UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

PEDRO LUIS COLTURATO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE PARA LIBERAÇÃO DE VITAMINA D3

ARARAQUARA - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE PARA LIBERAÇÃO DE VITAMINA D3

PEDRO LUIS COLTURATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADORA: Prof.ª Dr.ª Danielle Goveia

ARARAQUARA - SP

2019

Colturato, Pedro Luis.
C725d Desenvolvimento e caracterização de membranas de nanocelulose para liberação de vitamina D3 / Pedro Luis Colturato. – Araraquara: [S.n.], 2019.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Danielle Goveia.

1. Membranas de Nanocelulose. 2. Sistema de liberação de drogas. 3. Colecalciferol. 4. PVAl. 5. Bioprodutos. I. Goveia, Danielle, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE PARA LIBERAÇÃO DE VITAMINA D3

AUTOR: PEDRO LUIS COLTURATO
ORIENTADORA: DANIELLE GOVEIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELLE GOVEIA
Câmpus Experimental de Itapeva / UNESP

Prof. Dr. PAULO SERGIO TONELLO
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP - Sorocaba

Prof. Dr. AUGUSTO BATAGIN NETO
Câmpus Experimental de Itapeva / UNESP

Araraquara, 09 de dezembro de 2019

Dedico essa dissertação aos meus pais

Pedro e Nadeide, a minha irmã Ana Gilda,

a minha esposa Simone, aos meus filhos

Bruno e Milena, aos amigos Ivonete, Rodrigo,

Hiata, Luciana, Luana, Lowenne e Leonardo

pelo carinho, amor e suporte.

AGRADECIMENTOS

À Prof.ª Dr.ª **Danielle Goveia** pela orientação, confiança, paciência, oportunidades oferecidas e por todos os valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Rondinelli Donizetti Herculano** pela parceria na realização de análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

Ao Prof. Dr. **Higor Rogério Favarim**, pela excelente ajuda na interpretação da espectrofotometria UV-Vis.

Ao Prof. Dr. **Augusto Batagin Neto** e ao Prof. Dr. **José Cláudio Caraschi**, membros da banca examinadora do trabalho de qualificação, pelas correções e contribuição com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Paulo Sérgio Tonello,** membro da banca examinadora do trabalho de dissertação, pelas contribuições, sugestões e ensinamentos.

Ao **Vínicius de Jesus Carvalho de Souza** pela preparação da nanocelulose do línter de algodão.

À **Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva** (FAIT) pela parceria na utilização dos laboratórios e reagentes.

À empresa **Taquari Indústria e Comércio de Papéis Ltda** pela realização dos testes mecânicos de tração no equipamento Dinamômetro.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº 2016/23728-8, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao **Campus Experimental de Itapeva** pelo acesso à infraestrutura, cessão de materiais e equipamentos para a produção e análise dos dados.

À seção de **Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos**, Unesp-Campus Araraquara, em especial à servidora **Claudia Lúcia Molina**.

Meus sinceros agradecimentos.

As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Estudos epidemiológicos mostram que uma parcela significativa da população mundial, independente de idade, etnia e localização geográfica, apresenta baixos níveis séricos de vitamina D3. Neste contexto, a incorporação da vitamina D3 em novos sistemas de liberação de fármacos, como os sistemas transdérmicos, têm sido apontados como alternativa para a administração deste medicamento. A extração da nanocelulose de fibras vegetais e sua utilização na fabricação de insumos da área da saúde tem se destacado na medicina, pois apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. A celulose tem um longo histórico de aplicações na área da saúde, agindo como mediador na liberação controlada de fármacos, mas sua utilização nanoestruturada em membranas, como sistema de liberação local de fármacos ainda é um desafio. Neste estudo foi desenvolvida uma membrana, pela técnica de "*casting*", de nanocelulose extraída do linter de algodão e vitamina D3 acrescidos dos componentes, álcool polivinílico, glicerina e *tween* 80. A nanocelulose e as membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), teste de tração no dinamômetro e a cinética de liberação do fármaco por espectroscopia molecular no ultravioleta visível (UV-Vis). A membrana apresentou reprodutibilidade na síntese, ótimas propriedades físicas como flexibilidade, transparência e elasticidade, bem como resistência adequada para aplicações biomédicas. Por meio do FT-IR observou-se a presença de todos os componentes ativos na amostra, sem alteração estrutural ou formação de novas ligações. Os resultados da MEV-FEG mostraram cristais do fármaco na superfície e no "*bulk*" da membrana. A liberação da vitamina D3 em solução alcóolica, ocorreu de forma crescente e rápida, com valores de 3029 UI mL^{-1} de vitamina D3 em 60 minutos. Desta forma este estudo revelou a possibilidade do uso da membrana na liberação sustentada de vitamina D3, o novo biomaterial obtido pode no futuro se transformar em um novo modelo de suplementação para pessoas com deficiência de vitamina D3.

Palavras Chave: Membranas de Nanocelulose. Sistema de liberação de drogas. Colecalciferol. PVAl. Bioprodutos.

ABSTRACT

Epidemiological studies show that a significant portion of the population has low serum vitamin D3 levels, regardless of age, ethnicity and geographical location. In this context, the incorporation of vitamin D3 in new drug delivery systems, such as transdermal systems, has been suggested as an alternative for the administration of this drug. The extraction of nanocellulose from plant fibers and its use in the manufacture of health inputs has been highlighted in medicine, as it has properties such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. Cellulose has a long history of healthcare applications, acting as a mediator in controlled drug release, but its nanostructured use in membranes as a local drug delivery system is still a challenge. In this study a membrane was developed by casting technique of nanocellulose extracted from cotton linter and vitamin D3 plus the components, polyvinyl alcohol, glycerin and tween 80. Nanocellulose and membranes were characterized by high scanning electron microscopy. resolution (SEM-FEG), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), dynamometer tensile test and drug release kinetics by visible ultraviolet molecular spectroscopy (UV-Vis). The membrane showed reproducibility in synthesis, excellent physical properties such as flexibility, transparency and elasticity, as well as adequate resistance for biomedical applications. Through the FT-IR it was observed the presence of all active components in the sample, without structural alteration or formation of new bonds. SEM-FEG results showed drug crystals on the membrane surface and bulk. The release of vitamin D3 in alcoholic solution occurred rapidly and rapidly, with values of 3029 IU mL-1 of vitamin D3 in 60 minutes. Thus, this study revealed the possibility of using the membrane in sustained release of vitamin D3, the new biomaterial obtained may in the future become a new supplementation model for people with vitamin D3 deficiency.

Keywords: Nanocellulose Membranes. Drug release system. Cholecalciferol. PVAl. Bioproducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da vitamina D3 19
Figura 2 – Vias metabólicas da vitamina D3. 20
Figura 3 - Resumo da via da vitamina D3 e funções na pele humana. 21
Figura 4 - Prevalência mundial da deficiência da vitamina D3 em adultos.....22
Figura 5 - Estrutura molecular da celulose 24
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão dos três principais tipos de nanocelulose (nanocelulose cristalina, nanofibrilada e bacteriana).....25
Figura 7- Ilustração esquemática do mecanismo hipotético proposto de liberação da Vitamina D3 na pele através da aplicação da membrana de NC. 28
Figura 8 - Estrutura química do PVAL. 30
Figura 9 - Estrutura molecular do Tween 80. 31
Figura 10 - Estrutura química da glicerina.....33
Figura 11 - Ilustração da técnica utilizada para a produção da membrana de nanocelulose acrescidos do componente ativo vitamina D3. 35
Figura 12 - Teste mecânico de tração e alongamento das membranas de nanocelulose 36
Figura 13 - Aspectos gerais e caracterização visual da membrana de nanocelulose. 41
Figura 14 - Espectro no FT-IR da nanocelulose. 46
Figura 15 - Espectro no FT-IR da glicerina.....47
Figura 16 - Espectro do infravermelho do PVAL. 48
Figura 17 - Espectro do infravermelho da Vitamina D3 em solução alcóolica.....49
Figura 18 - Espectro do infravermelho da membrana nanovit. 50
Figura 19 - Espectro de absorção no FT-IR da membrana controle e membrana nanovit. 51
Figura 20 - Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) da nanocelulose com aumento de 100.000 vezes. 53
Figura 21 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana controle, ausência de VITD3, com aumento de 100.000 vezes. 54
Figura 22 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana nanovit com aumento de 25.000 vezes. 55

Figura 23 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana nanovit aumentada 1.500 vezes (A) e 50.000 vezes (B). 56
Figura 24 - Imagem de MEV-FEG da membrana nanovit após procedimento de liberação em solução alcóolica.....57
Figura 25 - Espectro de absorção da Vitamina D3 em solução alcóolica.....58
Figura 26 - Curva de calibração da Vitamina D3 diluída em álcool etílico absoluto. Leituras realizadas em 265 nm. 59
Figura 27 - Espectro UV-Vis dos líquidos receptores selecionados.....61
Figura 28 - Espectro de absorção molecular UV-Vis dos constituintes da membrana 62
Figura 29 - Espectro UV-Vis de liberação da membrana controle em função do tempo de liberação.....63
Figura 30 - Espectro UV-Vis de liberação da membrana nanovit em função do tempo de liberação.....64
Figura 31 - Espectro de absorção UV-VIS da membrana nanovit super em função do tempo de liberação.....65
Figura 32 - Curva de liberação da Vitamina D3 nas membranas nanovit e nanovit super em 265 nm. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doses de manutenção diárias da vitamina D3 recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência.....23
Tabela 2 - Composição das membranas.....34
Tabela 3 - Características encontradas nas membranas controle e nanovit.....42
Tabela 4 - Valores médios dos resultados do módulo de Young, deformação específica, força e alongamento.....43
Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão dos dados dos testes de esmagadura e resistência ao rasgo. 45
Tabela 6 - Análise comparativa da posição das bandas e tipo de vibração 52
Tabela 7- Leitura de absorbância em 265 nm nas membranas controle, nanovit e nanovit super em função do tempo de liberação.....66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais fontes de nanocelulose, procedimento de extração e tipo de nanocelulose. 26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. Objetivo geral 18
1.2. Objetivos específicos 18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1. Vitamina D3 19
2.2. Nanocelulose 24
2.3. Liberação de Fármacos 26
3. MATERIAIS E MÉTODOS 30
3.1. Materiais 30
3.1.1. Álcool Polivinílico (PVAL) 30
3.1.2. Tensoativo Polissorbato 80 (*Tween* 80) 31
3.1.3. Nanocelulose 32
3.1.4. Vitamina D3 32
3.1.5. Glicerina: 33
3.2. Métodos 33
3.2.1. Síntese das membranas 33
3.2.2. Caracterização física da membrana 35
3.2.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FT-IR) 38
3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) 38
3.2.5. Estudos de liberação do fármaco 39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
4.1. Caracterização e dimensões das membranas 41
4.1.1. Testes mecânicos de tração 42
4.1.2. Teste de compressão e resistência ao rasgo 44
4.2. Caracterização por FT-IR dos componentes e das membranas. 46

4.3. Caracterização da nanocelulose e das membranas por Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG). 53
4.4. Estudo da liberação do fármaco 58
4.4.1. Seleção do comprimento de onda 58
4.4.2. Curva padrão de calibração da resposta óptica da Vitamina D3. 59
4.4.3. Escolha do líquido receptor para avaliar a liberação da Vitamina D3:...60
4.4.4. Leitura dos picos de absorbância dos reagentes.....61
4.4.5. Estudo de liberação do princípio ativo no líquido receptor 62
5. CONCLUSÃO 69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D3 (VITD3) ou colecalciferol é um hormônio esteroide produzido a partir da ação fotolítica da radiação ultravioleta B sobre a molécula de 7-dehidrocolesterol encontrado no tecido epitelial, originando a pré-vitamina D3, a qual após absorvida, é metabolizada pelo fígado em 25-hidroxivitamina D3 e chegando até os túbulos renais é convertida na sua forma ativa a 1,25-di-hidroxivitamina D3 (KWAK et al., 2014). Evidências laboratoriais indicam que a forma hormonal ativa da VITD3 gera um número de respostas biológicas extra esqueléticas, além das já observadas no metabolismo ósseo, incluindo regulação da proliferação celular da pele, efeitos no sistema cardiovascular, proteção contra um número de doenças autoimunes, esclerose múltipla, câncer, obesidade e doença inflamatória intestinal (CHRISTAKOS et al., 2015).

Nos últimos anos, a VITD3 recebeu maior atenção devido à deficiência deste hormônio e do aumento de casos de raquitismo, tornando-se uma questão de saúde global. Estudos epidemiológicos demonstram níveis baixos desta vitamina em todo a população mundial, independente de faixa etária, escolaridade ou raça (PALACIOS; GONZALEZ, 2014).

Os três principais fatores para manter níveis saudáveis de VITD3 são a ingestão adequada de alimentos ricos em colecalciferol, exposição adequada aos raios UV-B do sol para permitir a síntese transdérmica deste hormônio e suplementação adequada. Portanto, as populações que não possuem uma ou mais dessas fontes de VITD3 correm risco de deficiência (REJINOLD et al., 2019). No entanto os métodos orais de ingestão possuem limitações em pacientes com distúrbios intestinais, doença de Crohn, distúrbios hepáticos, gástricos e renais crônicos. Estes pacientes possuem a absorção intestinal desta vitamina comprometida (BARRAL; 2007; COSTA, 2017).

Os principais fatores de risco para a diminuição dos níveis séricos de VITD3 são: uso excessivo de protetores solares, estilo de vida em ambientes de trabalho fechados, uso crônico de medicamento que reduz o colesterol sérico e consequentemente diminuição dos níveis de 7-dehidrocolesterol na pele, idade avançada, distância da linha do Equador, poluição do ar, pele negra, tabagismo,

síndromes de má absorção intestinal, entre outros (PEIXOTO et al., 2012; JORGE et al., 2018).

A VITD3 exibe baixa solubilidade em água, inúmeras formulações, como lipossomos, emulsões lipídicas e micelas mistas, foram criadas para aumentar a sua solubilidade. No entanto, essas formulações são instáveis e ocorre facilmente a degradação e oxidação durante o armazenamento. Assim, estudos de incorporação da VITD3 em novos sistemas de liberação são ainda necessários (LI et al., 2014; BURKIEWICZ et al., 2012).

Neste contexto, os materiais à base de nanocelulose (NC) têm potencial para serem usados como compostos de liberação controlada de cosméticos e drogas. Além do efeito sistêmico, também tem sido explorada a liberação local de fármacos com materiais à base de NC. Os materiais transdérmicos desenvolvidos, como membranas, hidrogéis e microesferas, potencializam a eficácia da droga reduzindo os efeitos colaterais. (HALIB et al., 2017).

O objetivo deste estudo é desenvolver um sistema de liberação da VITD3, empregando-se uma matriz de NC extraída do linter de algodão. Desta forma, foi obtida uma membrana com a adição do álcool polivinílico, glicerina e *tween* 80. O álcool polivinílico foi utilizado visando potencializar a permeação cutânea do medicamento. Como a VITD3 é lipossolúvel, foi utilizada a glicerina como agente solubilizador e tal composto também pode facilitar o deslocamento do fármaco na matriz polimérica. Na etapa de síntese da membrana, foi adicionado o surfactante *tween* 80 para diminuir a tensão superficial entre os componentes da formulação, uma vez que a nanocelulose tem caráter hidrofílico e a VITD3 é lipofílica, este composto é conhecido por atuar com um carreador de fármacos lipossolúveis. Desta forma, usando um polímero natural (nanocelulose), com um polímero sintético (álcool polivinílico) e um surfactante foi desenvolvida uma membrana para a liberação da VITD3, que poderá no futuro ser utilizada como modelo de suplementação desta vitamina ou até mesmo ser empregada em tratamentos tópicos da pele, como curativos ou potencial efeito cosmético na regeneração e cicatrização do tecido epitelial cutâneo.

OBJETIVOS:

1.1. Objetivo geral

Desenvolver uma membrana de nanocelulose acrescida do componente ativo vitamina D3 para liberação do fármaco.

1.2. Objetivos específicos

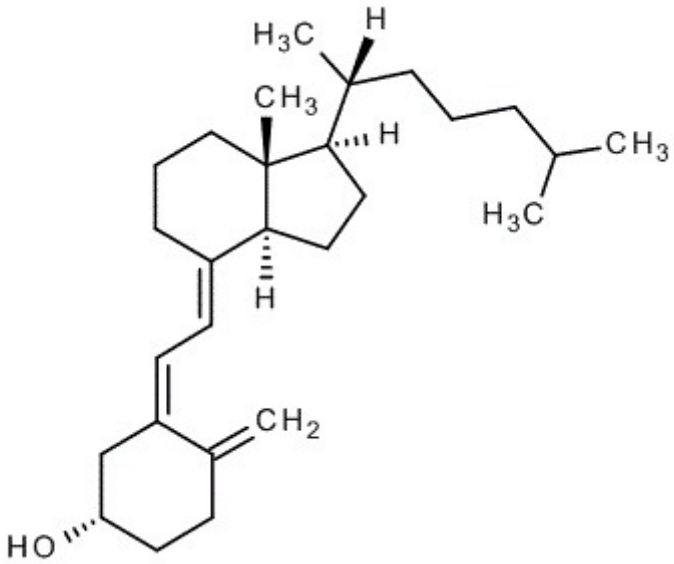
- ✓ Desenvolver uma membrana de NC/VITD3 através do método de "*casting*".
- ✓ Caracterizar a membrana quanto as suas propriedades físicas e químicas através de:
  - Análise de resistência à tração e alongamento, teste de esmagadura e teste de resistência ao rasgo.
  - Caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das membranas e de seus componentes.
  - Caracterização por microscopia eletrônica de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) da nanocelulose do linter de algodão e das membranas produzidas.
  - Desenvolvimento do método analítico de quantificação por espectrofotometria no ultravioleta-visível para a determinação da VITD3.
  - Liberar o componente ativo, VITD3, em solução receptora específica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vitamina D3

O princípio ativo de escolha neste estudo foi a vitamina D3 ou colecalciferol (Figura 1). Este composto apresenta uma massa molar de 384,64 g mol^{-1}, possuindo a fórmula química $C_{27}H_{44}O$, com ponto de fusão entre 82° e 87°C. Pertence a um grupo de moléculas secosteroides derivadas do 7-dehidrocolesterol, interligadas através de uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas. É um hormônio lipossolúvel que é essencial na dieta humana para regulação de uma série de sistemas do metabolismo celular (CASTRO, 2011).

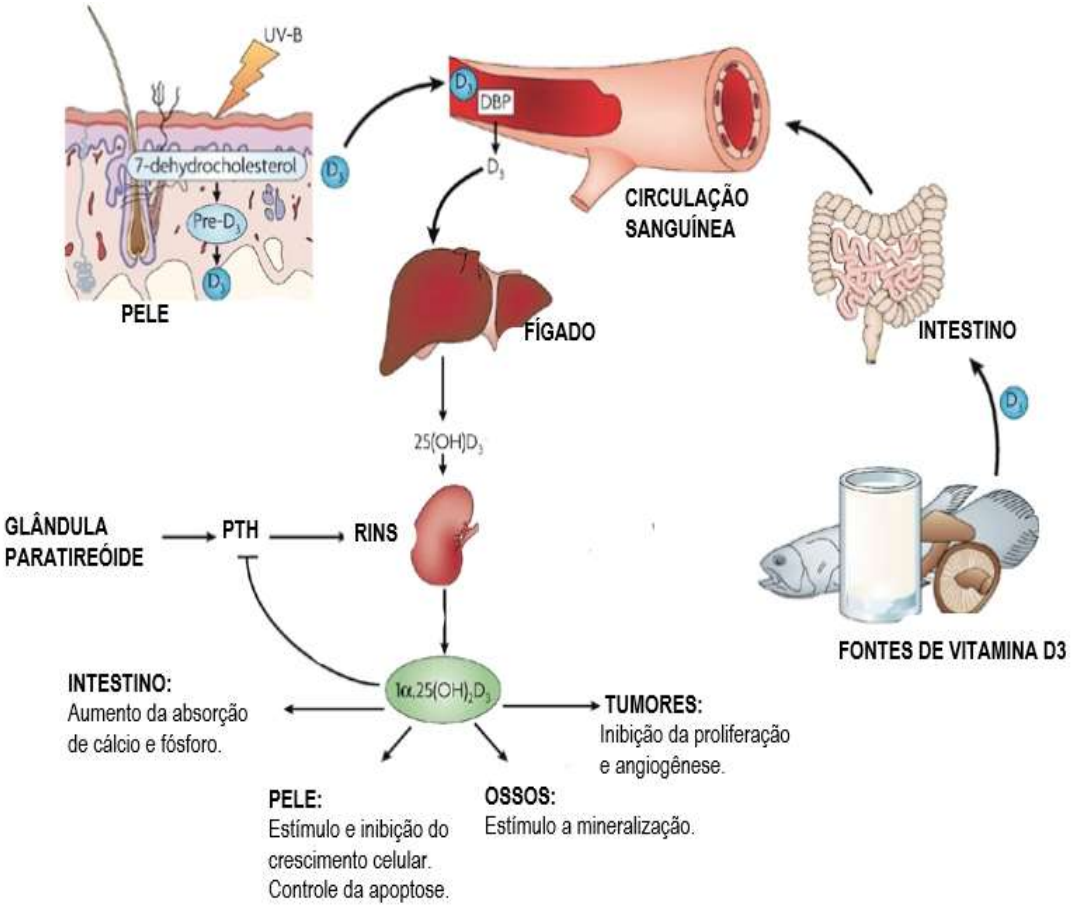
Figura 1 - Estrutura molecular da vitamina D3



Fonte: http://structuresearch.merck-chemicals.com/getImage/MDA_CHEM_500936.

A deshidrogenação do colesterol gera 7-dehidrocolesterol na pele humana e este é convertido em pré-vitamina D3 por irradiação UVB na faixa de 295 a 315 nm (OZTURK et al., 2015; KWAK et al., 2014). Como ilustrado na Figura 2, estes compostos após absorvidos são metabolizados no fígado em 25-hidroxivitamina D3, a qual é a forma presente na corrente sanguínea. O 25-hidroxivitamina D3 é ainda metabolizado pelos rins para a forma metabolicamente ativa em 1,25-di-hidroxivitamina D3 (STROBEL et al., 2013).

Figura 2 – Vias metabólicas da vitamina D3.



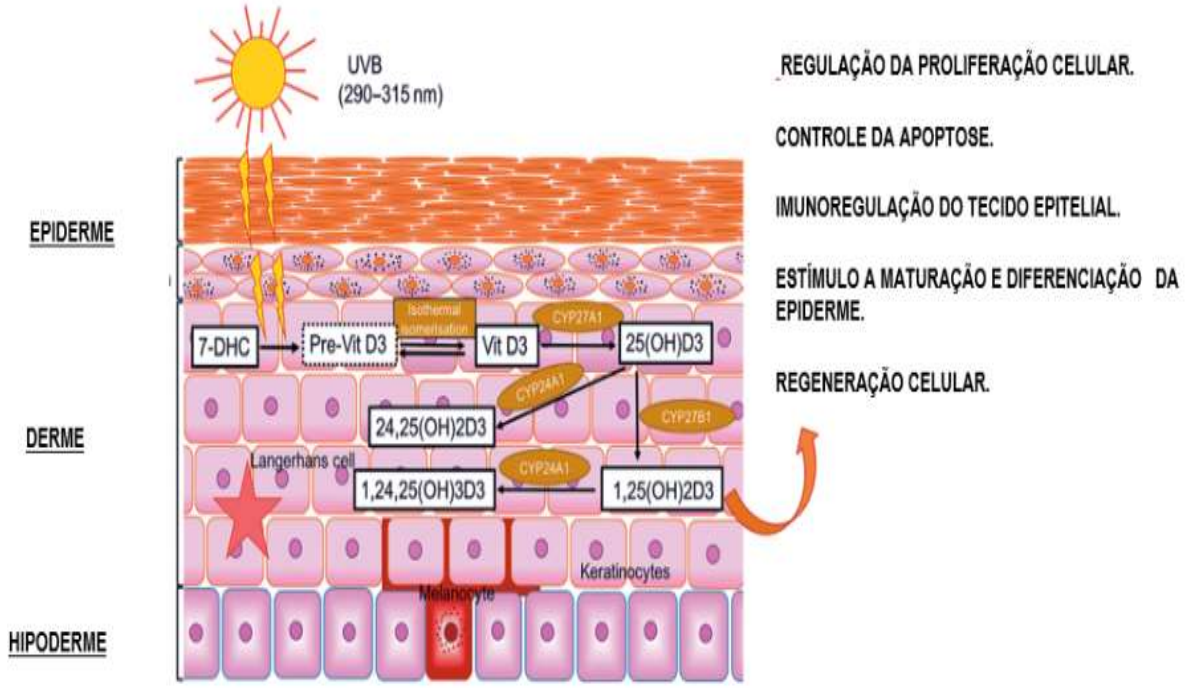
Fonte: Adaptado de Deep, Trump e Johnson (2007).

A forma ativa da VITD3, o 1,25-di-hidroxivitamina D3 ou calcitriol, desempenha um papel importante na regulação da homeostase do cálcio e mineralização de ossos. Também foram associadas outras funções no corpo, por exemplo, pode influenciar na diferenciação dos queratinócitos da pele e autoimunidade e, portanto, são utilizados em tratamento de vários distúrbios da pele, incluindo psoríase. Também estão envolvidos no controle de múltiplas vias intracelulares no controle da pressão arterial, proteção contra alguns tipos de câncer como de próstata, mama e cólon, bem como obesidade (RAMEZANLI et al., 2017).

A Figura 3 apresenta um resumo das principais funções da VITD3 na pele, demonstrando outras funções deste hormônio que vão além do efeito clássico no metabolismo ósseo. Observa-se que na pele a síntese de VITD3 ocorre por meio da

luz solar. A radiação UV-B (290-315 nm) realiza a fotólise sobre o 7-dehidrocolesterol encontrado no tecido epitelial, originando a pré-vitamina D3, esta sofre a ação de uma série de enzimas que irão culminar com a formação de 1,25-di-hidroxivitamina D3, o metabólico ativo da VITD3, o qual será absorvido pelos capilares teciduais e transportado por todo o corpo (DINIZ, 2012)

Figura 3 - Resumo da via da vitamina D3 e funções na pele humana.

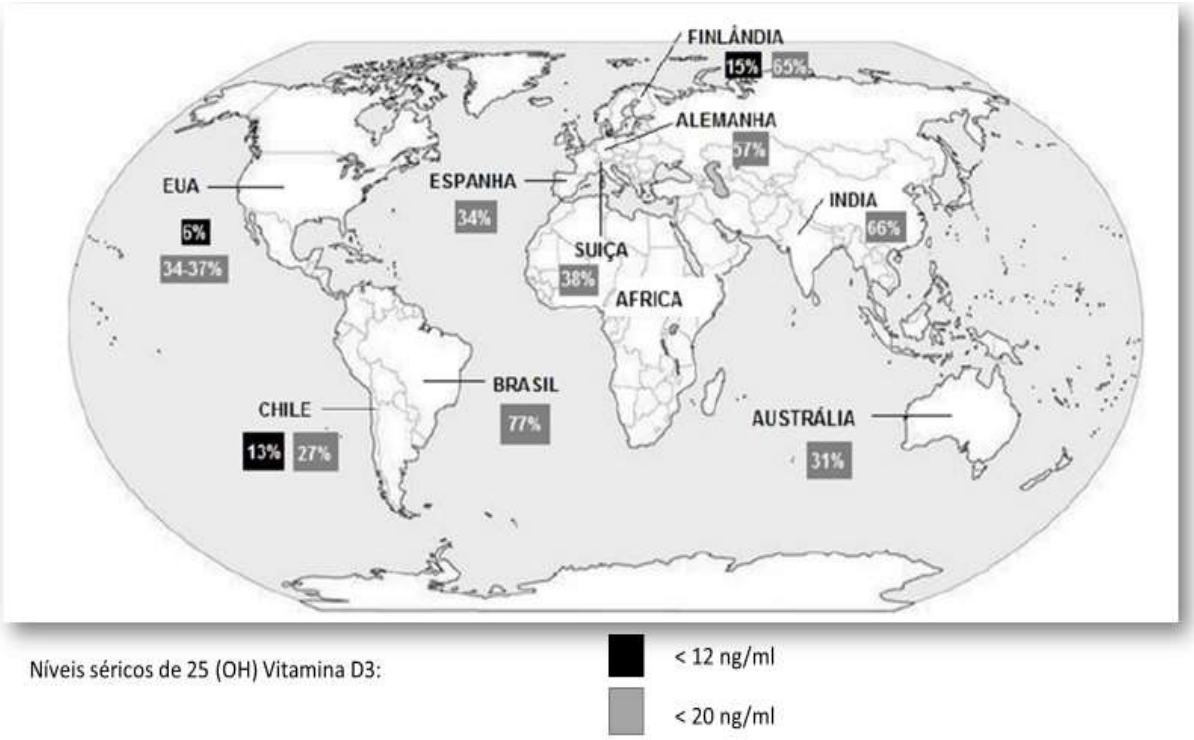


Fonte: Adaptado de Umar, Sastry e Al Ali (2018).

O seu papel no bom funcionamento de vários tecidos e órgãos incluindo a pele tem recebido um interesse crescente. Os principais efeitos produzidos pela VITD3 na pele são o estímulo e inibição do crescimento epitelial, regula a proliferação, apoptose (morte celular programada), diferenciação e é imunorregulador do tecido epitelial (KIM et al., 2018). Até o momento, intervenções terapêuticas (tópicas e sistêmicas) foram provadas como sendo benéficos no tratamento da psoríase e na regeneração celular. Estudos futuros são necessários para explorar as vias específicas afetadas e avaliar a segurança e eficácia do tratamento à base de VITD3 nas várias doenças inflamatórias da pele (COSTA, 2017).

Como ilustra a Figura 4, estudos epidemiológicos têm mostrado que uma parcela significativa da população mundial, independente de idade, etnia e localização geográfica, apresenta baixos níveis séricos de VITD3. Alguns países chegam a apresentar taxas de deficiência de vitamina D superiores a 50%, como observado no Brasil, Finlândia, Índia e Alemanha (JORGE et al., 2018).

Figura 4 - Prevalência mundial da deficiência da vitamina D3 em adultos.



Fonte: Adaptado de Palacios e Gonzalez (2014). Valores de Referência de 25 (OH) Vitamina D3: Deficiência: inferior a 20 ng/mL Insuficiência: 21 a 29 ng/mL Suficiência: 30 a 100 ng mL^{-1}.

A sua deficiência surgiu como um grande problema de saúde pública em todo o mundo (KIM et al., 2017). Tais evidências levaram a debates relacionados, até que certo ponto as medidas fotoprotetoras que visam proteger contra o câncer de pele, estariam causando a deficiência deste hormônio. Mas a exposição ao sol não deve ser usada como a única fonte de VITD3, pois também pode ser nocivo ao homem, devido ao risco carcinogênico (GILABERTE et al.,2011). Outros fatores que também estariam contribuindo para níveis baixos desta vitamina, como estilo de vida "*indoor*", uso crônico de estatinas (medicamentos para redução do colesterol), idade avançada, residência em locais distantes da linha do equador, poluição do ar, cor da pele,

tabagismo, síndromes de má absorção intestinal (PEIXOTO et al.,2012; JORGE et al., 2018).

Unidades Internacionais (UI) é o sistema de medidas adotado pela indústria farmacêutica para quantificar vitaminas, como a VITD3. Segundo a Tabela 1, as doses diárias recomendadas de VITD3 para a maioria das faixas etárias não ultrapassam 800 UI, porém em populações de risco doses de manutenção entre 1.000 UI e 2.000 UI são necessárias.

Tabela 1 - Doses de manutenção diárias da vitamina D3 recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência

Faixas etárias	População geral (UI)	População de risco (UI)
0 – 12 meses	**400**	**400 – 1.000**
1 – 8 anos	**400**	**600 – 1.000**
9 – 18 anos	**600**	**600 – 1.000**
19 – 70 anos	**600**	**1.500 – 2.000**
> 70 anos	**800**	**1.500 – 2.000**
Gestantes	**600**	**600 – 2.000**
Lactantes	**600**	**1.500 – 2.000**

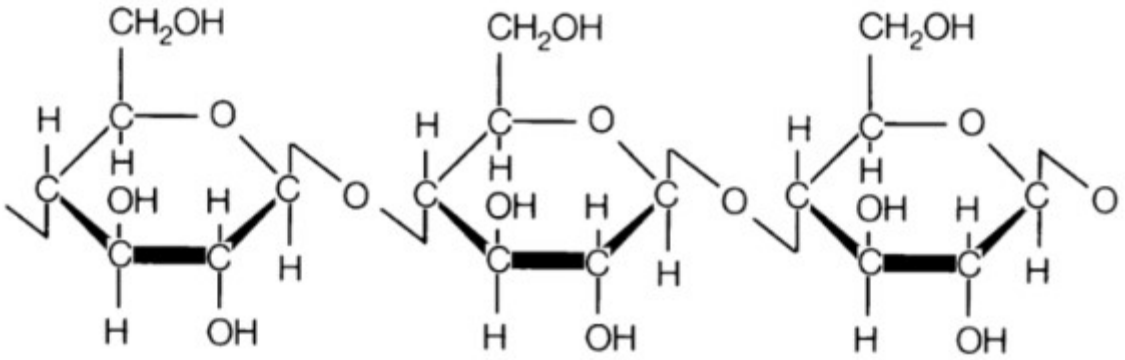
Fonte: Adaptada de (MAEDA et al., 2014), com base nas tabelas nutricionais do Institute of Medicine e da Endocrine Society.

A análise de risco define o limite máximo tolerável para 10.000 UI ao dia, para a população saudável em geral. Mas em algumas situações clínicas específicas, como na deficiência severa de VITD3 estes valores podem variar de 100.000 a 600.000 UI ao dia durante 3 a 5 dias (WISHER, 2012; GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018).

2.2. Nanocelulose

A celulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, é o polímero orgânico mais abundante na Terra, o principal componente da parede celular dos vegetais, sendo considerada uma fonte de energia sustentável e praticamente inexaurível (SALVI, 2010). A Figura 5 representa a estrutura química da celulose, um polímero linear de até 10.000 unidades de D-glicose, com ligações intermoleculares por pontes de hidrogênio e forças de Van der Walls (MORÁN et al., 2008)

Figura 5 - Estrutura molecular da celulose



Fonte: https://www.acs.org/content/acs/en/cellulose.html.

Com o surgimento e desenvolvimento da nanotecnologia a celulose ganhou atenção na forma de nanomaterial (LIN; DUFRESNE, 2014). Segundo Drexler (2004), a nanotecnologia consiste em produzir estruturas atômicas estáveis, com pelo menos uma dimensão (comprimento, largura ou diâmetro) inferior a 100 nanômetros (10^{-9} m), as quais podem ser manipuladas no sentido de se obter materiais com melhores performances (NUNES, 2014). Em geral os materiais nanométricos apresentam características físicas e químicas inovadoras em relação ao seu material de origem, o que resulta na possibilidade da utilização dos mesmos em aplicações tecnológicas (BÖRJESSON; WESTMAN, 2015).

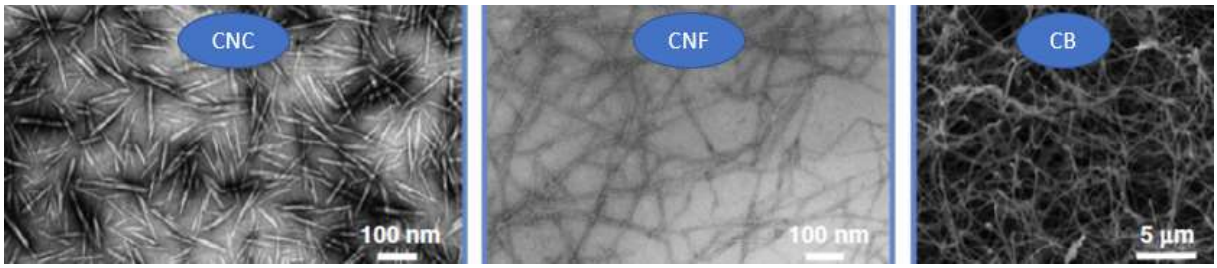
Segundo Santos (2012), as primeiras pesquisas sobre a nanocelulose (NC) surgiram em 1950 com Ranby. Ele obteve suspensões coloidais (hidrogéis) de celulose a partir da degradação controlada das fibras de celulose catalisada com ácido sulfúrico. Esse estudo foi realizado a partir do trabalho de Nickerson e Habrle (1947),

onde foi realizada a degradação das fibras de celulose por aquecimento em solução ácida.

Desde então pesquisas sobre nanotecnologia e nanocompostos, entre eles a nanocelulose, cresceram exponencialmente. Muitas dessas pesquisas abordam o isolamento da NC em diferentes fontes de matérias primas, sua estrutura e propriedades químicas (OKSMAN et al., 2016).

A celulose ganhou proeminência como material nanoestruturado, principalmente devido ao interesse no uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável. Como exemplificado na Figura 6, o termo NC é dado à nanocristais de celulose (CNC), extraídos quimicamente por hidrólise ácida, à celulose nanofibrilada (CNF), extraídas mecanicamente, e celulose bacteriana (CB) produzida por diversas espécies bacterianas (SPENCE; HABIBI; DUFRESNE, 2011; DUFRESNE, 2013; LEE et al., 2014).

Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão dos três principais tipos de nanocelulose (nanocelulose cristalina, nanofibrilada e bacteriana).



Fonte: Adaptado de Abitbol et al., (2016).

O Quadro 1 apresenta as principais fontes de extração de NC, que são madeiras em geral, fibras vegetais, algodão, linter do algodão, polpa de batata, entre outros.

Quadro 1 - Principais fontes de nanocelulose, procedimento de extração e tipo de nanocelulose.

Fontes de extração	Principais Procedimentos	Tipos de NC	Referência
Polpa de madeira	Pressão mecânica antes e/ou após tratamento químico ou enzimático. Diâmetro: 5–60 nm	CNC e CNF	Hamada and Bousfield (2010)
Linter de algodão	Hidrólise ácida da celulose. Diâmetro: 5–70 nm	CNC	Saito, Okita, et al. (2006)
Polpa de batata	Pressão mecânica antes e / ou após tratamento químico ou enzimático. Diâmetro: 5–60 nm	CNF	Dufresne et al. (2000)
Fibras vegetais	Pressão mecânica antes e/ou após tratamento químico e por hidrólise ácida da celulose. Diâmetro: 5–70 nm	CNC e CNF	Heiskanen et al. (2011)
Algodão	hidrólise ácida da celulose. Diâmetro: 5–70 nm	CNC	Saito, Nishiyama, et al. (2006)
Celulose bacteriana	Síntese Bacteriana. Diâmetro:20–100 nm	CB	KLEMM et al. (2011)

Fonte: KLEMM et al. (2011). NC: nanocelulose, CNC: nanocelulose nanocristalina , CNF: nanocelulose nanofibrilada.

A estratégia de desestruturação quimicamente induzida é comumente realizada para a extração de CNC da celulose nativa, através da remoção de regiões amorfas e preservação de cristais de NC da estrutura. Do outro lado, procedimentos mecânicos são mais utilizados para extração da CNF (NING LIN, 2014).

2.3. Liberação de Fármacos

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no uso de NC na área da saúde. Existem várias razões possíveis para este fenômeno: i) os custos de produção

são relativamente baixos em comparação com outros biopolímeros. ii) a celulose está amplamente disponível. iii) as fontes são sustentáveis. iv) o material tem excelentes propriedades mecânicas. v) NC possui uma área superficial específica alta. vi) apresenta ampla possibilidade de modificações químicas. vii) é biocompatível e viii) apresenta baixa toxicidade (HUA, 2016).

A celulose tem uma longa história de aplicações na indústria farmacêutica, em particular como excipientes, funcionando como mediadores especiais na liberação controlada e prolongada de drogas em comprimidos, sobretudo em razão de sua taxa de desintegração. Neste contexto, as formas físico-químicas de transportadores de fármacos a base de nanocelulose podem ser divididas em 3 grupos: i) as microesferas (ou micropartículas). ii) hidrogéis (ou géis) e iii) membranas (ou biofilmes). Estudos relatados sobre a NC dão uma grande perspectiva de avanços para a aceitação da nanocelulose como material comercial disponível para aplicações biomédicas (LIN; DUFRESNE, 2014; LAVOINE et al.,2012).

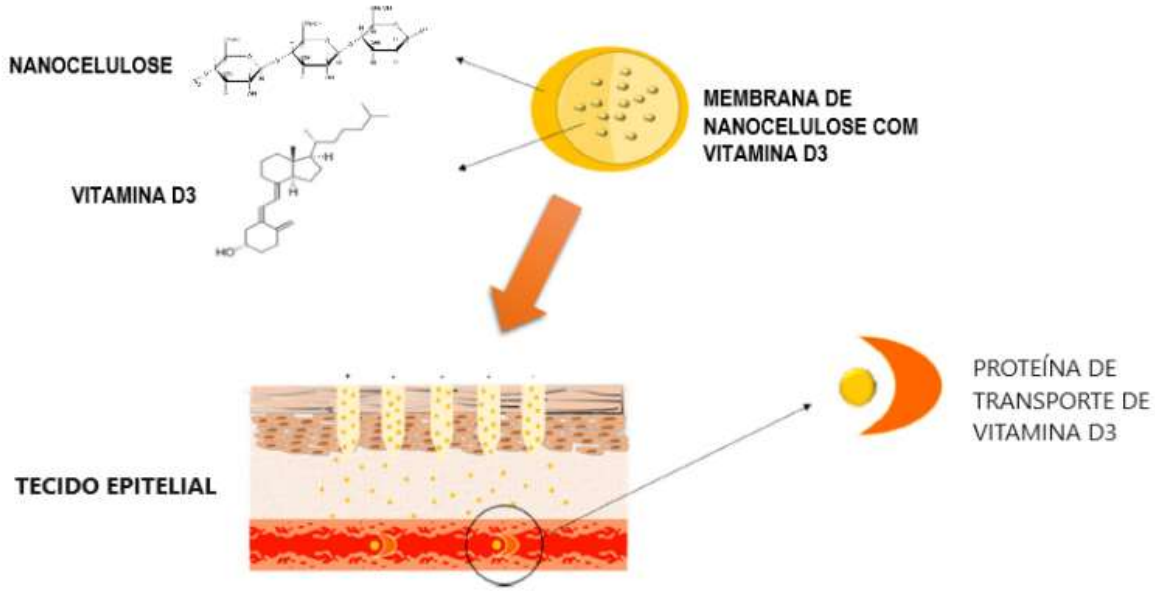
Uma das vantagens de se utilizar a NC está nas suas mais variadas propriedades como a alta pureza, cristalinidade, fibrilas finas, alta resistência mecânica e capacidade de retenção de água. Sendo assim, há a perspectiva de que o composto possa ser comercializado como biomaterial devido a sua biocompatibilidade, capacidade de cicatrização de feridas, moldabilidade e baixo custo (SOUZA, 2015; OLIVEIRA et al., 2012). As membranas derivadas da NC poderão ser utilizadas na medicina, bioengenharia, indústrias farmacêuticas e futuramente nas pesquisas para produção de cosméticos (UDDIN et al., 2018).

Além do efeito sistêmico, também tem sido explorada a liberação local de fármacos com materiais à base de NC (HALIB et al., 2017). Esta possui propriedades únicas, essenciais para a engenharia de tecidos. Na área médica já foram relatados estudos para aplicação como vasos sanguíneos artificiais para microcirurgia, enxertos para engenharia tecidual, substituição de pele e como sistema liberação de fármacos, além do material também funcionar como barreira contra microrganismos em lesões de pele e queimaduras, reduzindo a dor e o tempo de cicatrização (FISCHER, 2017).

A Figura 7 ilustra o mecanismo hipotético de liberação tópica de VITD3, proposto por Kim, Gater e Kim (2018), o qual estamos adaptando ao nosso estudo.

Neste contexto, a VITD3 ao atravessar o tecido epitelial poderá atingir a corrente sanguínea e ser transportada até o fígado e rins por proteínas de transporte específicas, exercendo seu efeito sistêmico sobre o metabolismo celular ou poderá desempenhar o seu efeito tópico sobre o tecido epitelial.

Figura 7- Ilustração esquemática do mecanismo hipotético proposto de liberação da Vitamina D3 na pele através da aplicação da membrana de NC.



Fonte: adaptado de Kim, Gater e Kim (2018).

A pele, apesar de suas propriedades de barreira, oferece várias vantagens como via de administração de fármacos. A administração dérmica de medicamentos por aplicação tópica pode localizar uma alta concentração de ativos nas camadas superiores da pele, que é o local de ação de muitos medicamentos que tratam distúrbios dermatológicos, e minimizar a exposição sistêmica do medicamento. A administração do medicamento depende das características físico-químicas do ativo e de seus transportadores na formulação. Muitos estudos têm se concentrado no uso de nanomateriais para melhorar a administração tópica de moléculas grandes e lipofílicas (RAMEZANLI et al., 2017).

A VITD3 é muito hidrofóbica e sensível a muitos fatores ambientais (por exemplo, umidade, calor e luz), que podem induzir isomerização ou oxidação de sua estrutura e afetar adversamente sua bioatividade (BALLARD et al., 2007). Embora a manipulação de compostos lipofílicos em transportadores de tamanho nanométrico tenha recebido atenção significativa na indústria alimentícia e farmacêutica, poucos relatos na literatura estão disponíveis para análogos da vitamina D (GUTTOFF et al., 2015; ALMOUAZEN et al., 2013).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem crescido na indústria farmacêutica nos últimos anos, dentre esses sistemas pode-se citar: i) os sistemas transdérmicos. ii) os lipossomas. iii) hidrogéis e iv) sistemas poliméricos matriciais (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Nas matrizes com fármacos hidrofóbicos a liberação da substância ativa ocorre por mecanismos de difusão através dos poros ou por erosão, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do fármaco e do excipiente utilizado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Neste estudo foi associado dois polímeros, sendo a NC um polímero natural e o álcool polivinílico (PVAL) um polímero sintético, que funcionam como agentes moduladores da liberação da VITD3. Neste contexto, o material a base de NC associado com a VITD3, pode permitir uma liberação controlada do princípio ativo, o que pode melhorar a eficácia do fármaco reduzindo os possíveis efeitos adversos pela passagem deste hormônio pelo trato intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

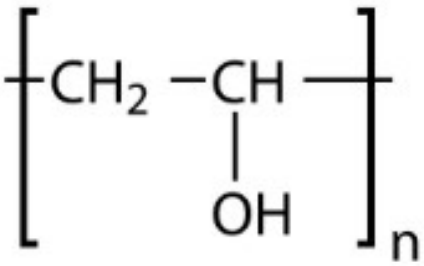
Os materiais utilizados no preparo das membranas foram:

Nanocelulose obtida por hidrólise ácida da celulose do línter de algodão, álcool polivinílico (Dinâmica®, Lote 94332), vitamina D3 (Fagron® (Fabr/Orig: Zhejiang Garden Biochemical High-Tech, lote C20170603A-5), glicerina líquida (Synth®), tensoativo *tween 80* (Dinâmica®) e água ultrapura (resistividade < 18,3 MΩ /cm).

3.1.1. Álcool Polivinílico (PVAL)

A Figura 8 ilustra a estrutura química do PVAL, $(C_2H_4O)n$, este é um polímero sintético hidrossolúvel devido à presença de grupos hidroxila (-OH) ligados à sua molécula. É um tensoativo não iônico empregado em formulações cosméticas como estabilizante, para aumentar a viscosidade das formulações e como lubrificante. Também se aplica para fórmulas geleificadas com secagem rápida após aplicação na pele formando uma película plástica hidrossolúvel denominada máscara plástica na concentração usual de 5 a 12% (SWEETMAN et al., 2008).

Figura 8 - Estrutura química do PVAL.



Fonte:https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/polyvinyl-alcohol-polymer-chemical-structure. Onde n é número de monômeros que constituem o polímero.

Utilizado como agente de permeação cutânea, provavelmente pela interação deste polímero com o estrato córneo da pele, possui ação como carreador de princípios ativos. O PVAL surge como uma substância com alto potencial para a

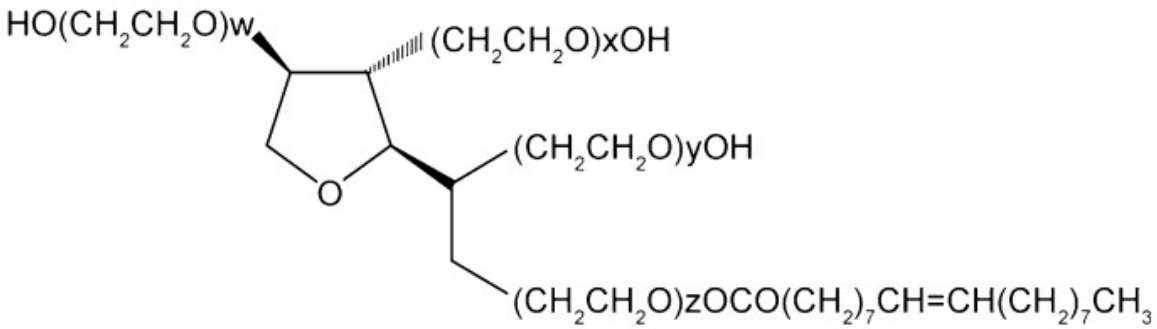
liberação de fármacos, uma vez que pode auxiliar na liberação de compostos na epiderme (VIEIRA, 2015).

Para a etapa de síntese das membranas foi preparado uma solução a 5% de PVAL, pesando 10g do pó químico e solubilizando em 190 mL de água ultra pura. Esta solução foi aquecida a 80°C sobre agitação constante em agitador magnético (Ethik®) durante 90 minutos até a completa solubilização do PVAL. Por meio deste procedimento obteve-se uma solução límpida e cristalina.

3.1.2. Tensoativo Polissorbato 80 (*Tween* 80)

A Figura 9 ilustra a estrutura molecular do tensoativo polissorbato 80, $C_{64}H_{124}O_{26}$. O *tween* 80 é um surfactante sintético composto por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano. Os surfactantes são produtos capazes de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água (GRIPPA, 2010).

Figura 9 - Estrutura molecular do Tween 80.



Fonte: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=TWEEN%C2%AE+80&interface

Vários sistemas de liberação de fármacos exigem propriedades surfactantes, devido ao caráter lipofílico e hidrofóbico de seus constituintes na membrana, os mais amplamente recomendados são os surfactantes não-iônicos com um balanço hidrofílico-lipofílico relativamente alto (GURSOY; BENITA, 2004)

Estudos anteriores de citotoxicidade revelaram que o surfactante não-iônico, como o *tween* 80, tem menor efeito tóxico que os catiônicos, aniônicos e anfóteros. Devido às suas propriedades menos citotóxicas, este surfactante foi selecionado para este estudo. Usando uma concentração adequada de surfactante a liberação cumulativa e a taxa de liberação da droga podem ser controladas (GUNATHILAKE, 2018).

Na etapa de síntese da membrana foi acrescido o *tween* 80, uma vez que a NC tem características hidrofílicas e a VITD3 possui caráter lipofílico. Este tensoativo foi adicionado para promover a solubilização do componente ativo e diminuir a tensão superficial da mistura.

3.1.3. Nanocelulose

A extração da NC foi feita por hidrólise ácida da celulose do línter de algodão com ácido sulfúrico (64% m/m) na proporção de 1:10 (polpa (g):ácido (mL), na temperatura de 60ºC e tempo de hidrólise de 30 minutos. Após esta etapa foi realizada a diálise da solução obtida com uma membrana da servapor de 21 mm de diâmetro (SOUZA, 2019). A determinação da dimensão da nanocelulose obtida foi feita por meio de microscopia eletrônica de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG).

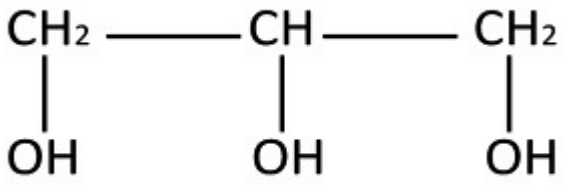
3.1.4. Vitamina D3

A VITD3 é um pó cristalino, esbranquiçado, com concentração inicial de 40.000.000 UI g^{-1}. A quantidade de vitamina D3 é comumente apresentada em duas unidades: i) microgramas (µg) ou ii) unidades internacionais (UI). Um micrograma é igual a 40 UI de VITD3. Devido a esta elevada concentração foi feita uma pré-diluição 1:50 (m/m). Foi pesado 1,0 g de VITD3, a qual foi solubilizada em 49,0 g de álcool etílico absoluto. Sabendo-se que cada grama do pó puro possui 40.000.000 UI de VITD3, obteve-se assim uma solução cuja concentração é de 800.000 UI (m/m) por grama de solução.

3.1.5. Glicerina:

A glicerina ou glicerol, fórmula molecular $C_3H_8O_3$, (Figura 10), pode ser usado como solvente, umectante, plastificante, emoliente e veículo na liberação de fármacos. É miscível em água e álcool, como solvente da VITD3 é comparada ao álcool e tem propriedades preservantes (LUBI; SATO; GAENSLY, 2003).

Figura 10 - Estrutura química da glicerina



Fonte: http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Glycerol-850-0

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese das membranas

Conforme a Tabela 2, foram produzidas neste estudo três tipos de membranas. Sendo duas membranas contendo VITD3 em concentrações diferentes e uma membrana controle sem a adição do princípio ativo. No primeiro caso, foi produzida uma membrana com uma concentração de 8.000 UI mL^{-1} de VITD3, denominada membrana nanovit. No segundo caso, foi produzida uma membrana com 40.000 UI mL^{-1} de VITD3, devido à concentração elevada de vitamina essa membrana foi denominada nanovit super. Na membrana denominada controle foi adicionado glicerina sem a adição do fármaco.

Foi utilizada a glicerina líquida como agente solubilizante da VITD3 e como agente plastificante da mistura para potencializar a formação da membrana. Para a síntese das membranas com o princípio ativo foram preparadas duas soluções de glicerina líquida com diferentes concentrações desta vitamina. Na primeira foi pesado 1,0 g de solução diluída 1:50 de VITD3 em álcool etílico absoluto e acrescentado a 30 ml de glicerina líquida (v/v). Tendo assim 800.000 UI de vitamina nesta solução. Na segunda foi pesado 5,0 g de solução diluída 1:50 de VITD3 em álcool etílico absoluto

e acrescentado a 30 ml de glicerina líquida (v/v). Tendo assim 4.000.000 UI de vitamina nesta solução.

Para a pesagem dos compostos foi utilizada balança analítica Marte/Shimadzu®, com precisão de 0,0001g, modelo AW 220.

Tabela 2 - Composição das membranas.

Membranas	**Nanocelulose (mL)**	**PVAL 5% (mL)**	**Glicerina (mL)**	***Tween* 80 (mL)**	**Vitamina D3 (UI mL^{-1})**
Membrana nanovit	15	50	30	5	8.000
Membrana nanovit super	15	50	30	5	40.000
Membrana Controle	15	50	30	5	Sem adição

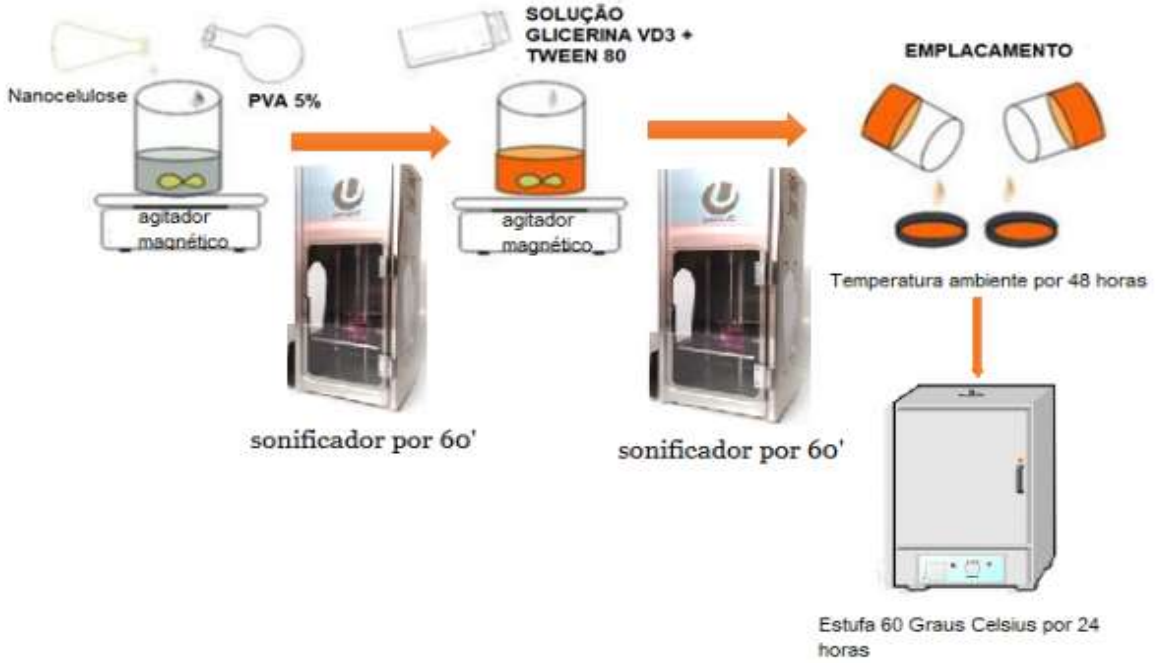
Fonte: o autor.

Como esquematiza a Figura 11, os componentes foram processados segundo a técnica de "*casting*", que consiste na preparação de uma solução com capacidade de formar membranas, segundo a metodologia de Fakhouri et al. (2007).

Foi medido 15 mL de nanocelulose e adicionado à 50 mL de solução a 5% de PVAL. Esta solução foi submetida a sonificação por 60 min para uma completa dissolução da nanocelulose, em um sonicador ultrassônico, Ultronique®, Ecosonics, com potência de 500 W, frequência de 20 khz e macroponta de titânio com 13 mm de diâmetro. Após estes procedimentos, a solução de PVAL e de NC foram misturadas

as soluções de glicerina com diferentes concentrações de VITD3. Após estas etapas foi acrescentado em todas as soluções o emulsificante *tween* 80, como agente tensoativo. Então foi realizada a sonicação desta solução por 60 minutos. As soluções foram colocadas em placas de petri e deixadas a temperatura ambiente para evaporação por 48 horas. Em seguida foram deixadas em estufa por mais 24 horas a 60°C.

Figura 11 - Ilustração da técnica utilizada para a produção da membrana de nanocelulose acrescidos do componente ativo vitamina D3.



Fonte**:** o autor.

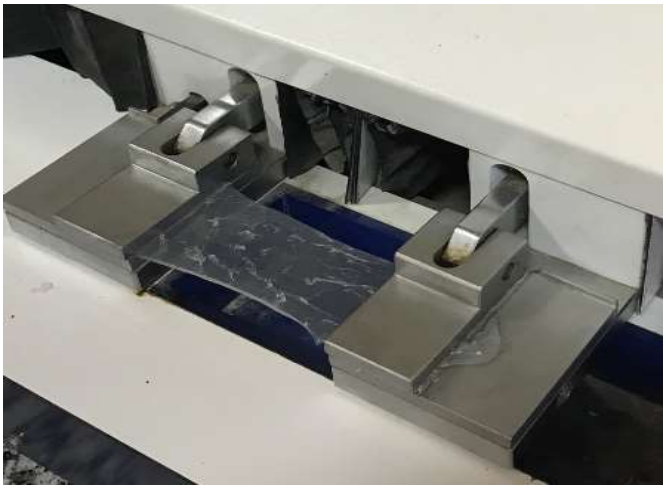
3.2.2. Caracterização física da membrana

Os seguintes parâmetros foram considerados na avaliação das características físicas das membranas: massa, espessura, diâmetro, elasticidade e flexibilidade. As membranas foram divididas em dois grupos: i) Membranas controle, sem adição da vitamina D3. ii) Membranas nanovit, com adição da VITD3.

Foram realizados os testes mecânicos de tração no equipamento Dinamômetro, Qualitylabor®. Os ensaios de tração foram realizados para determinar

o alongamento e a resistência das membranas antes e após a incorporação da vitamina D3. As membranas foram confeccionadas e tiveram suas extremidades presas pelas cargas de tração, ao acionar o equipamento, o corpo da membrana se deforma até a ruptura, determinando assim o alongamento do material e a força necessária para o rompimento da membrana (Figura 12).

Figura 12 - Teste mecânico de tração e alongamento das membranas de nanocelulose



Fonte: o autor.

O módulo de elasticidade, também chamado de módulo de Young, refere-se à capacidade do material em resistir ao alongamento, foi calculado utilizando-se da Equação 1:

$$Y = \frac{F/A}{\Delta l/l_0} = \frac{F \cdot l_0}{A \cdot \Delta l} \quad (1)$$

Em que:

F= força de tração (N)

A = área transversal do corpo de prova (mm²)

$\Delta \ell$= e o alongamento sofrido (mm)

ℓ_0 = é o comprimento do corpo não tracionado (mm)

Para a determinação da área transversal foi padronizado um corpo de prova das membranas com 60 mm de comprimento, 20 mm de largura e 4 mm de espessura. Estas medidas seguiram as especificações do dinamômetro para a realização do teste. Portanto, foi padronizado um corpo de prova com 80 mm² de área transversal (largura x espessura). A temperatura durante a realização dos testes foi de aproximadamente 26ºC. Os cálculos de tensão (força/área) e deformação específica (deformação/comprimento da membrana) foram determinados manualmente a partir da Equação 1.

O teste de resistência ao rasgo foi realizado no equipamento Digital Elmendorf Tear Tester, modelo 53984 FRANK®. O aparelho opera por meio de um pêndulo com cargas definidas para determinar a força (Kgf) requerida de forma a avaliar a resistência de materiais ao rasgo. Foi confeccionado um corpo de prova, da membrana controle e nanovit, com 100 mm de comprimento, 60 mm de largura e 4 mm de espessura.

O teste de esmagadura foi realizado para medir a resistência (KN/m) à compressão das membranas no equipamento SCT - Short Compression Tester, modelo 18510 FRANK®. A amostra é colocada nos grampos abertos e pressionando o botão iniciar as braçadeiras fecham e se movem junto com uma velocidade de 3 +/- 0,1 mm / min. Foi padronizado um corpo de prova com 60 mm de comprimento, 20 mm de largura e 4 mm de espessura.

Os testes de tração, resistência ao rasgo e esmagadura foram realizados na membrana controle e membrana nanovit. Os testes foram realizados em triplicata, extraídos as médias e o desvio padrão. A temperatura durante a realização dos testes foi de aproximadamente 26ºC.

3.2.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FT-IR)

O FT-IR define-se como uma das técnicas qualitativas para identificação de compostos químicos desconhecidos mais utilizada atualmente, ela tem um baixo custo operacional, as análises podem ser realizadas de forma rápida e simples e pouco resíduo é gerado após a sua aplicação. Esta técnica consiste em observar as bandas geradas e relacionar cada número de onda resultante com modos vibracionais de grupos funcionais ou ligações entre átomos específicos (STUART, 2004).

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma das mais importantes técnicas para a caracterização de polímeros, em termos de identificação e determinação de características estruturais, principalmente no que se refere a grupos funcionais e de ligações químicas entre as moléculas presentes na amostra. Desta forma foram realizadas análises de FT-IR de todos os componentes da membrana de forma individualizada, sendo também realizada a leitura da membrana de nanocelulose com e sem o componente ativo. As determinações foram realizadas no Equipamento FT-IR Bruker-Tensor 27®. Os espectros foram obtidos das membranas preparadas após a secagem das amostras. Foi utilizado o módulo de espectroscopia de reflexão totalmente atenuada, na região 350-4000 cm^{-1}. Cada espectro foi obtido acumulando 32 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1}.

3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG) permite obtenção de imagens detalhadas da morfologia dos materiais com resolução de até 1 nm e determinação do tamanho de partículas de dimensão mínima de 10 nm. Com a técnica de MEV-FEG é possível obter imagens de topografia utilizando elétrons secundários, estudar a porosidade, defeitos, contaminações, granulometria e morfologia dos materiais.

Para a obtenção das imagens foi utilizado o Microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) Marca JEOL, modelo JSM-7500F. Foram realizadas análises de 4 materiais distintos: i) das superfícies da membrana controle e ii) membranas nanovit, iii) da superfície da membrana nanovit após esta ser submetida ao processo de liberação da vitamina D3 em solução receptora de

álcool etílico absoluto, iv) a determinação da dimensão da nanocelulose obtida do línter de algodão.

As amostras foram previamente desidratas e montadas diretamente em *stubs* e metalizadas em equipamento de metalização BAL-TEC® coating system (modelo SCD-50). Foi necessário realizar um revestimento das amostras com carbono à vácuo. A distância entre o alvo e a amostra foi mantida em 50 mm para todos os depósitos de carbono. Durante a deposição, o vácuo foi mantido a $2x10^{-1}$ mbar. Uma camada condutora de carbono é geralmente necessária para reduzir o efeito da carga elétrica na superfície causada pela interação entre o feixe de elétrons e a amostra, o que pode resultar em distorção da imagem (BARRETO; TITA; ORLANDI, 2019).

3.2.5. Estudos de liberação do fármaco

A quantificação da VITD3 liberada nos estudos de liberação foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando-se do equipamento SPECORD 50®; espectrofotômetro de feixe único com detector para medição na faixa de 190 a 1100 nm, com lâmpadas de deutério (UV) e de halogênio (Vis). Para as leituras de absorbância foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm. Embora a farmacopeia americana em seus últimos estudos recomende a utilização de métodos cromatográficos para a determinação direta de fármacos, os métodos por espectrofotometria ainda apresentam vantagens por serem técnicas de quantificação relativamente baratas e de determinação rápida. Desta forma o emprego de espectrofotometria passou a apresentar uma alternativa promissora desde que sua metodologia seja padronizada (SENA et al., 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Para os estudos de liberação da VITD3 foram realizados os seguintes procedimentos:

- ✓ Seleção do comprimento de onda em que a VITD3 com maior pico de absorbância óptica.
- ✓ Confecção da curva padrão de calibração da resposta óptica da VITD3. Sendo realizadas diluições seriadas do princípio ativo, para isto foi escolhido como

solvente o álcool etílico absoluto. A curva foi realizada empregando padrões na faixa linear de 0 a 8.000 UI mL^{-1} de VITD3.

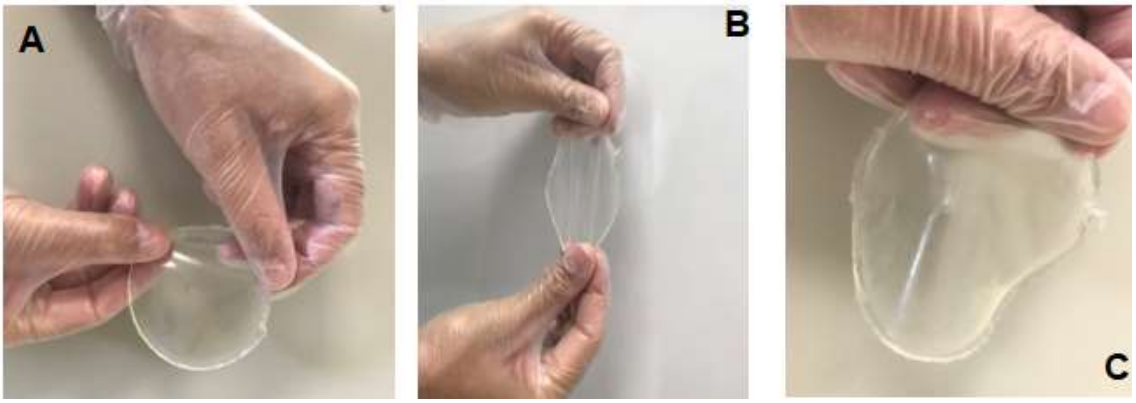
- ✓ Escolha do líquido receptor para avaliar a liberação da VITD3: Foram escolhidos dois líquidos receptores para liberação da VITD3: i) solução contendo uma mistura de álcool etílico absoluto 50% e tampão fosfato-alcalino 50% (v/v) e ii) solução contendo apenas álcool etílico absoluto.
- ✓ Leitura dos picos de absorbância dos reagentes utilizados na manipulação das membranas.
- ✓ Liberação do princípio ativo no líquido receptor e confecção da curva de liberação da VITD3 em função do tempo. A liberação da VITD3 foi realizada em um béquer contendo 200 ml dos líquidos receptores, as membranas foram colocadas no seu interior e alíquotas da imersão de 5 ml de solução foram retiradas após decorridos 5, 15, 30, 45 e 60 min. Foi realizada a leitura das amostras por espectrofotometria UV-Vis e determinada a concentração de VITD3 liberada em função do tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização e dimensões das membranas

O primeiro passo após as etapas de secagem em estufa e síntese das membranas foi a avaliação dos aspectos gerais e visuais das membranas. A Figura 13 ilustra o aspecto físico, avaliado visualmente, das membranas em especial a espessura, elasticidade e flexibilidade. Percebe-se que a membrana apresentou pouca transparência e coloração branca opalescente.

Figura 13 - Aspectos gerais e caracterização visual da membrana de nanocelulose.



Fonte**:** o autor.

O segundo passo foi avaliar o peso, a espessura e o diâmetro das membranas de NC após as etapas de secagem. A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados nas membranas controle e na membrana nanovit.

Tabela 3 - Características encontradas nas membranas controle e nanovit.

Membrana	Massa (g)	Espessura (mm)	Diâmetro (mm)
controle	11,30 ± 1,25	3,55 ± 0,26	91,5 ± 1,29
nanovit	12,095 ± 1,27	3,75 ± 0,35	93 ± 1,41

Fonte: o autor.

Os resultados encontrados na Tabela 3 demonstram que a membrana controle e a membrana nanovit apresentaram características físicas muito semelhantes, não apresentaram variações significativas na sua massa, espessura e diâmetro após as etapas de secagem, dentro dos desvios padrões.

As membranas nanovit e nanovit super apresentaram maior oleosidade na superfície em relação a membrana controle, isto se deve a característica lipofílica da VITD3.

4.1.1. Testes mecânicos de tração

Na Tabela 4, são apresentados os resultados dos testes mecânicos de tração e alongamento sofrido pelas membranas controle e membrana nanovit, o módulo de Young, a deformação específica e a força necessária para a ruptura das membranas.

Tabela 4 - Valores médios dos resultados do módulo de Young, deformação específica, força e alongamento.

Membrana	Força (N)	ℓ_0 (mm)	$\Delta \ell$ (mm)	ℓ f (mm)	Área (mm^2)	Tensão (N/ mm^2) (MPa)	Deformação Específica (%)	Módulo de Young (MPa)
Nanovit	23,7 ± 2,68	60	40,8 ±2,76	98,8 ±2,77	80	0,29±0,04	64,7±4,66	0,46± 0,02
Controle	13,9 ±0,98	60	27,1 ±1,87	85,7 ±1,87	80	0,17±0,17	42,9±3,18	0,40± 0,05

Fonte**:** o autor. Legenda: $\ell 0$- comprimento do corpo de prova não tracionado, $\Delta \ell$ – alongamento sofrido, ℓ comprimento final do corpo de prova após ser tracionado.

A análise dos dados dos testes de tração sugerem que a composição química das membranas influencia no alongamento e em especial a presença de VITD3 leva a um aumento da elasticidade do material. Nota-se na Tabela 4, que a membrana nanovit apresentaram valores de alongamento 40,8 mm com desvio padrão de 2,76, superior a membrana controle com 27,1 mm com desvio padrão de 1,87.

O módulo de Young, indica a rigidez intrínseca do material. Nota-se na membrana nanovit um valor médio de 0,46 MPa, com desvio padrão de 0,02, enquanto o módulo de Young da membrana controle foi em média de 0,40 MPa, com desvio padrão de 0,05. Quanto maior o módulo de Young, maior será resistência à deformação do material. Analisando dados da literatura, estudos realizados por Cinman (2014) e Drago (2014) obtiveram resultados similares em membranas de látex impregnadas com medicamentos, com resultados de módulos de Young 0,86 MPa e 0,63 MPa, respectivamente.

Foi observado na Tabela 4, uma maior porcentagem de deformação do material rico em VITD3, em média 64,7%. Uma vez empregada uma tensão sobre o material este se deformou plasticamente, não retornando a sua forma original. Os polímeros, como as membranas de celulose, apresentam um comportamento

intermediário entre os materiais com características elásticas e os líquidos com viscosidade alta (HERCULANO, 2014).

Os testes mecânicos aos quais as amostras foram submetidas revelaram em hipótese, que o fármaco adicionado a matriz polimérica da membrana nanovit pode influenciar na resistência e na deformação específica do material em relação a membrana controle. A VITD3 agregada ao “bulk” da membrana pode proporcionar teoricamente um aumento das ligações cruzadas, um aumento na interação dentre as cadeias por forças de van der Walls e pontes de hidrogênio, formando uma rede tridimensional no interior do material (SILVA, 2016).

A formação de ligações cruzadas tem um grande efeito nas propriedades mecânicas dos materiais poliméricos. Na tecnologia de liberação controlada, é muito importante que as características mecânicas dos materiais sejam bem conhecidas, pois a força das ligações entre os componentes presentes nas membranas influencia nos sistemas de liberação local de fármacos. Matrizes com ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros permitem que as membranas absorvam mais água sem se dissolver e desta forma aderir a superfícies de aplicação, permitindo assim prolongar os períodos de liberação de drogas (COELHO, 2012).

4.1.2. Teste de compressão e resistência ao rasgo

Nos testes de resistência à compressão é determinada a força, a uma velocidade de deformação constante, necessária para comprimir ou romper um material colocado entre duas placas paralelas controladas. Observa-se na Tabela 5 que as membranas nanovit, apresentaram maiores valores de resistência a compressão do que as membranas controle. No teste de resistência ao rasgo, onde se determina a força necessária para romper a membrana percebe-se que as membranas ricas em VITD3 possuem uma maior resistência.

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão dos dados dos testes de esmagadura e resistência ao rasgo.

Membrana	Teste de Esmagadura (kN/m)	Teste de Resistencia ao Rasgo (Kgf)
Nanovit	3,16 ± 0,10	15,2 ± 0,66
Controle	3,02 ± 0,10	11,5 ± 1,50

Fonte: o autor.

Analisando as características mecânicas encontradas nas membranas pode-se afirmar que a adição do componente ativo VITD3 proporcionou um incremento na resistência mecânica da membrana nanovit. Como é apresentado nas Tabelas 4 e 5, houve aumento dos valores dos testes tração, módulo de Young (elasticidade), percentual de deformação, esmagadura e teste ao rasgo em comparação com as membranas controle, sem adição do fármaco.

Machado et al. (2014) relataram módulos de Young em membranas biodegradáveis de fibras de cocos branqueadas da ordem de 3 MPa em compósitos contendo 30% de fibras. Membranas de látex apresentam módulos de Young entre 0,76 e 4,14 MPa (CALLISTER; RETHWISCH, 2012; HERCULANO; 2010). Ao comparar os valores biomecânicos da pele excisada em tensão, há uma grande variabilidade entre diferentes estudos, variando entre 2.9 e 150 MPa (GRIFFIN et al., 2016). Membranas de nanocelulose bacteriana utilizadas como curativo de pele em pacientes com queimaduras extensas apresentaram módulos de Young de 4,5 MPa (FU; ZHANG; YANG, 2013). Segundo Zanela et al. (2018) para materiais com PVAL o módulo de Young variou de 1,0 a 2,6 MPa, o alongamento na ruptura varia de 42 a 421%., sendo diretamente influenciado pela concentração do polímero e pela temperatura.

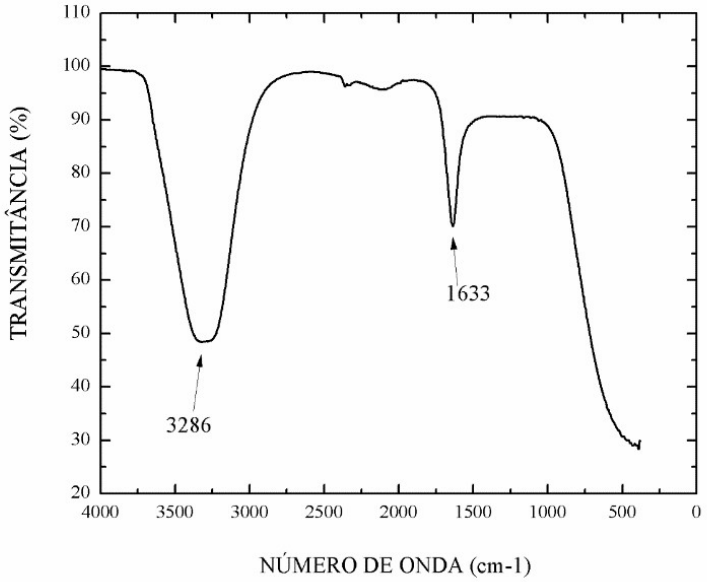
Desta forma é possível afirmar que as membranas sintetizadas possuem resistência suficiente para aplicação biomédica como curativos ou aplicação sobre a pele. Como observa-se na Tabela 4, os valores do módulo de elasticidade apresentaram valores médios na faixa de 0,46 MPa. Os testes de esmagadura e resistência ao rasgo foram realizados para simples comparação entre as membranas

produzidas, comprovando assim que o acréscimo do fármaco proporcionou um aumento da resistência na membrana.

4.2. Caracterização por FT-IR dos componentes e das membranas.

A análise de FT-IR permite detectar possíveis modificações das propriedades físico-químicas e interações entre os componentes do material. Desta forma foram obtidos espectros de todos os componentes utilizados na síntese do material de forma individualizada e das membranas controle e da membrana nanovit. A Figura 14 apresenta as bandas do espectro infravermelho da NC obtida por hidrólise ácida do línter de algodão.

Figura 14 - Espectro no FT-IR da nanocelulose.

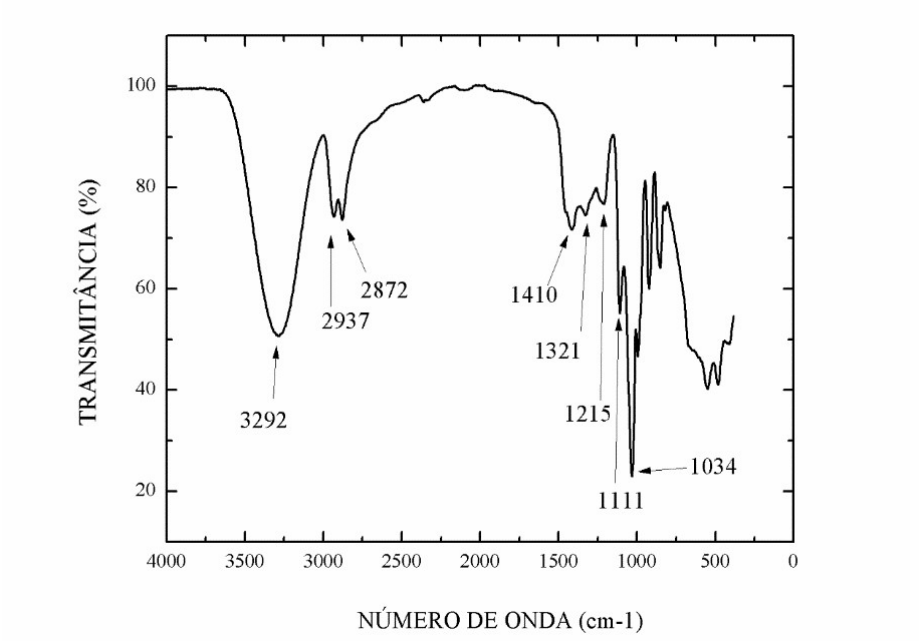


Fonte: o autor.

O espectro de FTIR mostrou duas principais regiões de absorção, uma na região de baixo comprimento de onda (800-1800 cm^{-1}) e o outra na região de maior comprimento de onda (2700-3800 cm^{-1}). A presença da banda em 1633 cm^{-1} é característica da lignina e celulose, sendo atribuída às ligações de hidrogênio intramoleculares da lignina e vibrações C-H e C-O dos anéis polissacarídeos de celulose. As ligações de alongamento de -OH são observadas em 3286 cm^{-1} (WANG et al., 2014; NASCIMENTO, 2018)

A Figura 15 mostra os espectros de FT-IR da glicerina. O espectro apresenta picos característicos de grupos funcionais encontrados na estrutura molecular deste composto.

Figura 15 - Espectro no FT-IR da glicerina

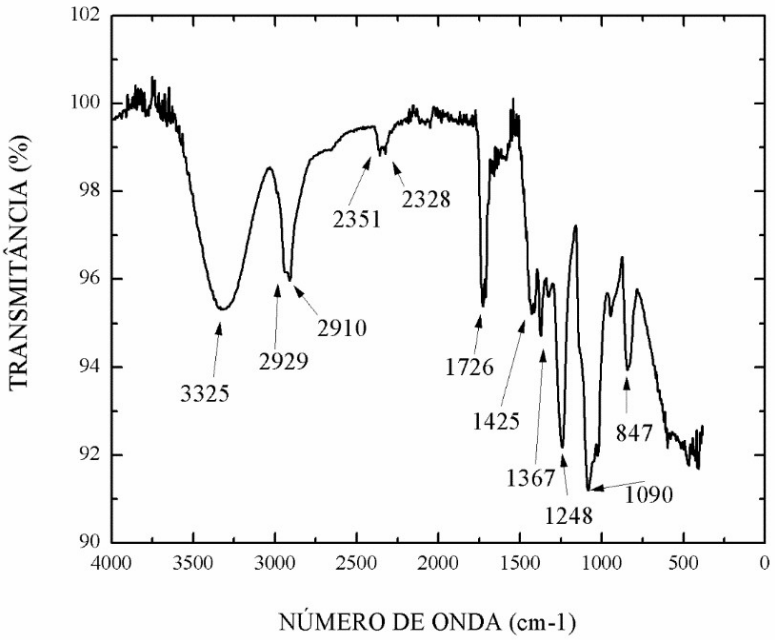


Fonte: o autor.

As vibrações obtidas na banda de 3292 cm^{-1} são atribuídas ao grupo -OH. Outra região característica que é semelhante em todos os espectros analisados da glicerina por diferentes autores é a região de vibração de 2700-3000 cm^{-1} característica de vibrações assimétricas do $-CH_2$ e $-CH_3$ em 2937 cm^{-1} e simétricas em 2872 cm^{-1}. As vibrações de estiramento axial da ligação C-O em álcoois se encontram na região de 1260-1000 cm^{-1}. Em 1410 cm^{-1} observa-se a presença da vibração característica da ligação C-O-H (JAKUBOWSKA et al., 2017; LÓPEZ-DÍAS et al., 2017).

Na Figura 16 é mostrado o espectro de FT-IR da amostra de PVAL, onde observa-se os principais picos associados a este polímero.

Figura 16 - Espectro do infravermelho do PVAL.

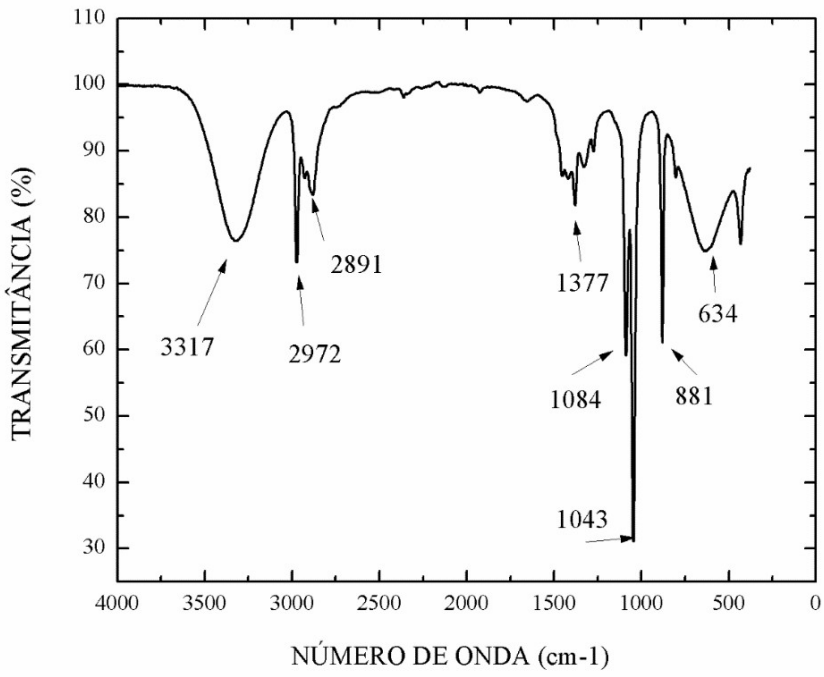


Fonte: o autor.

Pode-se observar a banda de alongamento C-H entre 2850-3000 cm^{-1} e bandas intensas de hidroxila típicas de álcool (banda de alongamento -OH em 3325 cm^{-1}). Ao redor de 1090-1425 cm^{-1} nota-se os picos associados ao grupo C-O e em 1726 cm^{-1} verifica-se uma banda que pode ser atribuída a ligação -C=O (ANICUTA et al., 2010).

A Figura 17 mostra o espectro infravermelho da vitamina D3. O espectro exibe picos caracteristicos em 3317, 2972, 2891, 1377 e 881 cm^{-1}.

Figura 17 - Espectro do infravermelho da Vitamina D3 em solução alcóolica.

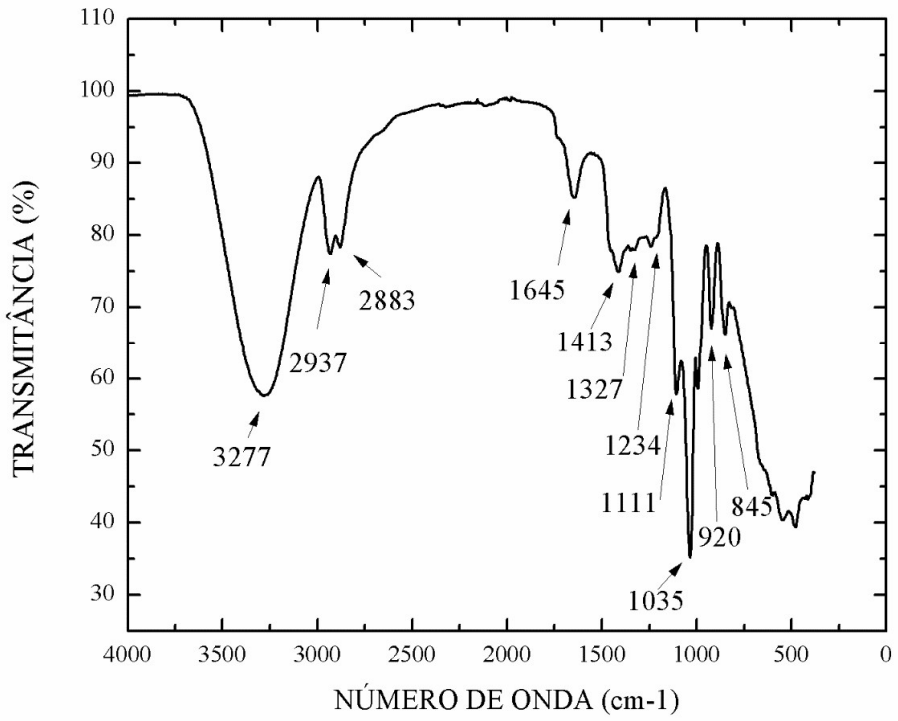


Fonte: o autor.

O pico em 3317 cm^{-1} é atribuído a ligação de hidrogênio -O-H, já as bandas em 2972 cm^{-1} e 2891 cm^{-1} correspondem a estiramentos -C-H. A banda em 1377 cm^{-1} corresponde a deformação angular em caso de dimetil geminal, em 880 cm^{-1} pode ser associado à vibração de $C=CH_2$. Em 1043 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O de álcool secundário. As bandas observadas estão com conformidade com a literatura (HEIDARI, 2016; MEDEIROS, 2013; STRATULAT et al., 2015; KOSHY; BEYER, 1984).

Os espectros de infravermelho obtidos da membrana nanovit com vitamina D3 encontram-se ilustrados na Figura 18.

Figura 18 - Espectro do infravermelho da membrana nanovit.

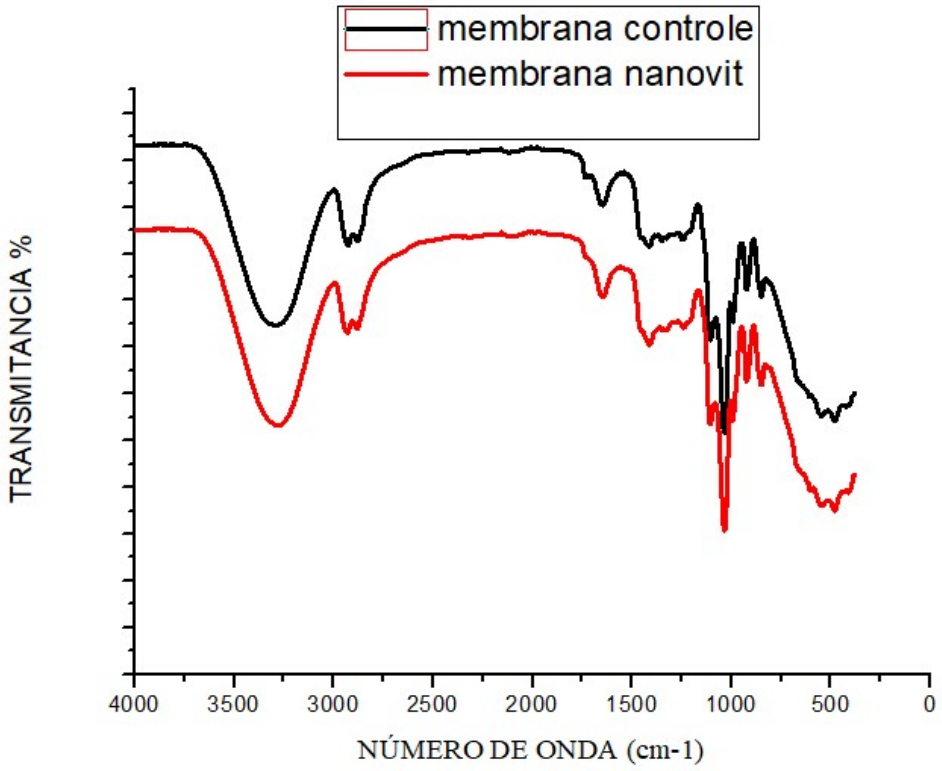


Fonte: o autor

A avaliação das bandas de vibração apresenta em 3277 cm^{-1} o grupamento -OH, em 2937 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} o alongamento C–H, em 1645 cm^{-1} o alongamento de C=C, em 1413 cm^{-1} a flexão de CH_2 e em 845 cm^{-1} a deformação angular de C=C-H (PAVIA, 2010).

A Figura 19 apresenta uma comparação entre os espectros no infravermelho por transformada de Fourier da membrana controle (sem vitamina D3) e da membrana nanovit (com vitamina D3).

Figura 19 - Espectro de absorção no FT-IR da membrana controle e membrana nanovit.



Fonte: o autor.

Ao compararmos os espectros de FT-IR da membrana controle com a membrana nanovit verifica-se que não houve alteração estrutural dos componentes das membranas. Em especial não se pode notar a formação de novas bandas e alterações espectrométricas, o que indica a ausência de *cross-linking* e formações de novas ligações na membrana. A formação de tais ligações poderiam de fato, influenciar no processo de liberação controlada da vitamina D3, (DRAGO, 2014).

Na Tabela 6 é apresentado um sumário acerca das principais bandas vibracionais identificadas nos reagentes e nas membranas controle e nanovit, pela análise de FT-IR. Foi feita a atribuição e tipo de vibração encontrados na literatura para as correspondentes bandas vibracionais (PAVIA, 2010).

Tabela 6 - Análise comparativa da posição das bandas e tipo de vibração

NC	Glic.	PVAL	VITD3	Mb Ctrl	Mb nanovit	
		Número de onda (cm^{-1})				Atribuição e tipo de vibração
3286	3292	3325	3317	3290	3277	–OH alongamento
	2937	2929	2972	2933	2937	Vibração de estiramento assimétrica de –CH3
	2872		2891	2873	2883	Vibração simétrica de alongamento de –CH2
1633				1654	1645	C=C de aromáticos
	1321	1425	1377	1346	1413	vibração da ligação -C-O-H
	1034	1090	1043	1036	1035	estiramento C-O de álcool secundário
			881		920	deformação angular de C=C-H

Fonte**:** o autor. Legendas: NC - nanocelulose, Glic - glicerina, PVAL – álcool polivinílico, VITD3 – vitamina D3, Mb Ctrl – membrana controle, Mb nanovit – membrana nanovit.

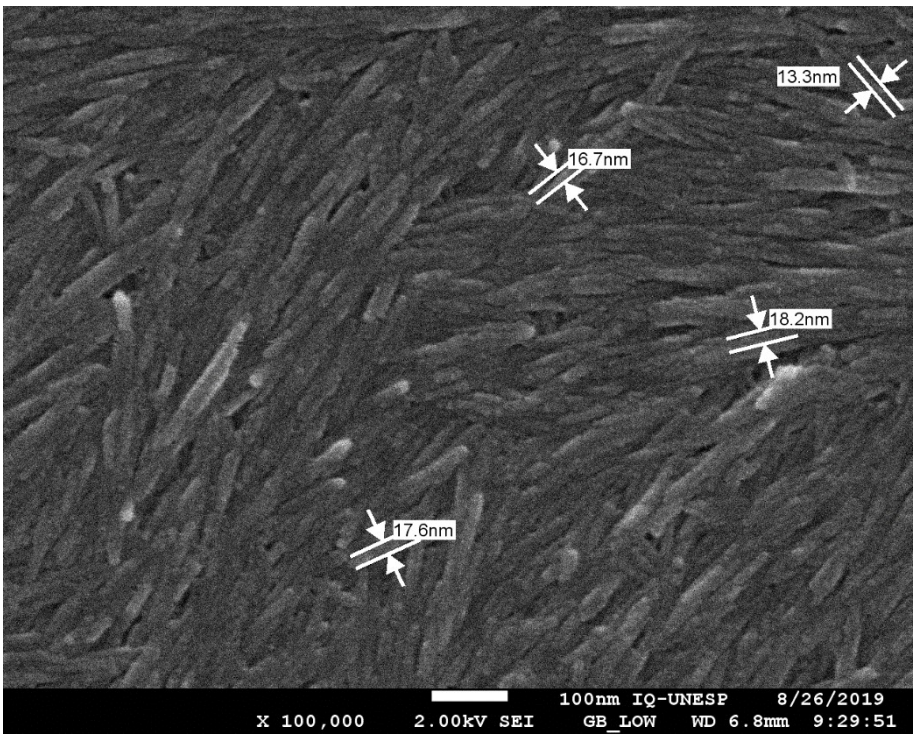
Ao analisar os dados do FT-IR, verifica-se que o alongamento -OH estão presentes em todos os componentes. Nota-se que as bandas 3286 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} da NC são observadas na membrana controle e nanovit, os estiramentos 1377 cm^{-1}, 1043 cm^{-1} e 881 cm^{-1} da VITD3 tem correspondência nas bandas encontradas na membrana nanovit.

Vale a pena ressaltar, mais uma vez, que nenhuma banda nova foi detectada pela análise por FT-IR das membranas, isto reforça a integridade do fármaco na membrana, pois seus grupamentos funcionais foram mantidos, não induz ao *cross-linking,* indicando que este sistema possui as características necessárias para funcionar como carreador deste princípio ativo

4.3. Caracterização da nanocelulose e das membranas por Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).

As análises realizadas por esta técnica permitiram a visualização da topografia das membranas e avaliação mais detalhada da superfície do material, permitindo avaliar as dimensões da NC utilizada na confecção das membranas. A Figura 20 apresenta o resultado da análise de MEV-FEG da suspensão de NC extraída por hidrólise ácida do linter de algodão; é possível observar que ao menos uma das dimensões apresenta escala nanométrica. Observa-se uma rede emaranhada de nanocristais com alto grau de orientação preferencialmente paralelas. As fibras de NC tem formato tubular e apresentam largura na faixa de 15 nm.

Figura 20 - Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) da nanocelulose com aumento de 100.000 vezes.



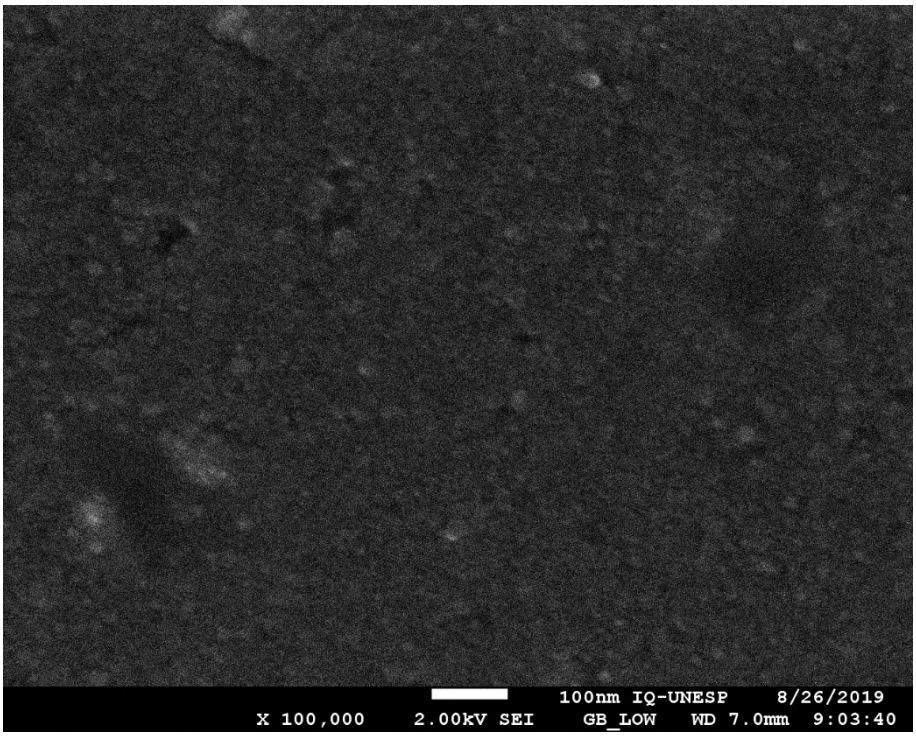
Fonte: o autor.

Segundo Damasio (2015) os nanocristais de celulose são similares a pequenos cilindros ou bastonetes, isolados a partir da hidrólise ácida das fibras. O mecanismo de obtenção da nanocelulose demonstra que a ação dos agentes de hidrólise promove a extração das regiões amorfas das fibrilas elementares de celulose. A Figura 20

demonstra que a suspensão obtida é constituída de fragmentos em forma de agulha confirmando a formação dos nanocristais de celulose.

A Figura 21 apresenta a análise de microscopia eletrônica da membrana utilizada como controle, ou seja, sem adição de VITD3.

Figura 21 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana controle, ausência de VITD3, com aumento de 100.000 vezes.

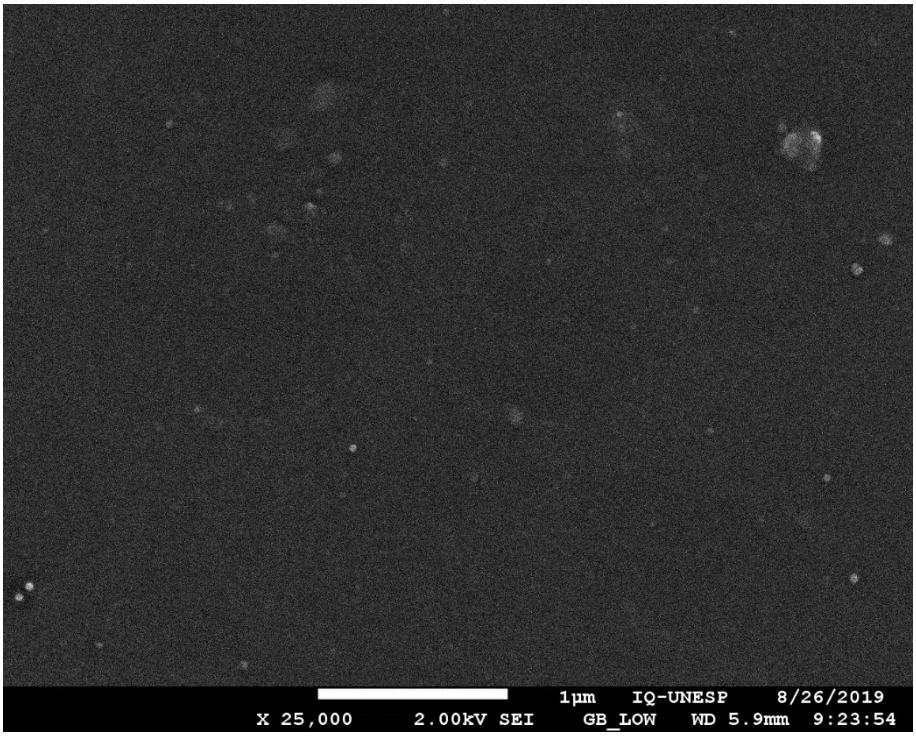


Fonte: o autor

A membrana controle apresenta continuidade, distribuição homogênea dos materiais, ausência de porosidade e leve textura superficial. Em outras palavras, não há sinais de agregação de polímeros visíveis na superfície da membrana. Esse é um aspecto muito importante para os compósitos, a fim de obter o máximo proveito da incorporação de nanopartículas em matrizes de polímeros (POONGUZHALI; BASHA; KUMARI, 2017). Estudos realizados por Luo et al. (2017), Frone et al. (2011) e Belbekhouche et al. (2011), apresentaram resultados de microscopias eletrônicas de membranas de nanocelulose com características semelhantes aos aqui apresentados em relação a topografia.

A Figura 22 apresenta a membrana nanovit com adição da VITD3, pode-se observar a presença de cristais na superfície.

Figura 22 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana nanovit com aumento de 25.000 vezes.

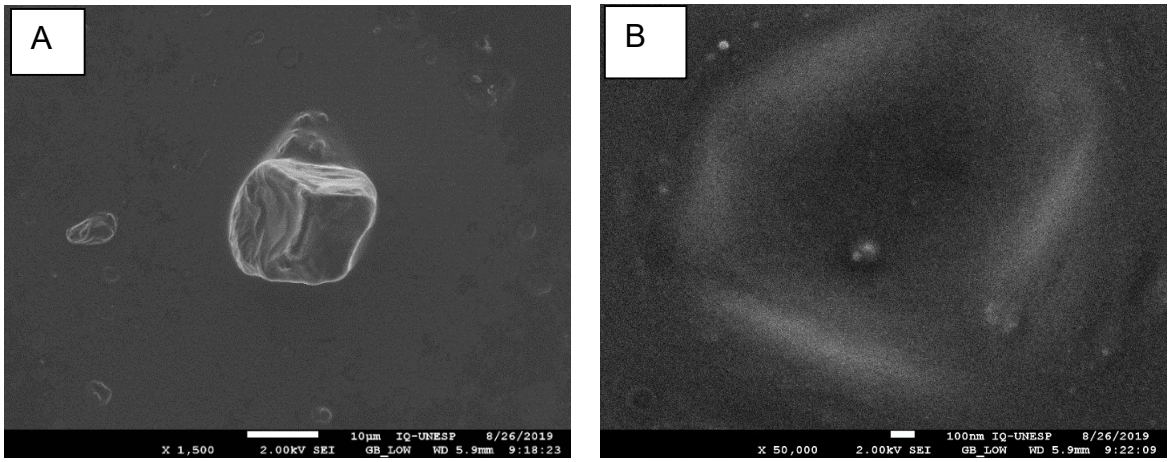


Fonte: o autor.

Esta membrana apresenta superfície lisa, homogênea e contínua, sem porosidade e possivelmente seja a presença do fármaco na superfície da membrana na forma de cristais esbranquiçados. A membrana nanovit apresentou maior oleosidade em comparação a membrana controle, sobretudo pela presença da VITD3, a qual apresenta propriedades lipofílicas, justificando a oleosidade encontrada.

A Figura 23 apresenta a análise de microscopia eletrônica na membrana nanovit, aumentada (1500 e 50.000 vezes), há presença de estruturas com aspecto oleoso semelhantes a micelas com cristais de VITD3 no seu interior.

Figura 23 - Análise de microscopia eletrônica (MEV-FEG) da membrana nanovit aumentada 1.500 vezes (A) e 50.000 vezes (B).

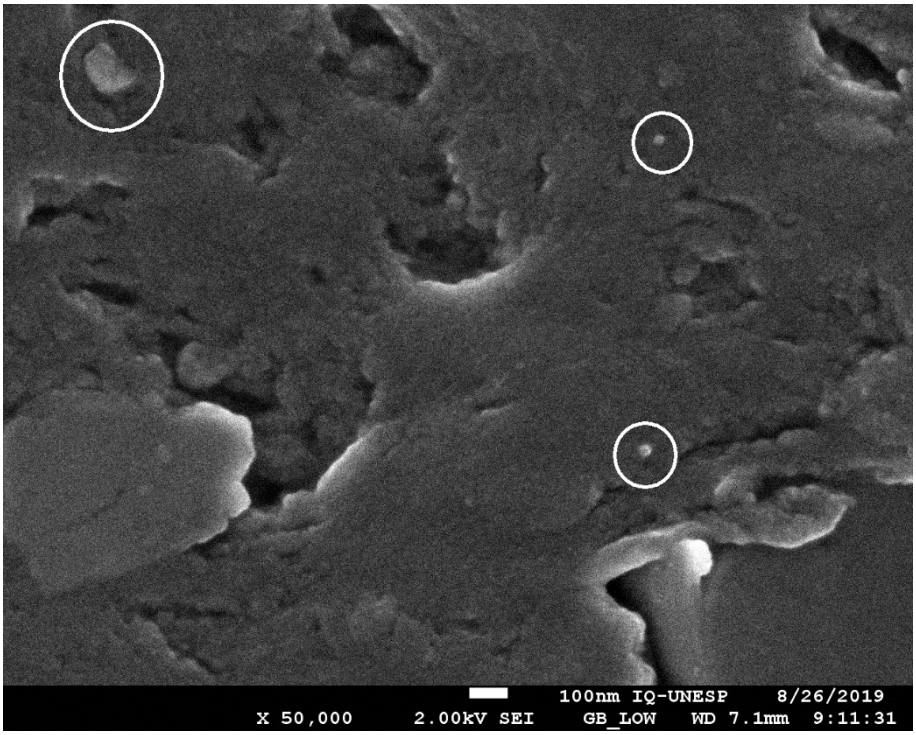


Fonte: o autor.

As imagens obtidas revelam a presença de estruturas semelhantes a micelas na membrana nanovit, isto já era esperado, visto que na composição química da membrana foi adicionado o surfactante *tween 80* para diminuir a tensão superficial entre os componentes da formulação. Este tensoativo tem como característica formar micelas em misturas óleo em água. Na Figura 23A, com aumento de 1.500 vezes, nota-se a presença de inúmeras estruturas semelhante a micelas. Já na imagem 23B em aumento de 50.000 vezes pode-se avaliar que no interior das micelas há presença de cristais, atribuídos a VITD3, visto que na membrana controle não foi observado tais estruturas. Há ausência de aglomerados na superfície da membrana o que contribui para que a matriz de NC e PVAL seja considerada um bom sistema de liberação da VITD3.

Na Figura 24 verifica-se o resultado da análise de MEV-FEG da membrana nanovit, após a membrana ser submetida à testes de liberação do fármaco em solução alcóolica.

Figura 24 - Imagem de MEV-FEG da membrana nanovit após procedimento de liberação em solução alcóolica.



Fonte: o autor

A membrana apresenta-se com superfície porosa, heterogênea e irregular após a fase de liberação da droga. Nota-se a presença de cristais de VITD3 no interior do "*bulk"* da membrana. Observa-se que a membrana apresentou alteração estrutural em comparação com a membrana controle, isto pode indicar que o processo de liberação do fármaco ocorre por erosão e não por difusão.

Como mostrados pelas análises de MEV-FEG as partículas de celulose apresentaram diâmetros menores que 100 nm, o que caracteriza o material extraído do línter de algodão como nanoestruturado. A membrana controle e membrana nanovit apresentaram características condizentes com materiais poliméricos com topografia homogênea, sem porosidade, aspecto liso, contínuo e sem aglomerados. Há uma clara diferença na textura da superfície entre a membrana controle e a membrana nanovit em relação a oleosidade superficial e a presença de micelas. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) mostraram que cristais

de VITD3 estavam presentes na superfície da membrana nanovit, o que corrobora para que este sistema tenha uma liberação rápida do fármaco.

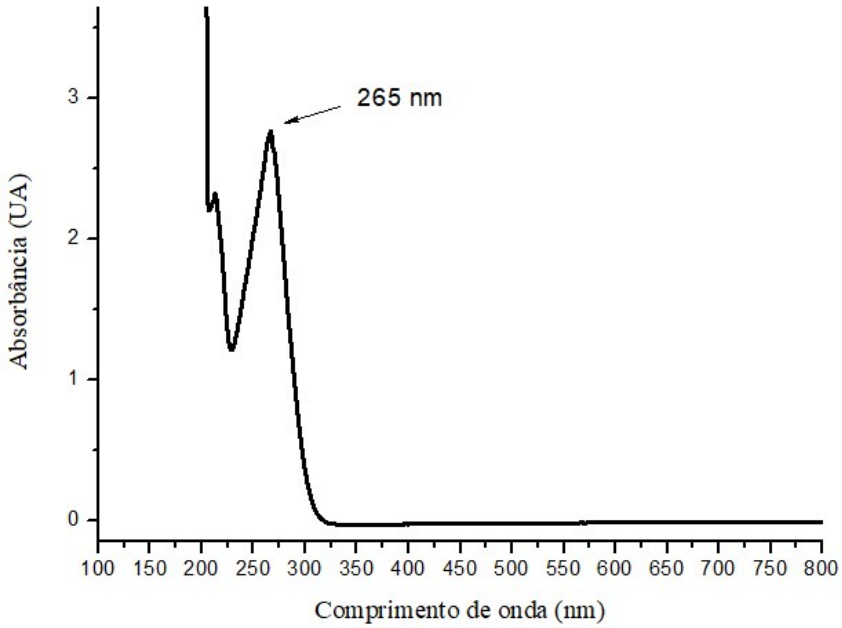
4.4. Estudo da liberação do fármaco

4.4.1. Seleção do comprimento de onda

Para a confecção da curva de calibração da resposta óptica da VITD3, em função da sua concentração em solução, foram realizadas diluições seriadas do princípio ativo. Para tanto foi escolhido como solvente o álcool etílico absoluto, devido ao caráter lipofílico da VITD3 de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010). A escolha de um solvente na espectroscopia é muito importante, um critério a ser seguido é que um bom solvente não deve absorver radiação no mesmo comprimento de onda do soluto cujo espectro está sendo analisado (PAVIA, 2010).

O espectro UV-Vis é geralmente registrado como a absorbância do material em função do comprimento de onda da luz empregada na excitação das amostras. A Figura 25 apresenta o valor máximo de absorbância encontrado em uma solução com VITD3 diluída em álcool etílico absoluto.

Figura 25 - Espectro de absorção da Vitamina D3 em solução alcóolica.



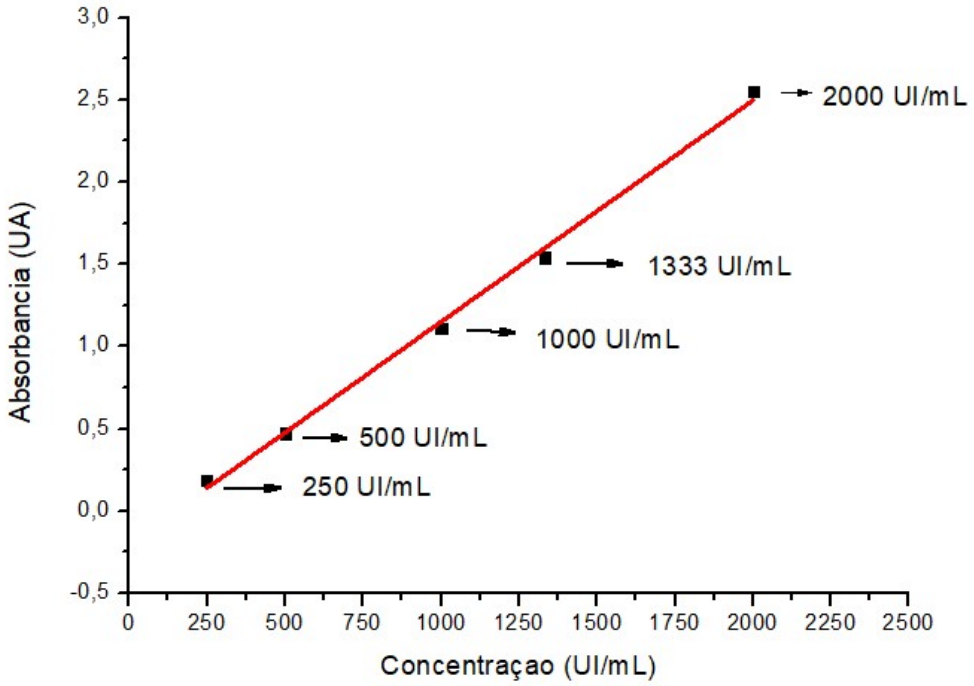
Fonte: o autor.

O princípio básico é que cada composto absorve ou transmite luz em uma certa amplitude de comprimento de onda, ou seja, a quantidade de luz absorvida ou transmitida é proporcional à concentração da substância em solução (XAVIER; DORA; BARROS, 2016). Após uma varredura entre 100 e 800 nm verifica-se um pico de absorção em 265 nm, como mostra a Figura 25. Trabalhos realizados por Medeiros (2013), Costa (2017) e Ashok e Kumar (2011) encontraram picos de absorbância da VITD3 com valores em 265 nm.

4.4.2. Curva padrão de calibração da resposta óptica da Vitamina D3.

Como observa-se na Figura 26, o gráfico da curva de calibração foi confeccionado com padrões de VITD3 entre 250 UI mL^{-1} e 2000 UI mL^{-1}.

Figura 26 - Curva de calibração da Vitamina D3 diluída em álcool etílico absoluto. Leituras realizadas em 265 nm.



Fonte: o autor.

O gráfico foi confeccionado para determinar a quantidade de fármaco liberado no estudo no líquido receptor. Observa-se na Equação 2 a equação de regressão linear obtida com um coeficiente de correlação (r) =0,996. Este valor é considerado satisfatório pela RDC 166/2017 que preconiza um valor de coeficiente de correlação acima de 0,990 (BRASIL, 2017).

$$\boxed{A_{265} = (1{,}30.10^{-3} \times C_{VTD3}) - 0{,}20} \quad (2)$$

(y) (a) (x) (b)

Onde:

(y) = A_{265} - absorbância em 265 nm

(a) = coeficiente angular = $1{,}30.10^{-3}$

(x) = concentração da VITD3 em UI mL^{-1}

(b) = coeficiente linear (b) = -0,20

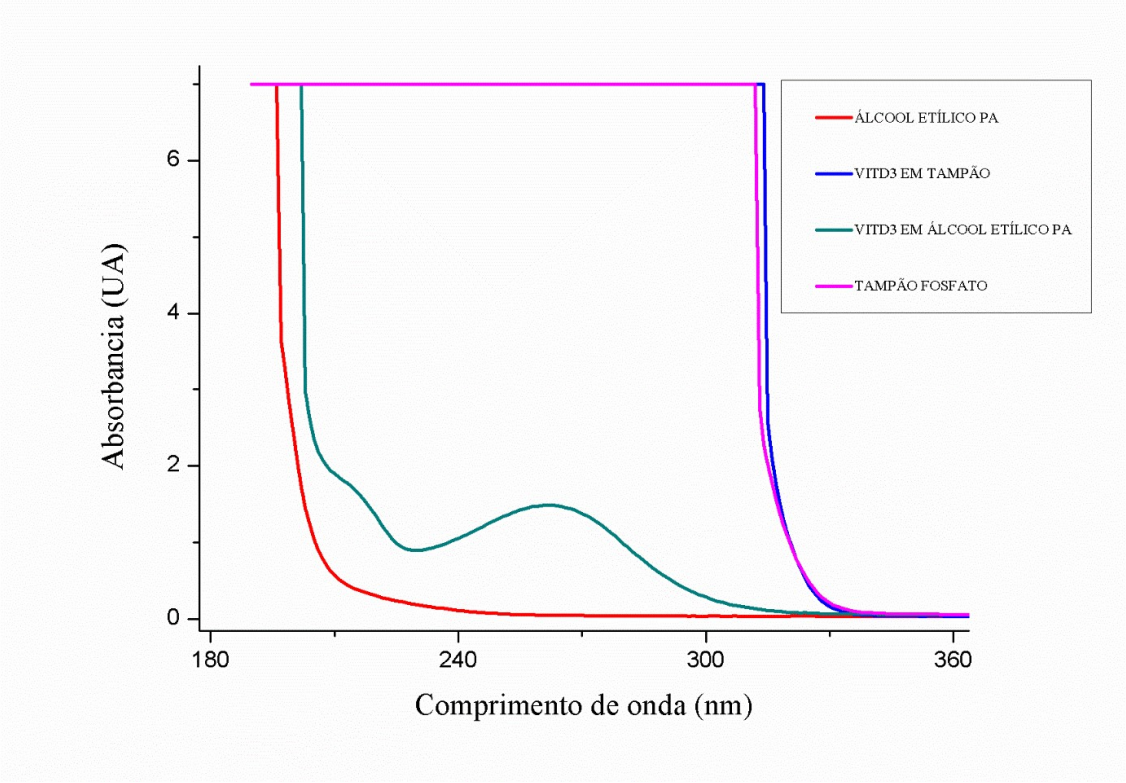
Observa-se que na metodologia empregada é possível detectar valores de concentração de VITD3 na faixa de 250 UI mL^{-1} até 2.000 UI mL^{-1}. Valores inferiores a 250 UI mL^{-1} não apresentaram leitura no espectrofotômetro UV-Vis e superiores a 2.000 UI mL^{-1} foi necessário realizar a diluição das amostras.

4.4.3. Escolha do líquido receptor para avaliar a liberação da Vitamina D3:

Como demonstra a Figura 27, o líquido receptor que apresentou melhor resposta óptica foi o álcool etílico absoluto, visto que na solução com 50% de álcool

etílico e 50% de tampão fosfato alcalino, percebe-se interferência direta na leitura espectrofotométrica, não sendo possível realizar a análise de UV-Vis destas soluções.

Figura 27 - Espectro UV-Vis dos líquidos receptores selecionados



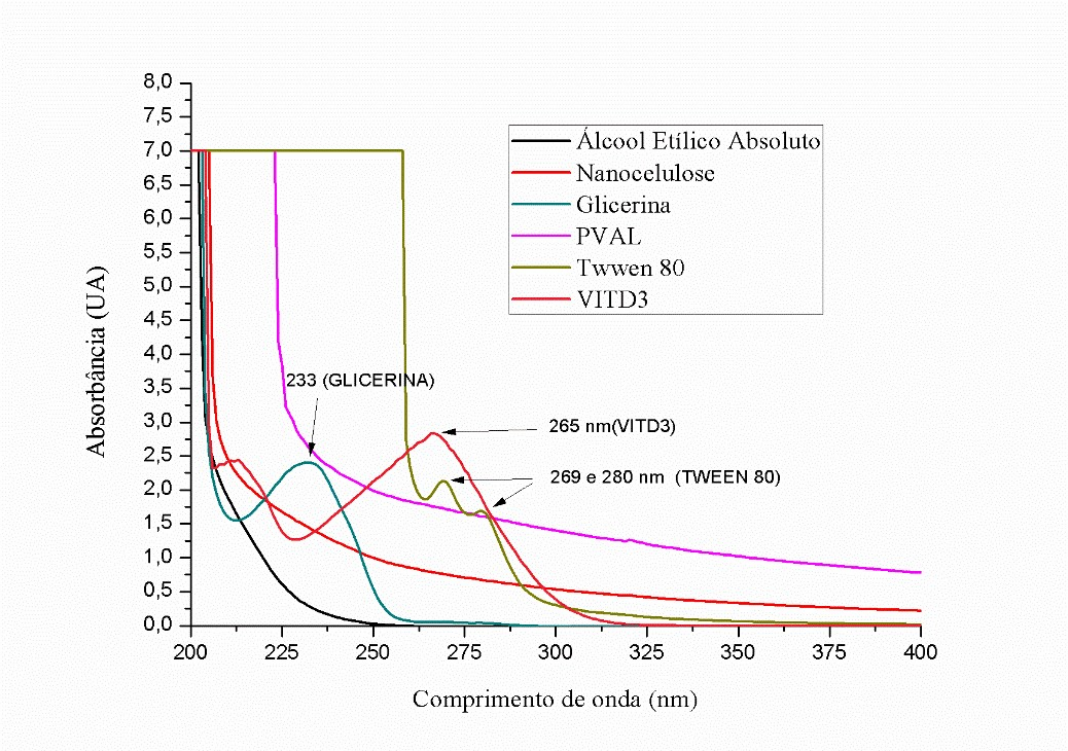
Fonte: o autor.

O álcool etílico absoluto não apresentou picos de absorbância em 265 nm, deste modo a VITD3 apresentou pico de absorbância bem evidente. Já na solução com tampão fosfato alcalino puro e na solução com VITD3 em tampão fosfato alcalino, os resultados dos espectros de absorção obtidos são largos e sobrepõem-se sobre a faixa de leitura óptica de 265 nm, não sendo possível realizar a identificação da VITD3 nesta solução. Desta forma foi padronizado neste estudo que o melhor líquido receptor para a VITD3 nas etapas seguintes de liberação seria o álcool etílico absoluto.

4.4.4. Leitura dos picos de absorbância dos reagentes

Como demonstra a Figura 28 foi realizada a espectrofotometria óptica de todos os componentes presentes na membrana.

Figura 28 - Espectro de absorção molecular UV-Vis dos constituintes da membrana



Fonte: o autor.

De modo geral é possível observar a sobreposição parcial dos espectros da VITD3 em 265 nm e do *tween* 80 com dois picos de absorção um em 269 nm e outro em 280 nm. Tal fato evidencia a necessidade de se fazer uma correção dos valores de absorbância encontrados no líquido receptor nesta região, a fim de se utilizar a equação de calibração proposta para a VITD3 (MALUF et al., 2017). Utilizando da propriedade aditiva da absorbância tem se a Equação 3:

$$\text{Abs Total} = \text{Abs (vitamina D3)} + \text{Abs (membrana controle em 265 nm)} \quad (3)$$

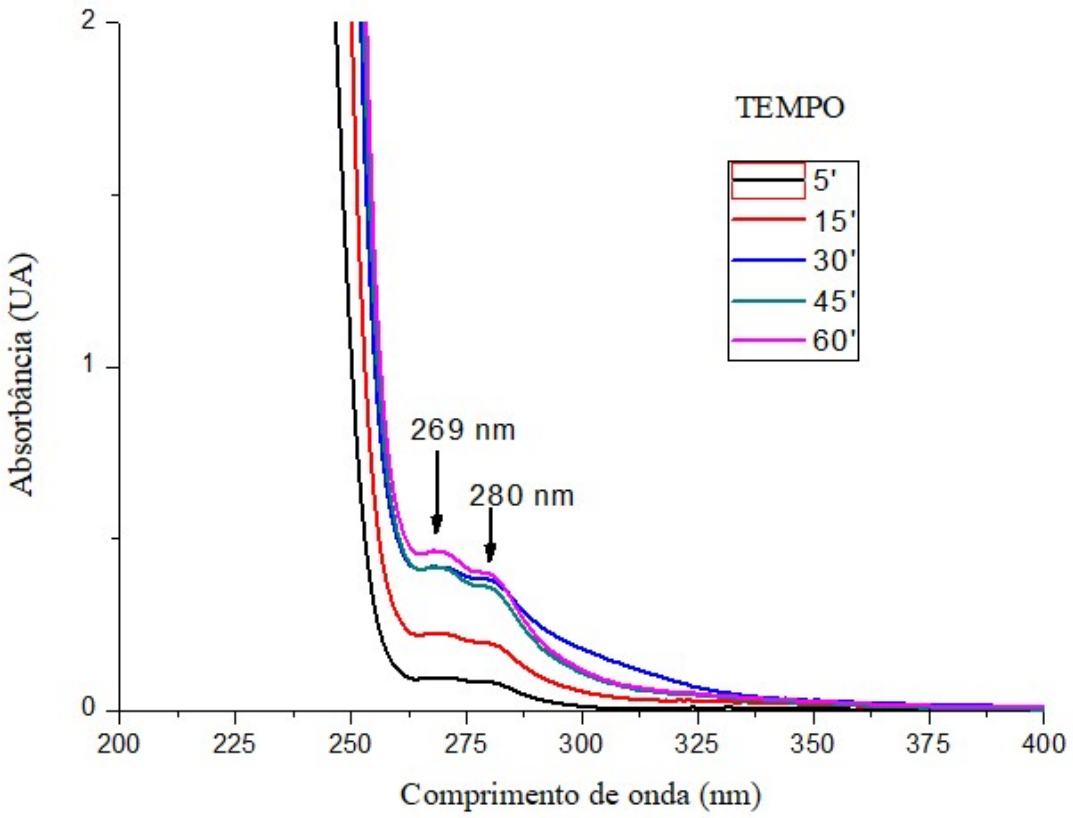
4.4.5. Estudo de liberação do princípio ativo no líquido receptor

Após a imersão das membranas em 200 mL de álcool etílico absoluto, sob agitação constante, alíquotas de 5 mL foram retiradas no intervalo de 60 min e realizada a leitura da absorbância por espectrofotometria UV-Vis. Foi definido o

comprimento de onda de 265 nm como referência para a determinação dos valores de absorbância e cálculo da concentração de VITD3 liberada em solução.

A Figura 29 apresenta as leituras de absorbância da membrana controle em função do comprimento de onda onde se percebe um pico de absorção da luz em 269 nm e 280 nm.

Figura 29 - Espectro UV-Vis de liberação da membrana controle em função do tempo de liberação.

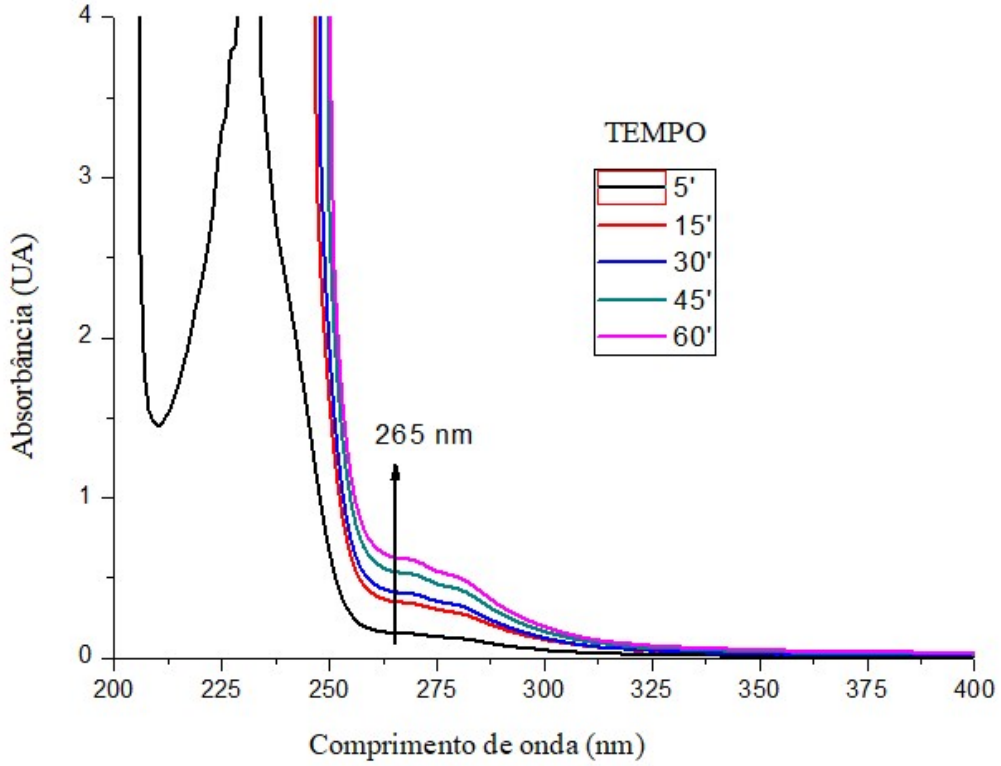


Fonte: o autor.

Os picos de absorbância encontrados no estudo de liberação da membrana controle apresentam valores similares, entre os comprimentos de onda em 269 nm e 280 nm, com os encontrados no espectro de absorção do *tween* 80, como observado na Figura 29. Isto demonstra que o *tween* 80 se desloca da membrana controle em direção ao líquido receptor. Desta forma foram medidos os valores de absorbância em 265 nm e referenciados como branco dos testes de liberação (Tabela 7).

Na Figura 30 é apresentada o espectro de liberação da membrana nanovit em solução alcoólica no intervalo de 60 min.

Figura 30 - Espectro UV-Vis de liberação da membrana nanovit em função do tempo de liberação.

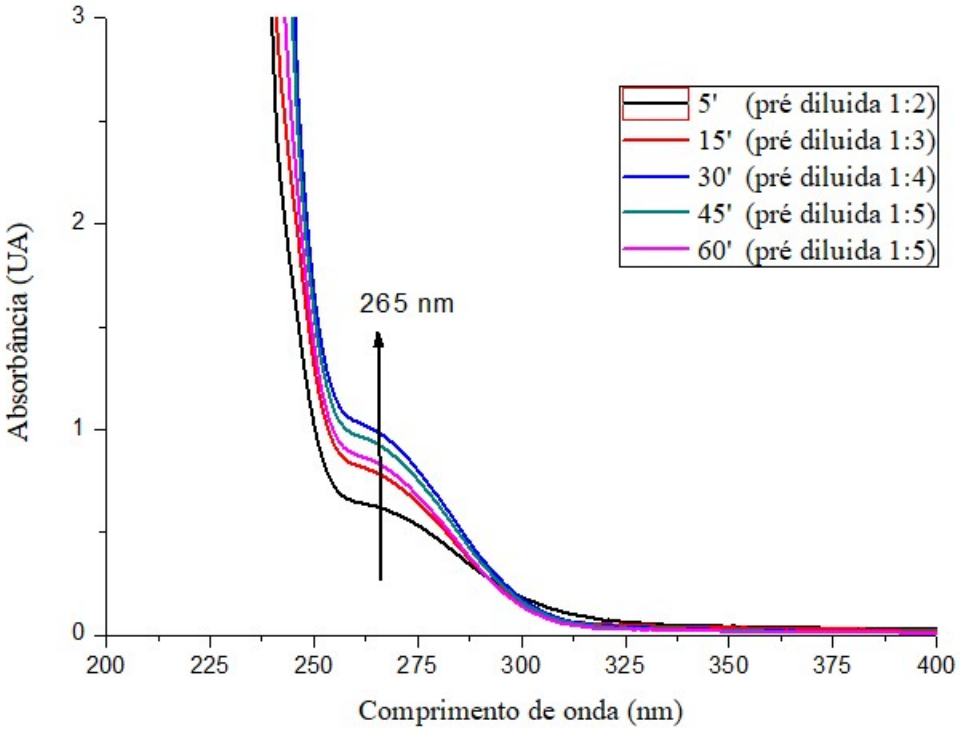


Fonte: o autor.

Os picos de absorbância em 233 nm são atribuídos a liberação da glicerina no líquido receptor. Os valores de absorbância encontrados em 265 nm da membrana nanovit estão muito próximos aos valores de absorbância da membrana controle. Isto se deve possivelmente a baixa concentração de VITD3 liberada neste sistema. Desta forma foi realizada o estudo de liberação na membrana nanovit super, a qual apresenta maior concentração de VITD3.

A Figura 31 mostra o espectro de absorção da membrana nanovit super em função do tempo de liberação. As alíquotas do líquido receptor coletadas foram diluídas previamente pois os valores de absorbância encontrados no comprimento de onda de 265 nm ultrapassaram o limite de detecção do espectrofotômetro.

Figura 31 - Espectro de absorção UV-VIS da membrana nanovit super em função do tempo de liberação.



Fonte: o autor.

Comparando as Figuras 30 e a Figura 31 percebe-se nitidamente que aumentando a concentração de VITD3 na membrana ocorre um aumento na absorbância no comprimento em 265 nm em relação a membrana controle. Como o *tween* 80 apresenta valores de absorbância com picos em 269 nm, este seria a única substância presente na membrana capaz de interferir nas leituras em 265 nm. Porém com o aumento da concentração da VITD3 na membrana nanovit super a interferência do *tween* 80 não é percebida, desta forma pode-se afirmar que o aumento da absorbância esta correlacionado com o aumento da concentração da VITD3.

Na Tabela 7 são apresentados as amplitudes de absorbância encontrada na membrana controle, nanovit (8.000 UI de VITD3) e nanovit super (40.000 UI) em função do tempo de liberação.

Tabela 7- Leitura de absorbância em 265 nm nas membranas controle, nanovit e nanovit super em função do tempo de liberação.

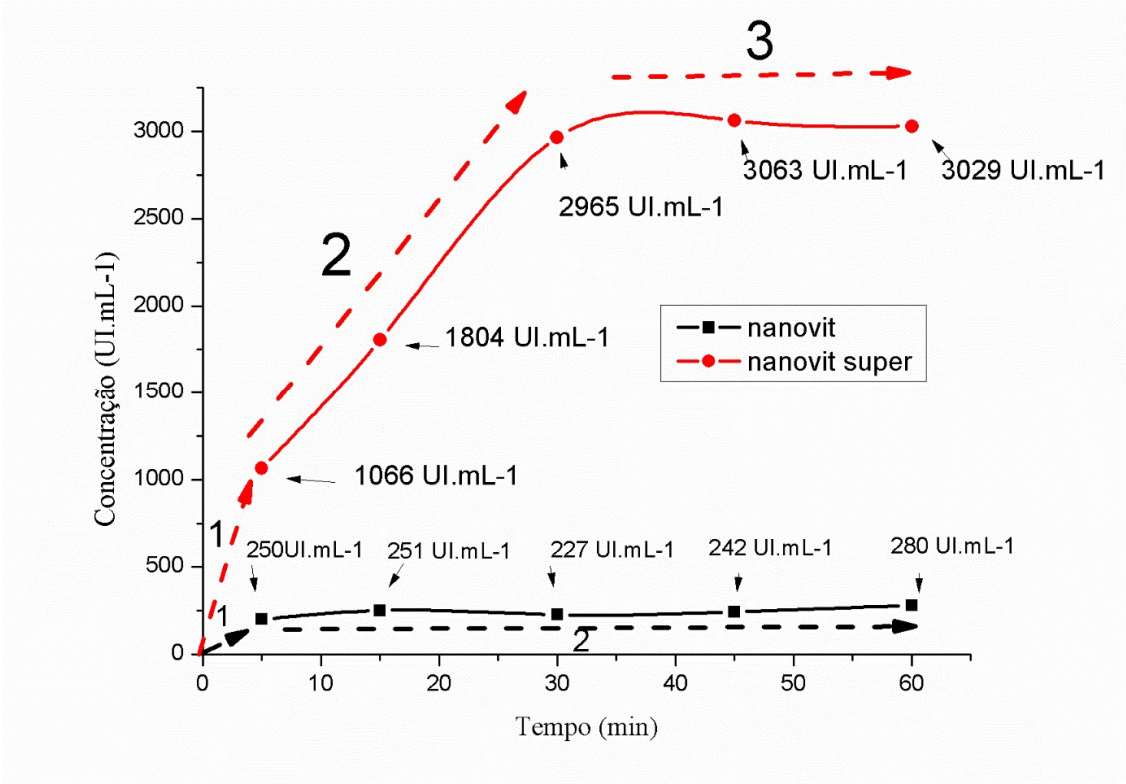
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA X TEMPO DE LIBERAÇÃO			
Tempo Minutos	Membrana controle (UA)	Membrana nanovit super (UA)	Membrana nanovit(UA)
5	0,09	1,28	0,15
15	0,22	2,37	0,35
30	0,31	3,97	0,41
45	0,42	4,20	0,53
60	0,45	4,20	0,62

Fonte: o autor. UA: Unidades de absorbância

A partir destes valores pode-se estimar a quantidade de VITD3 liberada no líquido receptor. Nota-se que os valores de absorbância encontrados na membrana controle e na membrana nanovit em função do tempo de liberação estão muito próximos, mas assim que se aumenta a concentração da VITD3 de 8.000 UI para 40.000 UI na membrana nanovit super os valores de absorbância sobem nitidamente. Estes dados são importantes pois, no sistema de liberação formado pela associação da NC com o PVAL, as interações entre os componentes da membrana permitem a liberação dos elementos presentes na matriz. Uma vez que pela análise dos espectros de absorção verifica-se a liberação da glicerina (Figura 30), do *tween* 80 (Figuras 29 e 30) e da VITD3 de forma mais acentuada na Figura 31.

Na Figura 32, utilizou-se as leituras de absorbância da membrana controle como referência e assim pode-se no sentido de se estimar as concentrações de VITD3 das soluções expostas à membrana nanovit e nanovit super.

Figura 32 - Curva de liberação da Vitamina D3 nas membranas nanovit e nanovit super em 265 nm.



Fonte: o autor.

Observa-se na membrana nanovit que o fármaco atingiu pico de concentração rapidamente em 5 min com concentração de 250 UI mL^{-1} na fase 1 do gráfico, isto se justifica devido ao "*releasing"* de superfície ou seja pela presença de fármaco adsorvido na superfície da membrana e posteriormente na fase 2 os valores de concentração atingiram um platô e se mantiveram constantes o que se deve à baixa concentração de VITD3.

É possível verificar na Figura 32 que a membrana nanovit super apresentou 3 fases distintas: i) na fase 1 ocorreu o "*releasing"* de superfície em 5 min onde atingiu a concentração de 1066 UI mL^{-1}, ii) na fase 2 ocorre a liberação do fármaco entre 5 min e 30 min isto se deve pelo fato do fármaco estar presente em regiões mais internas da membrana ("*bulk"*), com valores entre 1066 UI ml^{-1} e 2965 UI mL^{-1} e iii) na fase 3

onde a membrana atingiu um platô de liberação da VITD3 com valores constantes com pico máximo de 3063 UI mL^{-1}.

Nota-se que a membrana nanovit liberou a VITD3 rapidamente em 5 min, já na membrana nanovit super o processo de liberação até a saturação do líquido receptor durou 30 min. Os resultados apresentados demonstram que a VITD3 foi incorporada à membrana, pois a interação gerou a liberação da VITD3 no líquido receptor no decorrer do tempo, sendo gradativa, rápida, cumulativa e crescente.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, a vitamina D3 foi incorporada em um novo sistema de liberação de drogas, formado pela associação entre a nanocelulose, extraída do línter de algodão e o álcool polivinílico com a possibilidade de desenvolver um novo bioproduto de liberação sustentada.

A técnica de produção da membrana por "*casting*" revelou-se reprodutível facilitando a produção de novas membranas. A membrana formada apresentou flexibilidade e elasticidade própria para uso em sistemas de liberação de drogas. Analisando as características físicas pode-se afirmar que a adição do componente ativo proporcionou um incremento na resistência mecânica da membrana. O módulo de Young, em média 0,46 MPa, indicou que há resistência suficiente para aplicação biomédica funcionando como uma verdadeira matriz para incorporação da vitamina D3.

Os resultados indicam que há compatibilidade entre os constituintes da membrana, revelada pelo espectro de FT-IR, sem formação de novas ligações químicas. As análises de MEV-FEG mostraram distribuição homogênea dos materiais, sem porosidade e leve textura superficial, destacando-se a presença cristais do fármaco na superfície e no "*bulk*" da membrana.

A cinética de liberação da vitamina D3 em solução alcóolica, ocorreu de forma crescente, gradativa e rápida, tais resultados sugerem que este biomaterial tem excelente potencial na liberação desta vitamina, revelado pelas curvas de liberação da vitamina D3 por espectroscopia no UV-Vis. Percebe-se que correlacionando os resultados obtidos nas curvas de liberação da VITD3 com as imagens obtidas por MEV-FEG ocorre desestruturação interna nas membranas e isto possivelmente indica que a liberação do fármaco ocorre por erosão. Desta forma este estudo revelou a possibilidade do uso da membrana na liberação sustentada de vitamina D3, o novo biomaterial obtido pode no futuro se transformar em um novo modelo de suplementação para pessoas com deficiência de vitamina D3.

Percebe-se neste estudo alguns pontos que podem ser melhorados e implementados no futuro: i) necessidade da escolha de um líquido receptor mais similar com a pele humana, ii) a utilização de métodos analíticos de quantificação da

VITD3 que sofram menos interferentes dos componentes da formulação, iii) a aplicação da membrana em estudos de liberação do fármaco "*in vivo" e* iv) desenvolvimento de um protocolo de controle de qualidade das membrana para verificação da estabilidade de seus componentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITBOL, T.; RIVKIN, A.; CAO, Y.; NEVO, Y.; ABRAHAM, E.; BEN-SHALOM, T.; SHOSEYOV, O. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 39, p. 76-88, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010.

ALMOUAZEN, E.; BOURGEOIS, S.; JORDHEIM, L. P.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Nanoencapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation. **Pharmaceutical Research**. 30, 1137– 1146. 2013.

ANICUTA, S. G.; DOBRE, L.; STROESCU, M.; JIPA, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. **Analele Universită Ńii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară**, p. 1234-1240, 2010.

ASHOK, K.; KUMAR, R. To develop a simple (UV-VIS spectrometric) method for the estimation of multivitamin with special reference to capsules & tablets. **Genesis Journals: Pharmagene**, v. 2, n. 1, p. 43-8, 2011.

BALLARD, J. M.; ZHU, L.; NELSON, E. D.; SEBURG, R. A. Degradation of vitamin D3 in a stressed formulation: the identification of esters of vitamin D3 formed by a transesterification with triglycerides. J. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 43, 142–150. 2007.

BARRAL, D. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada,** v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007.

BARRETO, J.G.; TITA, D. L.; ORLANDI, M. O. Development of an automated method to perform a quantitative study of particle size distribution and the effect of a conductive layer in scanning electron microscopy. **Química Nova**, v. 42, n. 4, p. 447-452, 2019.

BELBEKHOUCHE, S.; BRAS, J.; SIQUEIRA, G.; CHAPPEY, C.; LEBRUN, L.; KHELIFI, B.; DUFRESNE, A. Water sorption behavior and gas barrier properties of

cellulose whiskers and microfibrils films. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1740-1748, 2011.

BÖRJESSON, M.; WESTMAN, G. Crystalline nanocellulose: Preparation, modification, and properties. **Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends; InTechOpen**: Londres, 2015. p. 159-191.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BURKIEWICZ, C. J. C. C.; GUADAGNIN, F. A.; SKARE, T. L.; NASCIMENTO, M. M. D.; SERVIN, S. C. N.; SOUZA, G. D. D. Vitamina D e cicatrização de pele: estudo prospectivo, duplo-cego, placebo controlado na cicatrização de úlceras de perna. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 5, p. 401-407, 2012.

CALLISTER JR., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução**. 8. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 487-503 p.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; VERSTUYF, A.: VERLINDEN, L.; CARMELIET, G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.

CINMAN, José Luiz Ferreira. **Desenvolvimento de um novo sistema dinâmico para avaliação da liberação de fármacos**. 2014. 59 f. Dissertação (mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, 2014.

COELHO, Sebastião de Lima. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação de nitrofurazona**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2012.

COSTA, Gabriela Maria D'Angelo. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3**. 2017. 132f. Dissertação (Mestrado

em Produção e Controle Farmacêutico) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

DAMÁSIO, Renato Augusto Pereira. **Caracterização e aplicações de celuloses nanofibrilada (CNF) e nanocristalina (CNC).** 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.

DINIZ, H. F.; ROMÃO, M. F.; ELIAS, R. M.; ROMÃO JÚNIOR, J. E. Insuficiência e deficiência de vitamina D em pacientes portadores de doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.34, n.1, p.58-63, 2012.

DRAGO, Bruno de Camargo. **Avaliação da liberação sustentada de fármaco e nanopartícula utilizando membranas de látex natural como carreador**. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, 2015.

DREXLER, K. E. Nanotechnology: from Feynman to funding. Bulletin of Science, **Technology & Society**, v. 24, n. 1, p. 21-27, 2004.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials today**, v. 16, n. 6, p. 220-227, 2013.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; DE MACEDO GONÇALVES, P. V.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativose gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FISCHER, M. R.; GARCIA, M. C. F.; NOGUEIRA, A. L.; PORTO, L. M.; DOS SANTOS SCHNEIDER, A. L.; PEZZIN, A. P. T. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Matéria** (Rio de Janeiro.), Rio de Janeiro, v. 22, supl. 1, e11934, 2017.

FRONE, A. N.; PANAITESCU, D. M.; DONESCU, D.; SPATARU, C. I.; RADOVICI, C.; TRUSCA, R.; SOMOGHI, R. Preparation and characterization of PVA composites with

cellulose nanofibers obtained by ultrasonication. **BioResources**, v. 6, n. 1, p. 487-512, 2011.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

GIL, Á.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: classic and novel actions. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 72, n. 2, p. 87-95, 2018.

GILABERTE, Y.; AGUILERA, J.; CARRASCOSA, J. M.; FIGUEROA, F. L.; DE GABRIEL, J. R.; NAGORE, E. La vitamina D: evidencias y controversias. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 102, n. 8, p. 572–588, 2011.

GRIFFIN, M.; PREMAKUMAR, Y.; SEIFALIAN, A.; BUTLER, P. E.; SZARKO, M. Biomechanical characterization of human soft tissues using indentation and tensile testing. **Journal of Visualized Experiments**, n. 118, p. e54872, 2016.

GRIPPA, G.A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em Allium cepa. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

GUNATHILAKE, T. M. S. U.; CHING, Y. C.; CHUAH, C. H.; ILLIAS, H. A.; CHING, K. Y.; SINGH, R.; NAI-SHANG, L. Influence of a nonionic surfactant on curcumin delivery of nanocellulose reinforced chitosan hydrogel. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1055-1064, 2018.

GURSOY, R.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 173-182, 2004.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**. 171, 117–122. 2015.

HABIBI, Y.; DUFRESNE, A. Highly Filled Bionanocomposites from Functionalized Polysaccharide Nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1974- 1980, 2008.

HALIB, N.; PERRONE, F; CEMAZAR, M.; DAPAS, B.; FARRA, R.; ABRAMI, M.; MURENA, L. Potential applications of nanocellulose-containing materials in the biomedical field. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 977, 2017.

HEIDARI, A. Measurement the Amount of Vitamin D2 (Ergocalciferol), Vitamin D3 (Cholecalciferol) and Absorbable Calcium (Ca2+), Iron (II)(Fe2+), Magnesium (Mg2+), Phosphate (PO4–) and Zinc (Zn2+) in Apricot Using High–Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Spectroscopic Techniques. **Journal of Biometrics and Biostatistics**, v. 7, n. 292, p. 19, 2016.

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

HERCULANO, R. D.; TRECCO, A.; BORGES, F. A.; PIERRI, E. G.; CHIN, C. M. 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.

HUA, Kai. **Nanocellulose for Biomedical Applications: Modification, Characterisation and Biocompatibility Studies**. 2015. 88f. Tese (Doutorado em Nanotecnologia) - Faculty of Science and Technology. Uppsala University, Uppsala, 2015.

JORGE, A. J. L.; CORDEIRO, J. R.; ROSA, M. L. G.; BIANCHI, D. B. C. Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases**. International Journal of Cardiovascular Sciences**, 31(4), 422-432. Epub May 21, 2018.

KACHEL-JAKUBOWSKA, M.; MATWIJCZUK, A.; GAGOŚ, M. Analysis of the physicochemical properties of post-manufacturing waste derived from production of methyl esters from rapeseed oil. **International Agrophysics**, v. 31, n. 2, p. 175-182, 2017.

KIM, H. G.; GATER, D. L.; KIM, Y. C. Development of transdermal vitamin D3 (VD3) delivery system using combinations of PLGA nanoparticles and microneedles. **Drug delivery and translational research**, v. 8, n. 1, p. 281-290, 2018.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438-5466, 2011.

KOSHY, K. T.; BEYER, W. F. Vitamin D3 (cholecalciferol). In: **Analytical profiles of drug substances**. Academic Press, 1984. p. 655-715.

KWAK, B. M.; JEONG, I. S.; LEE, M. S.; AHN, J. H.; PARK, J. S.Rapid determination of vitamin D3 in milk-based infant fórmulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 165, p. 569–574, 2014.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose–Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.

LEE, K. Y.; AITOMÄKI, Y.; BERGLUND, L. A.; OKSMAN, K.; BISMARCK, A. On the use of nanocellulose as reinforcement in polymer matrix composites. **Composites Science and Technology**, v. 105, p. 15-27, 2014.

LI, W.; PENG, H.; NING, F.; YAO, L.; LUO, M.; ZHAO, Q.; XIONG, H. Amphiphilic chitosan derivative-based core–shell micelles: synthesis, characterisation and properties for sustained release of Vitamin D3. **Food chemistry**, v. 152, p. 307-315, 2014.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S..; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LÓPEZ-DÍAZ, A.; RÍOS-CORRIPIO, M.; RAMÍREZ-CORONA, N.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. Revista Mexicana de Ingeniería Química, v. 17, n. 1, p. 63-73, 2017.

LUBI, N. C.; SATO, M. E. O.; GAENSLY, F. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de Mikania

glomerata Sprengel-Asteraceae (guaco). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 43-46, 2003.

LUO, H.; AO, H.; LI, G.; LI, W.; XIONG, G.; ZHU, Y.; WAN, Y. Bacterial cellulose/graphene oxide nanocomposite as a novel drug delivery system. **Current Applied Physics**, v. 17, n. 2, p. 249-254, 2017.

MACHADO, B. A.; REIS, J. H. O.; Silva, J. D.; CRUZ, L. S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F.; DRUZIAN, J. I. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1275-1282, 2014.

MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z.; CAMARGO, M. B. R.; SILVA, D. M. W.; BORGES, J. L. C.; BANDEIRA, F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 411-33, 2014.

MALUF, D. F.; NAGATA, N.; FARAGO, P. V.; ZAMORA, P. G. P. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p. 39-43, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MEDEIROS, Leandro de Albuquerque. **Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de colecalciferol de uso terapêutico: um estudo comparativo com formulações magistrais**. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MORÁN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P.; VÁZQUEZ, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, p. 149–159, 2008.

NASCIMENTO, D. M.; NUNES, Y. L.; FIGUEIRÊDO, M. C.; DE AZEREDO, H. M.; AOUADA, F. A.; FEITOSA, J. P.; DUFRESNE, A. Nanocellulose nanocomposite

hydrogels: technological and environmental issues. **Green chemistry**, v. 20, n. 11, p. 2428-2448, 2018.

NICKERSON, R. F.; HABRLE, J. A. Cellulose intercrystalline structure. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1507-1512, 1947.

NUNES, T. F. G. **Produção, caracterização e aplicação de nanofibras de celulose**. 2014. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

OKSMAN, K.; AITOMÄKI, Y.; MATHEW, A. P.; SIQUEIRA, G.; ZHOU, Q.; BUTYLINA, S.; HOOSHMAND, S. Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 83, p. 2-18, 2016.

OLIVEIRA, C. R.; CARVALHO, J. L.; NOVIKOFF, S.; BERTI, F. V.; PORTO, L. M. Bacterial cellulose membranes constitute biocompatible biomaterials for mesenchymal and induced pluripotent steam cell culture and tissue engineering. **Journal of Tissue Science and Engineering**, v. 11, p. 05, 2012.

OZTURK, B.; ARGIN, S.; OZILGEN, M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 187, p. 499–506, 2015.

PALACIOS, C.; GONZALEZ, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,** v. 144, p. 138–145, 2014.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução a espectroscopia.** 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 15-98 p.

PEIXOTO, P. V. et al. Hipervitaminose D em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(7):573-594, julho 2012.

POONGUZHALI, R.; BASHA, S. Khaleel; KUMARI, V. Sugantha. Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application**. International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 111-120, 2017.

RAMEZANLI, T.; KILFOYLE, B. E.; ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 196–203, 2017.

REJINOLD, N. S.; KIM, H. K.; ISAKOVIC, A. F.; GATER, D. L.; KIM, Y. C. Therapeutic vitamin delivery: **Chemical and physical methods with future directions. Journal of Controlled Release**, v. 298, p. 83–98, 2019.

SALVI, Denise Toledo Bonemer De. **Membranas condutoras iônicas de celulose bacteriana**. 2010. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, 2010. .

SANTOS, Daniele Bueno. **Propriedades ópticas de suspensões coloidais e filmes à base de nanocelulose.** 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, 2012.

SARWAR, M. S.; NIAZI, M. B. K.; JAHAN, Z.; AHMAD, T.; HUSSAIN, A. Preparation and characterization of PVA/nanocellulose/Ag nanocomposite films for antimicrobial food packaging. **Carbohydrate polymers**, v. 184, p. 453-464, 2018.

SENA, M. M.; FREITAS, C. B.; SILVA, L. C.; PÉREZ, C. N.; DE PAULA, Y. O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 75-79, 2007.

SILVA, Géssica Teixeira da. **Blendas poliméricas de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose com aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.** 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SOUZA, Drielle Justiniano de. **Incorporação de colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose visando aplicação em medicina regenerativa**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SOUZA, Vinicius J.C. **Impacto de nanocelulose na biodisponibilidade de ferro e manganês em sistemas aquáticos.** 2019. 50f. Trabalho de conclusão de curso

(Bacharelado – Engenharia de Produção). Campus experimental de Itapeva. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Itapeva, 2019.

SPENCE, K.; HABIBI, Y.; DUFRESNE, A. Nanocellulose-based composites. In: Cellulose fibers: bio-and nano-polymer composites. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 179-213.

STRATULAT, I. et al. Enrichment of cheese with vitamin D3 and vegetable omega-3. **Journal of functional foods**, v. 13, p. 300-307, 2015.

STROBEL, N.; BUDDHADASA, S.; ADORNO, P.; STOCKHAM, K.; GREENFIELD, H. Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D determination in meats by LC–IT-MS. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1042–1047, 2013.

STUART, B. H. **Spectrum Manipulation. In Infrared Spectroscopy**: Fundamentals and Applications: Sydney: John Wiley e Sons, 2004.

SWEETMAN, S. **Guia Completo de Consulta Farmaco-Terapêutica Martindale**. 3.ed. Barcelona: Pharma Editores, 2008.

UDDIN, M. M.; FAWZI, M.; VEETTIL, V. N. Nano-cellulose biopolymer based nano-biofilm biomaterial using plant biomass: An innovative plant biomaterial dataset. **Data in brief**, v. 17, p. 1245-1252, 2018.

UMAR, M.; SASTRY, K. S.; AL ALI, F.; AL-KHULAIFI, M.; WANG, E.; CHOUCHANE, A. I. Vitamin D and the pathophysiology of inflammatory skin diseases. **Skin pharmacology and physiology**, v. 31, n. 2, p. 74-86, 2018.

VIEIRA, Daniela. **Obtenção e caracterização de nanocelulose a partir de fibras de Chorisia speciosa St. Hil.** 2015. 60 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2015.

VILLALBA-RODRIGUEZ, A.M.; DHAMA, K.; IQBAL, H.M.N. Biomaterials-based hydrogels and their drug delivery potentialities. **International Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 7, p. 864-73, 2017.

WANG, Y.; WEI, X.; LI, J.; WANG, F.; WANG, Q.; CHEN, J.; KONG, L. Study on nanocellulose by high pressure homogenization in homogeneous isolation. **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 3, p. 572-578, 2015.

WISHER, D. M.: The complete drug reference. **Journal of the Medical Library Association**, v. 100, n. 1, p. 75-77, 2012.

XAVIER, R. M.; DORA, J.; BARROS, E. **Laboratório na Prática Clínica: Consulta Rápida:** Porto alegre, Artmed Editora, 2016.

ZANELA, J.; BILCK, A. P.; CASAGRANDE, M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Polyvinyl alcohol (PVA) molecular weight and extrusion temperature in starch/PVA biodegradable sheets. **Polímeros**, v. 28, n. 3, p. 256-265, 2018.