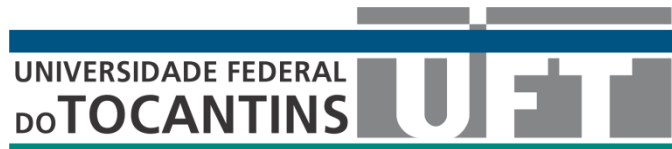


**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SUPORTADAS EM
MICROESFERAS E FILMES DE QUITOSANA: ESTUDO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E APLICAÇÃO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
IBUPROFENO**

**GURUPI-TO
2017**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SUPORTADAS EM
MICROESFERAS E FILMES DE QUITOSANA: ESTUDO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E APLICAÇÃO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
IBUPROFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Samuel Soares dos Santos

**GURUPI-TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

P436s Pereira, Anna Karla dos Santos.

Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: Estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada de ibuprofeno. / Anna Karla dos Santos Pereira. – Gurupi, TO, 2017.

76 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2017.

Orientador: Lucas Samuel Soares dos Santos

1. Quitosana. 2. Adsorção. 3. Ibuprofeno. 4. Antibacteriano. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácara 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

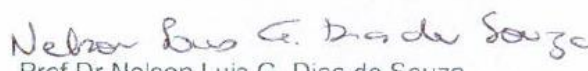


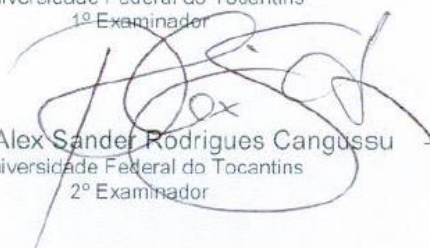
Ata de Defesa nº 31/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

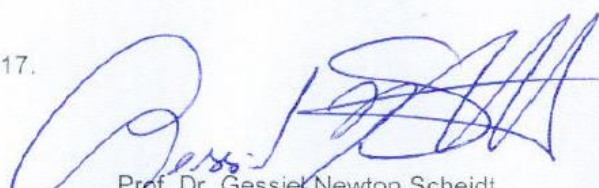
Aos 28 dias do mês de abril do ano de 2017, às 14 horas, na sala 02, edifício PARFOR, campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. LUCAS SAMUEL SOARES DOS SANTOS da Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. NELSON LUIS G. DIAS DE SOUZA da Universidade Federal do Tocantins e Prof. Dr. ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA, intitulada **"Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: Estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada de ibuprofeno"**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Lucas Samuel Soares dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
Orientador


Prof. Dr. Nelson Luis G. Dias de Souza
Universidade Federal do Tocantins
1º Examinador


Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu
Universidade Federal do Tocantins
2º Examinador

Gurupi, 28 de abril de 2017.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Dedico,

Ao meu noivo, Douglas, aos meus pais,
Joana e Laurindo e aos meus irmãos,
Carlos e Kaio.

Agradecimentos

À Deus;

Ao professor Dr. Lucas Samuel Soares dos Santos, pela orientação, dedicação, paciência e estímulos à pesquisa;

Ao meu noivo, Douglas Henrique por todo carinho, compreensão e ajuda;

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;

Aos meus pais, Joana e Laurindo, e aos meus irmãos, Carlos e Kaio;

Aos meus amigos do grupo de pesquisa GEMat pelos momentos de diversão e aprendizado, fazendo do ambiente de trabalho um local muito agradável;

Aos quitoamas, Keleen e João pelo companheirismo do dia-a-dia;

Às amigas Sara, Mayra e Taís pela troca de experiência, grupos de estudos e convívio durante o trajeto;

Ao meu amigo, Davi, por toda a ajuda;

Ao Programa de Pós-Graduação e ao coordenador do Programa prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt pela oportunidade;

Aos laboratórios de Química, LaMat, Labap, MIP, LabVac da Universidade Federal do Tocantins pela possibilidade de execução dos procedimentos experimentais;

À Universidade Federal do Piauí pelas análises;

A todos os professores,

Aos amigos de Gurupi os quais levarei sempre comigo

E a todos aqueles que contribuíram para realização do trabalho,

Obrigada!

Resumo

Desde a década de 90 que estudos relacionados com os polímeros quitina e quitosana têm sido estimulados. A presença em maior quantidade de grupos NH_2 na quitosana permite sua aplicação como biomaterial eficiente no carregamento de fármacos e na adsorção de cátions metálicos. Neste trabalho foram preparados filmes e microesferas de quitosana para uso em procedimentos de adsorção de íons prata, liberação de fármaco e atividade antibacteriana. O polímero apresentou grau de desacetilação correspondente a 81% e ponto de carga zero em $\text{pH} \sim 7$. As microesferas obtidas apresentaram um diâmetro médio de 2,911 μm e um desvio padrão de 0,325, quando úmidas. O uso da quitosana na forma de microesferas e filmes proporciona um aumento da área superficial, além de facilitar o manuseio do polímero. Os filmes obtidos foram formados com nanopartículas de prata em etapa única. O melhor pH para o estudo de adsorção de íons Ag^+ em meio aquoso está na faixa de pH de 5 a 7, o melhor ajuste foi ao modelo de Langmuir, o tempo ótimo para ocorrer adsorção máxima foi de 10 horas e o valor de energia aparente de adsorção (E) de 6,9 kJ/mol, o que a caracteriza adsorção física. O estudo de liberação de ibuprofeno foi realizado em fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado, a maior liberação do fármaco ocorreu no pH neutro dos fluidos intestinais. A liberação transdérmica de fármaco pelos filmes foi realizada apenas em $\text{pH}=7,4$ para simular o tecido sanguíneo e o ápice da liberação de ibuprofeno ocorreu logo no início do contato do material com o fluido simulado. As microesferas e os filmes com nanopartículas de prata demonstram ter atividade contra *E. coli* e *S. aureus*.

Palavras-chave: Quitosana, adsorção, ibuprofeno, antibacteriano.

Abstract

Since the 1990s studies related to chitin and chitosan polymers have been stimulated. The presence of more NH_2 groups in chitosan allows its application as an efficient biomaterial without drug loading and adsorption of metallic cations. In this work, chitosan films and microspheres were made for use in silver ion adsorption procedures, drug release and antibacterial activity. The polymer showed a degree of deacetylation corresponding to 81% and zero loading point at $\text{pH} \sim 7$. As obtained microspheres had a mean diameter of 2911 nm and a standard deviation of 0.325, when used. The use of chitosan in the form of microspheres and films provides an increase of the surface area, besides facilitating the handling of the polymer. The films were formed with single step silver nanoparticles. The best pH for the Ag^+ ion adsorption study in the aqueous medium is in the pH range of 5 to 7, the best fit for the Langmuir model, the optimal time for the maximum adsorption of 10 hours and the apparent energy value of adsorption (E) of 6,9 kJ / mol, which characterizes it physical adsorption. The study of ibuprofen release was performed in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, further release of the drug occurs no neutral pH of intestinal fluids. Transdermal delivery of drug by films was performed at $\text{pH} = 7.4$ to simulate blood tissue and the apex of ibuprofen release occurred early in contact with the simulated fluid material. As microspheres and films with silver nanoparticles they demonstrate activity against *E. coli* and *S. aureus*.

Key words: Chitosan, adsorption, ibuprofen, antibacterial.

Sumário

Lista de Tabelas	10
Lista de Figuras	11
Lista de abreviação	13
1. Introdução	14
2. Revisão bibliográfica	16
2.1. Quitosana	16
2.2. Liberação controlada de fármacos	18
2.2.1. Quitosana como matriz para liberação de fármaco	19
2.2.2. Ibuprofeno	20
2.3. Adsorção de íons metálicos	21
2.3.1. Cinética de adsorção	22
2.3.1.1.Equação de pseudo-primeria ordem	22
2.3.1.2.Equação de pseudo-segunda ordem	23
2.3.1.3.Difusão intra-partícula (Modelo Weber-Morris).....	23
2.3.2. Isoterma de Adsorção.....	24
2.3.2.1.Isoterma de Langmuir	24
2.3.2.2.Isoterma de Freundlich	25
2.3.2.3.Isoterma de Dubinin-Radushkevich (D-R).....	25
2.3.3. Quitosana como material adsorvente	26
2.4. Síntese de nanopartículas de prata	28
2.4.1. Ação bactericida do nanocompósito Cts/NPsAg	29
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Metodologia	33
4.1. Reagente utilizados	33
4.2. Purificação da quitosana	34
4.2.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho da quitosana	34
4.3. Formação dos filmes de quitosana puros e com nanopartículas de prata	34
4.3.1. Análise colorimétrica dos filmes de quitosana.....	35
4.4. Formação das microesferas porosas	35

4.4.1.	Análise das microesferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EED).	35
4.5.	Determinação do pH no ponto de carga zero	36
4.6.	Influência do pH na adsorção dos íons metálicos em microesferas de quitosana	36
4.7.	Cinética de adsorção em microesferas	36
4.8.	Isoterma de Concentração	37
4.9.	Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes e microesferas	38
4.9.1.	Preparo da suspensão do microrganismo	38
4.9.2.	Teste do disco-difusão	38
4.10.	Aplicação dos biomateriais no processo de carregamento e liberação controlada de fármaco	39
4.10.1.	Carregamento do fármaco em microesferas de quitosana puras	39
4.10.2.	Carregamento do fármaco em microesferas de quitosana com nanopartículas de prata	40
4.10.3.	Carregamento do fármaco nos filmes de quitosana puros	40
4.10.4.	Carregamento do fármaco nos filmes de quitosana com nanopartículas de prata	40
4.10.5.	Quantificação do total de fármaco incorporado nos biopolímeros	41
4.10.6.	Preparação dos fluidos simulados	41
4.10.7.	Liberação do fármaco nos fluidos simulados	41
4.10.8.	Liberação de prata nos fluidos simulados	42
4.10.9.	Taxa de intumescimento	42
5.	Resultados e Discussão	44
5.1.	Purificação da quitosana	44
5.2.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho da quitosana	44
5.3.	Preparo dos filmes de quitosana	45
5.4.	Análise colorimétrica dos filmes de quitosana	46
5.5.	Preparo das microesferas	48
5.6.	Análise das microesferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EED)	50
5.7.	Determinação do pH no ponto de carga zero (pH_{pcz})	51
5.8.	Influência do pH na adsorção dos íons Ag⁺	52
5.9.	Cinética de adsorção dos íons Ag⁺	53
5.10.	Isoterma de concentração	56
5.11.	Avaliação da capacidade antibacteriana dos biomateriais	59
5.12.	Liberação controlada de fármaco pelos biomateriais	62

5.12.1. Liberação de nanopartículas de prata no organismo pelos biomateriais	64
5.12.2. Taxa de intumescimento.....	65
6. Conclusão	67
Referências	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características do ibuprofeno	21
Tabela 2: Descrição dos reagentes utilizados	33
Tabela 3: Concentrações de AgNO_3 utilizadas na isoterma de adsorção a 25°C	37
Tabela 4: Comprimento de onda da cor complementar dos filmes com nanopartículas de prata	48
Tabela 5: Parâmetros obtidos através da linearização da curva cinética	54
Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo de pseudo segunda ordem	55
Tabela 7: Equações não lineares dos modelos de Langmuir e Freundlich	57
Tabela 8: Parâmetros obtidos através da equação do modelo de Langmuir	58
Tabela 9: Parâmetros obtidos através da linearização da isoterma D-R	59
Tabela 10: Comparação entre concentração do filme e diâmetro do halo	61

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura química da quitina ou quitosana, sendo n o grau de polimerização. 16
- Figura 2:** Representação esquemática da reação de reticulação de quitosana com epicloridrina 17
- Figura 3:** Comparação entre sistema de liberação convencional e controlada 19
- Figura 4:** Estrutura química do Ibuprofeno 21
- Figura 5:** Esquema representativo do mecanismo de adsorção de cátions e ânions metálicos sobre a quitosana por formação de complexos de quelatos e interações eletrostática, respectivamente 28
- Figura 6:** Ação das nanopartículas de prata contra amostras de *P. aeruginosa*. (a) Controle; (b) e (c) Tratadas com nanopartículas de prata. 30
- Figura 7:** Processo realizado na suspensão de *E.coli* e *S. aureus* 38
- Figura 8:** Espectro obtido por FT-IR da quitosana pura 45
- Figura 9:** Imagem fotográfica dos filmes de quitosana obtidos, sendo o filme de quitosana pura (a) e os filmes de quitosana com as seguintes concentrações de prata: 0,5 (b), 1,0 (c), 2,0 (d), 5,0 (e), 25 (f) e 52 (g) mmol L^{-1} . 46
- Figura 10:** Diagrama de cromaticidade marcado com os valores obtidos para diversos filmes de quitosana com prata 47
- Figura 11:** Diâmetro das microesferas porosas úmidas 49
- Figura 12:** Diâmetro das microesferas porosas secas 49
- Figura 13:** Microesferas de quitosana (a) úmida e (b) seca. 50

Figura 14: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microesferas de quitosana	50
Figura 15: Espectro de EED das microesferas de quitosana	51
Figura 16: Determinação do pH _{pcz} dos biomateriais.	52
Figura 17: Influência do pH na adsorção de íons Ag ⁺ em microesferas de quitosana	53
Figura 18: Cinética de adsorção de Ag ⁺ em microesferas de quitosana	54
Figura 19: Linearização conforme modelo cinético de pseudo segunda-ordem	55
Figura 20: Adsorção de íons Ag ⁺ em meio aquoso de diferentes concentrações	56
Figura 21: Linearização conforme modelo de Isoterma D-R	59
Figura 22: Halos de inibição formados pelos filmes com nanopartículas de prata para: (a) E.coli e (b) S.aureus	60
Figura 23: Halos de inibição formados pelas microesferas com nanopartículas de prata para: (a) E.coli e (b) S.aureus	61
Figura 24: Liberação de fármaco pelo polímero em forma de microesferas	62
Figura 25: Liberação de fármaco pelo polímero em forma de filmes	63
Figura 26: Taxa de intumescimento para o biopolímero ausente de ibuprofeno	65

Lista de abreviação

C_s – Concentração final da solução

C_t – Concentração no tempo t

C_{ts} - Quitosana

D-R – Dubinin–Radushkevich

K₁ - Constante de velocidade do modelo de pseudo-primeira ordem

K₂ - Constante de velocidade do modelo de pseudo-segunda ordem

K_F – Constante de adsorção da isoterma de Freundlich

K_i - Constante de velocidade do modelo de difusão intra-partícula

K_L – Constante da adsorção da isoterma de Langmuir

m - massa

n – Fator de heterogeneidade

N_f – mols adsorvidos

N_{f(t)} – mols adsorvidos no tempo t

N_i – número do mols inicial

N_{psAg} – Nanopartículas de prata

N^s – capacidade máxima de adsorção de Langmuir

N_s – número de mols do sobrenadante

pH_{pcz} – ponto de carga zero

R_L – Fator da separação da isoterma de Langmuir

TI – Taxa de intumescimento

1. Introdução

Desde a década de 90 que estudos relacionados com os polímeros quitina e quitosana têm aumentado [1]. Estes polissacarídeos apresentam atividades biológicas peculiares como biodegradação, biocompatibilidade, atoxicidade e capacidade de adsorção, o que possibilita a sua utilização em diversos produtos como, por exemplo, em biomateriais [2].

A quitosana, principal derivado da quitina, pode ser produzida por meio de reação de desacetilação com solução de base concentrada. Onde os grupos N-acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina dão lugar aos grupos amino ($-\text{NH}_2$) da quitosana [3]. A diferença da estrutura molecular da quitosana está na maior quantidade de grupos amino, o que permite sua solubilidade em meio ácido, Isto permite o uso deste polímero de diferentes formas, possibilitando sua ampla aplicação no carreamento de fármacos [4] e na adsorção de cátions metálicos [5].

Como já é de conhecimento que íons metálicos desenvolvem atividades farmacológicas, a formação de complexos entre fármacos e íons com potencial antimicrobianos suportados em matrizes versáteis surgem como auxiliares no tratamento de infecções [6].

Os íons prata (Ag^+) apresentam atividades tanto bacteriostáticas como bactericida [7] e isto fez com que a prata fosse utilizada durante séculos como agente antimicrobiano [8]. Recentemente, o foco no emprego de nanopartículas de prata (NpsAg) está direcionado à preocupação quanto ao uso excessivo de antibióticos, o que podem provocar um aumento da resistência dos microrganismos a esse tipo de medicamento[8]. Tanto a quitosana quanto as NpsAg possuem potencial antimicrobiano, no entanto, a combinação no nanocompósito quitosana-NpsAg apresenta um maior efeito [9]. As longas cadeias dos biopolímeros apresentam um grande número de grupos disponíveis para complexação de íons metálicos, além disso, a estrutura polimérica permite o controle de tamanho, forma e dispersão de nanopartículas [10].

O ibuprofeno é medicamento não esteroide usado para tratar dores de cabeça, dores musculares, artrite reumatóide, febre e dor aguda ou crônica relacionada com processos inflamatório e conseqüentemente uma combinação

desse princípio ativo com quitosana e nanopartículas de prata, pode auxiliar no processo de tratamento de infecções[6].

As variadas formas físicas da quitosana (pó, microesferas e filmes) permitem a liberação de fármacos por meio das matrizes preparadas por compressão direta, encapsulação ou de forma que possibilite a liberação transdérmica, aplicação cutânea para posterior absorção do fármaco pela circulação sanguínea, resolvendo problemas como insolubilidade e hidrofobicidade de determinados agentes terapêuticos [11].

Assim, a metodologia aplicada neste trabalho tem o intuito de combinar diferentes estruturas de quitosana com nanopartículas de prata e ibuprofeno para que possam ser utilizados como carreadores de fármaco e ainda material antimicrobiano.

2. Revisão bibliográfica

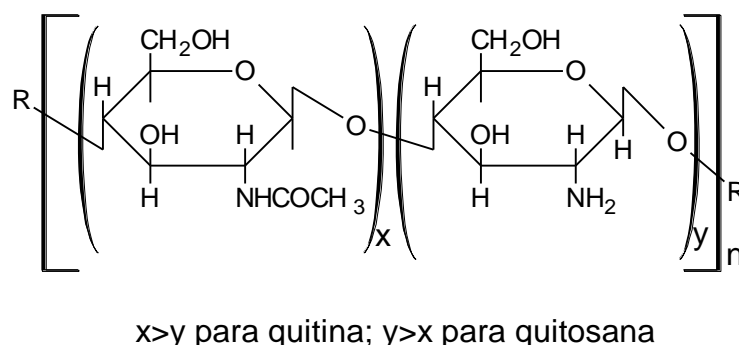
2.1. Quitosana

A quitosana é o principal derivado da quitina e sua principal forma de obtenção é por meio da desacetilação em meio básico [12]. Quando a quitina atinge um grau de desacetilação mínimo de 50% passa a ser chamada de quitosana e torna-se solúvel em meio ácido [13].

Quitina e quitosana são copolímeros e suas estruturas poliméricas consistem de unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Enquanto na quitina a primeira unidade está presente em maior quantidade, na quitosana há o destaque para os grupos amino [2], conforme mostra a Figura 1. Logo, esses dois polímeros se diferem quanto à quantidade relativa de grupos acetamido e amino presentes, o que acarreta na diferença de solubilidade em meio ácido.

Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes testados a quitosana é solúvel em meio ácido diluído, pois nessa situação forma-se um polímero catiônico devido a protonação do grupo amino ($-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$), conferindo a ela propriedades peculiares [3].

Figura 1: Estrutura química da quitina ou quitosana, sendo n o grau de polimerização

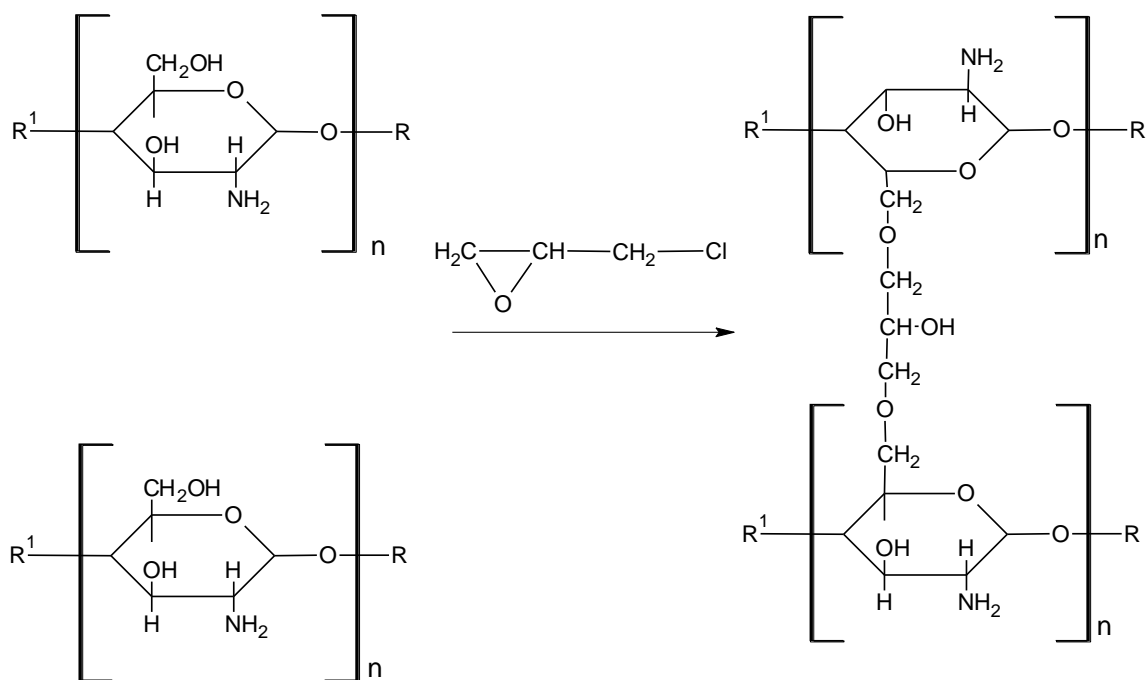


A quitina, por ser insolúvel e quimicamente não reativa, apresenta um menor conjunto de aplicações quando comparada com a quitosana. Conseqüentemente, a vasta aplicabilidade da quitosana está associada com o seu peso molecular (PM) e o grande número de grupos amino presentes [2].

Outra particularidade desses polímeros é a possibilidade de modificações em sua estrutura o que proporciona maiores interações químicas e resistência mecânica, química e/ou térmica aumentando a gama de utilização dos mesmos [14].

Uma forma de modificação química é por meio de reações de reticulação, nas quais os agentes reticulantes formam ligações entre as cadeias de quitosana, alterando as propriedades do polímero. Um exemplo de agente reticulante comumente empregado no processo de modificação da quitosana é a epícloridrina. Em condições ácidas, a reação de reticulação entre quitosana e epícloridrina ocorre nos grupos hidroxilas [15], conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da reação de reticulação de quitosana com epícloridrina



O processo de reticulação das cadeias poliméricas da quitosana, ao utilizar a epícloridrina como agente reticulante, inicia-se com uma reação de eliminação do haleto, seguida de abertura do anel epóxi, e consequente formação do entrecruzamento [16].

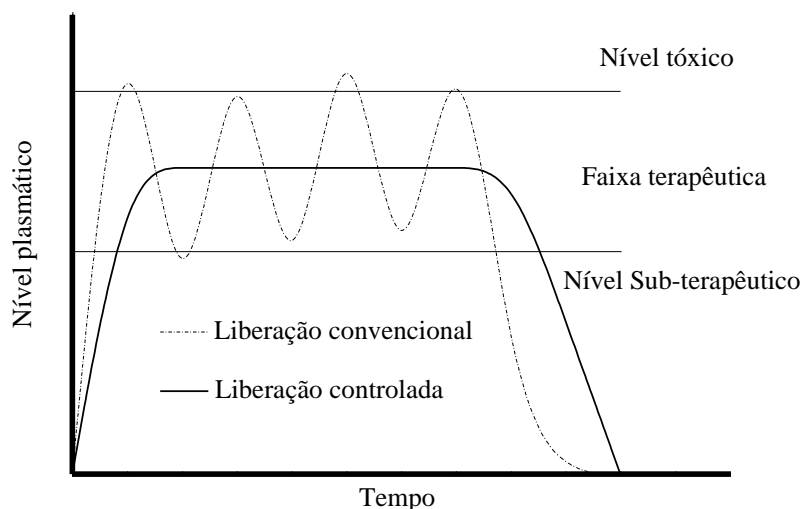
2.2. Liberação controlada de fármacos

A busca por novos materiais com potencial para liberação controlada de fármaco que satisfaçam as exigências de baixo custo e maior eficiência para melhores terapias é crescente. Nesse sentido, diversos fármacos já conhecidos e eficazes passam por reformulações adquirindo um novo sistema de administração proporcionando uma maior eficiência ou uma terapia mais benéfica [17].

Os sistemas de liberação controlada são dispositivos capazes de incorporar certa quantidade de um princípio ativo, controlando a taxa de liberação de acordo com o tempo, bem como o local de ação. O objetivo principal dos sistemas de liberação controlada é manter uma concentração constante do medicamento, que deve permanecer na faixa terapêutica, ou seja, entre o mínimo eficaz e concentração tóxica mínima durante um longo período de tempo [18].

As formas farmacêuticas com característica de liberação controlada, (maior permanência do fármaco no organismo) apresenta algumas vantagens, tanto farmacológicas quanto na aderência do paciente, em relação às formas convencionais (liberação imediata do princípio ativo e posterior declínio) tais como: baixa oscilação dos níveis terapêuticos, não apresenta níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos, aumenta concentrações plasmáticas de medicamentos com meia-vida curta, aumenta a segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência [19]. A Figura 3 representa um gráfico comparativo entre as formas farmacêuticas de liberação controlada e convencional.

Figura 3: Comparação entre sistema de liberação convencional e controlada



Apesar das vantagens descritas, os sistemas de liberação controlada também apresentam algumas limitações, pois em caso de não aceitação do medicamento a interrupção do efeito terapêutico imediato é impossibilitada, além de poder acumular o fármaco com velocidade de eliminação lenta, causando elevada dosagem do princípio ativo no organismo [19].

Dessa forma, buscam-se matrizes capazes de carrear o princípio ativo de forma segura no organismo.

2.2.1. Quitosana como matriz para liberação de fármaco

Para obtenção de melhores sistemas de liberação controlada, características como capacidade de delimitar a disponibilidade de fármaco e manter a ação terapêutica por determinado período de tempo, são cruciais na escolha da matriz. Diversas são as opções de matrizes com potencial para tal finalidade, dentre elas os polímeros se destacam [20].

Em alguns sistemas matriciais poliméricos, a liberação do fármaco ocorre mediante a degradação da matriz ocasionada por meio de determinado efeito químico ou físico, como alteração de pH do meio, força iônica e/ou temperatura [21].

No caso de fármacos aniônicos o único polímero utilizado para liberação controlada de droga é a quitosana [22]. O considerável interesse da quitosana

como excipiente para as várias formas de dosagem está relacionado às suas propriedades físico-químicas e biológicas, pois o polímero é capaz de penetrar as membranas mucosas por meio de interações iônicas entre os grupos amino catiônicos primários da quitosana e as subestruturas aniônicas constituintes do muco e também por ligação de hidrogênio. Logo, a mucoadesividade da quitosana relaciona-se diretamente com o seu grau de desacetilação [23].

As membranas mucosas são as superfícies úmidas que revestem as paredes das variadas cavidades corporais, portanto, a mucoadesão é a interação atrativa entre uma forma de dosagem farmacêutica e uma membrana mucosa [24]. A quitosana pode interagir com constituintes da camada mucosa e prolongar o tempo de residência de uma forma de dosagem no local de absorção, melhorando a biodisponibilidade do fármaco. Estas interações podem acelerar a dissolução de fármacos cristalinos, interrompendo parcialmente a sua cristalinidade, facilitando sua absorção [23].

Essas propriedades da quitosana resultaram no desenvolvimento de numerosos sistemas de administração de fármacos para vários locais de aplicação, sendo eles pela via oral, ocular, nasal, vaginal, bucal, parenteral, intravesical e entrega de vacinas [22].

2.2.2. Ibuprofeno

Desenvolvido em 1961, o ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não esteroide, com efeitos analgésicos e antipiréticos. Inicialmente era prescrito apenas para transtornos reumáticos, com o tempo tornou-se disponível para o tratamento de dor e febre. Hoje, está entre os analgésicos mais comumente usados para dor leve a moderada, na qual a dose única recomendada é de 200-400 mg [25].

O único efeito patológico significativo do ibuprofeno, bem como dos demais anti-inflamatórios não esteroides, é a ulceração do trato gastrointestinal [26]. Esse medicamento apresenta-se na forma de pó branco ou cristais incolores, possui ponto de fusão entre 75 a 77 °C, e é relativamente insolúvel em água, mas prontamente solúvel na maioria dos solventes orgânicos [27].

Estudos buscando novas matrizes capazes de solucionar as desvantagens desse tipo de fármaco estão sendo realizados, de modo a

desenvolver formas eficientes para retenção do fármaco de interesse. A estrutura química do ibuprofeno está representada na Figura 4 e algumas características dispostas na Tabela 1.

Figura 4: Estrutura química do Ibuprofeno

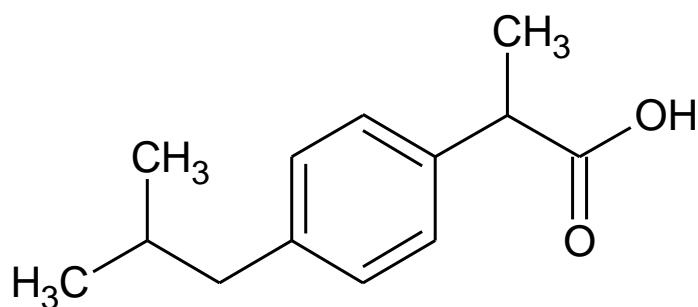


Tabela 1: Características do Ibuprofeno

Características do Ibuprofeno		
Massa molecular	Fórmula Molecular	Nome IUPAC
206,28 g mol ⁻¹	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Ácido (RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico

2.3. Adsorção de íons metálicos

Adsorção é uma técnica amplamente utilizada na remoção de metais em solução por ser um processo simples, eficiente e econômico. É denominada adsorção o processo que inclui um ou mais adsorvato fixado através de ligações químicas ou físicas sobre um adsorvente [28].

Quando o adsorvato liga-se através de interações de Van der Waals com o adsorvente conservando a identidade das substâncias adsorvidas tem-se a chamada adsorção física, também chamada fisissorção. Quando a interação ocorre por meio de uma adsorção química ou quimissorção há transferência de elétrons entre adsorvato e adsorvente formando um composto químico. Potanto, a fisissorção é baseada nos processos de separação e a quimissorção corresponde à quebra ou formação de ligações químicas [29].

Para compreender e analisar quantitativamente o processo de adsorção é necessário realizar isotermas de adsorção e estudos cinéticos que revelam os dados do equilíbrio. A cinética é importante por determinar a que tempo as amostras atingem o equilíbrio e nesse determinado tempo a isoterma é realizada em diferentes concentrações a fim de verificar a eficiência do adsorvente [30].

2.3.1. Cinética de adsorção

O estudo cinético de adsorção é importante para determinar a que taxa ocorre a remoção do adsorvato pelo adsorvente e o tempo necessário para alcançar o equilíbrio. O processo é realizado com o intuito de projetar sistemas de tratamento de adsorção apropriados [31]. Os modelos matemáticos mais utilizados para tratamento dos dados cinéticos é o modelo de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda-ordem e difusão intra-partícula.

2.3.1.1. Equação de pseudo-primeria ordem

Neste modelo, considera-se que a taxa de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao número de sítios desocupados . A equação original do modelo de pseudo-primeira ordem é representada pela Equação 1[32].

$$N_{f(t)} = N_f (1 - \exp K_1 t) \quad \text{Equação 1}$$

Em que: $N_{f(t)}$ é a quantidade adsorvida no tempo t , N_f é a quantidade adsorvida no equilíbrio e K_1 é a constante de velocidade de adsorção.

A equação linearizada para este modelo é representado pela Equação 2.

$$\log(N_f - N_{f(t)}) = \log N_f - \frac{K_1}{2.303} t \quad \text{Equação 2}$$

2.3.1.2. Equação de pseudo-segunda ordem

O modelo de pseudo-segunda ordem também é baseado na capacidade de adsorção do sólido. Neste modelo a taxa de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao quadrado do número de sítios desocupados [32]. A equação original do modelo de pseudo-segunda ordem é representada pela Equação 3.

$$N_{f(t)} = \frac{K_2 N_f^2 t}{1 + N_f K_2 t} \quad \text{Equação 3}$$

Em que: K_2 é a constante de velocidade do modelo de pseudo-segunda ordem. Para este modelo a forma linearizada é admitida pela equação 4.

$$\frac{t}{N_{f(t)}} = \frac{1}{K_2 N_f^2} + \frac{t}{N_f} \quad \text{Equação 4}$$

A constante K_2 e o número de mols adsorvidos no equilíbrio, N_f , são utilizados para calcular a velocidade de adsorção (h) inicial através da equação 5 [33].

$$h = K_2 N_f^2 \quad \text{Equação 5}$$

2.3.1.3. Difusão intra-partícula (Modelo Weber-Morris)

Em alguns casos a adsorção de soluto varia quase proporcionalmente com $t^{1/2}$ ao invés de com o tempo de contato t . A equação linearizada para este modelo é representada pela Equação 6 [34].

$$N_{f(t)} = K_i \sqrt{t} \quad \text{Equação 6}$$

Em que: K_i é a constante de velocidade do modelo de difusão intra-partícula.

2.3.2. Isoterma de Adsorção

A eficiência no processo de adsorção é determinada através das isotermas de adsorção, ou seja, a isoterma é a principal fonte de informação do processo e é baseada na relação de equilíbrio entre a quantidade de material adsorvido e concentração da solução a uma determinada temperatura [35].

Para estipular a correlação mais apropriada para as curvas de equilíbrio os modelos de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich são os mais utilizados.

2.3.2.1. Isoterma de Langmuir

O modelo de Langmuir assume a formação de uma monocamada na superfície externa do adsorvente, ou seja, a distribuição do adsorvato ocorre em sítios específicos e homogêneos na superfície do adsorvente sendo que em cada sítio é capaz de adsorver apenas um átomo ou molécula, não podendo ocorrer nenhuma adsorção adicional. O modelo de Langmuir pode ser escrito na forma da Equação 7 [36]:

$$N_f = \frac{N^s K_L C_s}{1 + K_L C_s} \quad \text{Equação 7}$$

Onde N^s é o valor de máxima adsorção, C_s é a concentração final da solução, N_f é o número de mols fixos, K_L é uma constante relacionada à constante de Langmuir do processo sólido-líquido.

Uma característica da isoterma de Langmuir é o fator de separação, (R_L), representado pela equação 8:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo C_0 a concentração inicial mais alta do metal [37]. Quando valores de $R_L > 1$ indicam que o processo é desfavorável, $R_L = 1$ indica uma isoterma linear,

$0 < R_L < 1$ indica que o processo é favorável e $R_L = 0$ indica que o processo é irreversível [36].

2.3.2.2. Isoterma de Freundlich

Ao contrário da isoterma de Langmuir, a isoterma de Freundlich descreve as propriedades da adsorção para sistemas com superfície heterogênea, onde ocorre adsorção em multicamadas com interação entre as moléculas de adsorbato. O modelo é representado pela equação 9 [36]:

$$N_f = K_F C_s^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 9}$$

Em que: N_f é a quantidade de adsorbato retido no sólido; C_s é a concentração final da solução; K_F e n são constantes. Sendo que, quanto maior o valor de n , maior é a heterogeneidade dos sítios disponíveis para adsorção [38]. A adsorção é considerada favorável quando n encontra-se na faixa entre 2 e 10 [37].

2.3.2.3. Isoterma de Dubinin-Radushkevich (D-R)

O modelo D-R caracteriza os poros do adsorvente e propõe a energia livre de adsorção. Através do ajuste dos dados experimentais a este modelo é possível dizer se a adsorção que ocorre no sistema é de natureza física ou química. A equação original é representada pela equação 10 [39-40].

$$N_f = K_{DR} \exp(-B\varepsilon^2) \quad \text{Equação 10}$$

Em que: K_{DR} é a constante de Dubinin-Radushkevich; ε é o potencial de Polanyi e B é a constante energética.

O potencial de Polanyi é o produto da diferença entre a energia livre na fase adsorvida e na fase líquida e é representado de acordo com a equação 11.

$$\varepsilon = RT \ln\left(1 + \frac{1}{c_s}\right) \quad \text{Equação 11}$$

Em que: R é a constante dos gases ($8,314 \text{ JK}^{-1}$); T é a temperatura em Kelvin e C_e é concentração no equilíbrio. Aplicando um logaritmo natural à equação 10, obtêm-se uma relação linear entre o número de mols adsorvidos por grama de adsorvente e o potencial de Polanyi, representado pela equação 12 [39].

$$\ln N_f = \ln K_{DR} - B\varepsilon^2 \quad \text{Equação 12}$$

Traçando o gráfico de $\ln N_f$ versus ε^2 é possível obter uma reta. O coeficiente linear e angular desta reta corresponde respectivamente aos valores de K_{DR} e B. A constante B relaciona-se com o valor de E através da equação 13. Nesta equação é considerada a variação de energia livre quando um mol de soluto é transferido da solução para a superfície do adsorvente [39].

$$E = \sqrt{\frac{1}{2B}} \quad \text{Equação 13}$$

O valor de E, energia aparente de adsorção, calculado através da isoterma D-R, indicará se a interação entre adsorvente e adsorvato é física ou química. Quando a energia aparente de adsorção, encontra-se na faixa de $1-8 \text{ KJmol}^{-1}$, a adsorção é considerada física. Para a adsorção química o valor de E raramente é menor que 8 KJ mol^{-1} [40].

2.3.3. Quitosana como material adsorvente

Diversos trabalhos utilizam quitosana como material bioadsorvente na remoção de íons metálicos, pois este biopolímero é abundante na natureza e uma alternativa economicamente viável. Porém, apresenta algumas desvantagens no quesito de instabilidade ácida e térmica o que implica em baixa capacidade de adsorção. Uma alternativa para melhorar a capacidade de remoção de metais desse polímero é a modificação física pela conversão do pó

de quitosana em gel para posterior formação de microesferas, filmes ou nanopartículas acarretando em um aumento de sua porosidade e área superficial [41], além de facilitar a separação após o processo.

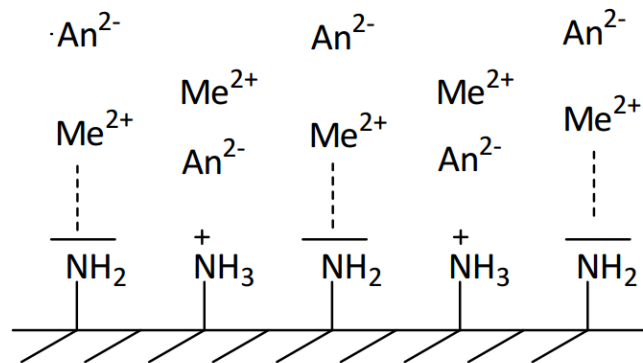
Além das modificações físicas realizadas com a finalidade de melhorar a adsorção, alguns reagentes de reticulação, tais como glutaraldeído, glioxal, formaldeído, epícloridrina e isocianatos, são utilizados com o intuito de melhorar propriedades mecânicas e eliminar problemas de solubilidade da quitosana [42].

O potencial adsorvente da quitosana se dá pelos grupos funcionais reativos, hidroxila e grupo amina. Os pares de elétrons livres dos átomos de O e N são responsáveis pela capacidade de adsorção da quitosana, onde os mesmos podem ser positivamente carregados se prótons suficientes estão presentes em solução ou carregados negativamente quando em condições básicas [43].

Vários parâmetros podem influenciar no processo de adsorção de íons metálicos pela quitosana, tais como: grau de desacetilação, peso molecular do polímero, pH, concentração dos íons metálicos, e a composição da solução [44].

Em soluções com baixos valores de pH, a quitosana atua como uma resina de troca aniônica devido à protonação do seus grupos aminos. Exemplos de ânions metálicos que podem interagir eletrostaticamente com a carga positiva dos grupos NH_3^+ são os íons arsenato e cromato. À medida que o pH aumenta, a carga positiva da superfície do polímero diminui, ocasionando formação de complexos quelatos entre os cátions metálicos e o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio, esquema da interação entre cátions e ânions metálicos está representado na Figura 5 [44].

Figura 5: Esquema representativo do mecanismo de adsorção de cátions e ânions metálicos sobre a quitosana por formação de complexos de quelatos e interação eletrostática, respectivamente.

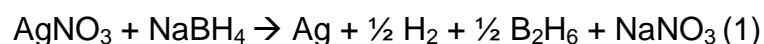


Fonte: Mende, M. et. al.; 2016 [44].

2.4. Síntese de nanopartículas de prata

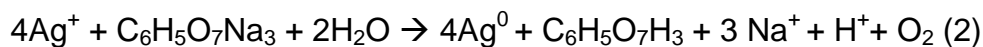
Com a nanotecnologia foi possível constatar que a cada tamanho um mesmo material pode apresentar características físicas e químicas distintas, sendo as nanopartículas de prata um material de grande interesse devido às suas propriedades como boa condutividade, elevado efeito catalítico, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana [45].

Vários métodos têm sido utilizados para sintetizar e estabilizar as nanopartículas de prata. O método mais simples e mais comum utilizado para formação de nanopartículas de metal é a redução química de sais metálicos. O processo envolve a redução de um sal iônico na presença de agentes redutores [46]. Um precursor de prata bastante utilizado é o nitrato de prata que pode ser reduzido por agentes redutores como borohidreto de sódio e citrato de sódio conforme as reações 1 e 2, respectivamente.



As nanopartículas de prata produzidas por este método possuem tamanho entre 5 a 20 nm de diâmetro e banda de maior absorvância na faixa entre 380 – 400 nm do UV-vís. Contudo, a redução com citrato de sódio

proporciona partículas com diâmetro maiores e na faixa de 50-100 nm e absorvência máxima no comprimento de onda de 420 nm [47].



Contudo, o uso do citrato de sódio como redutor é devido a sua baixa toxicidade e relativa facilidade de obtenção.

Outro método para formação de nanopartículas de prata é a síntese verde. Um processo sustentável, pois utiliza agente redutor benigno e estabilizador atóxico. Na formação de nanopartículas, utiliza-se um estabilizador para controlar a formação e estabilidade à dispersão das nanopartículas metálicas. Para tal finalidade, os polímeros têm sido amplamente utilizados, pois são capazes de controlar o crescimento, estabilizar as dispersões metálicas e limitar o tamanho da partícula [48].

A quitosana é um biopolímero com potencial para atuar no processo de síntese de nanopartículas, pois o excesso de amina e grupos hidroxila presentes apoiam a nucleação assim como a estabilização dos NpsAg. Isto é, As NpsAg adsorvidas na superfície do polímero são impedidos de agregação adicional [49].

2.4.1. Ação bactericida do nanocompósito Cts/NPsAg

Novas cepas de bactérias resistentes aos atuais antibióticos estão se desenvolvendo e isso é um grave problema. Portanto, há um grande incentivo para desenvolver novos bactericida o que oferece uma oportunidade para as pesquisas nessa área [50].

Com o desenvolvimento da resistência aos antibióticos as empresas farmacêuticas e pesquisadores estão à procura de novos agentes antibacterianos. A prata tem sido utilizada como agente antibacteriano durante séculos e nessa situação, materiais em nanoescala surgiram, como novos agentes antibacterianos, devido à sua elevada área superficial em relação ao volume e às propriedades físicas e químicas peculiares [51].

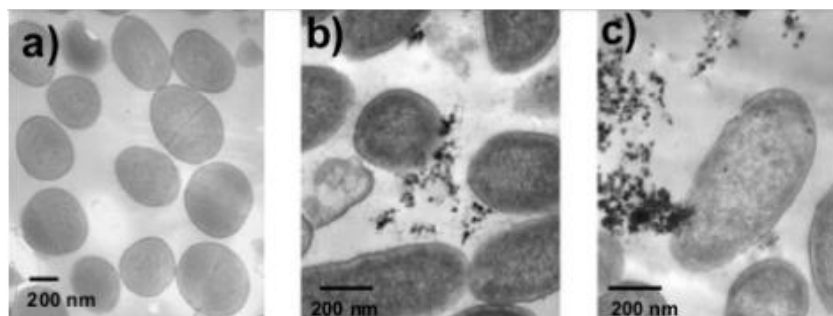
Além de ser utilizada na preparação de nanopartículas de prata, como agente redutor ou como estabilizador, a quitosana também apresenta

características antibacterianas [52]. O nanocompósito formado pela junção do biopolímero às nanopartículas de prata tem potencial para atuar como um novo agente bactericida.

O mecanismo proposto para a ação antibacteriana do nanocompósito, Figura 6, é a ruptura da membrana celular seguida de ligação ao DNA com consequente inibição da sua replicação [6].

Figura 6: Ação das nanopartículas de prata contra amostras de *P. aeruginosa*.

(a) Controle; (b) e (c) Tratadas com nanopartículas de prata.



Fonte: Morones, J. R. et al., 2005 [50].

As nanopartículas de prata podem ser visualizadas dentro da bactéria. E danos visíveis na membrana celular podem ser vistos quando comparados com a amostra de controle.

A diferença estrutural das membranas das bactérias permite uma classificação geral delas como Gram-negativas ou Gram-positivas. Essa diferença estrutural está na organização dos peptidoglicanos um componente da membrana celular. As bactérias gram-negativas exibem uma fina camada de peptidoglicano, aproximadamente 2 a 3 nm, entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Já as bactérias gram-positivas apresenta uma camada de peptidoglicano de cerca de 30 nm de espessura [50].

Obviamente, o peptidoglicano nas paredes celulares das células Gram-positivas é muito mais espesso do que nas Gram-negativas. A parede celular mais espessa de organismos Gram-positivos é de imensa importância prática para proteger a célula da penetração de íons de prata no citoplasma [53].

Tendo em vista o comportamento da quitosana em conjunto com as nanopartículas de prata e o seu potencial como matriz para adsorção e liberação controlada de fármaco foi possível traçar alguns objetivos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Sintetizar filmes e microesferas de quitosana como suporte para nanopartículas de prata e avaliar seu efeito bactericida e carreador de fármaco para processo de liberação controlada de ibuprofeno.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar e definir níveis de purificação e desacetilação da quitosana;
- Obter filmes e microesferas de quitosana;
- Avaliar o desempenho das microesferas no processo de adsorção de íons prata
- Incorporar nanopartículas de prata e ibuprofeno aos filmes e microesferas obtidos;
- Avaliar a capacidade bactericida do polímero, com e sem nanopartículas de prata;
- Avaliar o potencial dos polímeros na forma de microesferas e filmes como matrizes de liberação de ibuprofeno.

4. Metodologia

4.1. Reagente utilizados

Os reagentes utilizados no presente trabalho são descritos na tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos reagentes utilizados

Reagente	Fórmula Molecular	Fabricante	Pureza
Ácido acético	CH ₃ COOH	Dinâmica	99,7%
Ácido clorídrico	HCl	Neon	37,0%
Ácido nítrico	HNO ₃	Dinâmica	65,0%
Epicloridrina	C ₃ H ₅ ClO	Aldrich	99,8%
PVP	(C ₆ H ₉ NO) _x	Aldrich	NE*
Quitosana	--	Polymar	NE*
Hidróxido de sódio	NaOH	Alphatec	99,0%
Cloreto de sódio	NaCl	Neon	99,0%
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Aldrich	98,0%
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄	Dinâmica	99%
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	Ecibra	NE*
Nitrato de prata	AgNO ₃	Cennabras	99,8%

*NE = Não especificada pelo fabricante

4.2. Purificação da quitosana

Para a etapa de purificação, cada 1,0 g de quitosana (Polymar) foi solubilizada em 300 mL de solução de ácido acético 3% (m/v) sendo a suspensão obtida mantida sob agitação constante por um período de 24h à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada em um filtro de membrana milipore e tratada com solução de NaOH 10% (m/v) para precipitação da forma neutralizada de quitosana. A separação do sobrenadante foi realizada por centrifugação. Posteriormente, o precipitado foi lavado até a neutralidade das águas de lavagem [54].

4.2.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho da quitosana

A fim de se determinar o grau de desacetilação da quitosana foi realizada a análise de espectroscopia no infravermelho. Para tal medida utilizou-se um espectro. Os materiais obtidos foram analisados em um espectrofotômetro Bomen Hartmann & Braun (MB-Series), usando pastilhas de KBr contendo aproximadamente 1% em massa do material estudado, com uma resolução de 4 cm^{-1} e com 32 varreduras consecutivas.

4.3. Formação dos filmes de quitosana puros e com nanopartículas de prata

A preparação dos filmes com nanopartículas de prata foi realizada em diferentes concentrações do metal. Misturou-se 4 ml de soluções de AgNO_3 , em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 25 e 52 mmol L^{-1}), com 10 mL de uma solução de quitosana (7 mg mL^{-1}) dissolvida em solução de ácido acético 5% e mantidos em agitação até completa homogeneização. A mistura obtida foi transferida para uma placa de Petri e deixada em repouso durante 12 h a 95°C [7]. Para a formação dos filmes puros o mesmo procedimento foi tomado, porém na ausência de solução de AgNO_3 .

Após a secagem, solução de NaOH 1M foi depositada sobre os filmes por 2h, para a completa remoção de resíduos ácidos e retirada do filme da

superfície. Os filmes foram lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente [55].

4.3.1. Análise colorimétrica dos filmes de quitosana

Com o intuito de determinar a cor complementar característica de nanopartículas de prata foi utilizado um Colorímetro CHROMA METER modelo CR-400 – Konita Minolta.. acoplado a um processador de dados.

4.4. Formação das microesferas porosas

A fim de obter uma solução polimérica 5% (m/v), uma mistura de quitosana e PVP (1:1) foi solubilizada em solução de ácido acético $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com epicloridrina (0,3 % m/v) e deixada sob agitação magnética por 24h. Após esse período a solução viscosa obtida foi transferida para uma bureta e gotejada, com o auxílio de uma ponteira de micropipeta, em uma solução 2 Mol L^{-1} de NaOH para a formação das microesferas. As microesferas sintetizadas foram lavadas com água até atingir $\text{pH} \sim 7$ e submersas em água destilada a uma temperatura de 80°C , onde foram mantidas sob leve agitação por um período de seis horas para remoção do PVP [56], responsável por fornecer maior porosidade às microesferas.

4.4.1. Análise das microesferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EED).

A microscopia eletrônica de varredura é uma importante técnica utilizada para análise microestrutural de sólidos. Quando acoplado a um Espectrômetro de energia dispersiva (EDS) a microscopia eletrônica permite a análise elementar das amostras. Neste trabalho as amostras foram suportadas em fitas de carbono e metalizadas com ouro numa metalizadora Quorum Q150RES, por 30s utilizando uma corrente de 20 mA. As imagens foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura FEI Instruments, modelo Quanta FEG 250, utilizando elétrons retroespalhados.

4.5. Determinação do pH no ponto de carga zero

O pH_{pcz} foi determinado para o polímero tanto na forma de microesfera como em formato de filme. Para isso utilizou-se aproximadamente 0,1g de filme e 0,1g de microesferas úmidas de quitosana. Os sólidos foram deixados em contato com 50 mL de solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹ sob 10 diferentes valores de pH inicial (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12) ajustados com soluções de HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹. Após 24 h sob agitação constante a 120 rpm e 25°C, os filmes e as microesferas foram retirados e o pH final da solução anotado. O valor do pH_{pcz} corresponde à faixa onde o pH final permanece constante independente do valor de pH inicial [57].

4.6. Influência do pH na adsorção dos íons metálicos em microesferas de quitosana

Para verificar a influência do pH na adsorção dos íons metálicos, amostras de, aproximadamente, 0,1g de microesferas foram transferidas para recipientes de polietileno contendo 25 ml de solução de AgNO₃ 1 mmol L⁻¹ em diferentes valores de pH. Estes valores foram controlados pela adição de quantidades adequadas de HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ ou NaOH 0,1 mol L⁻¹, ajustando os valores de pH inicial em 4, 5, 6, 7 e 8 [23]. As suspensões obtidas foram mantidas em agitação numa mesa agitadora a 120 rpm por um período de 24h. Em seguida o material polimérico foi retirado e a quantidade de íons Ag⁺ no sobrenadante quantificada utilizando espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis no comprimento de onda de 198 nm.

4.7. Cinética de adsorção em microesferas

Em 15 frascos de polietileno foram adicionadas 25 mL de uma solução de nitrato de prata na concentração 1x10⁻³ mol L⁻¹. Adicionou-se a estas soluções aproximadamente 0,1g microesferas úmidas. Os frascos foram colocados a uma mesa agitadora com velocidade de 120 rpm pelo período de 24 horas. Em diferentes intervalos de tempo um frasco era retirado e o material

adsorvente utilizado era removido [58]. A concentração da solução resultante foi determinada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.

4.8. Isoterma de Concentração

Para a construção da isoterma de concentração utilizou-se frascos de polietileno com aproximadamente 0,1g microesferas úmidas e 25 mL de solução de prata em 13 diferentes concentrações [58]. Os valores de concentração e temperatura encontram-se na Tabela 3. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 3: Concentrações de AgNO_3 utilizadas na isoterma de adsorção a 25° C

Amostra	1	2	3	4	5	6	7
Concentração (mol L ⁻¹)	1×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}	4×10^{-4}	5×10^{-4}	8×10^{-4}	1×10^{-3}
Amostra	8	9	10	11	12	13	
Concentração (mol L ⁻¹)	$1,5 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	3×10^{-3}	$3,5 \times 10^{-3}$	4×10^{-3}	

As misturas foram agitadas numa mesa agitadora pelo período de 24 horas. O sobrenadante foi analisado utilizando a espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. O número de mols adsorvido por grama de material adsorvente (N_f) foi calculado aplicando a Equação 14.

$$N_f = \left(\frac{N_i - N_s}{m} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Em que: N_i é o número de mols inicial; N_s é a quantidade de mols presente na solução sobrenadante e m é a massa pesada de adsorvente após a secagem.

Os resultados obtidos foram ajustados aos modelos de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich, para avaliar qual modelo explica melhor o sistema estudado.

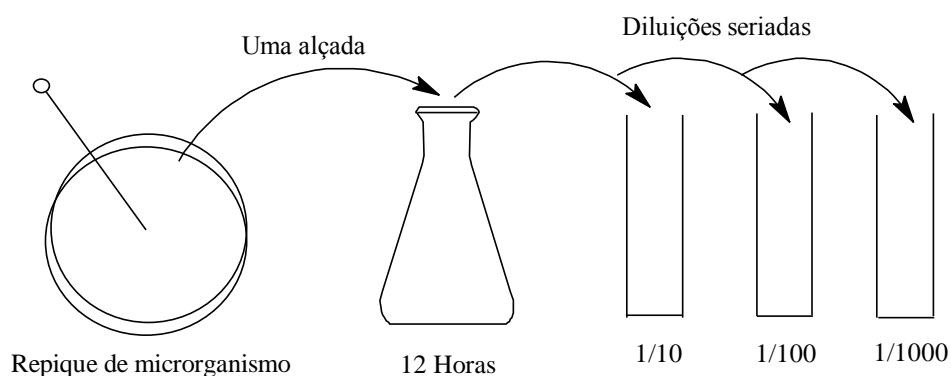
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes e microesferas

A atividade antibacteriana *in vitro* dos materiais carregados com nanopartículas de prata foi avaliada por meio do teste de disco-difusão utilizando repiques de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, gentilmente cedidos pelos laboratórios do Campus de Gurupi, Labvac e Labap, respectivamente.

4.9.1. Preparo da suspensão do microrganismo

Com o auxílio de uma alça bacteriológica algumas colônias de cada microrganismo, inicialmente em placas com ágar, foram coletadas e incubadas em 125 mL de meio de cultura Luria Bertani por 12 horas à temperatura de 37°C e em agitação de 180 rpm. Terminado o período de incubação, 0,1 mL de cada suspensão foi diluída, repetidamente, em 0,9 mL de solução salina, até atingir a diluição 1/1000 [58]. O procedimento pode ser resumido conforme a Figura 7.

Figura 7: Processo realizado na suspensão de *E.coli* e *S. aureus*



4.9.2. Teste do disco-difusão

O teste realizado trata-se de uma técnica baseada na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano suportado no biomaterial. O agente antimicrobiano quando se difunde leva à formação de um halo de inibição do

crescimento bacteriano [59]. Para tal, placas de Petri foram preparadas em triplicata e após a solidificação do meio de cultura, LB, 0,1 ml da suspensão de microrganismo na diluição 1/1000 foi inoculada com o auxílio da alça de Drigalski.

Os filmes preparados em diferentes concentrações, conforme procedimento descrito no item 4.3, foram cortados em círculos de 6 mm de diâmetro e esterilizados em câmara com lâmpada de UV por 15 minutos. Em seguida, os sete pedaços de filmes, sendo um controle, foram dispostos de modo asséptico nas placas de Petri previamente inoculadas com as bactérias. As placas então preparadas foram incubadas por 72 horas à 37°C [60].

As microesferas utilizadas no teste do halo correspondem ao produto final da adsorção de prata nas concentrações referentes aos pontos 1, 4 e 8 da isoterma, conforme procedimento descrito no item 4.8. Depois da adsorção do precursor de íons metálicos, o substrato foi seco à temperatura ambiente e posteriormente imerso numa solução de 0,01% de citrato de sódio durante 30 minutos [61]. Após secagem, foi pesado aproximadamente 12 mg de microesferas de cada concentração, sendo estas colocadas juntas de modo asséptico nas placas de Petri previamente inoculadas com as bactérias. As placas então preparadas foram incubadas por 72 horas à 37°C.

4.10. Aplicação dos biomateriais no processo de carregamento e liberação controlada de fármaco

Os filmes e microesferas de quitosana também foram avaliados como matrizes para o transporte e liberação de ibuprofeno [62].

4.10.1. Carregamento do fármaco em microesferas de quitosana puras

A quitosana na forma de microesfera foi carregada com ibuprofeno pelo método de evaporação do solvente. Inicialmente, 200 mg de ibuprofeno foram dissolvidos em 4 ml de etanol. Em seguida, essa solução foi adicionada a 4g de esferas úmidas. A suspensão foi agitada por 12 horas e após esse tempo o material foi colocado em estufa a 60°C até a total evaporação do solvente.

4.10.2. Carregamento do fármaco em microesferas de quitosana com nanopartículas de prata

Após o processo de adsorção de íons Ag^+ , realizado em solução 1×10^{-4} mol L^{-1} de AgNO_3 , 4 g de microesferas ainda úmidas foram pesadas e colocadas em contato com 200 mg de ibuprofeno dissolvidos em 4 ml de etanol. Essa mistura foi mantida em agitação por 12 horas e após esse período seguiu-se para a estufa onde permaneceu por mais 12 horas à 95°C , para a formação das nanopartículas de prata, e então o material foi lavado e seco à temperatura ambiente.

4.10.3. Carregamento do fármaco nos filmes de quitosana puros

O carregamento de ibuprofeno nos filmes foi realizado numa única etapa, durante a formação dos filmes. Para isso, pesou-se 88 mg de fármaco que foram dissolvidos em 4 ml de etanol. Em seguida, a essa solução foi adicionado 10 ml de uma preparação de quitosana solubilizada em ácido acético 5% (7 mg mL^{-1}) e 0,2 ml de epicloridrina, a mistura foi mantida em agitação até a homogeneidade e então vertida sobre uma placa de Petri e seca à temperatura de 35°C até completa evaporação do solvente. Finalmente, o filme foi deixado em contato com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até o destacamento, depois lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente.

4.10.4. Carregamento do fármaco nos filmes de quitosana com nanopartículas de prata

A formação do filme, bem como seu carregamento com nanopartículas de prata e fármaco foram realizados em etapa única. Logo, 88 mg de ibuprofeno foram pesados e solubilizados em 4 ml de etanol. Em seguida, a essa solução misturou-se 10 ml de quitosana previamente solubilizada em ácido acético 5% (7 mg mL^{-1}), 4 ml de solução de AgNO_3 5 mM e 0,2 mL de epicloridrina. A solução resultante foi mantida em agitação até a completa homogeneização e posteriormente vertida sobre uma placa de Petri e seca à 95°C durante 12 horas para formação das nanopartículas de prata. Por fim, o

filme foi deixado em contato com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até o destacamento, em seguida lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente.

4.10.5. Quantificação do total de fármaco incorporado nos biopolímeros

Para determinar a quantidade de ibuprofeno presente nas microesferas de quitosana puras e impregnadas com nanopartículas de prata e nos filmes puros e impregnados com nanopartículas de prata, uma porção de cada material foi pesada, triturada, solubilizada em etanol e mantida em agitação de 150 rpm por 12 horas, para que ocorresse a solubilização do fármaco. Para todos os materiais, o sobrenadante foi analisado por espectroscopia eletrônica no comprimento de onda de 203 nm.

4.10.6. Preparação dos fluidos simulados

Para determinação da quantidade de fármaco liberada no organismo dois tipos de fluidos foram simulados: o fluido gástrico simulado (FGS) e o fluido intestinal simulado (FIS).

O FGS consiste numa solução de HCl com $\text{pH} = 1,2$ e o FIS é obtido por meio de uma solução tampão fosfato com $\text{pH} = 7,4$. Para o preparo da solução tampão fosfato foram pesados 3,9 g de NaCl, 11,54 g de NaH_2PO_4 e 11,62 g de K_2HPO_4 , todos solubilizados em água destilada na quantidade suficiente para 1 L de solução.

4.10.7. Liberação do fármaco nos fluidos simulados

Na avaliação da liberação *in vitro* do ibuprofeno, 150 mg de microesferas carregadas com o fármaco, com e sem a presença de nanopartículas de prata, foram colocadas em contato com 25 mL de solução de FGS a uma temperatura de 37°C , sob agitação de 150 rpm, por 2 horas. Em seguida o material foi filtrado e colocado em contato com solução de FIS nas mesmas condições anteriores por um período de 7 horas.

Para os filmes carregados com o fármaco, puros e com nanopartículas de prata, uma porção de 40 mg foi pesada e colocada apenas em contato da solução de FIS por um período de 6 horas, em agitação de 150 rpm, a uma temperatura de 37°C. Em ambos os casos, durante todo o processo, em determinados intervalos de tempo, alíquotas de 3 mL dos fluidos eram retiradas para quantificar a concentração de ibuprofeno presente nos fluidos, o mesmo volume retirado era repostado a fim de manter o volume inicial. As amostras obtidas foram quantificadas por espectroscopia na região do UV-Vís no comprimento de onda de 203 nm.

Um método corrigido foi utilizado para calcular a quantidade real de ibuprofeno liberada no fluido [63]. O cálculo é baseado conforme equação 15.

$$C_{t-corr} = C_t + \frac{v}{V} \sum_0^{t-1} C_t \quad \text{Equação 15}$$

Onde C_{t-corr} é a concentração real de ibuprofeno liberada no tempo t ; C_t é a concentração de ibuprofeno no instante t medida no UV / Vís, v é o volume amostrado tomado a um intervalo de tempo determinado, e V é o volume total de fluido de liberação.

4.10.8. Liberação de prata nos fluidos simulados

A fim de determinar se há liberação de prata nos fluidos simulados, os materiais obtidos, ausentes de ibuprofeno, foram submersos em FGS e FIS nas mesmas condições anteriores de tempo e então as amostras foram quantificadas por espectroscopia na região do UV-Vis no comprimento de onda de 212 nm.

4.10.9. Taxa de intumescimento

Com intuito de determinar o grau de intumescimento dos materiais, os polímeros puros foram preparados no formato de filme e microesferas. Após secagem, uma quantidade determinada de cada biopolímero, foi colocada em contato com 5 mL de solução de FGS nas duas primeiras horas e

posteriormente imersos em solução de FIS por mais 3 horas e mantidos em agitação constante de 100 rpm, no caso das microesferas. Para os filmes, uma determinada quantidade do material ficou em contato com 5 mL somente de fluido intestinal simulado e mantido em agitação de 100 rpm por 5 horas.

Em determinado intervalo de tempo os materiais eram retirados, o excesso de água extraído com auxílio de papel filtro e posteriormente pesado. A taxa de intumescimento (TI) foi definida através da Equação 16:

$$TI = \frac{m_t - m_i}{m_i} \quad \text{Equação 16}$$

Onde: m_t e m_i correspondem às massas em um determinado tempo t e inicial, de cada material, respectivamente.

5. Resultados e Discussão

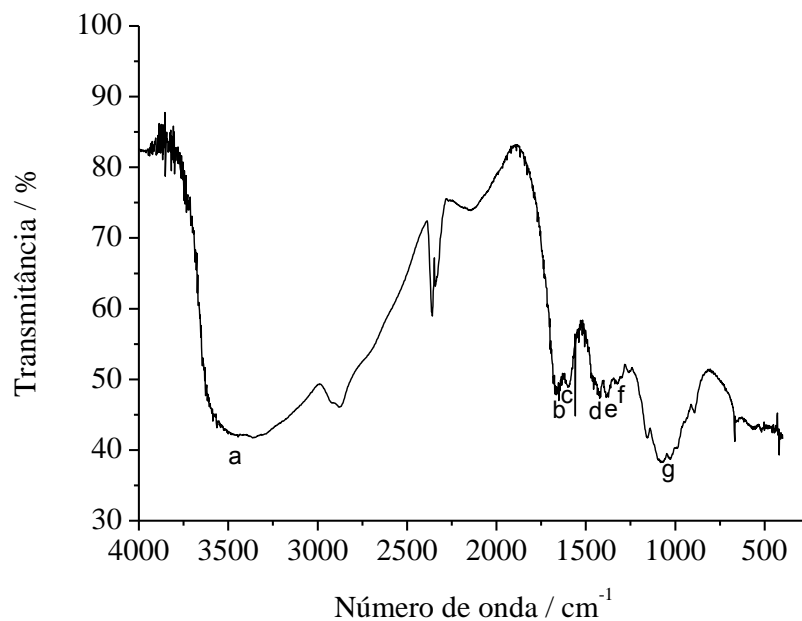
5.1. Purificação da quitosana

A etapa de purificação da quitosana é realizada de modo a eliminar o material suspenso presente logo após a dissolução do polímero em ácido acético, trazendo mais confiabilidade aos resultados, uma vez que grande parte dos interferentes é eliminada.

Para a escolha do método de purificação algumas características devem ser consideradas, tais como: o rendimento do processo, grau de pureza e solubilidade do polímero [64]. O rendimento obtido da etapa de purificação da quitosana foi satisfatório e correspondente a 93%.

5.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho da quitosana

O espectro de infravermelho, representado na Figura 8, revelou bandas característica do polímero quitosana. As principais bandas referentes à quitosana observadas no espectro de infravermelho (IV) foram: (a) banda de estiramento de OH entre 3440 a 3480 cm^{-1} , banda esta que parece sobreposta à banda de estiramento N-H; (b) deformação de C = O de amida I (entre 1661 a 1671 cm^{-1}); (c) deformação de N-H (entre 1583 a 1594 cm^{-1}); (d) deformação de -CN de amida (por volta de 1425 cm^{-1}); (e) deformação simétrica de CH_3 (entre 1380 a 1383 cm^{-1}); (f) deformação de -CN de grupos amino (entre 1308 a 1380 cm^{-1}) e (g) bandas características de estruturas polissacarídicas na região de 890–1156 cm^{-1} [65].

Figura 8: Espectro obtido por FT-IR da quitosana pura

Geralmente, as bandas que se referem ao polímero quitosana são muito semelhantes, pois todas apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais. O grau de acetilação foi determinado conforme equação 17:

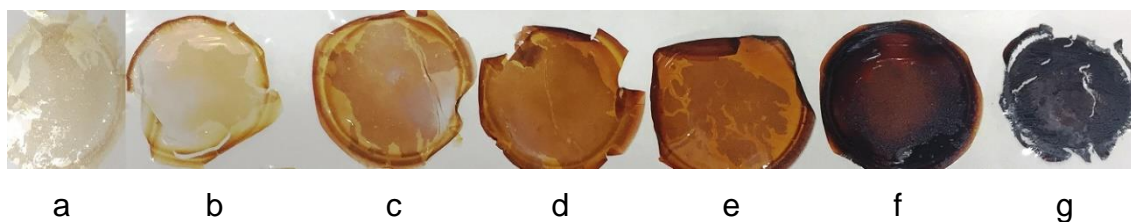
$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.03133 GA \quad \text{Equação 17}$$

Onde A_{1320} e A_{1420} são os valores das absorvâncias para as bandas de infravermelho localizadas em 1320 e 1420 cm^{-1} [66]. Com o grau de acetilação determinado assumiu-se que o grau de desacetilação (GD) do polímero utilizado no trabalho é de 81%.

5.3. Preparo dos filmes de quitosana

Filmes de quitosana puros e com prata foram preparados sendo as nanopartículas de prata sintetizadas em conjunto com os filmes numa única etapa, proporcionando, assim, um produto final com alta homogeneidade, conforme pode ser verificado na Figura 9.

Figura 9: Imagem fotográfica dos filmes de quitosana obtidos, sendo o filme de quitosana pura (a) e os filmes de quitosana com as seguintes concentrações de prata: 0,5 (b), 1,0 (c), 2,0 (d), 5,0 (e), 25 (f) e 52 (g) mmol L^{-1} .



Como resultado foram obtidos sete filmes, sendo o filme (a) puro e os demais obtidos em diferentes concentração de nanopartículas de prata. Pode-se observar que conforme a concentração de nanopartículas de prata aumenta os filmes de quitosana perdem sua integridade o que pode ser explicado pelo fato da quitosana também agir como agente redutor de prata e assim oxidar. Além disso, com o aumento da concentração de nanopartículas de prata os filmes escurecem, passando de uma coloração amarela, cor complementar característica de nanopartículas de prata, para uma coloração preta, correspondente à prata em escala macroscópica, essa coloração foi caracterizada com auxílio de um colorímetro.

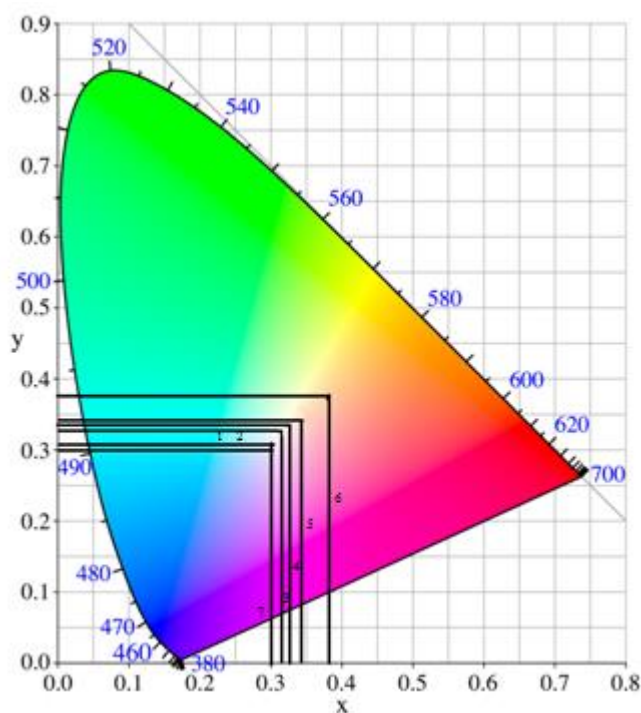
5.4. Análise colorimétrica dos filmes de quitosana

Os filmes com nanopartículas de prata foram analisados em um colorímetro, uma vez que a cor produzida pelas nanopartículas de prata, bem como suas propriedades, dependem de seu diâmetro e forma. A coloração apresentada pelos filmes pode ser interpretada por meio de um diagrama de cromaticidade (Figura 10).

As bandas de energia responsáveis pelas propriedades dos metais alteram seu comportamento quando esses materiais se encontram em tamanhos distintos. Em escala nanométrica os raios das partículas são menores que o comprimento de onda da radiação Uv-vís incidida sobre elas e isso causa uma oscilação coletiva dos elétrons formando dipolos elétricos pelo carregamento da superfície. Esse efeito resulta em um comprimento de onda específico que origina a banda plasmons de superfície [67].

As nanopartículas de prata apresentam banda de ressonância de plasmons em aproximadamente 400 nm e à medida que essas partículas aumentam em tamanho a banda se alarga e desloca-se para maiores comprimento de onda [67].

Figura 10: Diagrama de cromaticidade marcado com os valores obtidos para diversos filmes de quitosana com prata



A Figura 10 demonstra o comprimento de onda e a região onde se encontra as nanopartículas de prata conforme a coloração observada nos filmes obtidos. Em análise aos sete filmes o processador de dados do colorímetro disponibiliza valores de coordenadas x e y para cada material que ao serem identificados no diagrama de cromaticidade oferecem o comprimento de onda daquela região específica. O comprimento de onda de cada filme de acordo os pontos obtidos em cada coordenada está disposto na Tabela 4.

Tabela 4: Comprimento de onda da cor complementar dos filmes com nanopartículas de prata

Filme	1	2	3	4	5	6	7
Conc. de solução AgNO ₃ (mmol L ⁻¹)	0	0,5	1,0	2,0	5,0	25,0	52,0
Comprimento de onda / nm	575	576	580	583	581	561	485

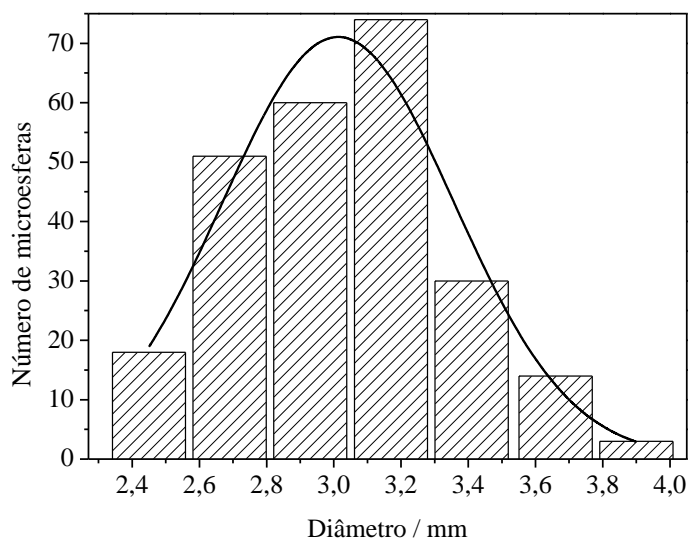
Observando os dados da Tabela 4, nota-se que a coloração dos filmes está próxima da região amarela, com exceção do filme 7, correspondente à concentração 52 mM de AgNO₃, pois conforme aumenta a concentração de AgNO₃ as partículas de prata se agregam e aumentam em tamanho, fazendo com que a coloração mude, passando da cor amarela, uma característica da prata em escala manométrica, até atingir uma coloração mais escura de menor comprimento de onda característica da prata em escala macroscópica [67].

5.5. Preparo das microesferas

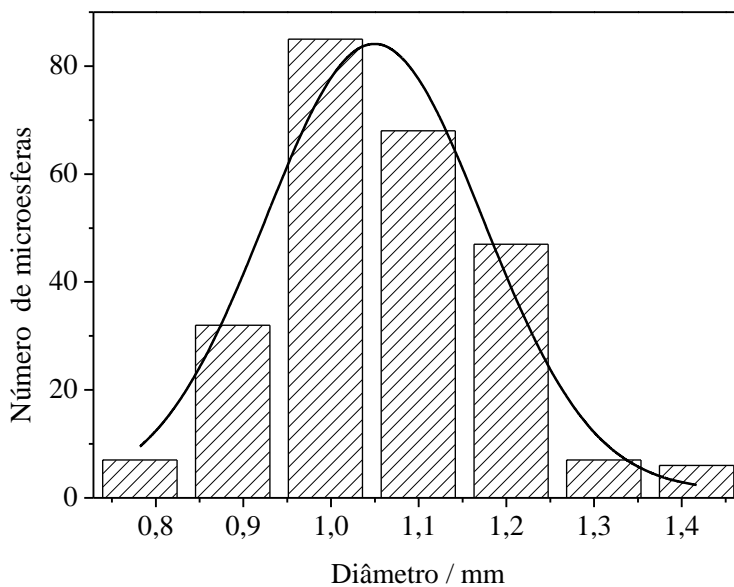
A quitosana é insolúvel em meio básico, porém, devido à protonação de seus grupos amino ($\text{-NH}_2 \rightarrow \text{-NH}_3^+$) ela torna-se solúvel em meio ácido [56]. Conseqüentemente, as microesferas de quitosana porosas podem ser preparadas através do gotejamento de uma solução viscosa de ácido acético com quitosana e PVP em um recipiente contendo solução básica.

Com a finalidade de proporcionar ao polímero uma maior resistência mecânica, foi aplicado no momento da dissolução da quitosana em meio ácido um volume de epícloridrina, ocasionando a reticulação das cadeias moleculares do material.

O gotejamento procedeu-se com o auxílio de uma ponteira de micropipeta com o intuito de proporcionar tamanho micro às esferas e manter a uniformidade das mesmas. As microesferas porosas de quitosana úmidas apresentaram diâmetro entre 2,4 a 3,9 mm (Figura 11) com valor médio de 2,911 ($\pm 0,325$) mm.

Figura 11: Diâmetro das microesferas porosas úmidas

Quando secas, as microesferas reduziram seu tamanho e apresentaram diâmetros entre 0,8 e 1,4 mm (Figura 12), com valor médio de 1,008 ($\pm 0,128$) mm.

Figura 12: Diâmetro das microesferas porosas secas

A Figura 13 apresenta imagens fotográficas das microesferas porosas obtidas, onde é possível perceber a diferença de diâmetro com a secagem.

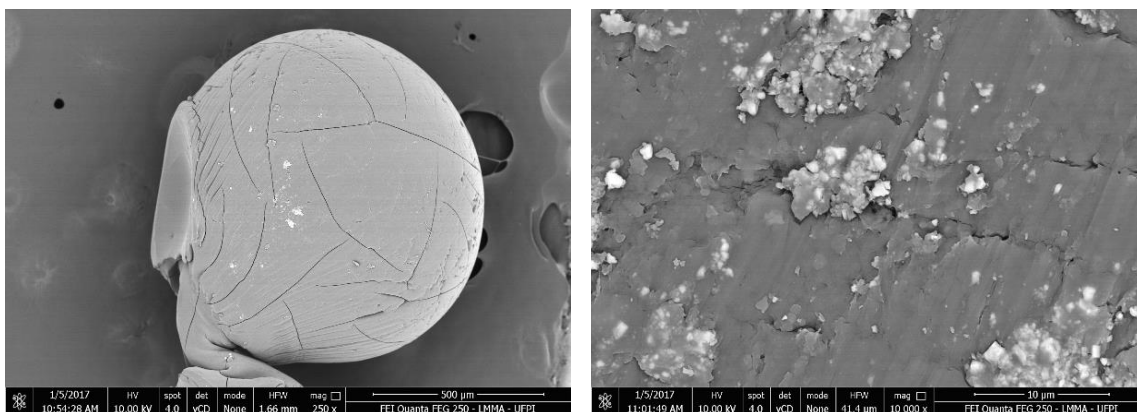
Figura 13: Microesferas de quitosana (a) úmida e (b) seca.



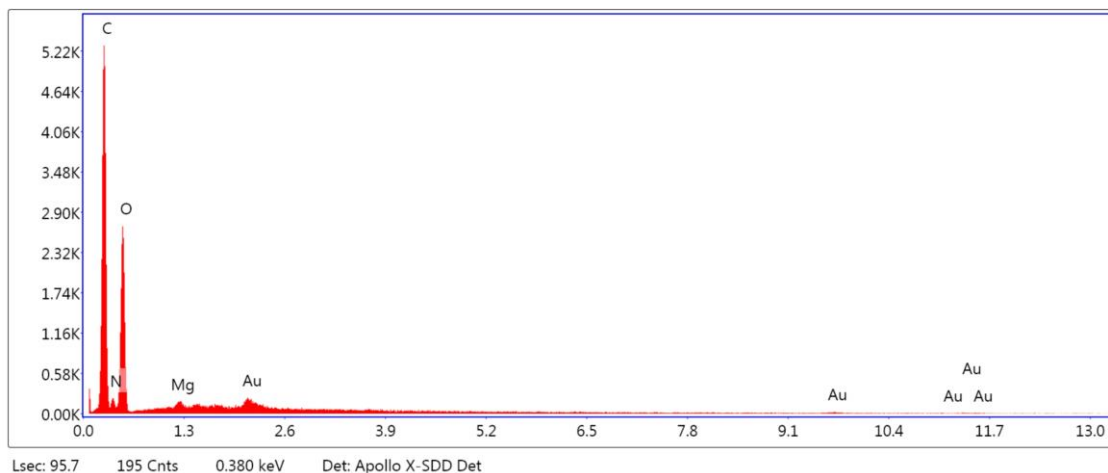
5.6. Análise das microesferas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EED)

O acoplamento destas duas técnicas facilita a determinação da composição química da amostra analisada. As imagens de MEV obtidas, bem como o espectro de EED para as microesferas de quitosana são apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microesferas de quitosana



Na Figura 14, pode-se observar que a microesfera de quitosana na sua superfície apresenta rugosidade e não assume uma forma esférica perfeita. Isto pode ser consequência do processo de formação da amostra.

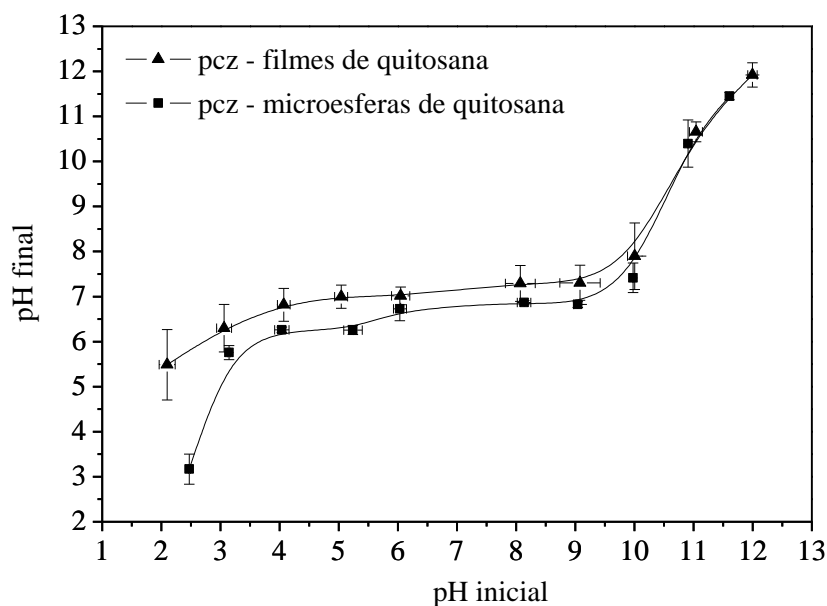
Figura 15: Espectro de EED das microesferas de quitosana

Através do espectro de EED, representado pela Figura 15, foi possível quantificar os elementos presentes nas amostras, embora os elementos C e O estejam presentes em maiores quantidades, estas não podem ser utilizadas para fins de quantificação dos componentes, visto que a própria fita de carbono sobre a qual a amostra é depositada possui esses elementos. Já a presença de ouro na amostra é decorrente do processo de metalização da amostra e a presença de Mg é decorrente de impurezas e interferências do equipamento.

5.7. Determinação do pH no ponto de carga zero (pH_{pcz})

Os resultados encontrados referente ao pH_{pcz} dos materiais obtidos estão representados na Figura 16.

O pH no ponto de carga zero para os filmes e para as microesferas são 7,15 e 6,8, respectivamente. Essa pequena diferença pode estar relacionada ao fato que as microesferas utilizadas no procedimento encontram-se reticuladas e os filmes utilizados nessa etapa não são reticulados. Apesar dos materiais estarem em formas diferentes, nota-se que os valores de pH_{pcz} encontrados estão próximos, por volta de 7. Conhecendo o comportamento das cargas na superfície dos materiais é possível presumir possíveis interações eletrostáticas.

Figura 16: Determinação do pH_{pcz} dos biomaterias

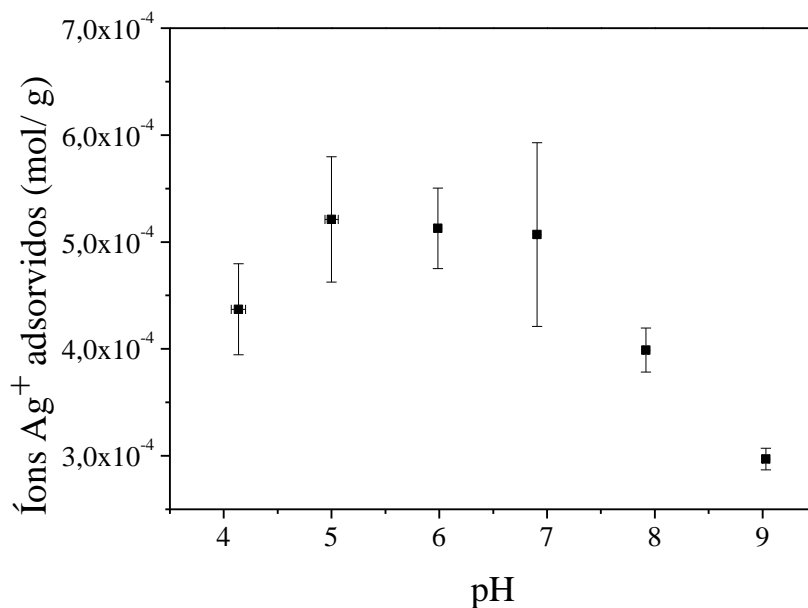
Tendo em vista que o pH_{pcz} da quitosana é aproximadamente 7, acima desse valor o biopolímero fica negativamente carregado, logo, em soluções aquosas cujo pH > pH_{pcz} a adsorção de cátions é favorecida, enquanto que em soluções de pH < pH_{pcz} o biopolímero encontra-se positivamente carregado favorecendo, assim, a adsorção de ânions [68].

5.8. Influência do pH na adsorção dos íons Ag⁺

O procedimento não foi realizado para pH < 4, pois o material adsorvente pode solubilizar nessa faixa de pH. Em pH > 7 há a formação de hidróxidos de prata que dificultam a adsorção, como pode ser observado na Figura 17.

Analisando os dados, é possível notar que a retenção dos íons Ag⁺ aumenta à medida que o valor de pH também aumenta (Figura 17). A quantidade de prótons presente em baixos valores de pHs influencia diretamente na adsorção de cátions pelo material empregado. Quanto mais ácida a solução, maior a presença de íons H⁺, logo, os prótons e os cátions irão competir entre si pelos sítios do adsorvente [69]. Esse comportamento já era esperado uma vez que os dados obtidos pelo pH_{pcz} revelou que em pH ácido a superfície do material estaria carregada positivamente, fato que não favorece a adsorção de espécies com carga positiva.

Figura 17: Influência do pH na adsorção de íons Ag^+ em microesferas de quitosana

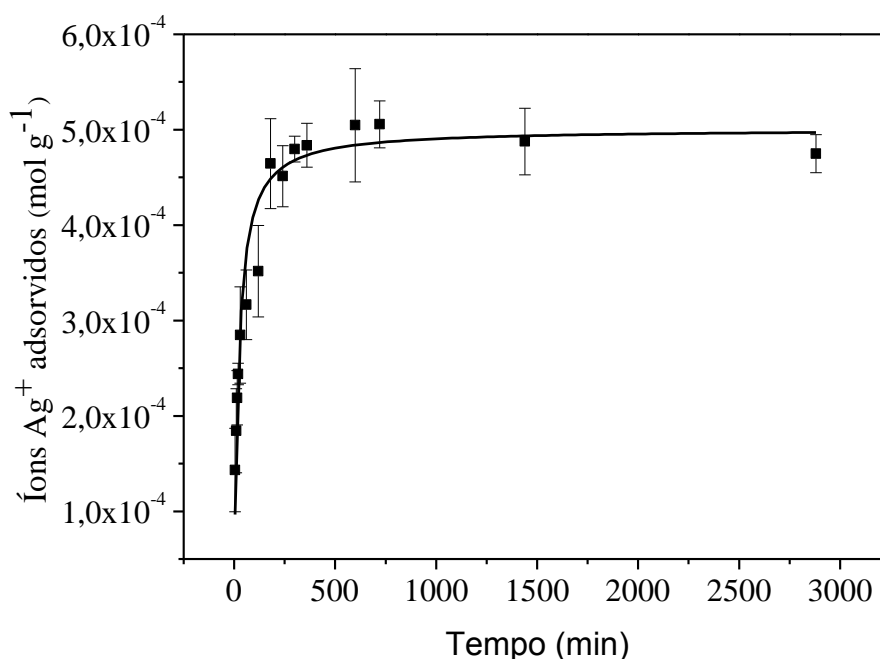


O ápice, bem como o equilíbrio, da adsorção dos íons Ag^+ foi atingido em pH 5, 6 e 7. Conforme o pH_{pzc} o meio ideal para adsorção de cátions em microesferas de quitosana seria em pH básico, porém deve-se levar em consideração o limite de precipitação dos metais que no presente trabalho ocorre em $\text{pH} > 7$. Portanto, solução básica não foi utilizada a fim de evitar a formação de hidróxidos [70].

5.9. Cinética de adsorção dos íons Ag^+

Um estudo cinético foi realizado a fim de se determinar o tempo de equilíbrio na adsorção dos íons Ag^+ . Os resultados obtidos são apresentados conforme Figura 18.

Analisando o gráfico é possível notar um rápido aumento da quantidade de íons Ag^+ adsorvidos pelas microesferas de quitosana nas primeiras horas e uma posterior saturação é alcançada a partir de 10 h de contato entre o adsorvente e o adsorvato.

Figura 18: Cinética de adsorção de Ag^+ em microesferas de quitosana

Como forma de verificar o mecanismo que rege o processo de adsorção, modelos de pseudo primeira-ordem, pseudo segunda-ordem e difusão intrapartícula foram testados no presente trabalho. Para uma análise quantitativa é preciso que haja comparação entre o coeficiente de correlação de cada modelo. Os parâmetros que foram obtidos através da linearização dos diferentes modelos encontram-se na Tabela 5.

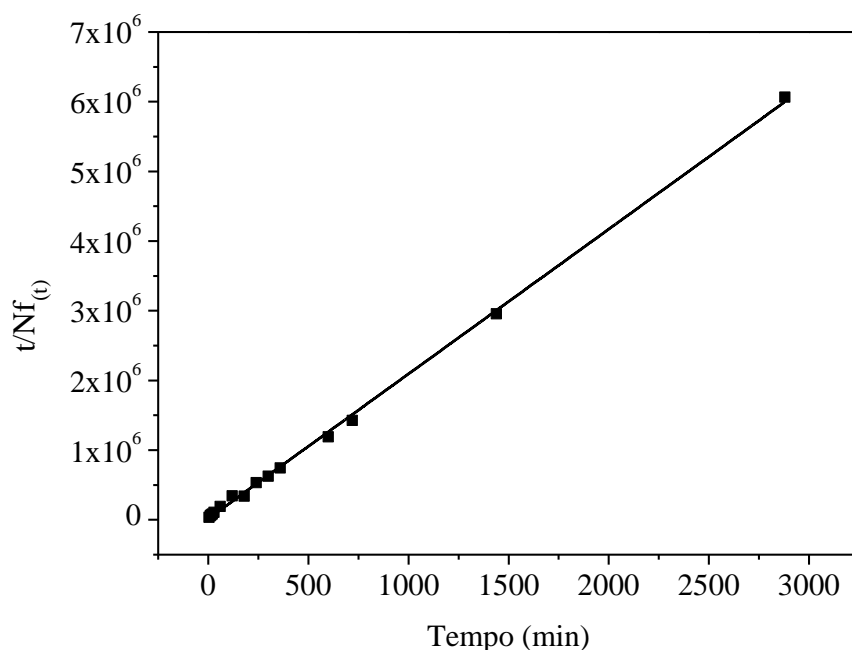
Tabela 5: Parâmetros obtidos através da linearização da curva cinética

Modelo cinético	Equação da reta
Pseudo primeira ordem	$Y = -3,9833 - 0,0004 X$ ($R^2 = 0,3479$)
Pseudo segunda ordem	$Y = 16306,7 + 2077,5 X$ ($R^2 = 0,999$)
Difusão intrapartícula	$Y = 0,0003 + 6 \times 10^{-6} X$ ($R^2 = 0,4973$)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, é possível afirmar que os dados cinéticos que mais se adequaram são referentes ao modelo de pseudo segunda-ordem, pois este oferece o melhor coeficiente de correlação, $R^2 = 0,999$.

O gráfico representado pela Figura 19 ilustra a equação linearizada obtida pelo mecanismo de pseudo segunda-ordem.

Figura 19: Linearização conforme modelo cinético de pseudo segunda-ordem



Com base nos valores de coeficiente linear e coeficiente angular obtido pela equação de pseudo segunda-ordem, representados na Tabela 5, foi possível calcular os parâmetros cinéticos da constante de velocidade (K_2), a quantidade adsorvida no equilíbrio (N_f) e também a velocidade de adsorção inicial (h). Os referidos dados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo de pseudo segunda ordem

Pseudo segunda ordem			
K_2 (g mol ⁻¹ min ⁻¹)	N_f (exp) (mol g ⁻¹)	N_f (calc) (g mol ⁻¹)	h (mol g ⁻¹ min ⁻¹)
264,7	4,93x10 ⁻⁴	4,81x10 ⁻⁴	6,13x10 ⁻⁵

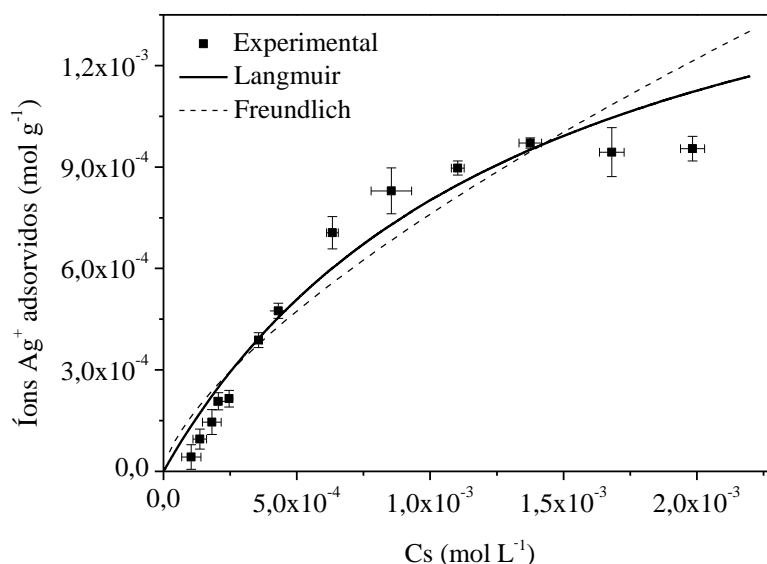
Analisando as informações da Tabela 6 é notável a semelhança entre o valor de N_f experimental (N_f (exp.)) e o valor de N_f obtidos pelo cálculo do

modelo de pseudo segunda-ordem (N_f (calc.)). Conforme dados da literatura, o modelo de pseudo segunda ordem é empregado nos casos em que a taxa de ocupação de sítios de adsorção é proporcional ao quadrado do número de sítios desocupados [71].

5.10. Isoterma de concentração

Os resultados referentes à adsorção dos íons Ag^+ com variação da concentração, bem como o ajuste não linear aos modelos de Langmuir e Freundlich estão demonstrados na Figura 20.

Figura 20: Adsorção de íons Ag^+ em meio aquoso de diferentes concentrações



A isoterma de adsorção, que está representada pela Figura 20, demonstra que o aumento da adsorção é diretamente proporcional ao aumento da concentração da solução, ou seja, a quantidade adsorvida aumenta à medida que a concentração também aumenta. Com o aumento da concentração da solução de $AgNO_3$ os sítios de adsorção da quitosana vão sendo ocupados, mas a tendência é uma decorrente saturação.

Em menores concentrações há também menores quantidades de íons Ag^+ , com isso a retenção da prata não é suficiente para preencher todos os sítios disponíveis para adsorção. Contudo, no decorrer do procedimento, os

sítios disponíveis na superfície vão sendo ocupados por completo atingindo o equilíbrio, o que explica a faixa constante de adsorção.

As informações obtidas no experimento foram ajustadas através da regressão não linear aos modelos de Langmuir, Freundlich. A representação das equações e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2), bem como a soma do quadrado dos erros (SQE), obtidos através do ajuste aos modelos de Langmuir e Freundlich encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Equações não lineares dos modelos de Langmuir e Freundlich

Isoterma	Equação	R^2	SQE
Langmuir	$N_f = \frac{N^s K_L C_S}{1 + K_L C_S}$	0,966	$3,8619 \times 10^{-8}$
Freundlich	$N_f = K_F C_S^{\frac{1}{n}}$	0,934	$8,19272 \times 10^{-8}$

A qualidade do ajuste foi verificada de acordo com o coeficiente de determinação (R^2) e por meio da soma dos quadrados dos erros (SQE) conforme Equação 18 [72].

$$\sum_1^n N_{f(cal.)} - N_{f(exp.)} \quad \text{Equação 18}$$

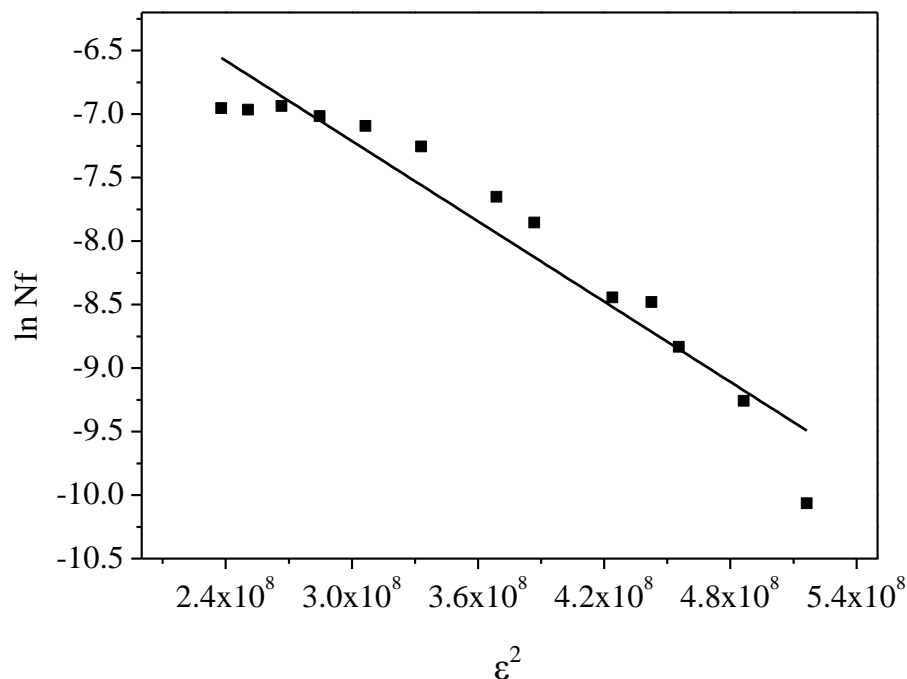
Tendo em vista o coeficiente de determinação de ambos os modelos e o resultado da SQE é possível notar que o modelo de Langmuir é o mais apropriado, pois apresentou um maior R^2 e uma menor SQE. Portanto, através da equação do modelo de Langmuir outros parâmetros, como capacidade máxima de adsorção e constante de adsorção, também podem ser determinados. Tais parâmetros estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros obtidos através da equação do modelo de Langmuir

Parâmetros da Isoterma de Langmuir		
$N^s_{\text{calc}} (\text{mol g}^{-1})$	K_L	$N^s_{\text{exp}} (\text{mol g}^{-1})$
0,0018	736,14	$9,58 \times 10^{-4}$

Comparando-se o valor adquirido de capacidade máxima de adsorção através do ajuste não linear ao modelo de Langmuir com o valor obtido experimentalmente, verificou-se que, na prática, os resultados foram inferiores aos valores teóricos. Esse fato pode ser explicado devido à origem natural do material utilizado para adsorção, a quitosana, a mesma pode conter irregularidades que interferem na eficiência do processo. Além disso, a repulsão eletrostática entre íons Ag^+ pode provocar uma redução da capacidade de adsorção do material [37]. Com valor do fator de separação obtido, $R_L=0,35$, pode-se assumir que a adsorção de íons Ag^+ por microesferas de quitosana é um processo favorável.

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de isoterma de Dubinin-Radushkevick com o intuito de calcular a energia envolvida na adsorção, e assim, identificar se a interação dos íons Ag^+ com as microesferas de quitosana é uma adsorção física ou química. A Figura 21 representa a forma linearizada do perfil da isoterma D-R e os parâmetros analisados encontram-se na Tabela 9.

Figura 21: Linearização conforme modelo de Isoterma D-R**Tabela 9:** Parâmetros obtidos através da linearização da isoterma D-R

Parâmetros da Isoterma D-R				
Equação da reta	R^2	K_{DR}	B	E (KJ mol ⁻¹)
$Y = - 4,05088 - 1,05381 \times 10^{-8} X$	0,921	0,0174	$1,0541 \times 10^{-8}$	6,9

Analisando o parâmetro E referente à isoterma D-R é possível dizer que a interação que há entre adsorvato/adsorvente no presente trabalho trata-se de uma adsorção física por apresentar valor $E < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ [39].

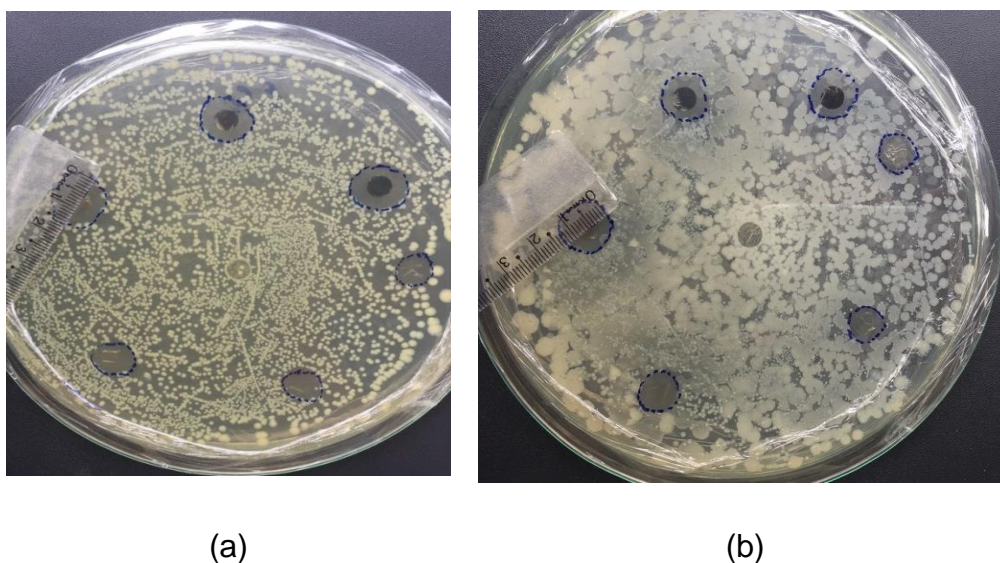
5.11. Avaliação da capacidade antibacteriana dos biomateriais

Para avaliar a ação que os materiais desempenham contra bactérias foram selecionados dois tipos desse microrganismo, um Gram-negativo e outro Gram-positivo. Por estar presente na superfície corporal dos mamíferos a bactéria gram-positiva selecionada foi *S. aureus* e por ser considerado um

parasita intestinal de mamíferos a bactéria gram-negativa selecionada foi *E. coli* [53].

No teste de disco-difusão realizado para averiguar o potencial antibacteriano dos filmes de quitosana (Figura 22) foi possível observar a formação do halo de inibição, caracterizando que o material possui atividade contra as referidas bactérias.

Figura 22: Halos de inibição formados pelos filmes com nanopartículas de prata para: (a) *E.coli* e (b) *S.aureus*



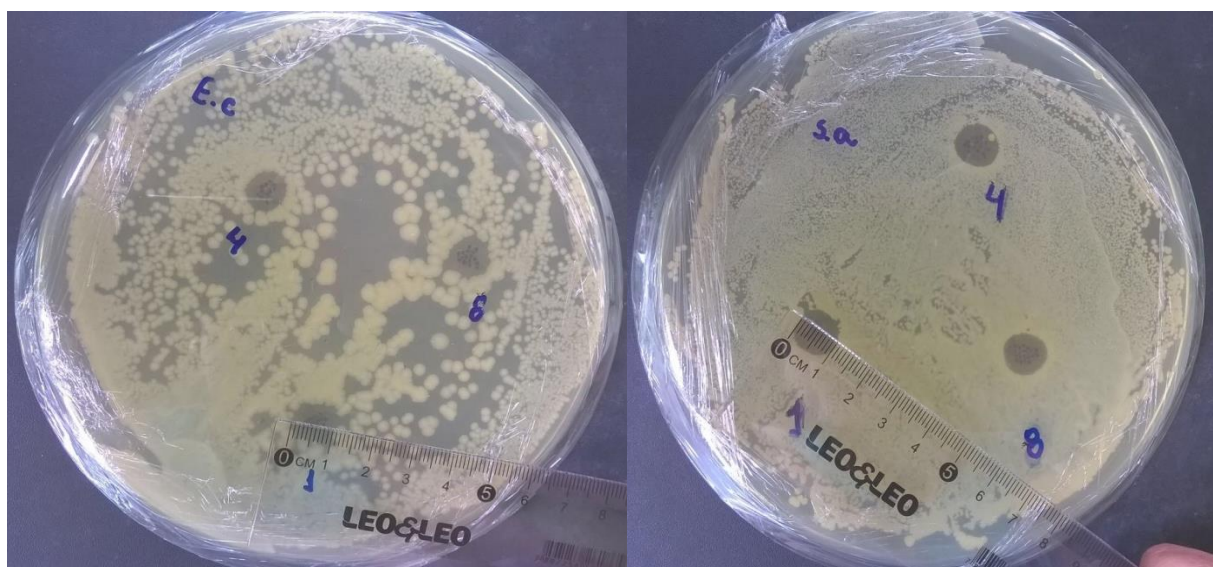
Na Figura 22, o maior halo de inibição mensurado apresentou diâmetro de 16 mm para *E.coli* e 13 mm para *S.aureus*. O filme que se destacou em relação ao halo de inibição foi o de concentração 5 mM de solução de AgNO_3 , o que mostra que a partir desta concentração a prata é eficiente contra as bactérias. Já os filmes localizados na região central da placa não apresentaram halo de inibição, uma vez que são de controle e não possuem nanopartículas de prata em sua composição. A comparação entre concentração do filme e diâmetro do halo para as duas bactérias está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10: Comparação entre concentração do filme e diâmetro do halo

	Concentração de AgNO ₃ (mmol L ⁻¹)					
	0,5	1,0	2,0	5,0	25	52
Diâmetro do halo (mm) – <i>E. coli</i>	11	11	12	16	15	15
Diâmetro do halo (mm) – <i>S. aureus</i>	9	9	11	13	12	12

Apesar de ser um teste qualitativo a diferença de diâmetro entre os halos formados para *E. coli* e *S. aureus* pode ser justificada pelo caráter estrutural das bactérias. Por ser gram-positiva a parede celular de *S. aureus* é mais espessa que a parede celular de *E. coli*, sendo essa característica de imensa importância para proteção da célula contra penetração das nanopartículas de prata no citoplasma. Logo, a maior espessura da parede celular sugere que *S. aureus* tem um sistema de defesa mais forte contra nanopartículas de prata [53].

O mesmo procedimento realizado para as microesferas com nanopartículas de prata pode ser verificado conforme Figura 23.

Figura 23: Halos de inibição formados pelas microesferas com nanopartículas de prata para: (a) *E.coli* e (b) *S.aureus*

(a)

(b)

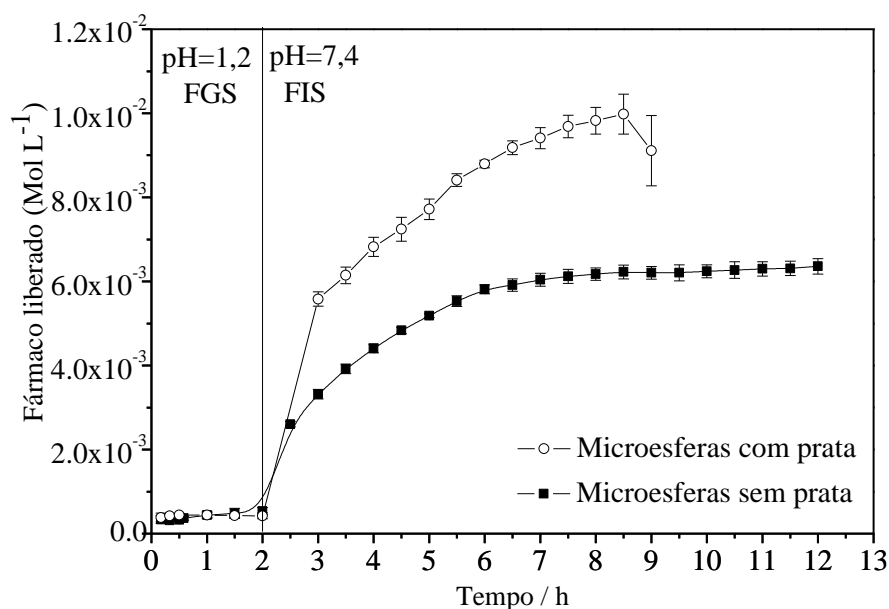
Para as microesferas com nanopartículas de prata as três concentrações avaliadas apresentaram halos de diâmetros semelhantes e correspondentes a aproximadamente 10 mm. O fato das microesferas serem oriundas de um processo de adsorção e apresentarem baixa aderência ao ágar pode interferir no processo de formação do halo.

5.12. Liberação controlada de fármaco pelos biomateriais

Os biomateriais na sua forma de filmes e microesferas foram avaliados como matrizes no processo de liberação controlada do fármaco ibuprofeno. Para isso, os polímeros foram separados de acordo com sua estrutura física o que diferenciou o método utilizado para carregamento e liberação controlada do fármaco.

Os resultados de liberação de ibuprofeno pelas microesferas porosas de quitosana com e sem a presença de nanopartículas de prata pode ser observado conforme Figura 24.

Figura 24: Liberação de fármaco pelos polímeros em forma de microesferas



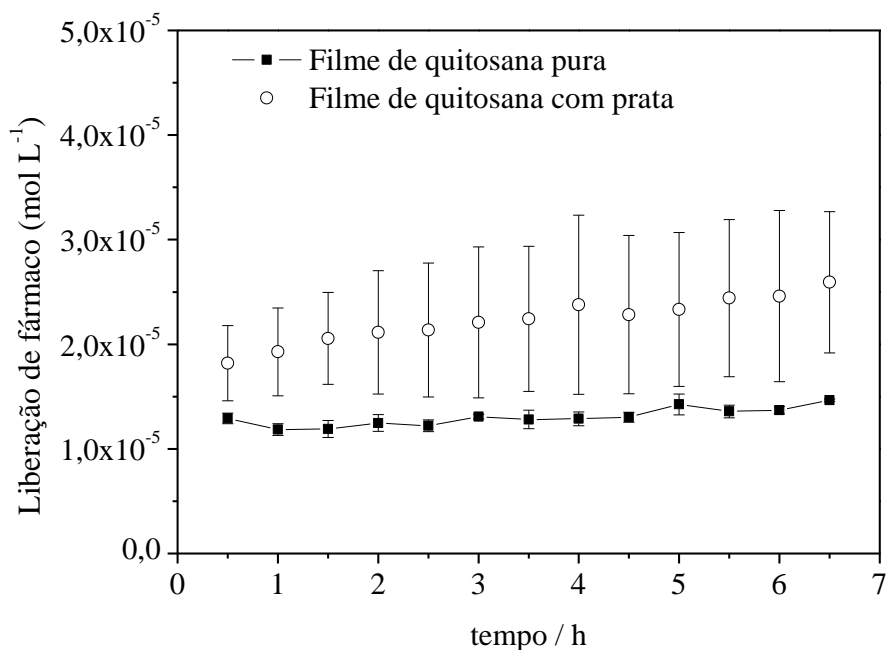
Verificando os resultados apresentados na Figura 24 é possível notar que o mecanismo de liberação de ibuprofeno está diretamente relacionado com

o pH do meio. Tanto para as microesferas com presença de nanopartículas de prata quanto para as microesferas na ausência de nanopartículas de prata a liberação de ibuprofeno em pH = 1,2 foi muito inferior da encontrada em pH = 7,4. No FIS a liberação foi alta a partir do primeiro momento, sendo maior no material que possui nanopartículas de prata.

Essa maior liberação de ibuprofeno no fluido intestinal simulado pode ser explicada pelo fato do ibuprofeno ser extremamente solúvel em pH básico [73]. Outro fato relevante é que o biopolímero, nessa condição de pH = 7,4, possui superfície com carga negativa, conforme observado no estudo do pH_{pzc} descrito anteriormente, e repele eletrostaticamente as cargas negativas do ibuprofeno (COO⁻). Comprovando que a liberação do fármaco em estudo ocorre no intestino e evita a deposição de altas dosagens da droga no estômago. O melhor desempenho do material com nanopartículas de prata pode estar relacionado à sorção do fármaco nas nanopartículas [6 - 74].

Os resultados obtidos da liberação de fármaco para os filmes de quitosana na presença ou ausência de nanopartículas de prata estão representados a seguir, Figura 25.

Figura 25: Liberação de fármaco pelos polímeros em forma de filmes



No caso dos filmes, o estudo de liberação de fármaco foi realizado apenas em pH = 7,4, pois o intuito desse material é a liberação transdérmica

de ibuprofeno, logo o pH sanguíneo em que o filme teria contato se encontra nessa faixa.

Observando a Figura 25 constata-se que o ápice da liberação do fármaco pelos filmes em pH=7,4 ocorre logo nos primeiros 30 minutos de contato e permanece constante.

O comportamento observado nas microesferas (Figura 24) também ocorre nos filmes (Figura 25), que é a maior liberação de fármaco pelos materiais na presença de nanopartículas de prata.

5.12.1. Liberação de íons prata no organismo pelos biomateriais

Um risco associado ao uso de prata em sistemas de liberação de fármacos é liberação de prata no organismo. Para tal, determinou-se a quantidade de prata liberada no fluido intestinal simulado que ficou em contato com as microesferas.

As microesferas utilizadas apresentaram $8,9 \times 10^{-5}$ mols de prata por grama do polímero. Após o contato do material com a solução corpórea simulada foi constatado a presença de $5,93 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de íons prata em fluido intestinal, o que caracteriza a liberação da mesma no organismo. Como os valores de comprimento de onda de máxima absorção dos íons prata em solução aquosa e do ibuprofeno são próximos, a liberação de prata pode afetar a quantificação do ibuprofeno. Desta forma, a maior liberação de ibuprofeno nos materiais que possuem prata poderia ser somente um erro ocasionado pela dificuldade em quantificar o fármaco. No entanto, a quantidade de íons prata liberada é muito pequena e não explica a grande diferença observada entre a capacidade de liberação das microesferas puras e com nanopartículas de prata. Portanto, a maior liberação de fármaco dos materiais com prata está relacionada à capacidade das nanopartículas de atuarem no carregamento e liberação do fármaco.

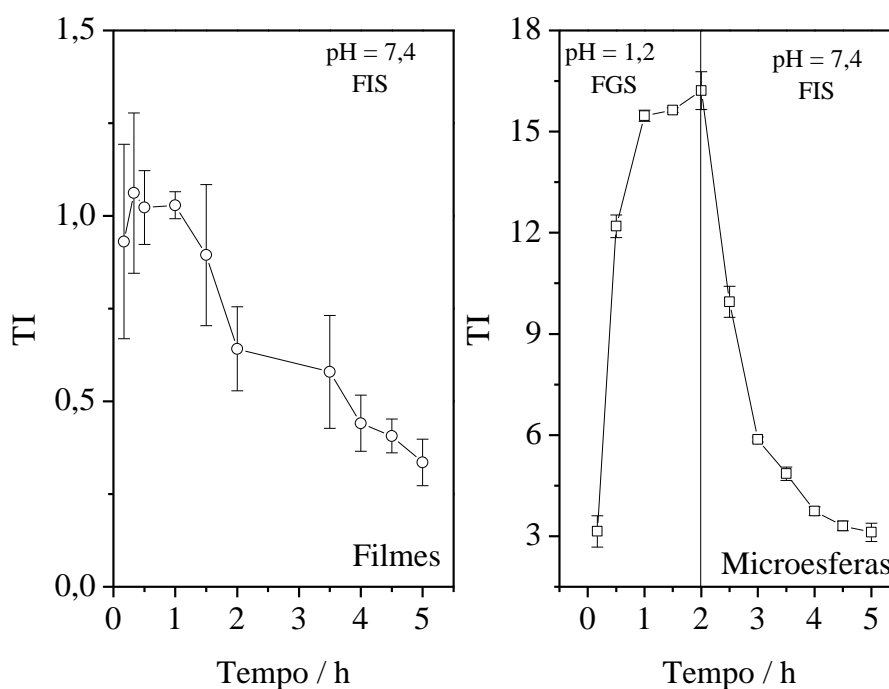
Estudos *in vitro* demonstraram que baixas concentrações de nanopartículas de Ag ($2,32 \times 10^{-4}$ M) permite uma maior variedade de aplicações *in vivo* e, portanto características como modificações no seu tamanho, forma, funcionalização e concentração devem ser levadas em consideração no momento de aplicá-las [75]. Um limite de exposição diário de 0,01 mg/m³ de

prata, em todas suas formas, foi estabelecido pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (2003), bem como uma dose de referência $0,005 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, conforme a Agência de Proteção Ambiental dos EUA [76].

5.12.2. Taxa de intumescimento

A taxa de intumescimento foi avaliada para o polímero na forma de microesferas em pH = 1,2 por 2 horas e em pH 7,4 por mais 3 horas. Já para os filmes a taxa de intumescimento foi avaliada apenas para pH = 7,4 pelo período de 5 horas. Observa-se na Figura 26 o comportamento encontrado para os biomateriais nas suas duas formas.

Figura 26: Taxa de intumescimento para o biopolímero ausente de ibuprofeno



Pelos dados obtidos e demonstrados na Figura 26, nota-se que a taxa de intumescimento (TI) para as microesferas de quitosana é claramente maior que a dos filmes, isso se deve ao fato de que as microesferas possuem uma maior quantidade de grupos amino disponíveis, que sofrem protonação em meio ácido, podendo reter água, porém sem ocorrer dissolução, pois estão reticuladas.

A taxa de intumescimento dos materiais diminui à medida que tempo de contato com a solução de FIS pH=7,4 aumenta. Nesse momento que ocorre desprotonação dos grupos aminos, a desidratação da cadeia e uma diminuição do intumescimento. O fato do material liberar água em tal pH facilita a liberação de ibuprofeno nesse meio.

6. Conclusão

A quitosana apresentou um grau de desacetilação de 81%.

Devido ao alto GD% foi possível solubilizar a quitosana em meio ácido para posterior formação das microesferas e dos filmes.

As microesferas obtidas apresentaram um bom controle na formação com diâmetro médio de 2,911 mm quando úmidas.

O polímero se mostrou eficiente no processo de adsorção, com comportamento cinético de pseudo-segunda ordem, com saturação dos sítios após dez horas em contato com a solução precursora de prata.

O estudo de adsorção apresentou um perfil mais adequado ao modelo de adsorção de Langmuir. O modelo de Dubinin-Radushkevich revelou que a adsorção entre adsorvente e adsorvato é de natureza física.

Como matriz para liberação controlada de fármaco o polímero demonstrou maior liberação em fluido intestinal simulado o que evita problemas gástricos em pacientes.

A matriz na presença de nanopartículas de prata permite uma maior presença do fármaco em sua superfície, disponibilizando o mesmo em maior quantidade.

Os materiais obtidos foram eficientes contra as bactérias *E. coli* e *S.aureus*.

Referências

- [1] H. Sashiwa and S. I. Aiba, "Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 29, no. 9, pp. 887–908, 2004.
- [2] O. KUMIRSKA *et al.*, "Influence of the chemical structure and physicochemical properties of chitin- and chitosan-based materials on their biomedical activity," in *BioBiomedical Engineering, Trends in Materials Science*, 2011, pp. 25–64.
- [3] V. V. C. Azevedo, S. a Chaves, D. C. Bezerra, M. V. L. Fook, and a C. F. M. Costa, "Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais," *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 2.3, pp. 27–34, 2007.
- [4] M. J. Alonso and A. Sánchez, "The potential of chitosan in ocular drug delivery," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 55, no. 11, pp. 1451–1463, 2003.
- [5] Y.-K. Twu, Y.-W. Chen, and C.-M. Shih, "Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions," *Powder Technol.*, vol. 185, no. 3, pp. 251–257, 2008.
- [6] I. M. Pereira E Silva, D. De Moraes Profirio, R. E. F. De Paiva, M. Lancellotti, A. L. Barboza Formiga, and P. P. Corbi, "A silver complex with ibuprofen: Synthesis, solid state characterization, DFT calculations and antibacterial assays," *J. Mol. Struct.*, vol. 1049, pp. 1–6, 2013.
- [7] P. Sanpui, A. Murugadoss, P. V. D. Prasad, S. S. Ghosh, and A. Chattopadhyay, "The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 124, no. 2, pp. 142–146, 2008.
- [8] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, and X. Ma, "The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 17, pp. 2375–2382, 2009.
- [9] S. Akmaz, E. Dilaver Adgüzel, M. Yasar, and O. Erguven, "The effect of ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2013, pp. 12–18, 2013.

- [10] V. Durga Praveena and K. Vijaya Kumar, "Synthesis and Characterization of Chitosan based Silver Nano Composite System for Antibacterial Applications," *Proc. Int. Conf. Adv. Nanomater. Emerg. Eng. Technol.*, pp. 76–79, 2013.
- [11] H. S. R. C. Silva, S. C. R. Kátia, and E. I. Ferreira, "Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.," *Quim. Nova*, vol. 29, no. 4, pp. 776–785, 2006.
- [12] O. B. G. Assis and S. Valmir L. da, "Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações," *Polímeros*, vol. 13, no. 4, pp. 223–228, 2003.
- [13] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [14] M. a. Torres, R. S. Vieira, M. M. Beppu, and C. C. Santana, "Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente," *Polímeros*, vol. 15, no. 4, pp. 306–312, 2005.
- [15] G. Wang, J. Liu, X. Wang, Z. Xie, and N. Deng, "Adsorption of uranium (VI) from aqueous solution onto cross-linked chitosan," *J. Hazard. Mater.*, vol. 168, no. 2–3, pp. 1053–1058, 2009.
- [16] A. de A. Gonsalves, C. R. M. Araújo, N. A. Soares, M. O. F. Goulart, and F. C. Abreu, "Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana," *Quim. Nova*, vol. 34, no. 7, pp. 1215–1223, 2011.
- [17] C. Ding and Z. Li, "A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems," *Mater. Sci. Eng. C*, 2017.
- [18] A. F. Rogobete *et al.*, "New aspects of controlled release systems for local anaesthetics: A review," *Trends Anaesth. Crit. Care*, no. 10, pp. 4–11, 2016.
- [19] M. A. M. De Lyra *et al.*, "Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 26, no. 5, pp. 784–793, 2007.
- [20] C. M. Lopes, J. M. S. Lobo, and P. Costa, "Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos," *Rev. Bras. Ciências Farm.*,

- vol. 41, no. 2, pp. 143–154, 2005.
- [21] E. C. Figueiredo, A. C. B. Dias, and M. A. Z. Arruda, “Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos,” *Rev. Bras. Ciências Farm. Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 44, no. 3, pp. 361–375, 2008.
- [22] A. Bernkop-Schnürch and S. Dünnhaupt, “Chitosan-based drug delivery systems,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 81, no. 3, pp. 463–469, 2012.
- [23] I. A. Sogias, A. C. Williams, and V. V. Khutoryanskiy, “Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen,” *Int. J. Pharm.*, vol. 436, no. 1–2, pp. 602–610, 2012.
- [24] V. V. Khutoryanskiy, “Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers,” pp. 748–764.
- [25] D. R. Mehlisch and J. Sykes, “Ibuprofen blood plasma levels and onset of analgesia,” *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 67, no. SUPPL. 178, pp. 3–8, 2013.
- [26] S. S. Adams, R. G. Bough, E. E. Cliffe, B. Lessel, and R. F. N. Mills, “Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 15, no. 2, pp. 310–330, 1969.
- [27] S. S. Adams, E. E. Cliffe, B. Lessel, and J. S. Nicholson, “Some Biological Properties of 2-(4-Isobutylphenyl)- propionic Acid,” *Res. Dep. Boots Pure Drug Co. Ltd.*, p. 1967, 1967.
- [28] L. Largitte and R. Pasquier, “A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon,” *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 109, pp. 495–504, 2016.
- [29] P. Atkins and J. Paula, *Físico-química. 9. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2012. vol. 2. .*
- [30] A. R. Vasques, S. M. a. G. U. De Souza, L. Weissenberg, A. A. U. De Souza, and J. A. B. Valle, “Adsorção dos corantes RO16, RR2 e RR141 utilizando lodo residual da indústria têxtil,” *Eng. Sanit. e Ambient.*, vol. 16, no. 3, pp. 245–252, 2011.
- [31] M. Özacar and I. A. Şengil, “A kinetic study of metal complex dye sorption onto pine sawdust,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 565–572, 2005.

- [32] P. Staroń, J. Chwastowski, and M. Banach, "Sorption and desorption studies on silver ions from aqueous solution by coconut fiber," *J. Clean. Prod.*, vol. 149, pp. 290–301, 2017.
- [33] Y. S. Ho, "Review of second-order models for adsorption systems," *J. Hazard. Mater.*, vol. 136, no. 3, pp. 681–689, 2006.
- [34] H. Qiu, L. Lv, B. Pan, Q. Q. Zhang, W. Zhang, and Q. Q. Zhang, "Critical review in adsorption kinetic models," *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, vol. 10, no. 5, pp. 716–724, 2009.
- [35] A. Dabrowski, "Adsorption - From theory to practice," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 93, no. 1–3, pp. 135–224, 2001.
- [36] G. Luiz Dotto, M. L. G. Vieira, J. O. Gonçalves, and L. A. De Almeida Pinto, "Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica.," *Quim. Nova*, vol. 34, no. 7, pp. 1193–1199, 2011.
- [37] M. C. Shinzato, T. J. . Montanheiro, V. de A. Janasi, S. Andrade, and J. K. Yamamoto, "Remoção de Pb^{2+} e Cr^{3+} em solução por zeólitas naturais associadas a rochas eruptivas da formação Serra Geral, Bacia Sedimentar do Paraná.," *Quim. Nova*, vol. 32, no. 8, pp. 1989–1994, 2009.
- [38] L. A. Linhares, F. B. Egreja Filho, V. M. De Bellis, E. A. Dos Santos, and R. Ianhez, "Utilização dos modelos de Langmuir e de Freundlich na adsorção de cobre e zinco em solos Brasileiros," *Acta Agronômica*, vol. 59, no. 3, pp. 303–315, 2010.
- [39] A. U. Itodo and H. U. Itodo, "Sorption energies estimation using Dubinin-Radushkevich and temkin adsorption isotherms," *Life Sci. J.*, vol. 7, no. 4, pp. 68–76, 2010.
- [40] V. T. Fávere and H. G. Riella, "Cloreto de N-(2-hidroxil) propil-3-trimetil amônio quitosana como adsorvente de corantes reativos em solução aquosa.," *Quim. Nova*, vol. 33, no. 7, pp. 1476–1481, 2010.
- [41] L. Zhang, Y. Zeng, and Z. Cheng, "Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review," *J. Mol. Liq.*, vol. 214, pp. 175–

- 191, 2016.
- [42] M. S. Chiou, P. Y. Ho, and H. Y. Li, "Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads," *Dye. Pigment.*, vol. 60, no. 1, pp. 69–84, 2004.
- [43] E. Salehi, P. Daraei, and A. Arabi Shamsabadi, "A review on chitosan-based adsorptive membranes," *Carbohydr. Polym.*, vol. 152, pp. 419–432, 2016.
- [44] M. Mende, D. Schwarz, C. Steinbach, R. Boldt, and S. Schwarz, "Simultaneous adsorption of heavy metal ions and anions from aqueous solutions on chitosan—Investigated by spectrophotometry and SEM-EDX analysis" *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 510, pp. 275–282, 2016.
- [45] F. Antunes, N. Dal'Acqua, C. Bergmann, and M. Giovanela, "Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos," *Estud. Tecnológicos em Eng.*, vol. 9, no. 1, pp. 20–26, 2013.
- [46] S. M. Lee, K. C. Song, and B. S. Lee, "Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 2, pp. 688–692, 2010.
- [47] Z. S. Pillai and Prashant V. Kamat, "What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 3, pp. 945–951, 2004.
- [48] M. Bin Ahmad, M. Y. Tay, K. Shameli, M. Z. Hussein, and J. J. Lim, "Green synthesis and characterization of silver/chitosan/polyethylene glycol nanocomposites without any reducing agent," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 8, pp. 4872–4884, 2011.
- [49] a Murugadoss and A. Chattopadhyay, "A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 15603, 2008.
- [50] J. R. Morones *et al.*, "The bactericidal effect of silver nanoparticles," *Nanotech*, vol. 2346, no. 16, pp. 2346–2353, 2005.
- [51] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation

- of antimicrobials,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [52] R. Yoksan and S. Chirachanchai, “Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 115, no. 1, pp. 296–302, 2009.
- [53] Q. L. FENG, J. WU, G. Q. CHEN, F. Z. CUI, T. N. KIM, and J. O. KIM, “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *J Biomed Mater Res.*, vol. 15;52(4), pp. 662–8, 2000.
- [54] K. dos Santos Alves, R. R. Lima Vidal, and R. de Carvalho Balaban, “Chitosan derivatives with thickening properties obtained by reductive alkylation,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 2, pp. 641–646, 2009.
- [55] C. C. Santana *et al.*, “Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos,” *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, vol. 66, no. 4, pp. 995–1002, 2014.
- [56] M. Zeng, X. Zhang, L. Shao, C. Qi, and X. M. Zhang, “Highly porous chitosan microspheres supported palladium catalyst for coupling reactions in organic and aqueous solutions,” *J. Organomet. Chem.*, vol. 704, pp. 29–37, 2012.
- [57] R. F. L. Ribeiro, V. C. Soares, L. M. Costa, and C. C. Nascentes, “Efficient removal of Cd^{2+} from aqueous solutions using by-product of biodiesel production,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 237–238, pp. 170–9, 2012.
- [58] Y. Yi, Y. Wang, and H. Liu, “Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 53, no. 4, pp. 425–430, 2003.
- [59] L. M. Sejas, S. Silbert, A. O. Reis, and H. S. Sader, “Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil,” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 39, no. 1, pp. 27–35, 2003.
- [60] L. Franceline Aparecida, S. Nilda de Fátima Ferreira, L. Cristiane de Cássia Pires, and S. Washington Azevedo da, “Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico,” *Brazilian J. Food Technol.*, pp. 33–40, 2014.

- [61] A. Mironenko, E. Modin, A. Sergeev, S. Voznesenskiy, and S. Bratskaya, "Fabrication and optical properties of chitosan/Ag nanoparticles thin film composites," *Chem. Eng. J.*, vol. 244, pp. 457–463, 2014.
- [62] A. P. Vieira, S. Badshah, and C. Airoidi, "Ibuprofen-loaded chitosan and chemically modified chitosans-Release features from tablet and film forms," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 52, no. 1, pp. 107–115, 2013.
- [63] W. Xu *et al.*, "Controllable release of ibuprofen from size-adjustable and surface hydrophobic mesoporous silica spheres," *Powder Technol.*, vol. 191, no. 1–2, pp. 13–20, 2009.
- [64] R. Signini and S. P. Campana Filho, "Purificação e caracterização de quitosana comercial," *Polímeros*, vol. 8, no. 4, pp. 63–68, 1998.
- [65] J. E. Dos Santos, J. D. P. Soares, E. R. Dockal, S. P. Campana Filho, and É. T. G. Cavalheiro, "Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens," *Polímeros*, vol. 13, no. 4, pp. 242–249, 2003.
- [66] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières, and M. Rinaudo, "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization," *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 8, pp. 3569–3580, 2001.
- [67] M. A. Melo, L. S. S. Santos, M. Do Carmo Gonçalves, and A. F. Nogueira, "Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino," *Quim. Nova*, vol. 35, no. 9, pp. 1872–1878, 2012.
- [68] W. Silva and S. Oliveira, "Modificação das características de adsorção do bagaço de cana para remoção de azul de metileno de soluções aquosas," *Sci. Plena*, vol. 8, no. 7, pp. 1–9, 2012.
- [69] R. S. Jimenez, S. M. Dal Bosco, and W. A. Carvalho, "Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolécita - Influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares," *Quim. Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 734–738, 2004.
- [70] E. Repo, J. K. Warchol, T. A. Kurniawan, and M. E. T. Sillanpää, "Adsorption of Co(II) and Ni(II) by EDTA- and/or DTPA-modified chitosan: Kinetic and equilibrium modeling," *Chem. Eng. J.*, vol. 161, no. 1–2, pp.

- 73–82, 2010.
- [71] J. O. Babalola, N. a. a. Babarinde, V. O. Oninla, and O. a. Popoola, “Kinetics, Equilibrium, and Thermodynamics Studies of the Biosorption of Lead (II) and Chromium (III) by *Basella alba* L.,” *Pacific J. Sci. Technol.*, vol. 9, no. 2, pp. 610–620, 2008.
- [72] K. Y. Foo and B. H. Hameed, “Insights into the modeling of adsorption isotherm systems,” *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 2, p. 2, 2010.
- [73] P. P. WIN, Y. SHIN-YA, K.-J. HONG, and T. KAJIUCHI, “Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 53, pp. 305–310, 2003.
- [74] Z. A. Tagar *et al.*, “Selective, simple and economical lead sensor based on ibuprofen derived silver nanoparticles,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 157, no. 2, pp. 430–437, 2011.
- [75] A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, J. J. Schlager, L. Dai, and S. M. Hussain, “Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 23, p. 235104, 2008.
- [76] M. E. Samberg, S. J. Oldenburg, and N. A. Monteiro-Riviere, “Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 3, pp. 407–413, 2010.