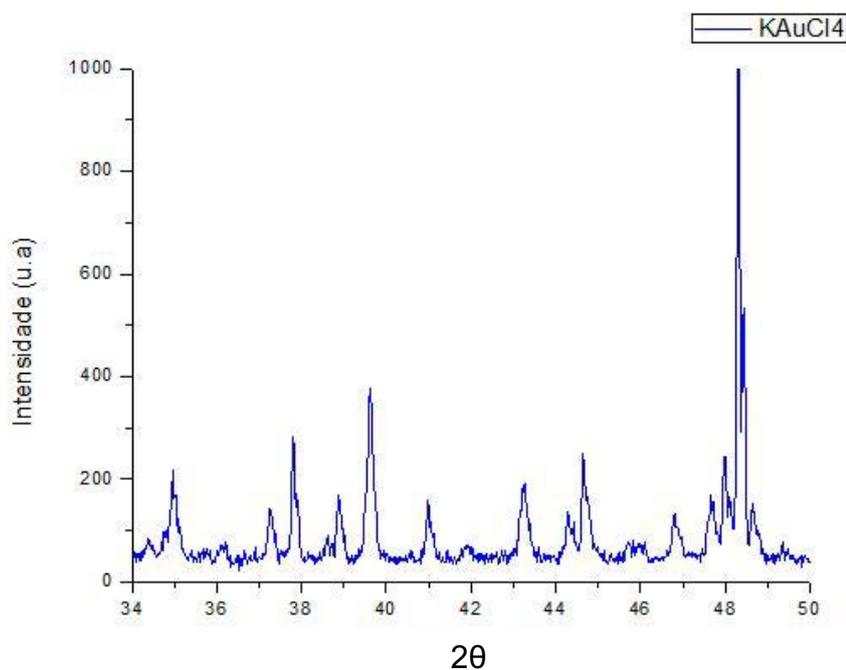
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.11 Difração de Raio-X

A técnica de DRX foi utilizada para identificar as reflexões de Bragg características para o ouro e o fármaco metronidazol, como apresentam as Figuras 43, 44 e 45.

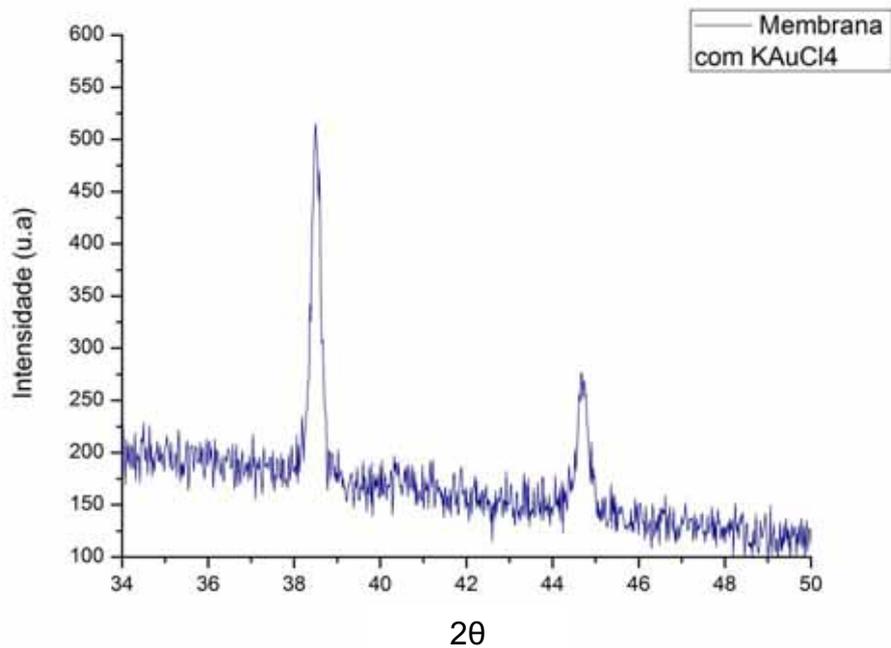
O ouro apresenta-se como sistema cristalino de fase cúbica de face centrada (CFC) e a reflexão mais representativa de Bragg foi encontrada em  $38,18^\circ$  correspondente ao plano (111). A maior intensidade do pico correspondente ao plano (111) indica uma orientação cristalográfica preferencial nessa direção. Este difratograma de DRX sugere a presença de nanopartículas de ouro nos filmes poliméricos dos sistemas estudados [75].

**Figura 43** - Difratograma de raios-X obtido para o sal  $\text{KAuCl}_4$ .



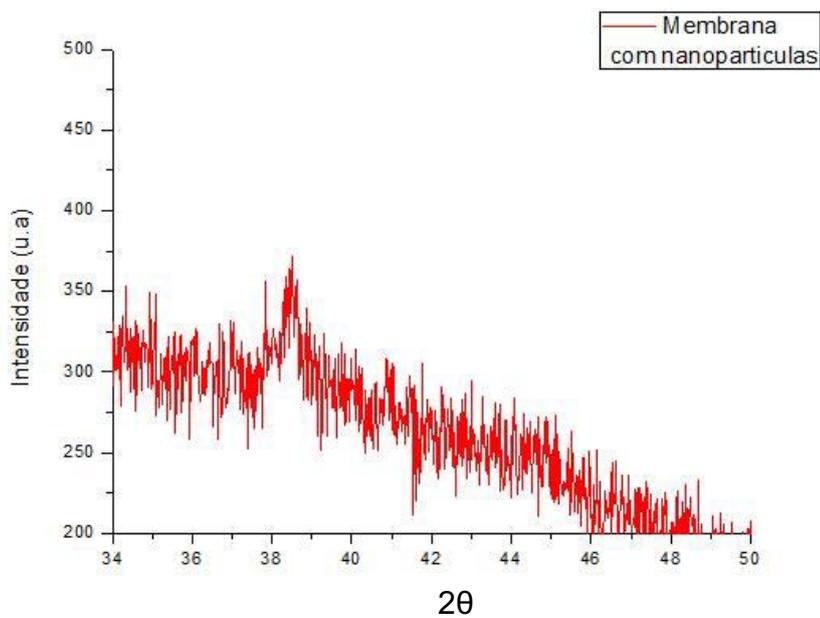
**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 44** - Difratoograma de raios-X obtido para a membrana com  $\text{KAuCl}_4$  incorporado.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 45** - Difratoograma de raios-X obtido para a membrana de látex com nanopartículas de ouro incorporadas.

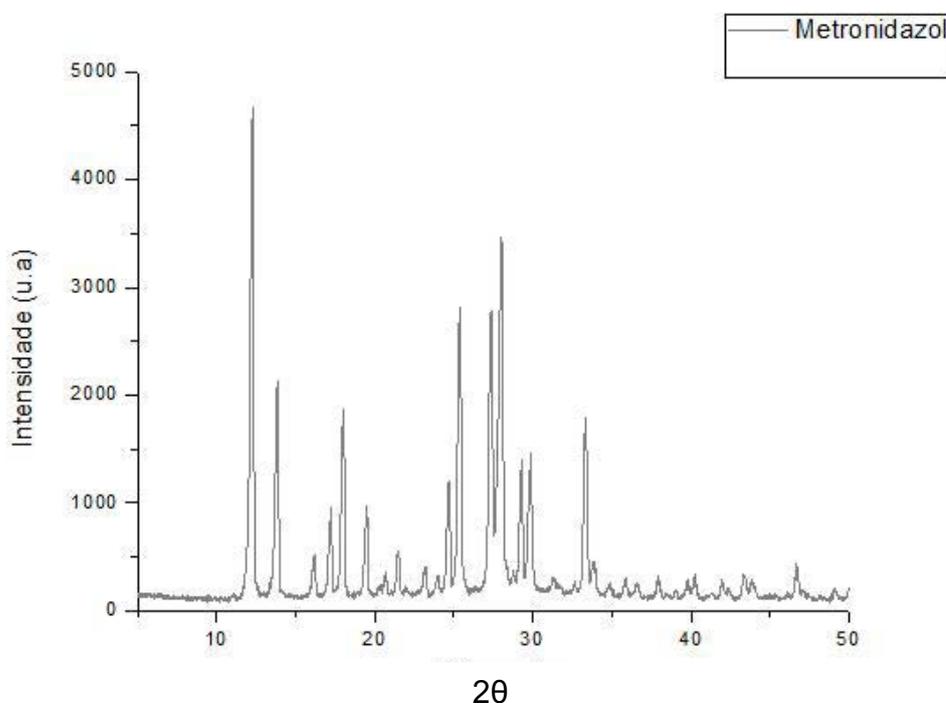


**Fonte:** Arquivo pessoal.

As interpretações qualitativas dos difratogramas foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados das fichas JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) ficha nº 4-0784 e com o difratograma concebido à partir da análise via DRX de  $\text{KAuCl}_4$  em pó e da membrana de látex com 25 mg de  $\text{KAuCl}_4$  em pó incorporado via casting, presentes nas Figuras 46, 47 e 48 respectivamente. Ao analisar o primeiro difratograma referente a látex e  $\text{KAuCl}_4$ , é possível observar a presença de um pico na região de  $44,39^\circ$ . Este pico representa o plano (200) também característico do ouro. O mesmo não é observado no difratograma referente à membrana com nanopartículas incorporadas. Isso se deve à quantidade menor de ouro presente nesta amostra.

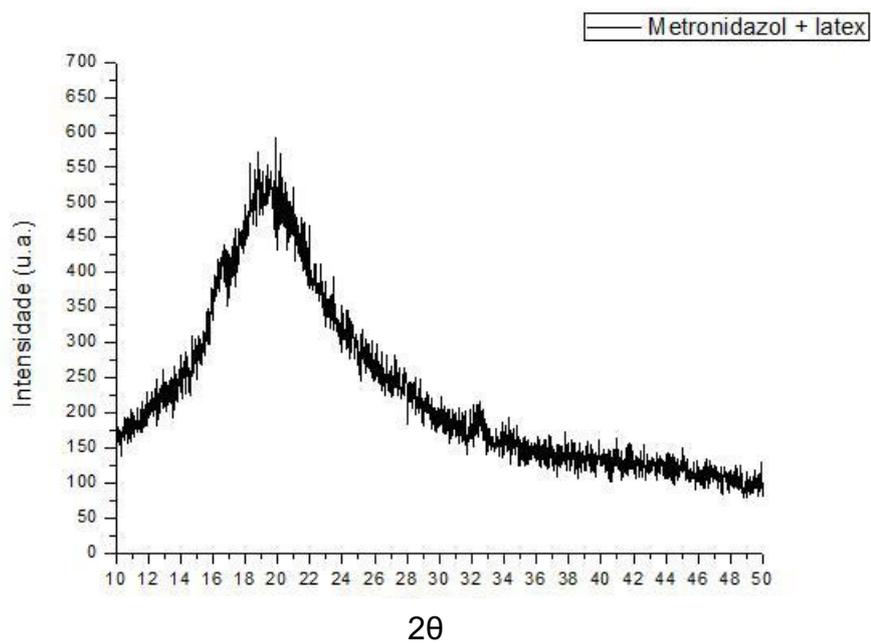
Os padrões de difração de raios-X do metronidazol em pó e o incorporado na membrana de látex estão demonstrados nas Figuras 46 e 47. Também foi feita a análise via Difractometria de raios-X para o látex puro e o resultado encontra-se na Figura 48.

**Figura 46** - Difratograma de raios-X obtido para o metronidazol em (pó).



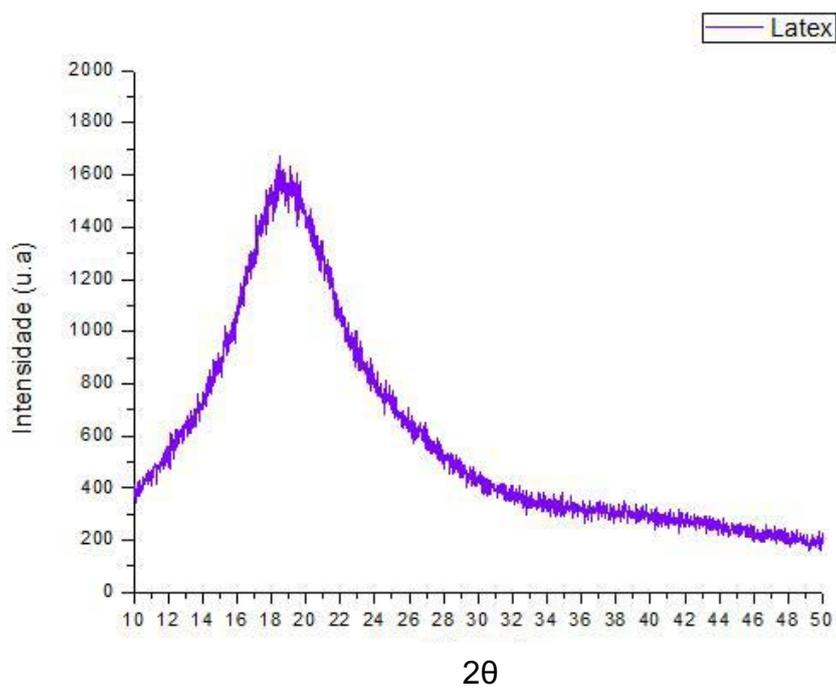
**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 47** -Difratograma de raios-X obtido para a membrana com metronidazol



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 48** - Difratograma de raios-X obtido para a membrana de látex.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Na Figura 46 que representa o difratograma relativo ao metronidazol em pó, é possível observar as bandas de difração associadas ao fármaco no estado cristalino. Já na Figura 47, a qual contém os dados relativos à droga incorporada à membrana, não é possível fazer a mesma observação, apresentando apenas uma alteração na região de  $18^\circ$ , a qual sugere estruturas em estado amorfo. Fato este que se comprova ao analisar a Figura 48 correspondente ao padrão de difração do látex puro que contém elevação na mesma região. Este resultado indica que um estado amorfo de uma dispersão molecular sólido na matriz do polímero é formado, após a incorporação da droga [7,33]. Os outros resultados apresentados neste trabalho confirmam a presença de moléculas do fármaco na matriz polimérica.

#### **4.12 Teste de tensão deformação**

Os testes biomecânicos de tração foram realizados no Laboratório de Física, Biofísica e Biomateriais da Faculdade de Ciências e Letras de Assis da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), com os quais se determinou o grau de deformação e resistência de cada membrana. Para isso, foram preparadas amostras com 44 mm de comprimento por 15 mm de largura e a espessura de cada uma foi determinada através de um micrometro. Estes dados de caracterização de cada membrana encontram-se na Tabela 2.

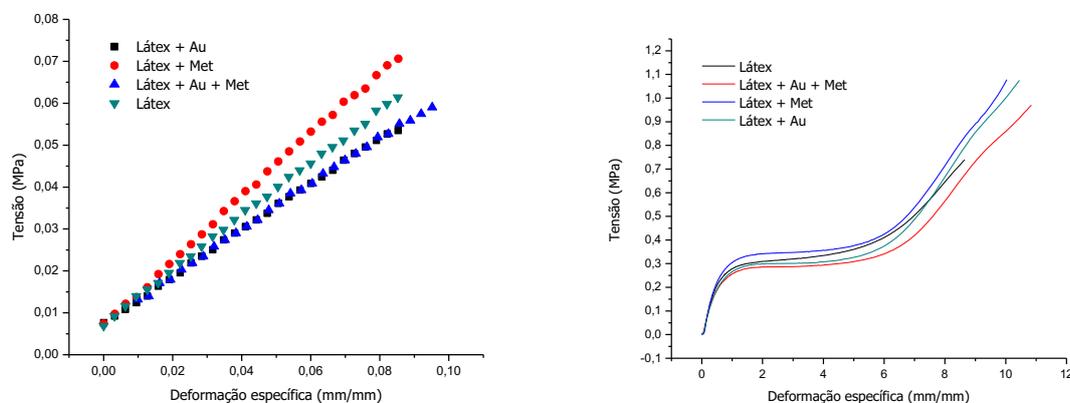
**Tabela 2** - Dados relativos à resistência física das membranas de látex e substâncias incorporadas

AMOSTRA	% (DEFORMAÇÃO ESPECÍFICA)	TENSÃO DE RÚPTURA (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Látex	865,205	0,7389	0,6360 ± 0,00314
Látex+Au	1045,455	1,07557	0,5527 ± 0,00291
Látex+MET	1003,795	1,07795	0,75431 ± 0,00403
Látex+MET+Au	1084,275	0,97048	0,54616 ± 0,00362

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os testes de tração a que as amostras foram submetidas revelaram que a composição influencia na deformação e resistência (Figura 49). Observou-se que ao adicionar fármacos (proteínas) ao látex natural, ocorre um aumento da resistência mecânica. Este resultado era esperado, pois os fármacos estão agregados ao “bulk” da membrana de látex natural, aumentando o número de ligações cruzadas. Assim podemos inferir a partir da premissa de que as propriedades mecânicas dos elastômeros são função do número e do tipo de ligações cruzadas. Membranas oclusivas devem possuir características tais que conduzam requisitos biológicos, mecânicos e de uso clínico para servirem como barreira contra a invasão celular indesejável, ou seja, a resistência mecânica é um fator importante.

**Figura 49:** Gráficos que relacionam a tensão de ruptura e a deformação específica para as membranas de látex com várias composições.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

A Figura 49 mostra que a deformação de ruptura da membrana de látex natural ocorreu em 218 mm, enquanto para a membrana de látex com metronidazol observamos que ocorreu a ruptura em 130 mm, para a membrana de NRL com nanopartículas de ouro a ruptura ocorreu em torno de 180 mm e a membrana de látex natural que continha metronidazol e nanopartículas de ouro atingiu 112 mm em sua ruptura. Em resumo, observa-se que há mudança significativa na resistência mecânica da membrana com a adição do fármaco. É importante salientar, que a espessura da amostra influencia diretamente sua resistência, sendo diretamente proporcional, quando se comparam amostras do mesmo material.

Os quatro tipos de membranas utilizadas possuem o mesmo comprimento de base (44mm) e a mesma espessura (~1,56mm). A Figura 49 mostrou as forças de ruptura das membranas de latex, látex + NP, látex + MET e látex + MET + NP respectivamente.

O módulo de Young é definido pela equação 3:

$$Y \equiv \frac{F/A}{\Delta\ell/\ell_0} = \frac{F \cdot \ell_0}{A \cdot \Delta\ell}$$

**Equação 3**

Em que:

F= força de tração

A = área transversal do corpo de prova

$\Delta l$  = é o alongamento sofrido

$l_0$  = é o comprimento do corpo não tracionado

A partir da equação 3, observamos que o módulo de Young da membrana de NRL foi de 0,6360 MPa, enquanto para a membrana de NRL + MET foi de 0,5527 MPa. Já em relação a membrana de NRL com NP Au, observamos que o módulo de Young foi de 0,75431 MPa. Por fim, a membrana com as duas substâncias incorporadas (MET+NPAu) obteve-se módulo de Young próximo de 0,54616. De acordo com a literatura [15, 76-78] o látex natural possui resistência suficiente para aplicação biológica. Desta forma, podemos inferir que, apesar das mudanças no módulo de Young e na força de ruptura das NRL + MET, NRL+NPAu e NRL + NPAu+MET, estas amostras possuem resistência suficiente para aplicação biomédica.

#### **4.13 Avaliação de Citotoxicidade**

Neste trabalho, desenvolvemos complexos estáveis à base de látex natural e NPAu (NRL/NPAu), estando aptos a atuarem como futuros sistemas liberadores de substâncias ativas de maneira sustentada. Estes nanocomplexos são promissores para aplicações em tecidos biológicos, devido à sua biocompatibilidade exibida pelos materiais de partida, além da esperada biocompatibilidade dos materiais preparados, abrindo caminho para um leque de futuras aplicações. A Figura 50 mostra testes preliminares de citotoxicidade das

nanopartículas de ouro sintetizadas neste trabalho em células MC3T3- E1, onde podemos observar que estas nanopartículas são atóxicas.

**Figura 50** - Análise de citotoxicidade das nanopartículas de ouro sintetizadas neste trabalho em cultura de células MC3T3-E1: a-) sem MTT, b-) com MTT.

a-)



b-)



**Fonte:** Arquivo pessoal.

## **5. CONCLUSÃO**

## 5. Conclusão

Um novo sistema de liberação controlada de fármacos utilizando membranas de látex natural como carreador foi desenvolvido. O látex foi escolhido como carreador devido a sua excelente biocompatibilidade aliado a boa resistência mecânica e fácil manuseio. O metronidazol (antibiótico) foi utilizado como modelo de droga reforçado por nanopartículas de ouro.

Várias rotas para a produção das nanopartículas de ouro foram empregadas, e a mais versátil e eficaz foi a síntese empregando o citrato de sódio.

Observamos que a liberação do complexo (NpAu + fármaco) obedece a uma função  $y(t) = y_0 + A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2}$ . O cálculo da quantidade de fármaco liberado foi feito integrando esta função bi-exponencial. Observamos também que a espessura e quantidade de fármaco presente na membrana é determinante para o tempo de liberação do composto, onde a membrana de látex natural funciona como um reservatório.

Análises de infra-vermelho (FTIR) mostraram que não houve interação entre o metronidazol e o látex natural, pois não houve mudanças nas bandas de ligação deste fármaco. Trata-se de um resultado interessante, pois o látex natural é inerte sendo considerado um excelente material para carrear vários tipos de compostos biológicos.

Análises de difração de raio-X (DRX) mostraram que o metronidazol e o sal de ouro são cristalinos, e que esta cristalinidade é preservada quando incorporados à membrana, apesar da baixa intensidade observada.

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostraram que o metronidazol estava presente na superfície da membrana de látex, em que corrobora com os dados da liberação, pois a função bi-exponencial é devida a uma parcela do fármaco presente na superfície da membrana (liberação mais rápida) enquanto outra parcela do fármaco está na parte interna (bulk), com liberação mais lenta. Entretanto, tanto com o MEV quanto com a técnica de EDS não foi possível detectar as nanopartículas na membrana polimérica.

Com todos estes resultados interessantes, as perspectivas futuras serão utilizar análises térmicas (DSC, TG/DTG, DMA) para entender de uma forma mais detalhada a interação destas nanopartículas com o látex natural. Além disso, a espectroscopia FT-RAMAN poderá fornecer informações interessantes em relação às ligações moleculares que a espectroscopia por FTIR não pôde fornecer. Uma próxima etapa é averiguar o estímulo destas membranas em culturas de células e posteriormente *in vivo*.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. Referências Bibliográficas

1. HERCULANO, RD. **Desenvolvimento de membranas de latex natural para aplicações biomédicas**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
2. PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering Website**, v. 2, n. 4, p. 91-101, 2012.
3. BABU, R. P.; O'CONNOR, K.; RAMAKRISHNA S. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 8, p. 1-16, 2013.
4. LANGER, R.; PEPPAS, N. A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. **AIChE Journal**, v. 49, n.12, p. 2990–3006, 2013.
5. SILVA, A. J.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C.; SOUTO, P. C. S. Membranes from latex with propolis for biomedical applications. **Materials Letters**, v. 116, p. 235-238, 2014.
6. MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LCHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A., TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.
7. MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F. A.; CINMAN J. L. F.; DRAGO, B.C.; MIRANDA, M. C. R.; LOPES, R.; MAZALLI, A.; SILVA, R. G.; BARROS, N. R.; HERCULANO, R. D. Ciprofloxacin release using Natural Rubber Latex Membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, n. 157952, p. 1-7, 2014.
8. FERREIRA, M.; MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J.; MULATO, M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n.3, p. 564-569, 2009.
9. SAMPAIO, R. B.; MENDONCA, R. J.; SIMIONI, A. R.; COSTA, R. A.; SIQUEIRA, R. C.; CORREA, V. M.; TEDESCO, A. C.; HADDAD, A.; COUTINHO-NETTO, J.; JORGE, R. Rabbit Retinal Neovascularization Induced by Latex Angiogenic-Derived Fraction: An Experimental Model. **Current Eye Research**, v. 35, n. 1, p. 56-62, 2010.
10. TRECCO, A.; BORGES, F. A.; CHIN, C. M.; PERRI, E. G.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. 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, n. 1, p. 89-95, 2014.
11. KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, n. 510246, p. 1-8, 2014.
12. GUIDELLI, E. J.; RAMOS, A. P.; ZANIQUELLI, M. E.; BAFFA, O. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p.

140-145, 2011.

13. BLACKLEY, D. C. **Polymer Latices**. 2. ed., vol. 2, Londres: Springer Science & Business Media, 1997. 592 p.

14. JACOB, J. L.; D'AUZAC, J.; PREVÔT, J. C. The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. **Clinical Reviews in Allergy**, v. 11, n. 3, p. 325-337, 1993.

15. NEVES-JR, W. F. P.; GRAEFF, C. F. O.; FERREIRA, M.; MULATO, M.; BERNARDES, M. S.; COUTINHO-NETTO, J. Elastic Properties of Natural Rubber Tubes Produced by Dip-Coating. **Journal of Applied Polymer Science**, v.100, n. 1, p. 702-707, 2006.

16. YEANG, H. Y.; ARIF, S. A.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v. 27, n. 1, p. 32-45, 2002.

17. SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLD, D. H.; KURUP, V. P. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 2 Suppl, p. 33-39, 2002.

18. HERCULANO, R. D.; GUIMARÃES, S. A. C.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA-JÚNIOR, O. N.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C.F.O. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 57-61, 2010.

19. MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex - estudo experimental em cães**. 1996. 80 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

20. SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; NETO, J. B.; SEBASTIÃO ASSIS MAZZETTO, S. A.; ALVES-JR, P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, n. 4, p. 338-44, 2000.

21. ALVES, M. C. O. **Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

22. PINHO, E. C. C. M.; FARIA-SOUSA, S. J.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

23. ERENO, C.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; PASETTO, S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F. O.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 95, n. 3, p. 932-939, 2010.

24. BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.

25. FRADE, M. A. C.; BRUM-CURSI I.; FORTES-ANDRADE, F.; COUTINHO-NETTO J.;

- BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.
26. AIELO, P. B.; BORGES, F. A.; ROMEIRA, K. M.; MIRANDA, M. C. R.; ARRUDA, L. B.; LISBOA-FILHO, P. N.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, v. 17, n. Suppl 1, p. 146-152, 2014.
27. SCHMIDT, R. S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, R. M. G. Avaliação da Liberação Controlada de Fármaco (diclofenaco de potássio) utilizando a Biomembrana de Látex de Mangabeira como Carreador. In: **Anais da X Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, Assis/SP, 2011.
28. HERCULANO, R. D.; PEREIRA, C. P.; ERENO, C.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. C.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 253-256, 2009.
29. BORGES, F. A.; TRECCO, A.; MIRANDA, M. C. R.; PIERRI, E. G.; BARROS, N. R.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. Casearia sylvestris Swartz Extract Release Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 12, p.1420-1430, 2014.
30. ROMEIRA, K. M.; DRAGO, B. C.; MURBACH, H. D.; AIELO, P. B.; SILVA, R. M. G.; BRUNELLO, C. A.; HERCULANO, R. D. Evaluation of Stryphnodendron sp. release using natural rubber latex membrane as carrier. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 7, p. 693-697, 2012.
31. GIULIANO, C. B.; HERCULANO, R. D. Evaluation of ciprofloxacin and magnetic nanoparticles delivery system employing natural latex membranes as carrier. In: **Anais do XII - Brazil MRS Meeting - Encontro da SBPMat**, Campos do Jordão/SP, 2013.
32. MIRANDA, M. C. R. **Liberação controlada de peptídeos empregando membranas látex natural como matriz**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
33. HERCULANO, R. D.; QUEIROZ, A. A. A.; KINOSHITA, A.; OLIVEIRA-JR, O. N.; GRAEFF, C. F. O. On the Release of Metronidazole from Natural Rubber Latex Membranes. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v. 31, n. 2, p. 272-275, 2011.
34. PAUL, J. C.; PIEPER, B. A. Topical metronidazole for the treatment of wound odor: a review of the literature. **Ostomy Wound Manage**, v. 54, n. 3, p. 8-27, 2008.
35. BALE, S.; TEBBIE, N.; PRICE, P. A topical metronidazole gel used to treat malodorous wounds. **British Journal of Nursing**, v. 13, n. 11, p. S4-11, 2004.
36. SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. **Journal of Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 5-14, 1995.
37. METRONIDAZOL – WIKIPEDIA. Disponível em:  
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Metronidazol>>. Acesso em: 19 dezembro 2014.

38. WEI, D.; QIAN, W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfacecs**, v.62, n 1, p. 136-142, 2008.
39. BARBOZA-FILHO, C. G.; CABRERA, F. C.; DOS SANTOS, R. J.; SAEZ, J. A. D. S.; JOB, A. E. The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p.152–158, 2012.
40. GRABAR, K. C.; FREEMAN, R. G.; HOMMER, M. B.; NATAN, M. J. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 735-743, 1995.
41. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.
42. FRENS, G. Controled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold solutions. **Nature Physiology Science**. v. 241, p. 20-22, 1973.
43. VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2011.
44. JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. **Journal of the American Chemical Society**. v. 129, n. 45, p. 13939-13948, 2007.
45. WANGOO, N.; RAMAN, S. C.; SHEKHAWAT, G., Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. **Applied Physics Letters**, v. 92, n. 133104, p. 1-4, 2008.
46. VANGALA, K.; AMEER, F.; SALOMON, G.; LE, V.; LEWIS, E.; YU, L.; LIU, D.; ZHANG, D. Studying Protein and Gold Nanoparticle Interaction Using Organothiols as Molecular Probes. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 5, p. 3645–3652, 2012.
47. CALZOLAI, L.; FRANCHINI, F.; GILLILAND, D.; ROSSI, F. Protein–Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin–Gold Nanoparticle Interaction Site. **Nano Letters**, v. 10, n. 8, p. 3101-3105, 2010.
48. ZHOU, J.; RALSTON, J.; SEDEV, R.; BEATTIE, D. A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, n. 2, p. 251-262, 2009.
49. SIGMA-ALDRICH. **Gold Nanoparticles: Properties and Applications**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>>. Acesso em: 18 dezembro 2014.
50. HAMID, M. A.; IWAKU M.; HOSHINO E. The metabolism of phenylalanine and leucine by a cell suspension of *Eubacterium brachy* and the effects of metronidazole on metabolism. **Archives of Oral Biology**, v. 39, n. 11, p. 967-972, 1994.

51. HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. **Biomacromolecules**, vol. 5, n. 6, p 2340–2346, 2004.
52. WANG, B.; CHEN, K.; JIANG, S.; REINCKE, F.; TONG, W.; WANG, D.; GAO, C. Chitosan-mediated synthesis of gold nanoparticles on patterned poly(dimethylsiloxane) surfaces. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1203-1209, 2006.
53. ABU-BAKAR, N. H. H.; ISMAIL, J.; ABU-BAKAR, M. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in natural rubber. **Materials Chemistry and Physics**, v. 104, n. 2–3, p. 276–283, 2007.
54. POPIOLSKI, T. M. **Avaliação da Incorporação de nanopartículas de ouro em filmes automontados de polieletrólitos fracos**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.
55. ROGALSKI, A. Infrared detectors: an overview. **Infrared Physics & Technology**, v. 43, n. 1, p. 187–210, 2002.
56. WARD, I. M. E.; HADLEY, D. W. 2. ed. **Mechanical Properties of Solid Polymers**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2012, 461 p.
57. DIAS, S.C.; ÁVILA, G.B.; MOYSÉS, M. R.; RIBEIRO, J. C. R.; REIS, A. C.; PANZERI, H. Resistencia compresiva y traccional exhibida por un polímero alternativo utilizado en modelos odontológicos. **Acta Odontológica Venezolana**, v. 45, n. 2, p. 255-258, 2007.
58. NIELSEN, L. E.; LANDEL, R. F. **Mechanical Properties of Polymers and Composites**, 1. ed. New York: CRC Press, 1994, 580 p.
59. LATSCH, S.; SELZER, T.; FINK, L.; KREUTER, J. Determination of the physical state of norethindrone acetate containing transdermal drug delivery systems by isothermal microcalorimetry, X-ray diffraction, and optical microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p.383-395, 2004.
60. ARTURSSON, T.; HAGMAN, A.; BJORK, S.; TRYGG, J.; WOLD, S.; JACOBSSON, S. P. Study of preprocessing methods for the determination of crystalline phases in binary mixtures of drug substances by X-ray powder diffraction and multivariate calibration. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 8, p. 1222-1230, 2000.
61. BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, J.; LONNIE, D. **Electron Microscopy: Principles And Techniques For Biologists**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992, 542p.
62. MATRAB, T.; HAUQUIER, F.; COMBELLAS, C.; KANOUI, F. Scanning electron microscopy investigation of molecular transport and reactivity within polymer brushes. **Chemphyschem**, v. 11, n. 3, p. 670-682, 2010.
63. KLAUSS, P. **Estudo da Obtenção de Imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura e Espectros na Micro-Análise por Energia Dispersiva**. 2003. 26 f. TCC

(Monografia de Conclusão de Curso) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

64. BRUKER. FOURIER TRANSFORM INFRARED (VERTEX 70). Disponível em: <<http://www.bruker.com/products/infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-research-spectrometers/vertex-series/vertex-7070v/overview.html>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.

65. ANGULO-SANCHEZ, J. L.; CABOLLERO-MATO, P. Long chain branching in natural Hevea rubber - determination by gel permeation chromatography. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 54, p. 34-43, 1981.

66. 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**, v. 6, p. 1858-1863, 2005.

67. TATA, S. J. Distribution of proteins between the fractions of Hevea latex separated by ultracentrifugation. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v. 28, p. 77-83, 1980.

68. WONG, P. T. T.; MANTSCH, H. H. High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1, 2-diacylphospholipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 46, p. 213-224, 1988.

69. HERCULANO, R. D.; TZU, L. C.; SILVA, C. P.; BRUNELLO, C. A.; QUEIROZ, A. A. A.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Nitric oxide release using natural rubber latex as matrix **Materials Research**, v. 14, n. 3, p. 355-359, 2011.

70. BLATON, N. M.; PEETERS, O. M.; DE RANTER, C. J. 2-(2-Methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol (Metronidazole). **Acta Crystallographica Section B**, v. 35, p. 2465-2467, 1979.

71. ERK, N.; ALTUN, M. L. Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 1, p. 115-122, 2001.

72. JONG-WON PARK, J. W.; SHUMAKER-PARRY, J. S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. **Journal of American Chemistry Society**, v.136, n. 5, p. 1907–1921, 2014

73. MAGENHEIM, B., BENITA, S. Nanoparticles characterization. A comprehensive physicochemical approach. **Pharma Science**, v. 4, p. 221-241, 1991.

74. SIGMA-ALDRICH: Gold Nanoparticles with 30 nm diameters. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/753629?lang=pt&region=BR>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2014.

75. TRZYBIŃSKI, D.; NIEDZIAŁKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; TRYNDA, A.; SIKORSKI, A. Single-crystal X-ray diffraction analysis of designer drugs: hydrochlorides of metaphedrone and pentedrone. **Forensic Science International**, v. 232, n. 1-3, 28-32, 2013.

76. RABELO, R. E.; SANT'ANA, F. J. F.; PAULO, N. M.; ROMANI, A. F.; SILVA, L. A. F.; VIU, M. A. O.; ALVES, C. B.; OLIVEIRA-LIMA, C. R.; SILVA, O. C. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0.1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2005.

77. ZIMMERMANN, M.; RAISER, A. G.; BRAGA, F. V. A., TRINDADE, A. L. B.; LOPES, S. T. A. Membranas de látex natural na herniorrafia diafragmática experimental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p.1476-1483, 2008.

78. PESSAN, L. A.; HAGE, J. R. E. **Correlação entre processamento, estrutura e propriedades dos polímeros, Aperfeiçoamento em tecnologia de plásticos**. 1.ed. São Carlos: EdUFSCar, 2002, 100p.