

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE TERMOFLUIDODINÂMICA**

Área de concentração: Engenharia de processos

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
PAPAÍNA**

Autor : Eng^o. Gilberto Alexandre Soares Goulart

Orientadora: Prof^a. Dr^a Marisa Masumi Beppu

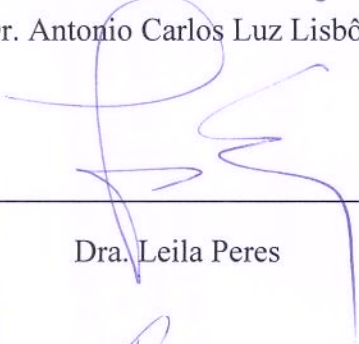
Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos pré-requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

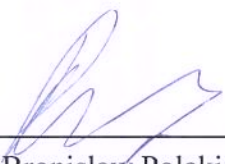
Campinas – São Paulo
Fevereiro, 2006

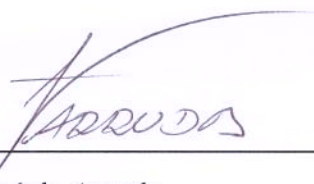
Tese de Doutorado defendida por Gilberto Alexandre Soares Goulart e aprovada em 17 de fevereiro de 2006, pela banca examinadora constituída pelos Doutores:

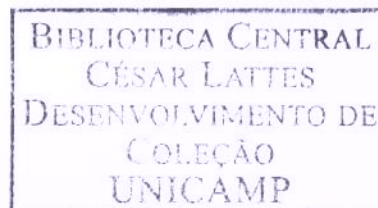

Dra. Marisa Masumi Beppu


Dr. Antonio Carlos Luz Lisboa

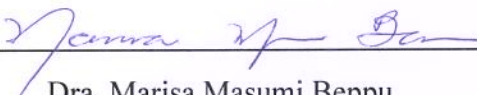

Dra. Leila Peres


Dr. Bronislaw Polakiewicz


Dr. Eduardo José de Arruda



Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Dra. Marisa Masumi Beppu
(Orientadora)

*“ Eu sou como uma aranha que
tece sua teia para viver.
Não tenho nada contra ninguém
Apenas teço minha teia.”*

Mestre Pastinha.

Dedico

A minha esposa, Mariângela, pela paciência, compreensão e constante incentivo. Ao meu filho Humberto, por encher minha vida de luz.

Agradecimentos

Esta tese foi resultado de esforço, dedicação, perseverança, aprendizado e experimentação, mas este trabalho não teria efeito algum se não fosse pelo auxílio de pessoas as quais tive o imenso prazer de encontrar em meu caminho.

- Primeiramente agradeço à Deus;
- À minha orientadora Marisa Masumi Beppu, que tornou tudo isso possível, através do apoio e da cobrança nas horas certas. Por sua amizade e espírito profissional;
- Ao professor Theo Guenter Kieckbush, por ter agido de forma decisiva no momento mais difícil de minha vida acadêmica, influenciando a permanência no programa de Doutorado da Engenharia Química da Unicamp;
- Ao professor César Costapinto Santana (DPB/FEQ/UNICAMP), por disponibilizar a utilização do espectrofotômetro (FTIR-ATR);
- Ao professor Carlos Grosso (DEPAN/FEA/UNICAMP), pela disponibilização do secador *spray-dryer*;
- Ao professor Watson (IQ/UNICAMP), pela liofilização das micropartículas de quitosana;
- Ao professor Cláudio Airoidi (IQ/UNICAMP), pelas análises de Raios – X, das micropartículas de quitosana;
- Ao professor João Sinésio Campos (DTP/FEQ/UNICAMP), pelo constante incentivo e amizade nestes últimos meses de trabalho;
- Aos laboratórios LRAC(FEQ/UNICAMP) e LCPP(DTF/FEQ/UNICAMP), pelos teste de TGA, DSC , MEV e Difração de Raios-X;

- Ao professor Bronislaw Polakiewicz (FCF/USP), por ter me acolhido com respeito, amizade e profissionalismo;
- Ao professor José Eduardo de Arruda (Farmácia/UCDB/MS), pelo empenho em trabalhar em colaboração, proporcionando a realização dos ensaios e análise de cicatrização *in-vivo*, realizadas em sua instituição de ensino;
- Ao professor Lincoln Carlos Silva de Oliveira (Farmácia/UCDB/MS), pelo apoio nos testes de cicatrização *in-vivo* e análises térmicas realizadas nos tecidos cicatrizados coletados dos hamsters;
- Aos meus colegas de laboratório, Marco, Rodrigo, Grínia, Rafael, Cassiano e Daniel, por sempre estarem prontos para auxiliar e para confraternizar; são grandes companheiros;
- Aos meus amigos, Marcílio Machado, Carlos Alberto Severo, Cibelem Benites, Victor Oswaldo Concha, Marcelo Pinto, Mariana, Reinaldo e Gilvan, pelo companheirismo, apoio e principalmente amizade que sempre me prestaram, obrigado de coração!!!
- A todos os meus familiares, que mesmo de longe incentivaram e emanaram energias positivas;
- Ao professor Luiz Antônio Almeida Pinto (laboratório de operações unitárias/FURG-RG/RS), por sua amizade e interesse, que mesmo de longe espera que seus pupilos ganhem o mundo;
- Ao meu mestre de capoeira Marcos Simplício, por sua amizade e força prestadas nas horas difíceis que passei aqui em Campinas.

RESUMO

A utilização de polímeros naturais como biomateriais tem crescido nos últimos anos. Existem polímeros naturais, como a quitosana, por exemplo, que têm grande potencial de uso nas áreas farmacêuticas, médicas, de engenharia de tecidos e engenharia biomédica (reconstituição de ossos), e matriz de liberação controlada de fármacos, com propriedades biológicas interessantes, tais como: biocompatibilidade com tecidos e órgãos humanos, não toxicidade, capacidade hemostática, bactericida, fungicida e principalmente propriedade cicatrizante. Este polímero pode ser utilizado juntamente com outros compostos, como a papaína, que é uma enzima proteolítica extraída do mamão e que possui propriedade antiinflamatória, fungicida facilita a cicatrização de tecidos epiteliais.

O objetivo deste trabalho foi estudar a utilização da quitosana e papaína no reparo de tecidos epiteliais. Para tal, foram produzidas micropartículas de quitosana com papaína sorvida em diferentes concentrações e também com a utilização de agentes reticulantes como o glutaraldeído 0,75% em massa e o tripolifosfato de sódio (TPP) 10% m/v, com a finalidade de imobilizar a enzima sobre as micropartículas de quitosana. As micropartículas foram testadas quanto a sua capacidade de liberação de papaína e avaliadas quanto ao tempo de armazenamento. Análises morfológicas (MEV), cristalográficas (DRX) e térmicas (TGA e DSC) foram realizadas para caracterização das micropartículas de quitosana, com a finalidade de verificar a influência do agente reticulante na liberação de papaína sorvida nas micropartículas de quitosana.

Foi observado que as micropartículas utilizadas na forma natural com papaína sorvida sofriam deterioração com o decorrer do tempo. Por esse foi mais indicado o uso de um agente reticulante, com a finalidade de imobilizar a papaína e manter sua atividade enzimática constante. O agente reticulante escolhido foi o TPP, pelo fato de não possuir toxicidade. Foi observado que a imobilização da papaína ocorreu de forma efetiva pelo uso do TPP, pois se conseguiu manter constante a atividade enzimática nas micropartículas de quitosana reticuladas por um período de tempo de 6 meses.

Palavras-chaves: Biomaterial, quitosana, papaína, micropartículas, cicatrização.

ABSTRACT

The use of natural polymers as biomaterials has been growing in the last years. Natural polymers as chitosan, consists in good examples with great potential for use in pharmaceutical and medical areas, tissue and biomedical engineering (reconstitution of bones), and controlled release of drugs. Chitosan presents interesting biological properties, such as: biocompatibility with tissue and organs, non toxicity, hemostatic, anti-bacterial, anti-fungal properties and mainly healing properties. It can be used associated with other active molecules, such as papain, that is a proteolytic enzyme of papaya and also possesses anti-inflammatory property, being able to facilitate the healing of epithelial tissues. The objective of this study was to evaluate the possibility of using of chitosan for wound healing. Hence, microparticles of chitosan with sorbed papain (in several concentrations) associated with the use of crosslinking agents as glutaraldehyde 0.75% (w/w) solution and sodium triphosphate (TPP) 10% (w/v) solution in order to immobilize the enzyme. The produced microparticles were tested on its capacity of papain release and the time of storage. Morphological (SEM), crystallographic (DRX) and thermal (TGA and DSC) analyses were performed for microparticles characterization, with the purpose to verify the influence of the crosslinking agent in the release of papain from the microparticles. As results, microparticles used in the natural form with sorbed papain underwent deterioration with elapsing of the storage time. For this reason, TPP was used to immobilize papain and keep its enzymatic activity, without presenting toxicity. The immobilization of the papain using TPP occurred in a satisfactory way, keeping the enzymatic activity of papain in chitosan microparticles even after a long shelf life.

Key-words: Biomaterial, chitosan, papain, microparticles, wound healing.

ÍNDICE ANALÍTICO

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
 CAPÍTULO 1	
1. NTRODUÇÃO.....	1
 CAPÍTULO 2	
2.OBJETIVO GERAL.....	4
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
 CAPÍTULO 3	
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1.BIOMATERIAIS.....	5
3.2.QUITOSANA.....	6
3.3.FONTES DE QUITINA E QUITOSANA.....	7
3.4.PROPRIEDADES DA QUITOSANA	8
3.5.FORMAS DE UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	10
3.6.MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS DA QUITOSANA.....	11
3.6.1.Utilização de agentes reticulantes	12
3.6.2.Modificações enzimáticas.....	14
3.7.PAPAÍNA.....	15
3.8.TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS.....	16
 CAPÍTULO 4	
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1.PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	20
4.1.1.Preparação da solução de quitosana.....	20
4.1.2.Preparação das micropartículas de quitosana.....	20
4.2.MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	21
4.2.1.Micropartículas de quitosana natural, com papaína sorvida.....	21
4.2.2.Modificação química das micropartículas de quitosana com imobilização de papaína utilizando-se agentes reticulantes.....	22

4.2.2.1.Imobilização da papaína com glutaraldeído.....	23
4.2.2.2.Imobilização de papaína com TPP.....	23
4.3.MÉTODO DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	24
4.3.1.Método de secagem por <i>spray drying</i>	24
4.3.2.Método de secagem por liofilização.....	25
4.4.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.5.CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	27
4.5.1.Distribuição do tamanho e determinação do tamanho médio de partícula.....	27
4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as micropartículas de quitosana.....	27
4.5.3.Difração de raios-X.....	28
4.5.4.Espectroscopia de infravermelho(FTIR-ATR).....	28
4.5.5.Análises térmicas.....	29
4.5.5.1.Análise de termogravimetria (TGA).....	29
4.5.5.2.Análise de calorimetria exploratória diferencial(DSC).....	29
4.5.6.Análise de umidade.....	30
4.6.AVALIAÇÃO DO TEMPO DE MEIA VIDA DA PAPAÍNA.....	30
4.7.ESTUDO DE APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	31
4.7.1.Cinética de liberação <i>in-vitro</i>	31
4.7.1.1.Preparação das amostras para teste de liberação (utilização de membranas de diálise).....	31
4.7.1.2.Cinética de liberação <i>in-vitro</i> para micropartículas de quitosana natural e reticuladas com papaína sorvida.....	32
4.7.1.3.Teste da eficiência de cicatrização <i>in-vivo</i>	33
CAPÍTULO 5	
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1.PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	35

5.2.CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	35
5.2.1.Distribuição do tamanho e determinação do tamanho médio de partícula.....	35
5.2.2.Difração de raios-X (DRX) para quitosana natural.....	38
5.3.TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA.....	38
5.4.MÉTODO DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	39
5.4.1.Secagem das micropartículas de quitosana sorvidas com papaína pelo método de <i>spray drying</i>	40
5.4.1.1.Difração de raios-x (DRX).....	40
5.4.1.2.Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
5.4.2.Secagem das micropartículas de quitosana sorvidas com papaína pelo método de liofilização.....	44
5.4.2.1.Difração de raios-X (DRX).....	45
5.4.2.2.Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
5.4.2.3.Testes de liberação de papaína.....	49
5.5.MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM PAPAÍNA SORVIDA.....	52
5.5.1.Teste de liberação de papaína a partir de micropartículas reticuladas com glutaraldeído.....	52
5.5.2.Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	53
5.5.3.Teste de liberação de papaína a partir de micropartículas reticuladas com TPP.....	55
5.5.4.Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.....	55
5.5.5.Difração de raios-X para as micropartículas reticuladas com TPP.....	57
5.5.6.Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR).....	59
5.5.7.Análises térmicas.....	60
5.5.7.1.Análise de Termogravimetria (TGA).....	60
5.5.7.2.Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	61
5.6.INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS MICROPARTÍCULAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA.....	62

5.6.1. Tempo de armazenamento para as micropartículas de quitosana com papaína sorvida.....	63
5.6.2.Tempo de armazenamento para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com papaína sorvida.....	64
5.7.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	66
5.8.ESTUDO DE APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	69
5.8.1.Cinética de liberação <i>in vitro</i> para micropartículas de quitosana contendo papaína e reticuladas com TPP	70
5.8.2.Cinética de liberação <i>in vitro</i> para micropartículas de quitosana envelhecidas contendo papaína e reticuladas com TPP	70
5.8.3.Estudo de liberação <i>in vivo</i>	74
5.8.3.1.Resultados macroscópicos para os testes de cicatrização " <i>in-vivo</i> "	74
5.8.3.2.Análises térmicas efetuadas nos tecidos dos Hamsters coletados pós-cicatrização.....	78
5.8.3.3.Análises termogravimétricas (TGA).....	79
5.8.3.4.Análise por TGA-DTG de TA (tecido animal), QT (controle positivo); QT 14 dias e QT 28 dias (implantadas nos animais – implantes <i>in- vivo</i>).....	80
5.8.3.5.Análise por TGA-DTG de Tecido animal (TA); QT (controle positivo); QP 14 dias e QP 28 dias (implantadas nos animais - implantes <i>in vivo</i>)	82

CAPÍTULO 6

6.DISSCUSSÃO GERAL.....	84
6.1.PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	84
6.2.MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	84
6.3.MÉTODOS DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS.....	86
6.4.MORFOLOGIA E CRISTALINIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	87
6.5.ESTUDO DA APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE	

QUITOSANA.....	88
CAPÍTULO 7	
7. CONCLUSÕES.....	91
7.1. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura molecular dos segmentos de cadeia da quitosana.....	6
Figura 3.2: Representação da estrutura química do glutaraldeído após reação com as cadeias de quitosana.....	13
Figura 3.3: Representação da estrutura química do tripolifosfato de sódio (TPP) após reação com quitosana.....	14
Figura 3.4: Molécula de papaína	15
Figura 3.5: Comparação entre o método convencional de dosagem de fármacos (a) e o método de liberação controlada (b)	17
Figura 4.1: Desenho esquemático do sistema de obtenção das micropartículas de quitosana.....	21
Figura 5.1: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 1% de quitosana.....	36
Figura 5.2: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 1,5% de quitosana.....	36
Figura 5.3: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 2 % de quitosana.....	37
Figura 5.4: Difratoograma de difração de raios-x para a quitosana natural.....	38
Figura 5.5: Gráfico da atividade enzimática da papaína a 37°C em solução aquosa ao longo do tempo.....	39

Figura 5.6: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1%, secas por spray drying.....	41
Figura 5.7: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por spray drying.....	41
Figura 5.8: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m, com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por spray drying.....	42
Figura 5.9: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v de papaína, seca por spray drying.....	43
Figura 5.10: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v, seca por spray drying.....	44
Figura 5.11: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m secas por liofilização.....	45
Figura 5.12: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v e secas por liofilização.....	46
Figura 5.13: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v e secas por liofilização.....	46
Figura 5.14: a) Micrografia das micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de	

quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por liofilização
e b) micrografia das micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana
1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por
liofilização..... 48

Figura 5.15: Perfil de atividade enzimática da papaína a partir de micropartículas de
quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com de papaína sorvida a
partir de uma solução de papaína 1% m/v, secas por spray
drying..... 49

Figura 5.16: Perfil de liberação da papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas
a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de
papaína 1% m/v, secas por liofilização..... 50

Figura 5.17: Perfil de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de
quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir
de solução de papaína 1% m/v, reticuladas com
glutaraldeído..... 53

Figura 5.18: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de
quitosana 1% m/m com papaína 1% m/v e reticuladas com
glutaraldeído..... 54

Figura 5.19: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de
quitosana 1% m/m com 3% m/v de papaína reticulada com
glutaraldeído..... 54

Figura 5.20: Perfil de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de
quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir

de solução de papaína 1% m/v reticuladas com TPP.....	55
Figura 5.21: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m adsorvida com papaína 1% m/v e reticuladas com TPP.....	56
Figura 5.22: Micrografia de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 3% m/v reticuladas com TPP.....	56
Figura 5.23: Micrografia de fratura da superfície de uma micropartícula de quitosana reticulada (fixada com epiclоридrina, para fins de melhorar a visualização dos poros).....	57
Figura 5.24: Difratoograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir e uma solução de papaína 1% m/v, reticuladas com TPP.....	58
Figura 5.25: Espectros de infravermelho (IV) micropartículas de quitosana pura (a) e micropartículas de quitosana modificadas com TPP e papaína (b); e (c) micropartículas de quitosana modificadas com glutaraldeído e papaína.....	60
Figura 5.26: Termogramas das micropartículas de quitosana modificada com TPP e papaína(a) e quitosana natural (b)	61
Figura 5.27: Análise de calorimetria exploratória diferencial para micropartículas de quitosana pura (a) e micropartículas de quitosana modificadas com TPP e papaína (b).....	62
Figura 5.28: Gráfico do perfil de atividade da papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir	

de solução 1% m/v de papaína secas por liofilização com tempo de armazenamento de 5 dias.....	63
Figura 5.29: Gráfico do perfil de atividade de papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 15 dias de armazenamento.....	64
Figura 5.30: Gráfico do perfil de atividade de papaína para micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, reticuladas com TPP, com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 5 dias de armazenamento.....	65
Figura 5.31: Gráfico do perfil de atividade de papaína para micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, reticuladas com TPP, com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 15 dias de armazenamento.....	65
Figura 5.32: Gráfico de Pareto mostrando a influência das variáveis independentes na cinética de liberação das micropartículas.....	68
Figura 5.33: Gráfico de superfície de respostas para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.....	69
Figura 5.34: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.....	71
Figura 5.35: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de	

quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2 % m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1 % m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.....	71
Figura 5.36: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas de quitosana 1% m/m, com papaína sorvida a partir de solução de papaína obtidas a partir de solução de quitosana 3% m/v e reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.....	72
Figura 5.37: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 3% m/v , reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.....	72
Figura 5.38: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1,5% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 2% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.....	73
Figura 5.39: Fotografia do procedimento de aplicação das micropartículas de quitosana, pura e modificadas com papaína e TPP, em lesões provocadas intencionalmente no tecido epitelial de Hamsters.....	74
Figura 5.40: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana pura (QT) e micropartículas de quitosana 1,5% m/m com papaína 2% m/v sorvida reticuladas com TPP (QP).....	79
Figura 5.41: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana pura (QT) e micropartículas de quitosana 1,5% m/m com papaína 2% m/v sorvida reticuladas com TPP (QP).....	81

Figura 5.42: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana, onde pode ser observado: pele natural, quitosana 1,5% m/m com 2% m/v de papaína sorvida reticulada com TPP (QP), 1,5% m/m com 2% m/v de papaína sorvida reticulada com TPP, implantada com 14 dias (QP 14 dias) e 1,5% m/m com 2% m/v de papaína sorvida reticulada com TPP, implantada com 28 dias (QP 28 dias)..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Trabalhos publicados visando a aplicação, principalmente, de quitosana na liberação controlada de drogas.....	11
Tabela 4.1: Níveis das variáveis usadas no planejamento experimental factorial.....	26
Tabela 4.2: Matriz de planejamento experimental para avaliação da influência dos parâmetros de controle, concentração de quitosana e de papaína nas micropartículas.....	26
Tabela 5.1: Tabela comparativa da atividade enzimática de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com glutaraldeído, com papaína sorvida.....	51
Tabela 5.2: Matriz de planejamento experimental com os fatores de estudo e resposta considerada.....	66
Tabela 5.3: Quadro de ANOVA da análise estatística realizada.....	67
Tabela 5.4: Tabela de resposta da cicatrização das análises de lesões provocadas na pele de Hamsters com o uso de curativos de micropartículas de quitosana pura (controle) e micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e papaína sorvida.....	77

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A incidência de lesões de pele, principalmente ferimentos de grande extensão causados por queimaduras, feridas crônicas, escara e úlceras de pressão, entre outros, são de extrema importância clínica em função da alta frequência com que ocorrem. Existem numerosas complicações que podem acentuar estas lesões, tais como proliferação bacteriana, tendo como consequência infecções, perda de fluido corporal e alto custo dos tratamentos face à demora dos mesmos quando para obtenção de cicatrização (Wouk *et al.*, 1998; Wollina *et al.*, 2003).

Durante o período de cicatrização, podem ainda aparecer outras complicações tais como: formação de tecido de granulação exuberante, contração do tecido e epitelização da ferida. Existe também grande incidência de feridas crônicas provocadas por escaras de pressão e de diabetes, as quais são de difícil cicatrização. Por esse motivo, é necessário que haja tratamento adequado que acelere o período de cicatrização e que amenize o desconforto do tratamento para o paciente (Souza, 1989, Wouk *et al.*, 1998; Moulin *et al.*, 1999).

A importância das lesões tem suscitado por parte dos pesquisadores, a obtenção de materiais compatíveis, ou biomateriais que possam abreviar o período de cicatrização e promover maior conforto ao paciente, sobretudo pelo alívio da dor. Entre os produtos utilizados encontram-se soluções anti-sépticas, quimioterápicas e películas e ou membranas biológicas ou sintéticas para uso tópico.

Segundo Wouk (1998), uma grande dificuldade encontrada durante o tratamento clínico de feridas com utilização de biofilmes é a necessidade de troca diária do curativo. Pode-se, desse modo, afirmar que este é o ponto crítico, que pode elevar o tempo e o custo do tratamento, causando maior desconforto ao paciente e riscos de contaminação, se cuidados com higienização do ferimento não forem tomados.

Durante os últimos anos, a utilização de biomateriais na área médica tem crescido muito. Dentre os biomateriais pode-se citar a quitosana, um biopolímero que vem despertando bastante interesse junto à comunidade científica mundial devido,

principalmente, ao seu grande potencial de aplicação em diversas áreas. Este fato tem sido observado tanto para as suas formas naturais como para os seus derivados (Knorr, 1991).

O uso de um biomaterial para o reparo de tecido cutâneo normalmente se dá na forma de ungüentos, que são de fácil aplicação, mas não garantem proteção mecânica da pele, ou no uso de filmes que aderem no ferimento podendo causar mais lesões. Uma outra possibilidade seria o uso de micropartículas biodegradáveis, que não necessitariam da troca do curativo durante o tratamento, podendo acelerar o período de cicatrização da pele.

A quitosana é um polissacarídeo natural oriundo da desacetilação da quitina através de uma base forte. Trata-se de um biopolímero hidrofílico. Tal propriedade da quitosana é proveniente do grupamento amino, responsável pela solubilidade da quitosana em soluções de ácido diluído (Hirano, 1996). A quitina é encontrada em grande quantidade na carapaça de crustáceos, no exoesqueleto de insetos e nas paredes celulares de fungos. Tanto a quitina quanto a quitosana assemelham-se quimicamente à celulose.

A quitosana possui grande aplicabilidade no campo da engenharia biomédica e de biomateriais, devido à sua habilidade em acelerar a cicatrização de lesões cutâneas. Apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade e bioatividade. Alguns estudos da literatura indicam propriedades antimicrobianas (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e cicatrizantes. Seus metabólitos residuais também são atóxicos tornando a quitosana, um material de grande potencial de aplicação na área médico-farmacêutico.

Existem, ainda, outros fatores que contribuem para que a quitina e a quitosana despertem interesse científico e tecnológico em diversas áreas, tais como: a) sua abundância na natureza; b) obtidos de fonte natural; c) são os principais componentes da casca de crustáceos, que geralmente são descartados como resíduos do processamento da indústria pesqueira; d) biodegradabilidade; e) biocompatibilidade com os órgãos, tecidos e células animais e vegetais; f) não são tóxicos em administração oral e implantes em animais; g) processabilidade em diversas formas como flocos, pós finos, grãos, membranas, esponjas, fibras, fios e géis. Possuem ação biológica em órgãos, tecidos e células de animais e vegetais, como também, nos solos e na hidrosfera, podendo ainda ser química ou enzimaticamente modificados (Hirano, 1996).

Na área de curativos hemostáticos, todos puderam, recentemente, com os acontecimentos da guerra entre os EUA e o Iraque, assistir ao anúncio do uso do produto

QuikClot da Z-Medica, de Connecticut, EUA, à base de zeólita e quitosana, que visa estancar sangramentos intensos. Além desses exemplos, a maioria dos produtos que contêm quitina e/ou seus derivados, disponível no mercado, ainda é destinada à administração por via oral para dietas de controle de peso.

O Brasil é um país que possui uma longa costa marítima, produzindo assim, grande quantidade de produto pesqueiro industrializado, sendo necessário o tratamento de todo o resíduo de pescado (crustáceos em particular) produzido pelas indústrias. Muitas vezes, tais resíduos não são reaproveitados e muito menos tratados, poluindo rios, lagoas e córregos. Esse fato acarreta um grande prejuízo para o meio ambiente e também para a sociedade, ocasionando mau cheiro, a incidência de insetos e de animais que podem causar doenças para população dos arredores. Há ainda, o problema do desperdício de material nobre, como quitina e quitosana, que são descartados juntamente na casca dos crustáceos não sendo aproveitados por grande parte das indústrias.

Existe, dessa forma, grande necessidade, no âmbito nacional, de estudos na área de produção e caracterização de biomateriais à base de quitosana. É imprescindível que o Brasil possua autonomia em termos de tecnologia para produção e aplicação deste biopolímero na área médica, dada a vasta costa marítima brasileira, que assegura uma rica fonte de quitosana.

Devido à necessidade de aplicação de novos materiais nas áreas biomédicas e farmacêuticas, a quitosana apresenta-se como um importante material que pode se enquadrar neste campo, principalmente para o controle da liberação de fármacos no organismo, podendo ser associada a outros compostos, como a papaína que é uma enzima proteolítica com propriedades anti-inflamatórias, formando um complexo e aumentando assim o potencial de cicatrização do material.

A perspectiva que se vislumbra, através do presente trabalho, é a utilização de micropartículas de quitosana como matriz polimérica para liberação de fármacos e também como agente cicatrizante, utilizando-se a papaína como um potencial facilitador da cicatrização de tecidos epiteliais, associando suas propriedades com as da quitosana .

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa estudar a obtenção de micropartículas de quitosana modificadas quimicamente e a verificação de seu potencial para a aplicação no reparo de lesões nos tecidos epiteliais. Para a modificação química, foram escolhidos dois agentes reticulantes, o glutaraldeído e o tripolifosfato de sódio (TPP). A papaína foi escolhida como agente ativo a ser adicionado nas micropartículas.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entre os objetivos específicos deste trabalho podem-se citar:

- Determinação de um processo de obtenção de micropartículas de quitosana para uso como biomaterial;
- Otimização dos melhores processos de secagem e sua eficiência na liberação controlada de papaína;
- Avaliação de agentes reticulantes que possam melhorar a etapa de liberação da papaína;
- Verificação do mecanismo de liberação *in-vitro* da papaína sorvida* nas micropartículas de quitosana.
- Implante *in-vivo* do material obtido.

* Neste trabalho, utilizamos o termo sorção para designar generalizadamente a incorporação da papaína na matriz de quitosana, que poderia ser um fenômeno de superfície (neste caso, usaria-se do termo "adsorção", assim como um fenômeno *bulk*, que poderia envolver "absorção").

CAPÍTULO 3

3. REVISÃO DE LITERATURA

A aplicação de materiais poliméricos com propósitos médicos e farmacêuticos vem crescendo rapidamente entre os biomateriais e tem sido evidenciada em diversos campos como engenharia de tecidos, implantes de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros (Azevedo, 2003). Nos últimos anos, tem crescido o interesse pelo uso de alguns biopolímeros na utilização como tecido artificial e reparo de lesões em tecidos epiteliais. Um exemplo de biopolímero disponível para estes tipos de reparos é a quitosana, estudada por ser um polissacarídeo biocompatível com tecidos animais e por ser biodegradável e não tóxico.

3.1. BIOMATERIAIS

Os biomateriais podem ser definidos como todo material utilizado para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos. Estes devem possuir a capacidade de permanecer em contato com tecido vivo e recompor partes lesadas do organismo, ou ainda auxiliar na recuperação. Podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluídos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo. Os biomateriais podem ser produtos metálicos, cerâmicos, poliméricos sintéticos ou naturais.

Os biomateriais devem possuir características imprescindíveis de: biocompatibilidade, ou seja, devem atender ao requisito de funcionalidade para o qual foram produzidos, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias; devem ser não-tóxicos; esterilizáveis e capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos que eles substituem (Szycher, 1992). A biocompatibilidade está relacionada à intensidade dos processos inflamatórios ou imunológicos desencadeados pelo organismo quando um material estranho entra em contato com fluidos biológicos.

A seleção de um biomaterial é baseada na combinação de suas propriedades mecânicas, físicas e biológicas (Benson, 2002) e depende da utilização ao qual é destinada. Como essas propriedades são extremamente sensíveis a variações da estrutura do material em escala

micro ou nanométrica, é fundamental que se tenha perfeito entendimento de como se correlaciona a microestrutura do material com as propriedades biológicas desejadas.

Atualmente, na área médica são empregados muitos tipos de biomateriais, tais como silicone e derivados, politetrafluoretileno, polietileno de alta densidade, vidro bioativo, acrílicos, adesivos entre outros, que podem ser utilizados em variados tipos de implantes.

Merkli (1996), afirma que o uso potencial de um polímero como biomaterial depende de sua biocompatibilidade e estabilidade dos tecidos vivos. Um dos parâmetros importantes de trabalho é o grau de pureza do produto. Sabe-se que os polímeros, depois de sintetizados, podem apresentar algum tipo de impureza, tais como: resíduos de solventes, catalisadores de reação, estabilizadores, subprodutos da reação, monômeros residuais e oligômeros.

Segundo Middleton (2002), os sistemas poliméricos são largamente utilizados na indústria farmacêutica, não só como material de revestimento de cápsulas e comprimidos, mas também como matrizes que permitem a fácil liberação de drogas no organismo de maneira controlada.

3.2. QUITOSANA

A quitosana, poli[β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranase], é um biopolímero catiônico, em meio ácido, resultante da desacetilação da quitina. A quitosana é representada pela fórmula geral $[C_6H_{11}O_4N]_n$, onde “n” indica o grau de polimerização da quitosana e possui a estrutura molecular conforme apresentado na Figura 3.1.

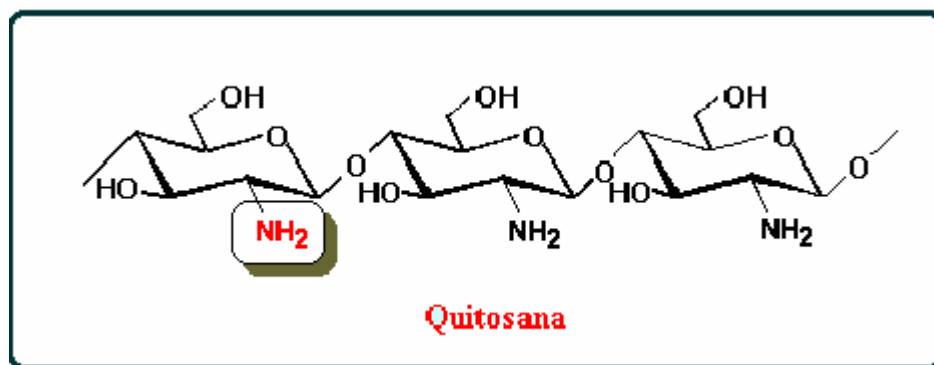


Figura 3.1: Estrutura molecular dos segmentos de cadeia da quitosana

A quitosana, total ou parcialmente desacetilada, é constituída de grupos D-glucosaminas (GlcN) e N-acetil-D-glucosaminas (GlcNAc), resultando em um copolímero de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina. Normalmente é denominada de poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina. A quitina é um polissacarídeo com ramificações de grupos acetamina que, quando desacetilados, transformam-se em quitosana.

Observa-se na Figura 3.1 que a quitosana possui no carbono 2 um grupamento amino primário, o qual confere ao polissacarídeo características químicas e físicas diferentes da quitina e da celulose. Este fato torna a quitosana um biopolímero extremamente interessante, por ser um polieletrólito com alta solubilidade e extrema reatividade (Hirano,1996).

A quitina e a quitosana são considerados polímeros heterogêneos, pois possuem em sua cadeia polimérica, tanto monômeros acetilados quanto desacetilados. Isto porque as formas totalmente acetiladas ou totalmente desacetiladas não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação em laboratório. Para diferenciar um polímero de outro se usa uma regra comum: se o grau de desacetilação do polímero for igual ou maior que 50% ($GD \geq 0,50$), o polímero é denominado quitosana, caso o contrário é quitina (Hirano,1996).

3.3. FONTES DE QUITINA E QUITOSANA

A quitina e a quitosana são polímeros biosintetizados e biodegradados na biosfera terrestre, em um volume anual estimando de 100 bilhões de toneladas por ano. A quitina é um dos materiais mais abundantes na natureza, perdendo apenas para a celulose (Muzzarelli,1973).

A quitina encontra-se largamente distribuída na natureza, sendo o maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos tais como os crustáceos. Também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras (Peter, 1995).

A quitina funciona como um componente fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos nos quais ocorre. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como

matrizes que interagem com outros constituintes, tais como carbonatos e fosfatos (Chen *et al.*, 1998).

No momento, a fonte de obtenção da quitina economicamente mais viável tem sido o rejeito das indústrias de processamento de crustáceos, destacando-se, em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas (Abazinge *et al.*, 1993). Alguns estudos demonstram que existe uma boa quantidade de quitina no cefalotórax do camarão-rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) (Tenuta & Zucas, 1985 e 1987), no caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) e na lagosta (*Panulirus argus*), sendo encontrado em torno de 14% em base úmida, demonstrando, portanto, a grande potencialidade do Brasil em produzir quitina e quitosana em larga escala. O Brasil produz grande quantidade de resíduos de crustáceos que são quase que completamente desperdiçados (IBAMA, 1994).

Ultimamente, devido ao crescimento do interesse científico e principalmente industrial em quitina e quitosana, outras fontes destes materiais foram avaliadas, como por exemplo, extração de quitina do fungo utilizado na produção de ácido cítrico (Muzzarelli *et al.*, 1994). Os pesquisadores acreditaram que, no futuro, os microorganismos serão uma das principais fontes de quitina e quitosana (Muzzarelli *et al.*, 1994). Entretanto, estas fontes alternativas de obtenção de quitosana ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, além de haver problemas técnicos, encarecendo o produto final. Com a finalidade de evitar problemas futuros, até mesmo de ordem bioecológica, têm crescido as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e quitosana (Arcidiacono & Kaplan, 1992).

3.4. PROPRIEDADES DA QUITOSANA

A quitosana é um excelente complexante de metais pesados e essa importante propriedade pode ser aplicada nas áreas farmacêutica, de saúde, de purificação de água e alimentícia. Os grupos amino livres presentes no polímero podem adquirir carga positiva, em presença de soluções ácidas diluídas, formando um sal solúvel que confere a quitosana suas propriedades específicas.

A quitosana pode ligar-se seletivamente a colesterol, gorduras, proteínas e células tumorais, como também com outros materiais como, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos, ácidos graxos entre outros, os quais, por sua superfície negativa interagem

fortemente com a quitosana, em razão da carga positiva desta. A quitosana é um excelente agente coagulante ou floculante devido à alta densidade de grupos amino que podem interagir com colóides, proteínas, corantes e polímeros carregados negativamente. Por exemplo, a quitosana se adere facilmente em polímeros naturais tais como os encontrados em cabelo e pele, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas.

A quitosana apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade e bioatividade, é atóxica, bactericida, fungicida e biodegradável e age como composto cicatrizante, apresentando vantagem em relação aos polímeros sintéticos que, na sua grande maioria, são tóxicos (Sinha, 2004; Kumar, 2000; Mi *et al.*, 1999c; Calvo *et al.*, 1997).

Alguns parâmetros são importantes para caracterizar a qualidade da quitosana, tais como: grau de desacetilação (GD), solubilidade em solução 1% de ácido acético, pH, viscosidade, turbidez, tamanho das partículas, fonte ou origem, massa molecular, conteúdo residual de proteínas e aminoácidos. O grau de desacetilação é também considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitosana e é determinado por inúmeros métodos propostos na literatura, tais como espectroscopia de infravermelho e de ultravioleta, ressonância magnética nuclear (RMN), análises térmicas, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e titulometria. Em grande parte dos métodos publicados, a técnica de espectroscopia de infravermelho é a mais utilizada, onde os dados são ajustados em equações relacionadas às bandas associadas aos grupos N-acetil e hidroxila presente na quitina. Como exemplo, as Equações 3.1 e 3.2 (Moore & Roberts, 1980; Miya *et al.*, 1980) foram desenvolvidas por diferentes autores para o cálculo do grau de desacetilação da quitosana:

$$GD = \left[1 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) * \frac{1}{1,33} \right] * 100 \quad (3.1)$$

$$GD = 97,67 - \left[26,486 \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \right] \quad (3.2)$$

Nas duas equações são utilizados os valores de absorbâncias das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} , que são associadas a carbonila (C=O) dos grupos N-acetil e hidroxila (OH),

respectivamente. A primeira banda varia conforme o grau de desacetilação da quitina, diminuindo para a quitosana e a segunda está presente tanto no espectro da quitina quanto da quitosana, portanto, não sofre variação.

3.5. Formas de utilização da quitosana

A quitosana é um material funcional de aplicação potencial em vários campos do conhecimento, como nas áreas biomédica, ecológica e industrial. Na área de medicamentos, a quitosana pode ser conformada de várias formas, tais como: membranas ou filmes; gel; nano e micropartículas; esferas; esponjas.

A quitosana é utilizada em pesquisas médicas como agente cicatrizante ou servindo de matriz polimérica para dar suporte a outros compostos. Kweon *et al.* (2003) trabalharam com a quitosana solúvel em água e também com complexo de quitosana e heparina, como agente acelerador de cicatrização em tecido cutâneo, sendo utilizados como pomada em ferimentos cutâneos de ratos. Os pesquisadores constataram que a quitosana solúvel em água apresentou não somente um bom efeito cicatrizante, mas também uma grande facilidade em ligar-se com peptídeos, principalmente com heparina. Constatou-se ainda que o complexo quitosana-heparina foi mais eficaz que a quitosana pura utilizada no processo de cicatrização *in-vivo*.

As formas de aplicação da quitosana variam de acordo com o sistema onde a mesma é destinada. Em muitos casos, utiliza-se a quitosana para liberação controlada de compostos ativos em medicamentos, reconstituição de tecidos e produção de tecido artificial.

Para a produção de partículas esféricas de quitosana, geralmente se utiliza glutaraldeído, com a finalidade de enrijecer a estrutura das esferas. A opção para se evitar a utilização do glutaraldeído seria substituí-lo por alginato de sódio. A aplicação de drogas liberadas através de membranas porosas e microesferas tem recebido muita atenção, principalmente para drogas utilizadas no combate ao câncer, tais como cisplatina, adriamicina e agentes terapêuticos baseados em peptídeos (Mi *et al.*, 2002; Supersaxo *et al.*, 1993; Wite *et al.*, 1993).

Implantes de hidrogel com macroporos são preparados a partir dos seguintes polímeros: poliacrilamida, ácido polimetacrílico, ácido poliacrílico, álcool polivinílico e polihidroxietilmetacrilato entre outros. Esses implantes têm sido usados com sucesso no

processo de liberação de proteínas como insulina e γ -globulina por longo período de tempo e em pH sensível destas proteínas (Peppas *et al.*, 1992; Baldwin *et al.*, 1998). Esponjas macroporosas também têm sido aplicadas no uso em engenharia de tecidos, para liberação controlada de drogas, para cicatrização e regeneração de tecidos (Tabata *et al.*, 1998; Recum *et al.*, 1998).

As estruturas poliméricas macro e microporosas são obtidas através de vários métodos. Elas podem ser preparadas por geração de bolhas de gás dentro do material durante a síntese, por indução de partículas solúveis dentro do polímero, copolimerização de uma emulsão bicontínua, ou por copolimerização de monômeros em um solvente (Gehrke, 1993; Okay *et al.*, 1992).

A utilização de polímeros naturais biodegradáveis é importante no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas, particularmente para a liberação de drogas à base de proteínas e peptídeos. Na literatura são encontrados diversos trabalhos que utilizam quitosana e outros polímeros como matriz polimérica para liberação controlada de drogas, como pode ser observado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Trabalhos publicados visando a aplicação de quitosana na liberação controlada de drogas.

Tipo de polímero utilizado	Forma de aplicação	Uso	Referência
Pectina	Esferas	Liberação controlada de Atenol.	Aydin, 1996.
Quitosana	Esferas	Liberação controlada de Calcitonina Salmão	Aydin et al., 1996.
Complexo Pectina amidada / quitosana	Grânulos (hidrogel)	Liberação controlada de drogas	Munjeri et al., 1997.
Quitosana/alginato	Partículas	Liberação controlada de albumina bovina	Aral, 1998.
Quitosana	Microesferas	Liberação controlada de diclofenaco de sódio	Gupta, 2000.
Complexos de quitosana/TPP	Esferas	Liberação controlada de drogas	Shu et al., 2000.
Complexos de quitosana/TPP	Esferas	Imobilização de drogas (indometacin)	Mi et al., 2002.
Complexos de quitosana	Micropartículas	Liberação controlada de drogas	Agnihotri e Aminabhavi, 2004.

3.6. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS DA QUITOSANA

A presença de grupos amino na quitosana a torna extremamente reativa e mais interessante que a celulose, ampliando as possibilidades de modificá-la quimicamente

(Peter, 1995). Na quitosana, os grupos amino encontram-se livres, e esta é sua grande vantagem em relação a outros biopolímeros, pois é um polieletrólito catiônico que forma sais em presença de ácidos, fazendo com que a quitosana seja reativa e solúvel (Peter, 1995; Ogawa & Magalhães, 1989).

Além de pesquisas básicas, esforços têm sido dispensados pelos pesquisadores para evidenciar novas aplicações deste biopolímero e suas formas modificadas, visto que são materiais de grande potencial de aplicação, superando a aplicação da celulose em muitos aspectos como, por exemplo, ser um polissacarídeo com grupos amino livres (Kurita, 1986).

As modificações da quitosana podem ser realizadas pela adição de agentes que promoverão reticulação na cadeia polimérica, com a finalidade de modificar as características mecânicas, físicas e ou químicas do polímero, ou então através da modificação da massa molecular do mesmo, através da utilização de enzimas hidrofílicas.

3.6.1. UTILIZAÇÃO DE AGENTES RETICULANTES

No decorrer dos anos, em busca de uma melhor estabilidade física e química para as matrizes poliméricas utilizadas como biomateriais, têm-se utilizado muitos agentes reticulantes, tais como: glutaraldeído, epícloridrina, diglicil etilenoglicol, entre outros, os quais são considerados tóxicos (Mi *et al.*, 2001). Um exemplo da toxicidade destes agentes reticulantes é evidenciado pela irritação em mucosas causada pelo uso do glutaraldeído (Lim *et al.*, 1997). O glutaraldeído normalmente age como agente formador de ligações cruzadas (crosslinking) através da reação que ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos amino livres dos compostos (Hajdu, 1975). Entretanto, o glutaraldeído, em muitos casos, deixa resíduos tóxicos na quitosana. A Figura 3.2 apresenta a possível estrutura química do glutaraldeído após a reação com a quitosana.

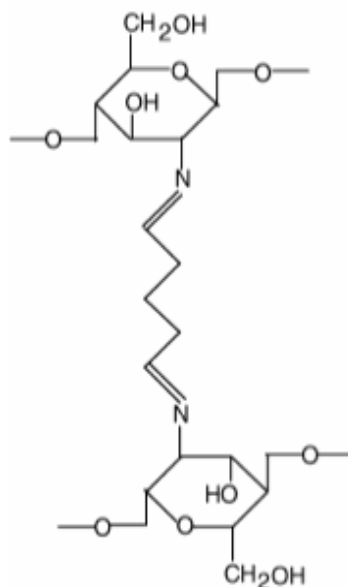


Figura 3.2: Representação da estrutura química do glutaraldeído após reação com as cadeias de quitosana.

Segundo Aral (1988), uma outra forma de obter-se uma boa reticulação da quitosana (*crosslinking*), é através do uso de pectina ou então de alginato de sódio. A utilização do alginato de sódio pode ser uma boa solução para se evitar o problema de toxicidade do glutaraldeído.

O uso da complexação entre macromoléculas de cargas opostas vem sendo muito pesquisado para preparar esferas e microesferas de quitosana, para liberação controlada de drogas (Shu *et al.*, 2000). Entre os agentes reticulantes utilizados, podemos encontrar o tripolifosfato de sódio (TPP) que é um sal, que contém um ânion atóxico e pode interagir com a quitosana catiônica através de forças eletrostáticas (Kawashima *et al.* 1985 a , b; Shu *et al.*, 2000). Na Figura 3.3 é apresentada a estrutura química do TPP após reação com quitosana.

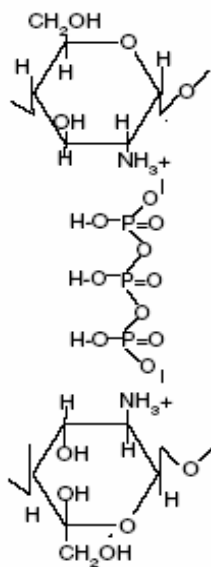


Figura 3.3: Representação da estrutura química do tripolifosfato de sódio (TPP) após reação com quitosana.

O complexo eletrostático de quitosana-TPP pode ser preparado por gotejamento da solução de quitosana na solução de TPP (Bodmier *et al.* 1989; Shirashi *et al.*, 1993; Sezer and Akbuga, 1995; Aydin and Akbuga, 1996; Calvo *et al.*, 1997 a, b; Shu and Zhu, 1999; Shu *et al.*, 2000).

3.6.2. MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS

As modificações da quitosana efetuadas através de reações enzimáticas geralmente são realizadas com a intenção de modificar a massa molecular do polímero. Algumas pesquisas têm sido realizadas com essa finalidade e mostram que a quitosana com baixa massa molecular possui melhor atividade antibacteriana em relação a quitosana de alta massa molecular.

Neste sentido, Kumar *et al.*, 2004, pesquisaram a modificação da quitosana com papaína, com a finalidade de obter o polímero com menor massa molar, que é mais interessante para a indústria farmacêutica e médica, principalmente com relação às propriedades bactericidas do polímero, obtendo bons resultados com a utilização de papaína livre para modificação da quitosana.

3.7. PAPAÍNA

A papaína é uma enzima proteolítica (hidrólise, classe 3) extraída do látex de frutos não maduros de mamão (*Carica papaya*). É classificada como cisteíno-protease devido à presença de um resíduo de cisteína com ação catalítica no seu sítio ativo. Apresenta sete cisteínas ao todo, seis das quais formam 3 ligações dissulfeto em um extremo da molécula. A Figura 3.4 apresenta a estrutura tridimensional da papaína, com as estruturas secundárias de folha alfa e beta da papaína.

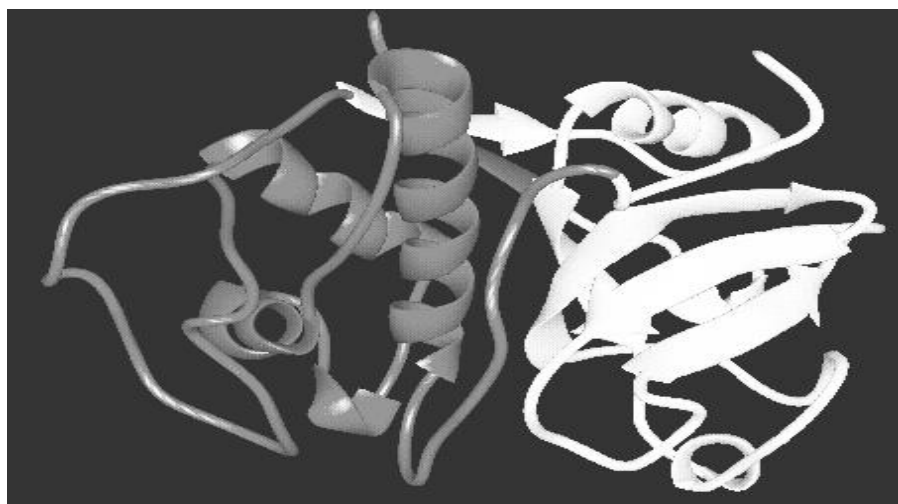


Figura 3.4: Molécula de papaína (Figura extraída do site, <http://www.qca.ibice.unesp.br/BNR/BNR02-2003.html>)

A papaína possui vasta aplicação na indústria de alimentos devido à sua forte ação proteolítica, tendo como principais aplicações, a clarificação de cerveja, o amaciamento de carnes e o processamento de couro em curtumes. Também é utilizada na área farmacêutica, como agente que dissolve o excesso de proteína e muco de tecido (<http://geocities.com/timesquare/cauldron/5112/biologia/riqueza1.html>).

Segundo Candido (1991), a papaína atua como "debridante" químico que facilita o processo de cicatrização, permeando tecidos necrosados e diminuindo sua atividade ao atingir tecidos vivos. Tem ação bacteriostática e bactericida e atua na como antiinflamatório, facilitando o alinhamento das fibras de colágeno dos tecidos, produzindo tecidos mais resistentes e reduzindo a formação de quelóides e cicatrizes. Nesse sentido,

pode-se incorporar uréia à papaína, o que intensifica ainda mais a sua capacidade de cicatrização.

A enzima pode ser mantida em solução de NaCl a 4°C por longo período de tempo sem a perda da atividade. É estável em faixa de temperatura de 30°C a 75°C, com temperatura de atividade ótima em torno de 60°C, e faixa de pH de 3,0 a 9,5 com pH ótimo em 6,5. A propriedade mais surpreendente da papaína é a sua resistência a temperaturas elevadas e quando em contato com solventes orgânicos (Aparecida, 1994) devido, principalmente à manutenção da estrutura ativa em função das pontes dissulfeto presentes nas cisteínas.

3.8. TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS

A tecnologia de liberação controlada de medicamentos no organismo humano vem sendo muito estudada, por apresentar eficácia prolongada e menor efeito colateral e, a liberação controlada da dosagem de drogas no organismo realça a segurança, eficácia e qualidade da terapia.

Atualmente, os sistemas de liberação controlada são definidos como aqueles nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com cinética bem estabelecida (Baker, 1987).

Os sistemas de liberação controlada oferecem vantagens em relação aos métodos convencionais (Graham, 1988), tais como:

- manutenção de níveis constantes de substâncias no organismo, implicando em eficiência maior na utilização do agente, ou seja, é necessário menor quantidade do fármaco para a produção do mesmo efeito que os sistemas convencionais;
- aplicação do agente diretamente no sítio de ação, produzindo altas e contínuas concentrações localizadas e evitando-se efeitos colaterais sistêmicos;
- menor frequência de administração do agente ativo, proporcionando ao conforto do paciente e aumentando a eficácia do tratamento,

A Figura 3.5 ilustra a comparação do método convencional de aplicação de múltiplas dosagens e o sistema de liberação controlada, utilizando o mesmo agente terapêutico

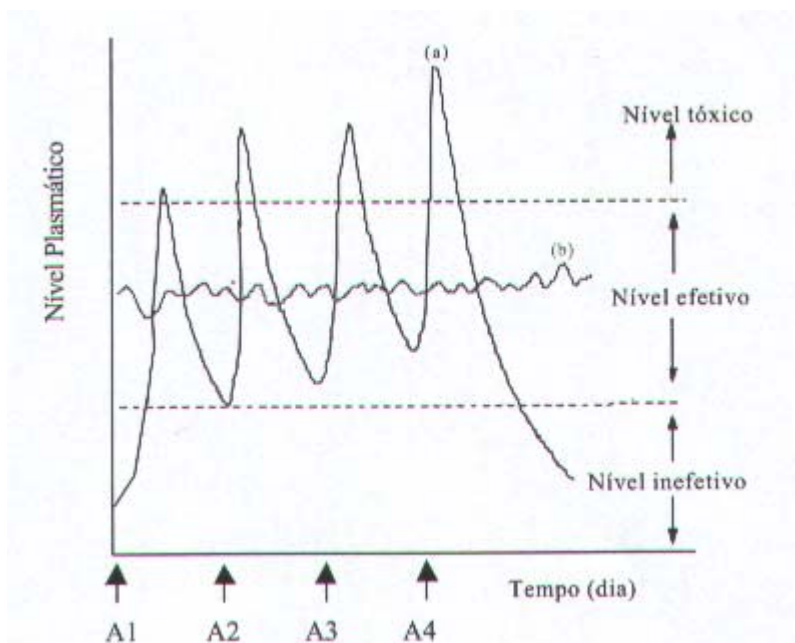


Figura 3.5: Comparação entre o método convencional de dosagem de fármacos (a) e o método de liberação controlada (b) (Thacharodi, 1996).

O primeiro método, curva (a), está longe de ser o método ideal, pois neste caso são necessárias dosagens diárias (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 ...), como é apresentado na figura 3.5. Isto proporciona variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo ocasionar intoxicação ou ainda não ocorrer o efeito farmacológico desejado, pois há uma faixa de concentração efetiva do agente farmacológico para o organismo. O método de liberação controlada, curva (b), proporciona pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, reduzindo a toxicidade (Vulcani, 2004).

Segundo Baker (1987), os tipos de mecanismos que controlam a liberação do fármaco determinam também sua classificação, podendo ser classificados em:

- sistemas controlados por difusão;
- sistemas controlados por embebição;
- sistemas controlados quimicamente.

SISTEMAS CONTROLADOS POR DIFUSÃO.

Os sistemas controlados por difusão são sistemas do tipo reservatório, nos quais uma membrana envolve o fármaco, controlando sua difusão, ou sistemas monolíticos, nos

quais o agente ativo está uniformemente dissolvido ou disperso na matriz polimérica (Thacharodi, 1996).

Nos sistemas de reservatório, a taxa de liberação é constante se houver uma concentração constante de fármaco no interior do reservatório. O mecanismo de liberação é governado pela primeira lei de Fick (Thacharodi, 1996), e pode ser expressa pela equação 3.3:

$$J_i = -D(dc_i/dx_i) \quad (3.3)$$

onde:

J = fluxo de massa

i = concentração do soluto (composto ativo, ou fármaco)

D = coeficiente de difusão do soluto (composto ativo, ou fármaco)

dc_i/dx = gradiente de concentração com relação à distância dentro da matriz polimérica.

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA POR EMBEBIÇÃO

Nos sistemas de liberação controlada por embebição, ocorre absorção do solvente do meio, modificando a cinética de liberação. Sendo assim, a mesma depende da função da taxa de absorção do solvente e da taxa de difusão do fármaco (Higuchi, 1970 *apud* Vucani, 2004, Sheu, 1991).

SISTEMAS CONTROLADOS QUIMICAMENTE

Nos sistemas controlados quimicamente, o fármaco pode estar distribuído uniformemente como nos sistemas monolíticos, nos quais o fármaco está imobilizado na matriz e a liberação ocorrerá pela erosão da matriz polimérica. Quando ocorrem ligações covalentes entre o fármaco e a matriz polimérica, a liberação ocorrerá por meio de cisões das ligações formadas, através de reações químicas, geralmente enzimáticas, hidrolíticas ou pela biodegradação da matriz (Higuchi, 1970, Martins, 1998).

Segundo Kumar (2000), um grande número de polímeros vêm sendo utilizados devido ao seu potencial de degradabilidade, sendo aproveitados tanto os polímeros sintéticos como os naturais. Drogas covalentemente acopladas a polímeros biodegradáveis

ou dispersas em matrizes poliméricas podem ser liberadas por erosão ou degradação do polímero.

Pelo fato da quitosana apresentar propriedades interessantes, como capacidade de formar gel em pH baixo, não promover nenhum tipo de reação na mucosa estomacal quando ingerida, sofrer uma gradual expansão em meio ácido, não ser tóxica, possuir capacidade de adsorção a partir dos sítios carregados, além de propriedades bioadesivas, a quitosana acaba apresentando potencialidade de aplicação para a indústria farmacêutica.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

4.1.1. Preparação da solução de quitosana

Uma solução 2,5% (em massa) foi preparada pela dissolução de 10g de quitosana extraída de casca de caranguejo (adquirida da Sigma-E.U.A., número de produto C 3646, com, no mínimo, 85% de desacetilação e alta massa molecular) em 485mL de solução acética, 3% em massa. Os flocos hidratados em meio ácido foram dispersos por agitação e mantidos por uma semana a 4°C para completa solubilização. Em seguida, a solução viscosa foi diluída em solução acética (3% em massa) para concentrações de 1%, 1,5% e 2%, cujas soluções foram então, filtradas em sistema a vácuo com filtro de papel.

As soluções filtradas foram então acondicionadas em frascos de polietileno à temperatura de 4°C, para posterior uso na obtenção das micropartículas de quitosana.

4.1.2. Preparação das micropartículas de quitosana

As micropartículas de quitosana foram preparadas a partir das soluções filtradas em concentrações de 1%, 1,5% e 2% m/m de quitosana, para serem utilizadas nas etapas de adição e liberação do composto ativo e caracterização das mesmas.

O método utilizado para obtenção das micropartículas consistiu na atomização de uma solução ácida de quitosana, através de um bico duplo-fluido, sobre uma solução alcalina (NaOH 1M), utilizada para coagular as micro-gotículas.

O método utilizado para preparação das micropartículas de quitosana consistiu de quatro etapas:

- a) Atomização da solução de quitosana à vazão constante com fluxo de nitrogênio controlado em que foi utilizado um sistema de atomização, fornecido pela *Spray Systems* do Brasil (1/4JN-SS+SU11-SS). A solução foi bombeada por bomba peristáltica da *Cole Parmer* a vazão de 40mL.min⁻¹ (calibração feita com água para a pressão de operação de N₂ no atomizador de 2,25 kgf/cm²).
- b) Formação das micropartículas propriamente dita, devido à não solubilização de quitosana em soluções alcalinas, através do método de inversão de fases, obtido

- sob agitação de 600 rpm em agitador magnético. As partículas foram então deixadas em solução alcalina por um período de aproximadamente 24 h.
- c) As micropartículas obtidas foram separadas da solução coagulante através de filtração, utilizando-se um sistema de peneiras da marca GRANUTEST, com abertura de 0,053 mm.
- d) As micropartículas foram lavadas inúmeras vezes com água Milli-Q ultra pura, até que fosse retirado todo o NaOH e que o pH se ajustasse na faixa de 6,8-7,0 e, em seguida, foram acondicionadas em água Milli-Q a 4°C.

A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático do sistema utilizado para obtenção das micropartículas de quitosana.

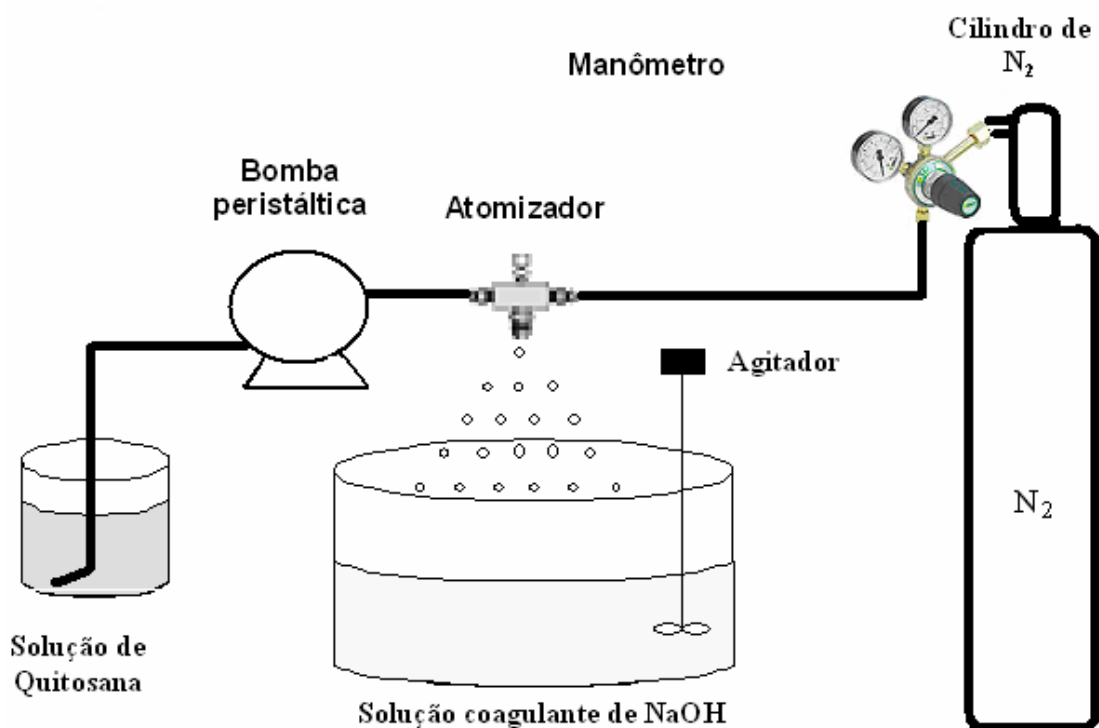


Figura 4.1: Desenho esquemático do sistema de obtenção das micropartículas de quitosana, por coagulação alcalina.

4.2-MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As micropartículas de quitosana obtidas foram utilizadas de duas maneiras:

- micropartículas naturais de quitosana, com papaína sorvida;

- micropartículas de quitosana reticuladas, com dois tipos de agentes reticulantes:
- solução aquosa de glutaraldeído 0,75% m/m;
- solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) 10% m/v.

4.2.1. Micropartículas de quitosana natural, com papaína sorvida

O método de modificação das micropartículas de quitosana com sorção de papaína, Brauzyn 100, fornecida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, consistiu nas seguintes etapas:

- Suspensões de micropartículas de quitosana, obtidas a partir de soluções de quitosana em diferentes concentrações (1%, 1,5% e 2% m/m), foram separadas por peneiramento e colocadas em béqueres;
- Soluções de papaína foram preparadas em diferentes concentrações e adicionaram-se 100 mL da solução preparada a 50 g de micropartículas. Três diferentes concentrações de papaína (1%, 2% e 3% m/v) foram utilizadas com a finalidade de verificar qual concentração de composto ativo teria mais eficiência nas características físico-químicas das micropartículas.
- A suspensão foi deixada em repouso por, aproximadamente, 12 horas;
- As micropartículas foram peneiradas e lavadas para a retirada da papaína em excesso;
- As micropartículas foram acondicionadas em solução de tampão fosfato de sódio, pH 7,4 em temperatura ambiente e levadas para o processo de secagem.

4.2.2. Modificação química das micropartículas de quitosana com imobilização de papaína utilizando-se agentes reticulantes

Para se promover melhor estabilidade mecânica e química às matrizes poliméricas, há trabalhos na literatura que utilizam agentes químicos, tais como glutaraldeído e epícloridrina, que são agentes denominados de reticulação química (Mi *et al.*, 1999c; Blanco *et al.*, 2000), e agentes denominados de reticulação iônica, como por exemplo, o tripolifosfato de sódio (TPP). Este último possui vantagem em relação aos dois anteriormente citados, devido ao fato de não possuir toxicidade (Mi *et al.*, 1999b; Shu and

Zhu, 2000, 2001). Neste trabalho, utilizou-se glutaraldeído e TPP como agentes reticulantes.

4.2.2.1. Imobilização de papaína com glutaraldeído

A imobilização da papaína nas micropartículas de quitosana de concentrações (1%, 1,5% e 2%) foi realizada com glutaraldeído, seguindo-se o procedimento:

- Imersão de 50 g de micropartículas de quitosana natural em 500 mL de uma solução de glutaraldeído 0,75% em massa por um período de 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação esporádica (devido à baixa resistência mecânica do material obtido);
- Lavagem exaustiva com água Milli-Q;
- Estocagem em água Milli-Q a 4°C;
- Sorção da papaína ao material reticulado, seguindo-se o procedimento de preparação de solução aquosa de papaína nas diferentes concentrações (1%, 2% e 3% m/v);
- Adição de uma quantidade conhecida de micropartículas à solução;
- A suspensão foi deixada em repouso por, aproximadamente, 12 horas;
- Peneiramento das micropartículas;
- Lavagem com água Milli-Q para retirar o excesso de papaína;
- Acondicionamento em solução de tampão fosfato de sódio, pH 7,4;
- Secagem.

4.2.2.2- Imobilização de papaína com TPP

Nesta etapa, as micropartículas de quitosana foram reticuladas com tripolifosfato de sódio 10%(m/v) conforme (Ko *et al.*, 2002), seguindo-se o procedimento:

- Imersão de 50g de micropartículas de quitosana natural em 500 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio 10% (m/v) por período de 2 horas, à temperatura ambiente com agitação esporádica, devido à baixa resistência mecânica do material obtido;
- Lavagem exaustiva com água Milli-Q;
- Estocagem em água Milli-Q a 4°C;

- Adsorção de papaína ao material reticulado, seguindo-se o procedimento de preparação de solução de papaína nas diferentes concentrações (1%, 2% e 3% m/v) e adição de quantidade conhecida de micropartículas a solução;
- A suspensão foi deixada em repouso por, aproximadamente, 12 horas;
- Peneiramento das micropartículas;
- Lavagem com água Milli-Q, para retirar o excesso de papaína;
- Acondicionamento em uma solução de tampão fosfato de sódio, pH 7,4;
- Secagem.

4.3. MÉTODO DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Dois métodos de secagem para as micropartículas de quitosana foram testados: por *spray drying* e por liofilização. Cada um dos métodos utilizados é descrito nas seções a seguir.

4.3.1. Método de secagem por *spray drying*:

Este método consistiu na utilização de secador tipo *spray dryer*, do laboratório de secagem do Professor Carlos Grosso, Departamento de Alimentos e Nutrição, DEPAN, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, para obtenção das micropartículas secas de quitosana. As etapas da operação de secagem foram:

- Preparação das micropartículas de quitosana para o processo de secagem, onde as micropartículas foram mantidas numa suspensão de tampão fosfato pH 7,4;
- Estabilização do equipamento de secagem: o secador foi deixado ligado até que se atingissem condições estáveis de temperatura, verificadas através de termopares presentes na entrada e saída do secador;
- Bombeamento da suspensão até a câmara de secagem, a uma pressão de operação constante (pressão da bomba de 14%), temperatura do ar de entrada de 200°C e temperatura de saída de 120°C;
- Recuperação das micropartículas secas, coletadas em ciclone acoplado ao sistema;

Para um volume de suspensão de 500 mL, o tempo total de secagem foi de 2 h.

4.3.2. Método de secagem por liofilização:

O método consistiu na utilização de baixas temperaturas sob vácuo, para passagem do estado sólido diretamente para o estado gasoso, ou seja, por sublimação. A secagem das micropartículas de quitosana por liofilização foi efetuada no Instituto de Química da UNICAMP, no laboratório do professor Watson Loh.

A secagem por liofilização é composta de 2 estágios: no primeiro estágio, o material a ser seco é previamente congelado e, no segundo, o material é levado para o processo de secagem em que é sublimado.

O congelamento do material pode ser efetuado de duas formas: congelamento rápido com nitrogênio líquido, ou por congelamento lento em *freezer* a baixas temperaturas. Geralmente, o tipo de congelamento afeta a morfologia do material, pois no congelamento lento haverá a formação de cristais de gelo em sua estrutura, alterando a conformação da mesma, o que não ocorre durante o processo de congelamento rápido.

O método de secagem nesta etapa foi conduzido com o uso de imersão em nitrogênio líquido, a uma temperatura de (-195°C), para efetuar o congelamento rápido das micropartículas de quitosana, seguido de secagem em liofilizador a temperatura de (-62°C) e pressão de operação de (10^{-2} Torr).

A operação de secagem seguiu as seguintes etapas:

- Preparação das micropartículas para secagem; mantidas em suspensão com tampão fosfato de sódio a um pH de 7,4;
- Congelamento com nitrogênio líquido;
- Secagem em liofilizador.

O processo de liofilização durou, aproximadamente, 24 h. Este período depende das propriedades das micropartículas congeladas, ou seja, quantidade de água, hidrofiliabilidade das partículas, entre outras.

4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para melhor avaliação da influência de alguns parâmetros na cinética de liberação da papaína contida nas micropartículas de quitosana, foi realizado um planejamento experimental do tipo fatorial 2^2 com ponto central em triplicata. As variáveis estudadas

foram a concentração de quitosana nas micropartículas e a concentração de papaína sorvida as micropartículas, conforme mostra a Tabela 4.1:

Tabela 4.1: Níveis das variáveis usadas no planejamento experimental fatorial

níveis	-1	0	+1
Concentração de quitosana (X_Q)	1%	1,5%	2%
Concentração de papaína (X_P)	1%	2%	3%

Os níveis experimentais escolhidos para utilização da solução de quitosana foram baseados em limitações físicas do sistema de bombeamento para obtenção das micropartículas. No caso da papaína, baseou-se em níveis considerados seguros, para posterior utilização como agente cicatrizante em testes *in-vivo*, de tal forma que foram escolhidos níveis que não pudessem causar qualquer tipo de rejeição ou irritação em tecidos epiteliais.

Os experimentos realizados seguiram a matriz de planejamento mostrada na Tabela 4.2, e foram efetuados todos os 7 experimentos obtidos a partir da matriz de planejamento, que foi construída conforme Barros Neto *et al.*, 2001.

Tabela 4.2: Matriz de planejamento para avaliação da influência dos parâmetros de controle, concentração de quitosana e de papaína nas micropartículas.

Nº de experimentos	X_Q	X_P
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Onde:

- X_Q refere-se à concentração de quitosana das micropartículas;
- X_P à concentração de papaína contida nas micropartículas ;
- A variável resposta (Y_{Ac}) é a atividade enzimática medida em ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) de tirosina produzida na reação da papaína com o substrato utilizado (caseína).

4.5.CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

4.5.1. Distribuição do tamanho e determinação de tamanho médio de partícula

As micropartículas de quitosana foram caracterizadas quanto à distribuição de tamanho das partículas utilizando-se um analisador de imagem por dispersão da luz (*Master S, Malvern*) no Laboratório de Recursos e Pesquisas Analíticas e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP, numa faixa de 10 μm a 1000 μm . As amostras de micropartículas foram suspensas numa mistura água/álcool, aproximadamente 30% v/v, com a finalidade de evitar que as mesmas aderissem às lentes do equipamento utilizado na análise, causando interferência no resultado.

4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as micropartículas de quitosana

As técnicas utilizadas para a avaliação morfológica são concentradas em microscopia (óptica e eletrônica de varredura). Tais técnicas têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho de microestruturas (Shaffazick *et al.*, 2003; Horisawa *et al.* 2002; Watnasirichaikul *et al.*, 2000; Jeon *et al.*, 1996; Skiba *et al.*, 1996). Para análise morfológica das micropartículas de quitosana, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura, a qual está fundamentada na análise da superfície de um sólido, na qual é incidido um feixe de elétrons por sua superfície da amostra. Os elétrons são captados por detectores especiais, gerando sinais que são utilizados para produzir uma imagem de aspecto tridimensional em anteparo de observação de até 500.000 vezes de aumento.

As análises das micropartículas foram efetuadas em equipamentos do Departamento de Materiais (DEMA) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP), onde foi utilizado um microscópio do tipo JEOL JXA-840A Electron Probe Microanalyzer. As

micropartículas de quitosana foram recobertas com uma camada fina de ouro, que serviu como agente metalizador para que se pudesse tornar a superfície das mesmas, condutora para o feixe de elétrons que gera a imagem das micropartículas através do microscópio.

4.5.3. Difração de raios-X

O fenômeno de difração de raios-X é resultante de um processo de espalhamento no qual os raios-X são espalhados pelos elétrons dos átomos em mudança de comprimento de onda.

Um feixe difratado é produzido por tal espalhamento somente quando certas condições geométricas são satisfeitas, as quais podem ser expressas pela Lei de Bragg ou equação de Laue (Cullity, 1956).

A relação entre o ângulo 2θ e a distância interplanar d é dada pela equação de Laue, equação 4.1:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (4.1)$$

Este método foi utilizado para a caracterização da cristalinidade das micropartículas de quitosana reticuladas, micropartículas de quitosana natural sorvidas com papaína.

A difração de raios-X foi realizada no equipamento X'Pert da Philips, no Laboratório de Recursos e Pesquisas Analíticas e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP.

4.5.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

Nesse estudo foram realizadas análises utilizando-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada a um elemento de reflexão total atenuada (ATR), para verificar a composição química quantitativa das amostras.

Sabe-se que cada molécula possui um estado de vibração característico. Assim, é possível identificá-la através dos valores da energia de radiação infravermelha absorvida. Estes valores são observados em picos, formando bandas de absorção ou transmitância, resultantes dos comprimentos de onda absorvidos.

O espectro foi obtido de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 16 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi FTIR NICOLET-PROTEGE 460, com acessório ATR de cristal

de germânio, do Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas do DPB/FEQ/UNICAMP.

4.5.5. Análises térmicas

Os métodos termo-analíticos são de grande importância para a análise de polímeros (Shaffazick *et al.*, 2003; Gedde, 1990) e têm sido utilizados também para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em diversas formulações de microesferas (Shaffazick *et al.*, 2003; Barkai *et al.*, 1990) e nanopartículas.

Informações úteis podem ser obtidas, a partir destes métodos, a respeito da morfologia do polímero cristalino e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado aos sistemas poliméricos (Shaffazick *et al.*, 2003; 51 Barkai *et al.*, 1990).

4.5.5.1. Análise termogravimétrica (TGA)

As análises térmicas foram realizadas para observação do comportamento e da estabilidade térmica das amostras. Para isso, foi utilizado um analisador termogravimétrico TGA da Perkin-Elmer. Todas as amostras foram analisadas após liofilização. O aquecimento foi feito em uma razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, em atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de $25 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

4.5.5.2. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Análises através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) têm sido utilizadas também para estudar as interações intermoleculares entre fármacos e coadjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e os coadjuvantes (Shaffazick *et al.*, 2003; Venkataram *et al.*, 1995). Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, despolimerização e degradação ou erosão do polímero (Shaffazick *et al.*, 2003).

Os eventos térmicos foram registrados em função da composição, estrutura do material e da história térmica. Para isso foi utilizado um analisador térmico DSC 2920 TA Instruments. O aquecimento foi feito em uma razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até temperatura de 450°C , em atmosfera inerte de nitrogênio, com vazão de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

A técnica de calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para avaliar o comportamento térmico das micropartículas de quitosana, naturais e reticuladas. Tais caracterizações foram também aplicadas sobre tecidos biológicos provenientes de teste "in vivo", realizados no laboratório de análises da FEQ-DTF e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UCDB/MS.

4.5.6. Análise de umidade

Este método foi efetuado para verificar a influência da umidade na atividade enzimática das micropartículas armazenadas em tempos diferentes. Para tal, foi utilizado o método de umidade por gravimetria, baseado na perda de massa em estufa a 105°C por 24 horas até massa constante. A umidade representa a atividade de água no material, que conforme (Cheftel, 1992), a atividade de água é um fator importante na conservação de proteínas, lipídeos entre outros, podendo proporcionar maior ou menor deterioração dos mesmos através de oxidação enzimática e do crescimento de microorganismos, fungos, bolores e bactérias.

4.6. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE MEIA VIDA DA PAPAÍNA

A avaliação do tempo de meia vida da papaína foi efetuada num período de 7 dias, com a finalidade de verificar se, durante este período, a enzima perderia sua atividade enzimática. A análise foi feita em condições de temperatura constante de 37°C, através da preparação de uma solução de papaína 1% m/v que foi deixada em banho termostatzado por 7 dias, sob agitação de 100 rpm.

O procedimento utilizado foi o seguinte:

- Retirar alíquotas da solução a cada 24 horas;
- Adicionar a cada alíquota, 2 mL de EDTA 1mM, 2 mL de caseína 1% (substrato), 2 mL de cisteína 5 mM e 2 mL de tampão fosfato pH 7,4;
- Deixar novamente em banho termostatzado por mais 30 minutos à temperatura de 37°C para promover a reação enzimática (quebra da proteína utilizada como substrato);
- Retirar as amostras do banho;

- Deixar em repouso por 15 minutos;
- Acidificar amostras com 6 mL de ácido tricloroacético, para precipitação do excesso de caseína que não reagiu com a enzima;
- Deixar em repouso por mais 15 minutos;
- Centrifugar as amostras, para separar o sobrenadante do precipitado;
- Retirar o sobrenadante e efetuar leitura do mesmo por espectrofotometria de UV;
- Ler sua absorbância em comprimento de onda de 280 nm, para verificar a concentração de papaína, utilizando curva padrão de tirosina, com caseína como substrato.

4.7. ESTUDO DE APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O estudo da aplicação das micropartículas de quitosana com imobilização de papaína por TPP foi efetuado através de testes que avaliaram a cinética de liberação *in-vitro* da papaína.

4.7.1. Cinética de liberação *in-vitro*

A avaliação da cinética de liberação *in-vitro* foi efetuada para as micropartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio e reticuladas com glutaraldeído. Para tal, foram seguidas etapas de preparação das amostras de micropartículas de quitosana, conforme item 4.7.1.1.

4.7.1.1. Preparação das amostras para teste de liberação (utilização de membranas de diálise)

As amostras de micropartículas de quitosana foram colocadas em membranas de diálise que possuíam capacidade para deixar permear a papaína. O procedimento para utilização destas membranas foi o seguiu as seguintes etapas:

- As membranas de diálise foram primeiramente cortadas a um comprimento de 6 cm;
- Uma das extremidades foi fechada com um fio de barbante de algodão e levada para pesagem;

- As micropartículas foram colocadas dentro das membranas e pesadas novamente (foram colocadas cerca de 10 mg de micropartículas de quitosana em cada membrana);
- A outra extremidade das membranas foi fechada e estas foram levadas para etapa de liberação *in-vitro* da papaína;

O uso de membranas de diálise foi efetuado com o intuito de evitar perda de micropartículas durante a coleta de alíquotas do sobrenadante.

4.7.1.2. Cinética de liberação *in-vitro* para micropartículas de quitosana natural e reticuladas com papaína sorvida

Para o ensaio de liberação foram aplicados dois procedimentos distintos. No primeiro, foi efetuada a troca do sobrenadante (meio de liberação da papaína) por um meio fresco, recém-preparado e, portanto, sem conter qualquer concentração inicial de papaína. Num segundo, tal troca não foi efetuada, mantendo-se mesmo líquido sobrenadante como meio de reposta à liberação de papaína.

PROCEDIMENTO COM TROCA DO SOBRENADANTE

- Preparar oito amostras de micropartículas de quitosana com papaína sorvida;
- Adicionar 10 mg de cada amostra a uma membrana de diálise;
- Colocar em béquer contendo 40 mL de solução tampão fosfato pH 7,4;
- Deixar em banho à temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 100 rpm;
- Retirar alíquotas de 2 mL do sobrenadante a cada hora e substituindo o sobrenadante por mais 40 mL provenientes da solução-mãe tampão fosfato;

PROCEDIMENTO COM TROCA DO SOBRENADANTE

- Preparar oito amostras de micropartículas de quitosana com papaína sorvida;
- Adicionar 10 mg de cada amostra a uma membrana de diálise;
- Colocar em béquer contendo 40 mL de solução tampão fosfato pH 7,4;
- Deixar em banho a temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 100 rpm;
- Retirar alíquotas de 2 ml do sobrenadante a cada hora, repondo a quantidade de sobrenadante retirada com mais 2 mL de solução de tampão fosfato;

Para cada alíquota retirada tanto com ou sem a substituição do meio de liberação, foi seguido o seguinte procedimento de quantificação de papaína:

- Adicionar a cada alíquota 2 mL de EDTA 1 mM, 2 mL de caseína 1%, 2 mL de cisteína 5 mM e 2 mL de tampão fosfato pH 7,4;
- Deixar novamente em banho termostatzado por mais 30 minutos a temperatura de 37°C;
- Retirar as amostras do banho;
- Acidificar com 6 mL de ácido tricloroacético 5% m/v, para precipitação do excesso de caseína que não reagiu com a enzima;
- Deixar em repouso por 15 minutos;
- Centrifugar as amostras;
- Separar o sobrenadante;
- Analisar o sobrenadante por espectrofotometria de UV;
 - Ler a absorbância em comprimento de onda de 280 nm, para verificar a concentração de papaína, utilizando o procedimento da curva padrão de tirosina, com caseína como substrato;

4.7.1.3. Teste da eficiência de cicatrização *in-vivo*

O estudo da eficiência de cicatrização *in-vivo* foi efetuado em 60 Hamsters, machos, acomodados em gaiolas individuais. Estes foram divididos aleatoriamente em um grupo para receber curativo com quitosana reticulada com tripolifosfato/papaína e o outro grupo para receber curativo com quitosana, o qual foi denominado grupo de controle. Durante o experimento, os mesmos foram mantidos em condições adequadas de higiene, iluminação, ventilação e suprimento hídrico e nutricional.

Todos os animais foram submetidos a lesões operatórias nos tecidos epiteliais do dorso-lombo-sacra e posteriormente aplicado o curativo composto de micropartículas de quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio/papaína e micropartículas de quitosana pura para avaliação da velocidade de cicatrização. Os curativos de micropartículas de quitosana aplicados foram preparados por leve compressão de uma determinada quantidade de micropartículas, em um molde circular com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm,

formando assim, um agregado de micropartículas de quitosana para ser aplicado no ferimento.

O teste de eficiência de cicatrização seguiu as seguintes etapas:

- **Preparação dos animais para lesão/técnica operatória;**

Na técnica operatória, os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico e fixados por suas patas a pranchas, a distância constante. A depilação foi efetuada na região dorso-lombo-sacra, em forma circular, numa área igual a aproximadamente $1,0\text{ cm}^2$, com auxílio de molde, tal procedimento foi efetuado no lado direito e no lado esquerdo do animal, com a finalidade de aplicação do curativo com micropartículas de quitosana pura (lado direito) e com micropartículas de quitosana com papaína sorvida e reticuladas com TPP (lado esquerdo).

- **Observação pós-operatória;**

Os animais foram observados quanto às mortes e também quanto à evolução das lesões, sendo avaliados qualitativamente a contração das feridas, a restauração cutânea, a presença de crostas no ferimento, secreções e indícios de infecções.

- **Sacrifício dos animais e biópsia;**

O sacrifício dos animais foi efetuado em grupos escolhidos subsequente às primeiras horas num período de 24 horas, 48 horas e 72 horas após a cirurgia e posteriormente no 7º dia após a cirurgia, no 14º dia, 21º dia e 28º. Para observação de cada grupo, os animais foram avaliados e então sacrificados. Após o sacrifício foram recolhidas amostras do tecido de cicatrização para avaliação do andamento do processo de cicatrização das feridas, retirando-se para isso quantidade de pele normal igual a 1cm e a panícula carnosa subjacente à úlcera.

As amostras coletadas após o sacrifício dos animais foram liofilizadas e levadas para realização das análises térmicas com a finalidade de verificar o comportamento térmico e o perfil de degradação do material para avaliação da velocidade de cicatrização *in-vivo*.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas de quitosana foram obtidas por atomização em bico do tipo spray a partir de três diferentes concentrações de solução de quitosana (1%, 1,5% e 2 % m/m). Estas concentrações foram escolhidas baseadas na faixa que possibilitava um melhor escoamento da solução até o bico atomizador.

A vazão de operação do aparato foi de 90 mL.min⁻¹ e o fluxo de nitrogênio foi controlado a pressão de 2,25 kgf/cm². O processo teve um tempo médio de duração de 40 minutos e foi observado que alguns fatores podiam influenciar o andamento do processo, tais como: concentração da solução de NaOH, vazão de alimentação do bico atomizador, distância do bico à superfície da solução de NaOH. Por esse motivo, todas essas variáveis foram mantidas constantes para cada preparação: concentração da solução de NaOH igual a 1 M, vazão de alimentação de 90 mL.min⁻¹, e distância do atomizador à superfície da solução de NaOH igual a 25 cm.

Um outro fator que influenciou no processo foi a concentração da solução de quitosana; foram utilizadas soluções de quitosana com concentrações de 1% m/m, 1,5% m/m e 2 % m/m.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

5.2.1. Distribuição do tamanho e determinação do tamanho médio de partícula

As micropartículas de quitosana, de diferentes concentrações (1%, 1,5% e 2% m/m) foram caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição de partículas utilizando um analisador de tamanho de partículas por difração a laser (*Mastersizer S, Malvern*) numa faixa de 10 µm a 1000 µm. Os resultados são mostrados nas Figuras (5.1 a 5.3). O diâmetro médio de Sauter para as respectivas partículas foi de 121 µm, 176 µm e 193 µm.

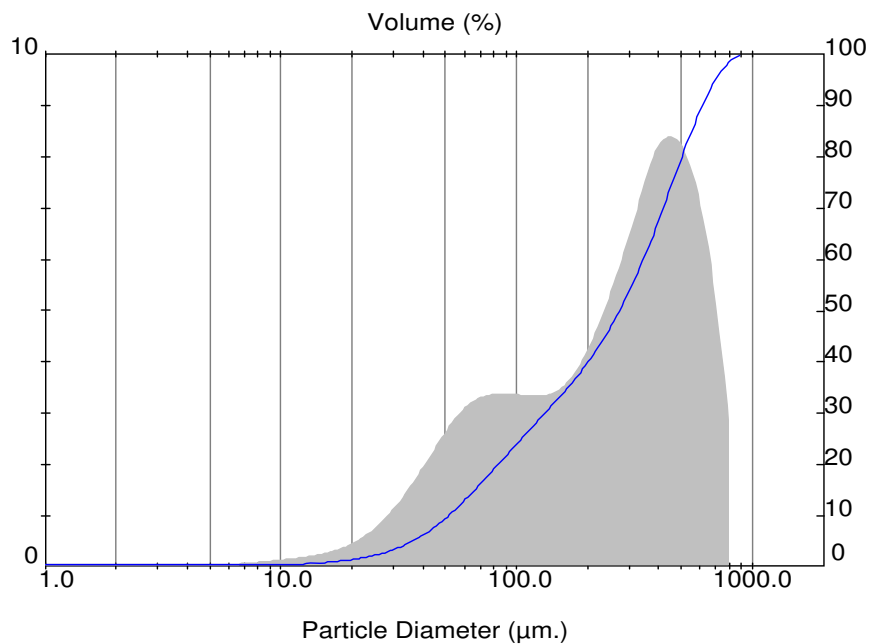


Figura 5.1: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 1% em massa de quitosana.

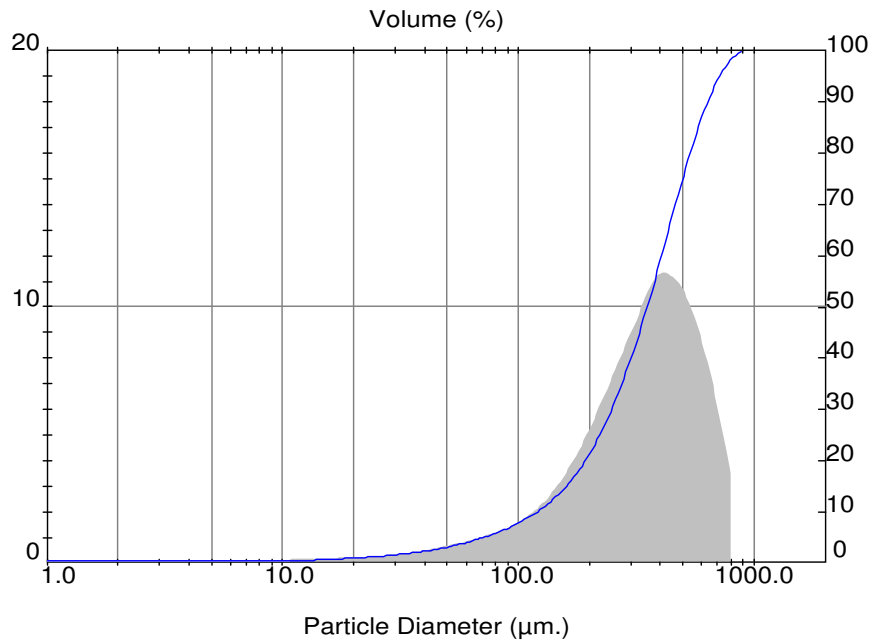


Figura 5.2: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 1,5% em massa de quitosana

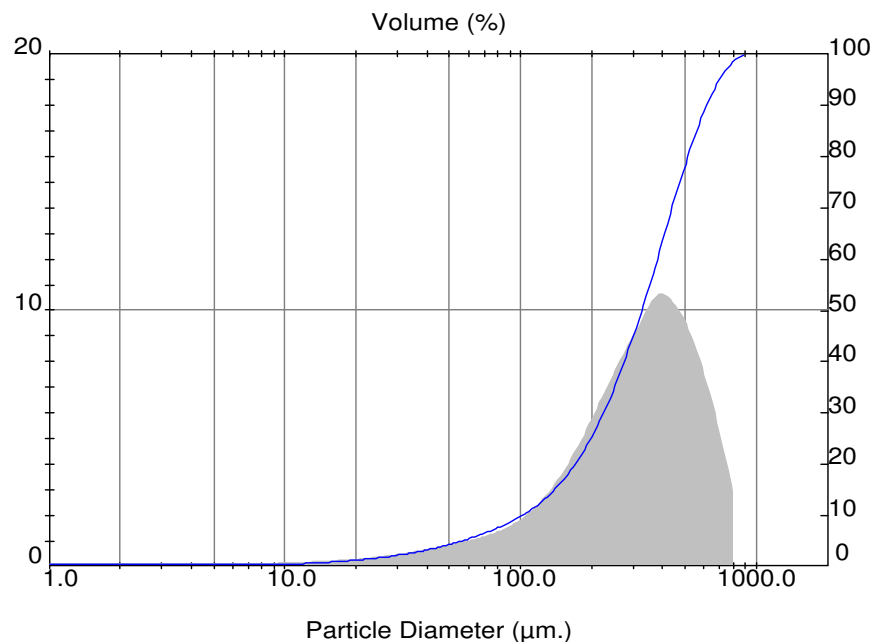


Figura 5.3: Distribuição de tamanho de partículas para micropartículas obtidas a partir de solução de quitosana com 2 % em massa de quitosana

Pode-se verificar que a distribuição do tamanho de partículas foi monomodal para as Figuras 5.2 e 5.3, porém para a Figura 5.1, esta distribuição apresentou um comportamento bimodal. Tal comportamento pode ser relacionado, neste caso, com a concentração da solução de quitosana utilizada de 1% m/m.

Esse fenômeno era esperado pelo fato da concentração da solução de quitosana influenciar na viscosidade da mesma e afetar no tamanho e na forma da partícula obtida. Isso se deve aos choques promovidos entre as gotículas de solução de quitosana provenientes do atomizador e a superfície da solução coagulante. Quanto menor a concentração da solução de quitosana, menor a uniformidade na distribuição de tamanho das micropartículas. Outro fato que pode ocorrer, é que as partículas obtidas a partir de concentrações menores de solução de quitosana tendam mais à agregação. Esta hipótese pode ser reforçada com as micrografias eletrônicas de varredura que evidenciam a irregularidade na forma dessas partículas.

5.2.2 Difração de raios-X (DRX) para quitosana natural

A difração de raios-X foi feita para a quitosana natural utilizada como matéria-prima e apresentou uma forma característica em seus picos conforme mostra a literatura. Este resultado será tomado como padrão de referência nas análises subseqüentes. O difratograma é apresentado na Figura 5.4.

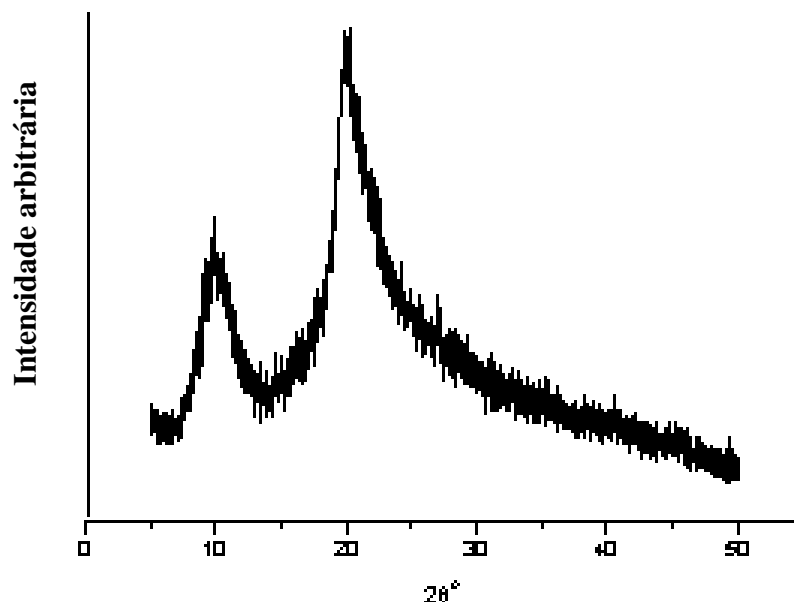


Figura 5.4: Difratograma de difração de raios-x para a quitosana natural.

Na Figura 5.4 podem ser observados os picos característicos da mesma com picos de reflexão em 2θ igual a $10,4^\circ$ e 22° , os quais são referentes a rede cristalina α . Há um poliformismo da quitosana, que reflete na distância interplanar da quitosana e a forma alomórfica da quitosana, a qual resulta num forte decréscimo na capacidade de sorção da mesma, decorrente do processo de desacetilação da quitosana (Kumar *et al.*, 2004; Qi & Xu, 2004). O aparecimento de tais picos indica o alto grau de cristalinidade da quitosana (Qi *et al.*, 2004).

5.3. TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA

O teste de atividade enzimática da papaína foi efetuado para a verificação da estabilidade da mesma num um período de 7 dias, a temperatura de 37°C , com a finalidade

de verificar se estava ocorrendo autólise enzimática, ou seja, degradação, o que poderia afetar o método de quantificação da atividade enzimática.

Como resultado, obteve-se uma curva de atividade enzimática para a papaína conforme apresentado pela Figura 5.5.

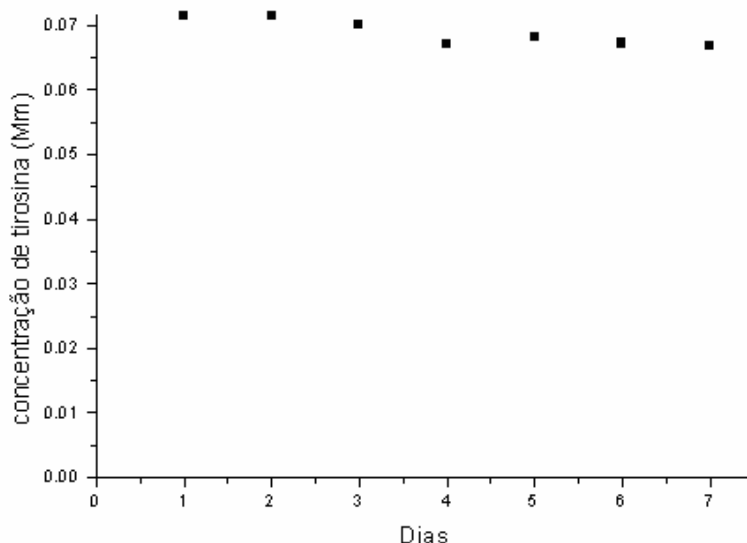


Figura 5.5: Gráfico da atividade enzimática da papaína a 37°C em solução aquosa ao longo do tempo, com utilização de duplicatas de cada ponto experimental.

Através da observação da Figura 5.5, pode-se notar que a atividade enzimática da papaína não sofreu alteração no período de tempo proposto, indicando a possibilidade do uso de tal enzima para sorção às micropartículas de quitosana. Esse resultado foi condizente com a literatura que diz que tal enzima é estável em temperaturas até 75°C.

5.4. MÉTODO DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Os métodos de secagem testados no presente trabalho foram: secagem por *spray drying* e por liofilização.

Com estes testes, buscava-se uma forma de comparação entre os dois métodos de secagem, com a finalidade de verificar qual dos métodos seria mais eficaz para a secagem das micropartículas de quitosana. Por esse motivo, foram efetuadas caracterizações tais

como MEV, para verificação de morfologia, e DRX, para verificação da cristalinidade, no material seco, além de testes de liberação enzimática para verificar a influência dos métodos na atividade enzimática da papaína a partir da micropartículas secas.

5.4.1. Secagem das micropartículas de quitosana com papaína sorvida pelo método de *spray drying*

O método de secagem por *spray drying* apresentou baixo rendimento, o qual foi ocasionado por problemas operacionais, pois a grande maioria das micropartículas injetadas na câmara de secagem aglomeravam, ficando no fundo da câmara sem sofrer arraste pelo ciclone, sendo expostas a altas temperaturas, em torno de 200°C.

As micropartículas coletadas pelo ciclone após o tempo de secagem foram submetidas a testes de liberação de papaína e testes morfológicos.

5.4.1.1. Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X foi efetuada para diferentes concentrações de micropartículas de quitosana sorvidas com papaína, secas pelo método de *spray drying*, com o objetivo de se observar a influência de fatores como método de secagem, concentração da papaína e da quitosana, na cristalinidade das micropartículas.

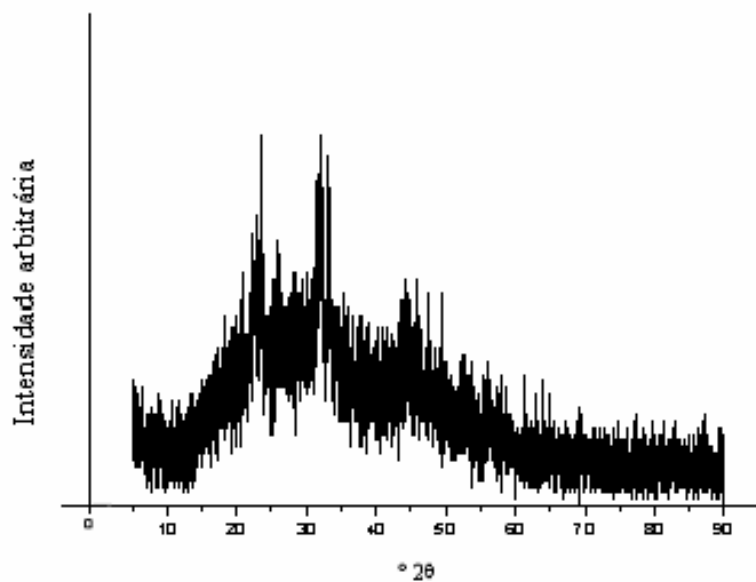


Figura 5.6: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1%, secas por *spray drying*.

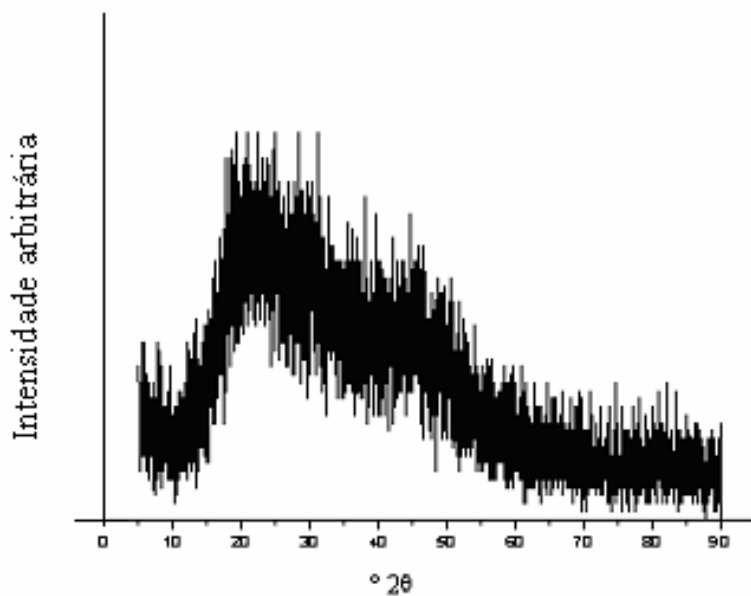


Figura 5.7: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por *spray drying*.

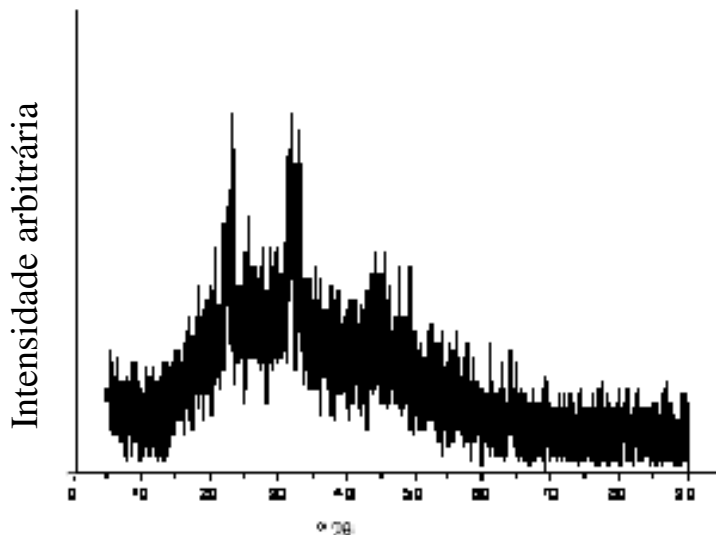


Figura 5.8: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m, com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por *spray drying*.

Pode-se observar, a partir das Figuras 5.6 , 5.7 e 5.8, variação na cristalinidade das micropartículas com diferentes concentrações de papaína e quitosana. Neste caso, foi observado que os picos característicos em 2θ igual a 10° e a 20° , que apareciam no difratograma da quitosana pura, não se mantiveram para as micropartículas de quitosana sorvidas com papaína e secas por *spray drying*. Neste método de secagem, foram observados deslocamentos uma menor intensidade dos picos, principalmente para as micropartículas com menor concentração de quitosana. Nesse caso, houve um alargamento dos picos, denotando menor cristalinidade para o material seco. Este comportamento, observado para as micropartículas com menor concentração de quitosana, já era esperado. Para as micropartículas com maior concentração de quitosana houve a formação de dois picos mais estreitos, mostrando que neste caso ocorreu uma melhor organização da estrutura das micropartículas, porém com menor intensidade em relação à cristalinidade da matéria prima.

Estas variações podem indicar que o método de secagem e a adição de papaína acabaram alterando a cristalinidade da quitosana. Esse fato é observado na literatura,

mostrando que modificações na molécula de quitosana podem induzir a alterações da cristalinidade (Lima, 2005).

Os métodos de processamento da quitosana podem realmente afetar a cristalinidade do polímero. Segundo a literatura, podemos encontrar alguns trabalhos em que são apresentados dados comparativos para os métodos de obtenção da quitosana e também de secagem da mesma, onde ocorre uma diminuição da cristalinidade do polímero, evidenciado através da alteração da distância interplanar entre as cadeias do mesmo quando comparados à secagem por liofilização e por secagem em estufa (Malgorzata et al., 2003).

5.4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada nas micropartículas secas por *spray drying* fornecendo informações quanto à forma e superfície, conforme observados nas Figuras 5.9 e 5.10.

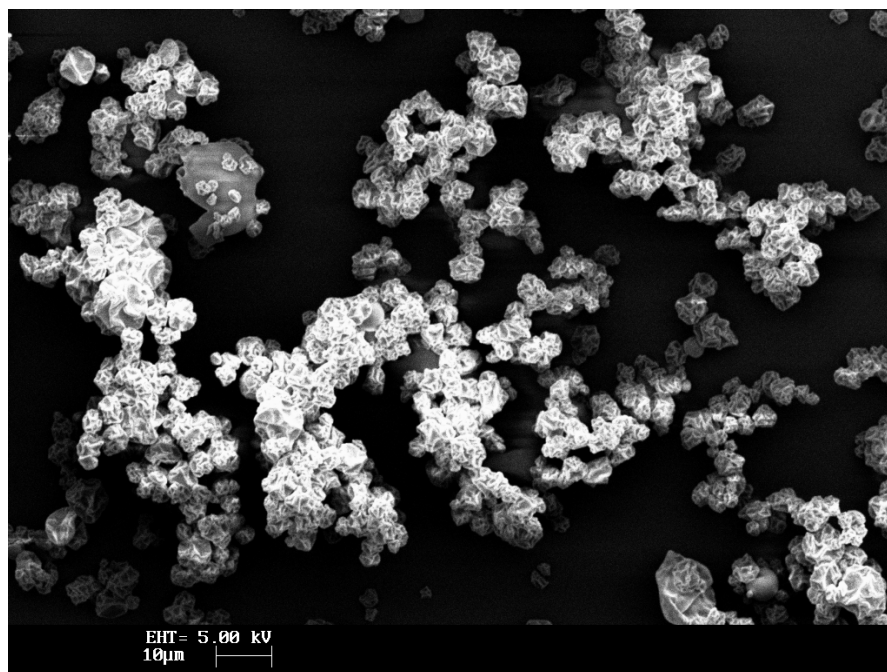


Figura 5.9: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v de papaína, seca por *spray drying*.

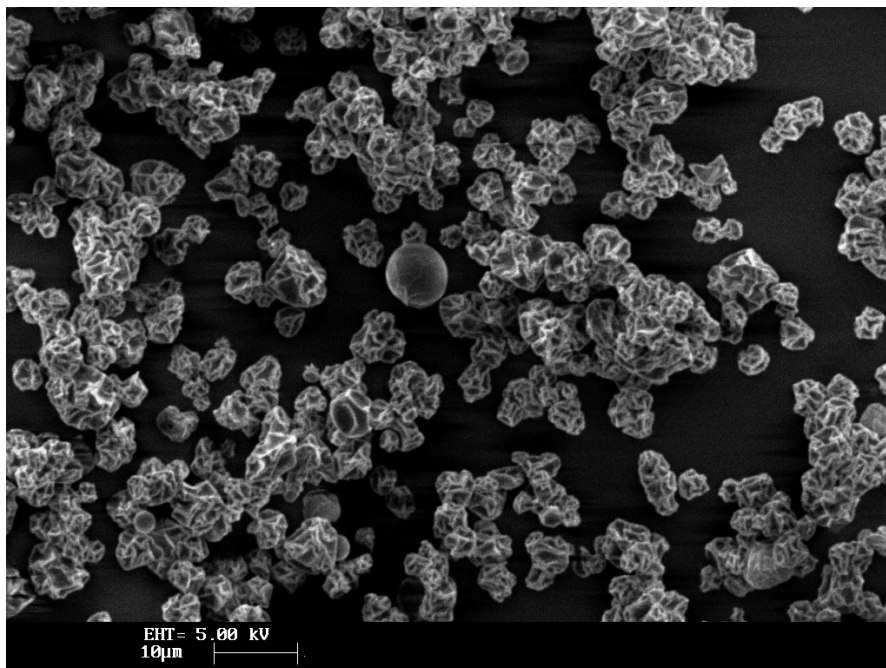


Figura 5.10: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3%, seca por *spray drying*.

A partir das micrografias contidas nas Figuras 5.9 e 5.10, pode-se constatar que a secagem efetuada por *spray drying* conferiu homogeneidade às micropartículas de quitosana, porém observou-se que as superfícies dessas micropartículas tornaram-se deformadas. Tal fenômeno pode ter ocorrido devido ao calor excessivo ao qual as micropartículas foram submetidas durante o período de secagem, além do colapso de sua superfície, com a perda de água.

5.4.2. Secagem das micropartículas de quitosana sorvidas com papaína pelo método de liofilização

O método de secagem por liofilização é considerado um método seguro, pois usa baixas pressões (vácuo) e baixas temperaturas, o que promove a conservação das características do produto final. Segundo Shalaby *et al.*, 1991, a secagem por liofilização é amplamente superior a outros métodos de secagem, por diminuir o teor de água e permitir a qualidade biológica do material.

As micropartículas de quitosana com papaína sorvida, secas por liofilização, também foram submetidas a testes de atividade enzimática da papaína e testes morfológicos.

5.4.2.1. Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X para diferentes concentrações de micropartículas de quitosana com papaína sorvidas, secas pelo método de liofilização, foi efetuada com o objetivo de observar a influência do método de secagem e da concentração de quitosana e papaína na cristalinidade das micropartículas. Os difratogramas das micropartículas de quitosana liofilizadas são apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12.

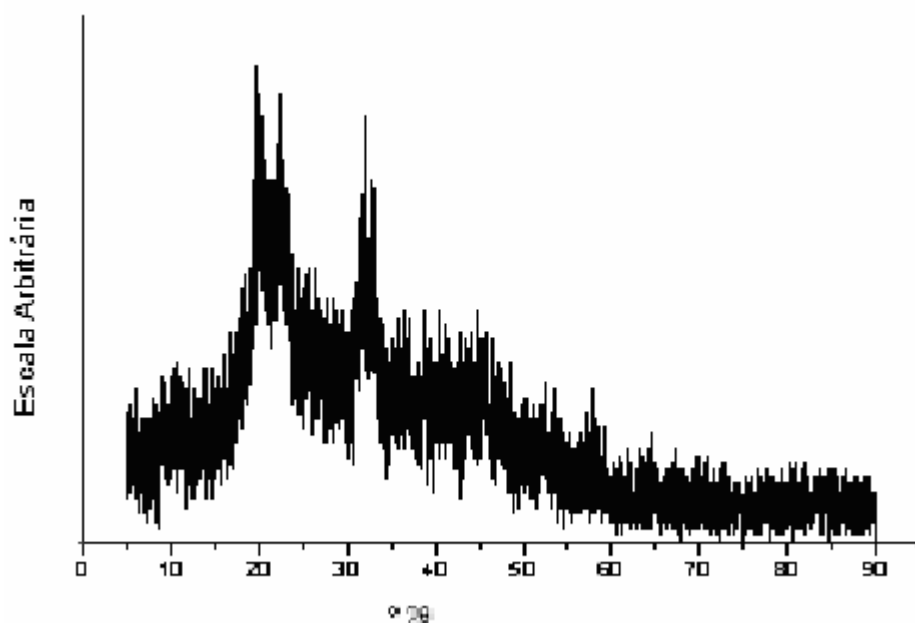


Figura 5.11: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m secas por liofilização.

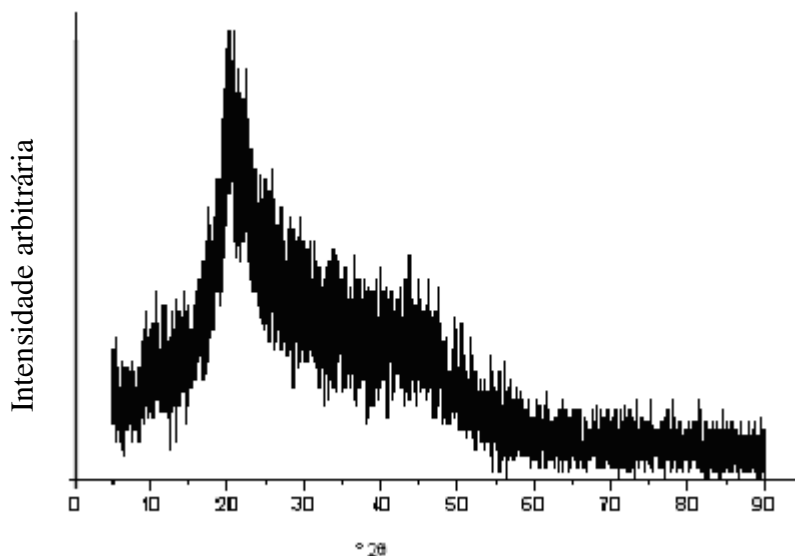


Figura 5.12: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v e secas por liofilização.

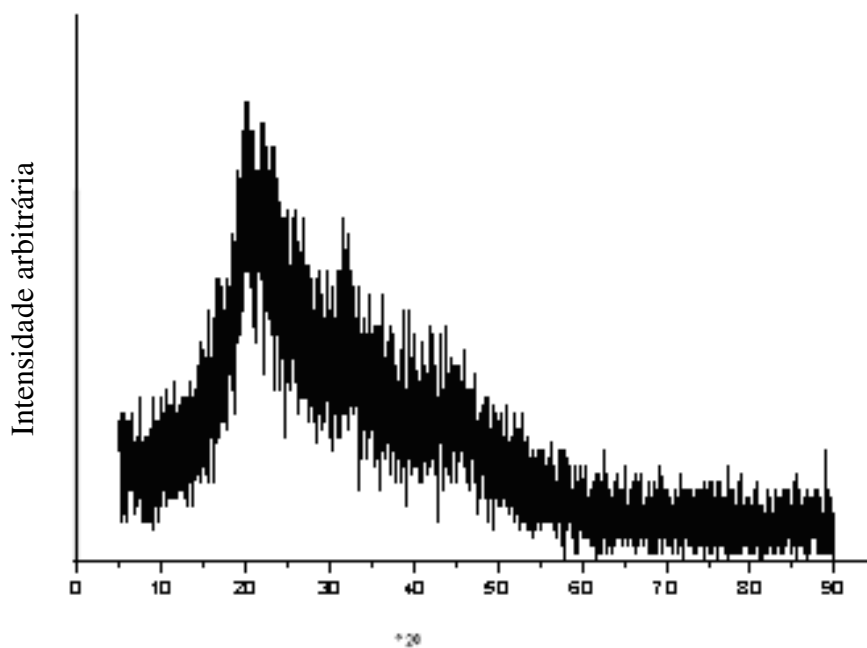


Figura 5.13: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v e secas por liofilização.

Observando as Figuras 5.11, 5.12 e 5.13, pode-se notar que ambas apresentaram uma menor cristalinidade em relação à quitosana pura.

Os resultados mostraram o aparecimento de apenas um pico em 2θ igual a 20° , o qual demonstrou que realmente houve variação na cristalinidade das micropartículas de

quitosana nas duas situações da secagem. Pode-se observar ainda que na secagem por liofilização, o difratograma do material seco ficou mais próximo do difratograma apresentado para a quitosana pura; isso pode estar indicando que o processo de liofilização acarreta uma menor alteração na cristalinidade do material. Tal resultado está indicando que o material obtido por este método de secagem apresenta-se mais amorfo que no caso da matéria prima (quitosana natural).

Neste caso, nota-se que houve um aumento na distância interplanar das moléculas, denotando maior desorganização na estrutura do material, conforme foi observado por Malgorzata *et al.*, 2003, que obtiveram resultados semelhantes aos apresentados no presente trabalho.

Estas variações indicam que o método de secagem, a adição de papaína e a reticulação acabaram alterando a cristalinidade da quitosana em relação à cristalinidade da quitosana pura. Esse fato é observado na literatura que indica que modificações na molécula de quitosana podem levar a alterações em sua cristalinidade (Lima, 2005).

5.4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada nas micropartículas de quitosana com papaína sorvida e secas por liofilização. Esta serviu para a obtenção de informações importantes a respeito da superfície das micropartículas e, conseqüentemente, da influência do método de secagem por liofilização na morfologia das mesmas.

Pode-se observar na Figura 5.14, que as superfícies das micropartículas de quitosana secas pelo método de liofilização apresentaram um aspecto diferenciado das micropartículas secas por *spray drying*.

Para as micropartículas liofilizadas não foi obtido um formato esférico, apresentando menor homogeneidade em relação à forma das micropartículas secas pelo método de *spray drying*, tais micropartículas apresentaram uma aparência folicular com aparecimento de poros em sua superfície, resultado que também foi observado por Risbud *et al.*, 2000.

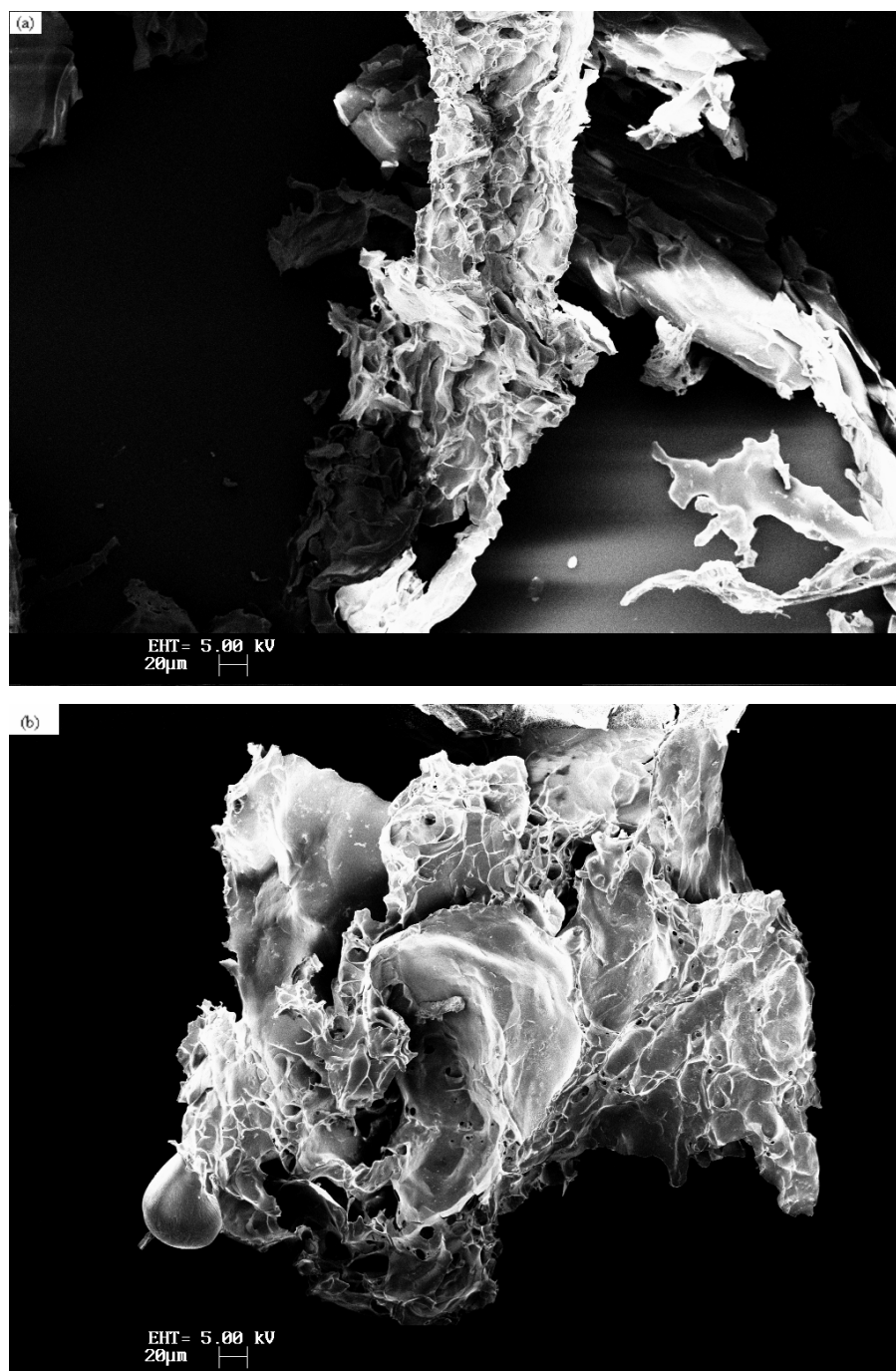


Figura 5.14: a) Micrografia das micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por liofilização e b) micrografia das micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 3% m/v secas por liofilização.

5.4.2.3. Testes de liberação de papaína

Testes preliminares de liberação de papaína foram efetuados em micropartículas com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína, tanto para micropartículas secas por *spray drying*, quanto para as secas por liofilização. Pode-se observar que para as micropartículas com papaína sorvida, secas por *spray drying*, a liberação da papaína ocorria de forma acentuada nas primeiras horas do experimento, ocorrendo um decréscimo da atividade enzimática com o decorrer do tempo, conforme observado na Figura 5.15.

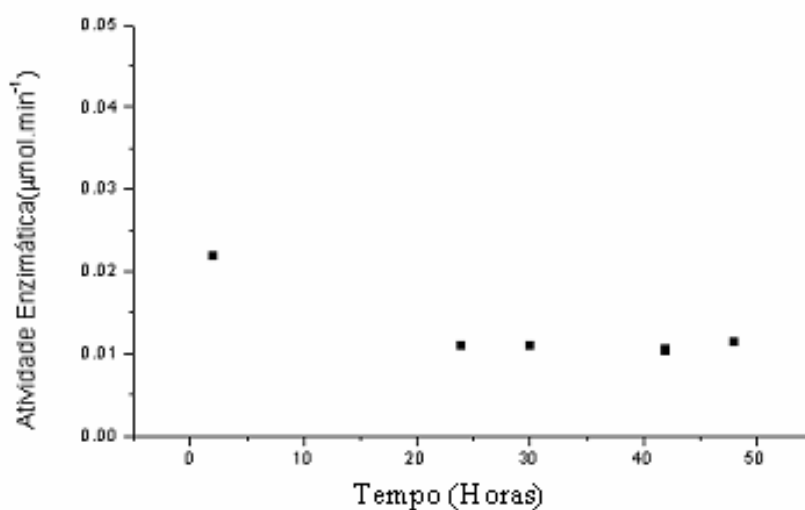


Figura 5.15: Perfil de atividade enzimática da papaína liberada a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com de papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 1% m/v, secas por *spray drying*.

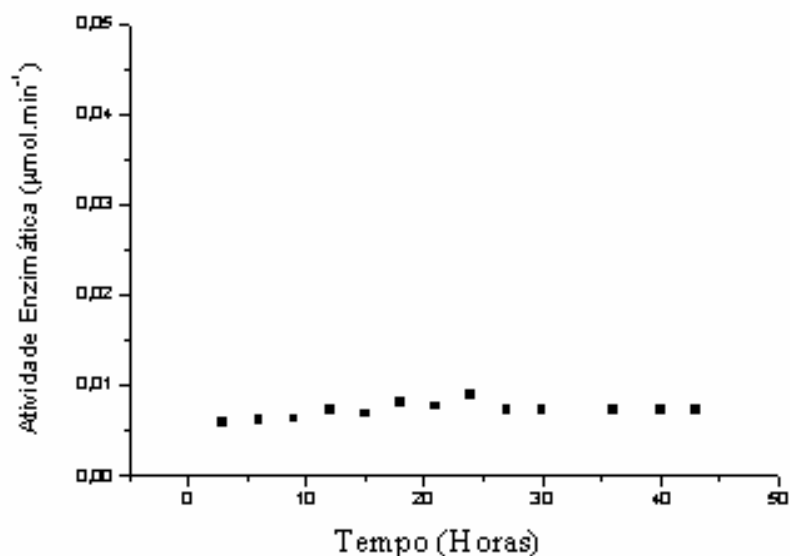


Figura 5.16: Perfil de liberação da papaína liberada a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 1% m/v, secas por liofilização.

O mesmo teste de liberação de papaína foi realizado para micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 1% m/v, secas por liofilização, para comparar os métodos de secagem e obteve-se um comportamento diferente no caso da liofilização, como pode ser observado na Figura 5.16.

Esse comportamento pode ser devido a diferenças morfológicas imprimidas pela secagem por liofilização, conforme observado por (Risbud *et al.*, 2000).

O método de secagem escolhido para o presente trabalho foi a liofilização, que apresentou melhores resultados em termos de atividade enzimática da papaína com o tempo de liberação a partir das micropartículas e também pelo fato de manter as características de cristalinidade que favorecem a liberação do princípio ativo.

Outro fator importante a ser salientado é que a secagem por *spray drying* apresentou problemas operacionais, os quais inviabilizaram a utilização do equipamento, pois as micropartículas tinham de ser bombeadas para dentro da câmara de secagem, através do bico atomizador. Isso acarretava uma grande perda de material, pois as micropartículas de

quitosana possuíam elevada velocidade terminal, devido ao tamanho de partícula, ficando depositadas em sua grande maioria no fundo da câmara de secagem.

Comparando os resultados de liberação, nota-se que as micropartículas de quitosana secas por liofilização mantiveram uma tendência constante até o fim do experimento, que ocorreu com aproximadamente 48 horas. Esse fato denotou melhores condições de liberação da papaína sorvida nas micropartículas de quitosana obtidas por esse método.

Um fator importante citado na literatura (Kumar *et al.*, 2004) é que a papaína possui capacidade de despolimerizar a quitosana. Sendo assim, optou-se pela utilização de agentes de reticulação para se imobilizar a papaína nas micropartículas de quitosana e comparar os dados de liberação enzimática tanto das micropartículas de quitosana com papaína sorvida quanto das micropartículas de quitosana reticuladas e com papaína sorvida. Os agentes reticulantes escolhidos para teste foram o glutaraldeído (0,75% m/m) e tripolifosfato de sódio (10 % m/v).

Testes preliminares foram efetuados, então, para se verificar a eficácia dos agentes reticulantes, glutaraldeído e TPP, conforme observado na Tabela 5.1. Micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e com TPP foram colocadas em solução de tampão fosfato de sódio para avaliar a liberação da papaína sorvida nas mesmas. Os resultados foram obtidos através de leitura em espectrofotômetro de UV com comprimento de onda de 280 nm. Isto foi efetuado para verificação da atividade enzimática da papaína contida nas micropartículas.

Tabela 5.1: Tabela comparativa da atividade enzimática de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com glutaraldeído, com papaína sorvida.

Material utilizado	Absorbância da Amostra a 280 nm	Atividade enzimática uMol/min
Micropartículas reticuladas com glutaraldeído	0,318	0,005
Micropartículas reticuladas com TPP	0,601	0,028

Pode-se observar na Tabela 5.1 que os agentes reticulantes usados foram adequados à imobilização da papaína. Entretanto, optou-se pela reticulação com TPP pelo fato do

mesmo poder ser usado sem restrições à saúde e ao meio ambiente, sendo adequadas a aplicações farmacêuticos.

5.5. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM PAPAÍNA SORVIDA

Como agentes reticulantes, foram testados o glutaraldeído e o tripolifosfato de sódio (TPP), porém a finalidade do trabalho foi para uso tópico das micropartículas de quitosana. Assim, um agente reticulante como o glutaraldeído, que apresenta resíduos aldeídicos tóxicos não seria conveniente. Por este motivo, o glutaraldeído foi utilizado no trabalho somente como meio de comparação para o TPP. Tanto o glutaraldeído quanto o TPP apresentaram boa capacidade de reticulação da quitosana.

Análises morfológicas, físico-químicas e testes preliminares de liberação de papaína a partir das micropartículas foram efetuados com o uso dos dois agentes de reticulação.

5.5.1. Teste de liberação de papaína a partir de micropartículas reticuladas com glutaraldeído

O teste de liberação de papaína foi efetuado em micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e verificou-se que não houve variações acentuadas na liberação da papaína durante o período de execução do teste (Figura 5.17).

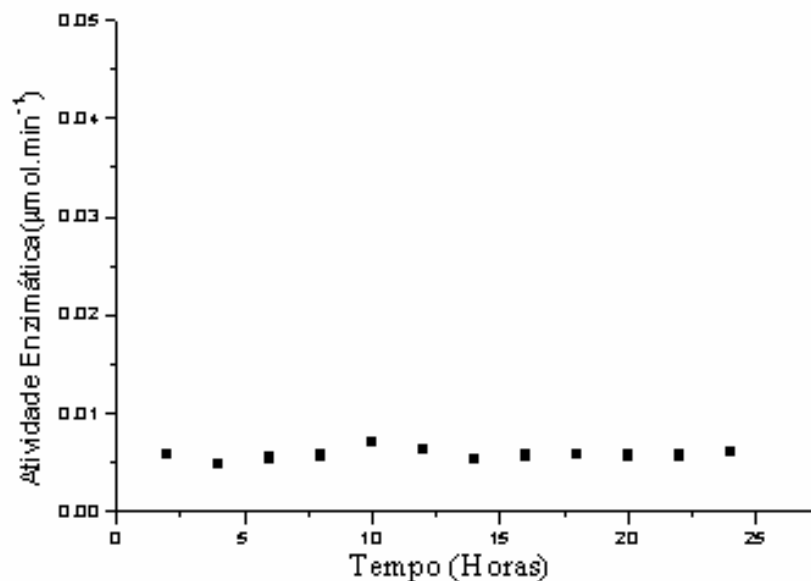


Figura 5.17: Perfil de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1% m/v, reticuladas com glutaraldeído.

Pode-se notar, na Figura 5.17, que a liberação das micropartículas foi praticamente constante. Este ato comprova a eficácia do agente reticulante na imobilização da papaína nas micropartículas. Esse teste foi efetuado para micropartículas com cinco dias de armazenamento.

5.5.2. Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada nas micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, com papaína sorvida e secas por liofilização.

Esta serviu para a obtenção de informações importantes a respeito da superfície das micropartículas em consequência da ação do agente reticulante, conforme observado nas Figuras 5.18 e 5.19.

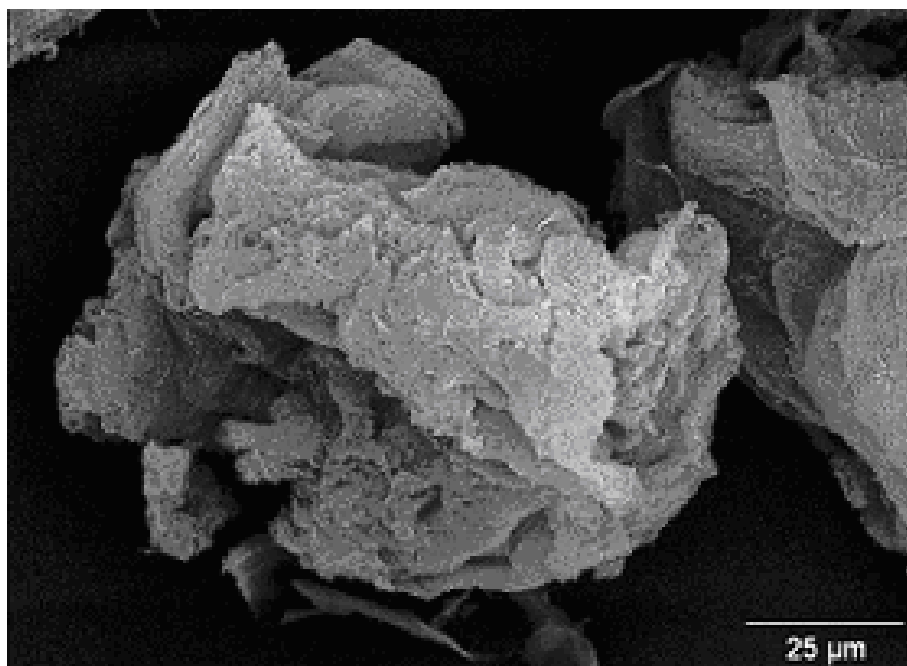


Figura 5.18: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% com papaína 1% e reticuladas com glutaraldeído.

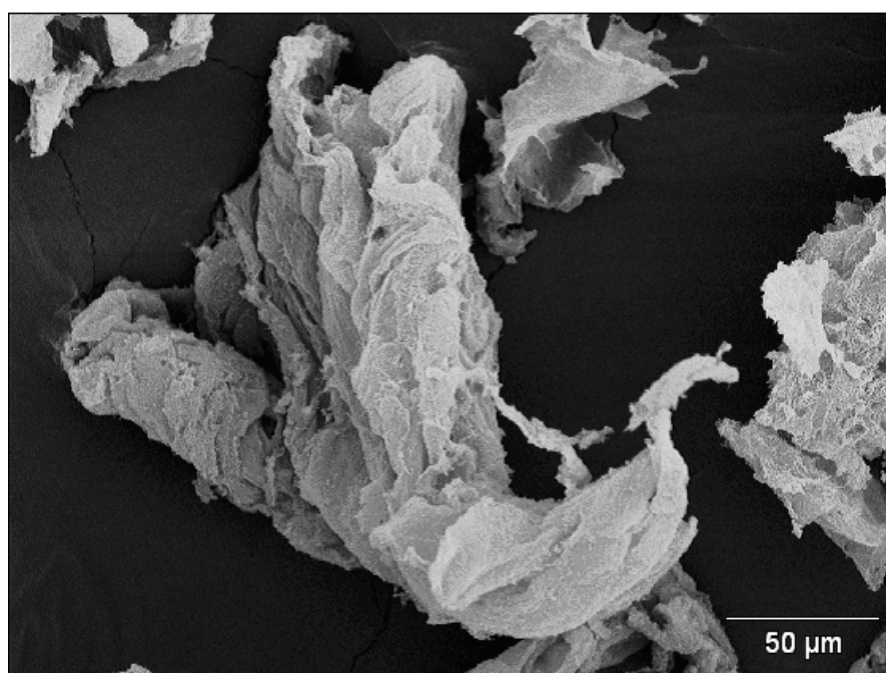


Figura 5.19: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% com 3% de papaína reticulada com glutaraldeído.

Através da análise da superfície apresentada pela Figuras 5.18 e 5.19, pode-se observar que as micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído apresentaram microporos na superfície e não possuíram homogeneidade em sua forma.

5.5.3. Teste de liberação de papaína a partir de micropartículas reticuladas com TPP

Os testes de liberação com TPP foram feitos em micropartículas de quitosana 1% com papaína sorvida na concentração de 1% a partir de solução de papaína e serviram para indicar a efetividade da imobilização da papaína conforme a Figura 5.20.

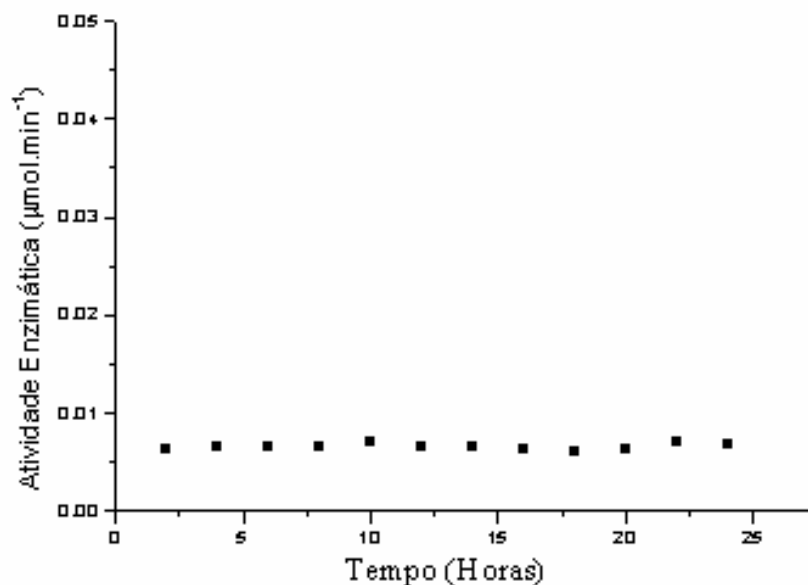


Figura 5.20: Perfil de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1% m/v reticuladas com TPP.

Foi observado, neste caso, que a liberação da papaína ocorreu de forma constante, o que sugere boa imobilização da papaína na micropartícula de quitosana.

5.5.4. Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada nas micropartículas de quitosana com papaína e secas por liofilização, reticuladas com tripolifosfato (TPP). Esta serviu para comparação com a reticulação anteriormente feita com glutaraldeído. Essa

informação foi importante para a tomada de decisão da utilização do TPP como agente reticulante.

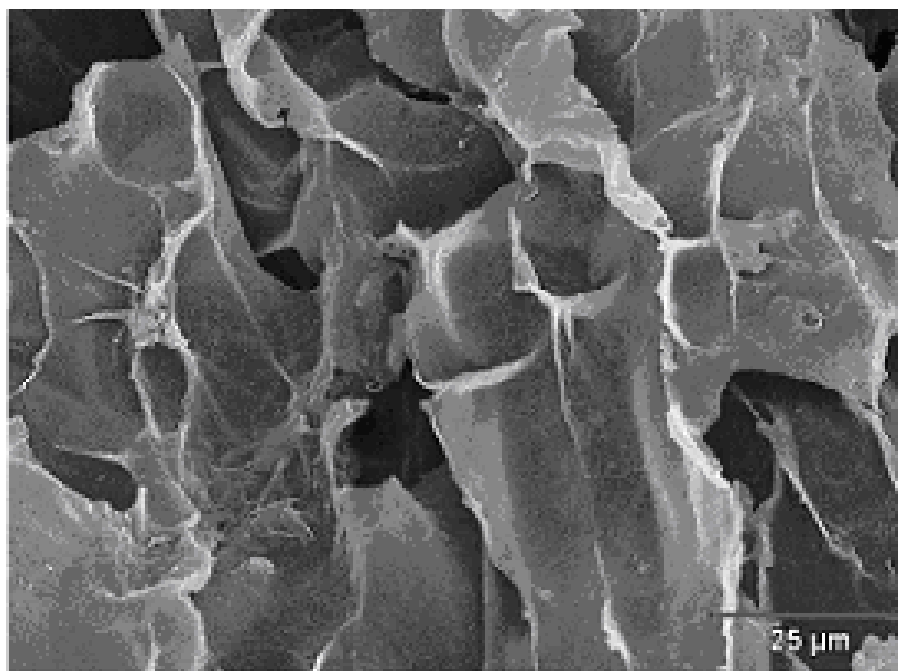


Figura 5.21: Micrografia de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% adsorvida com papaína 1% e reticuladas com TPP.

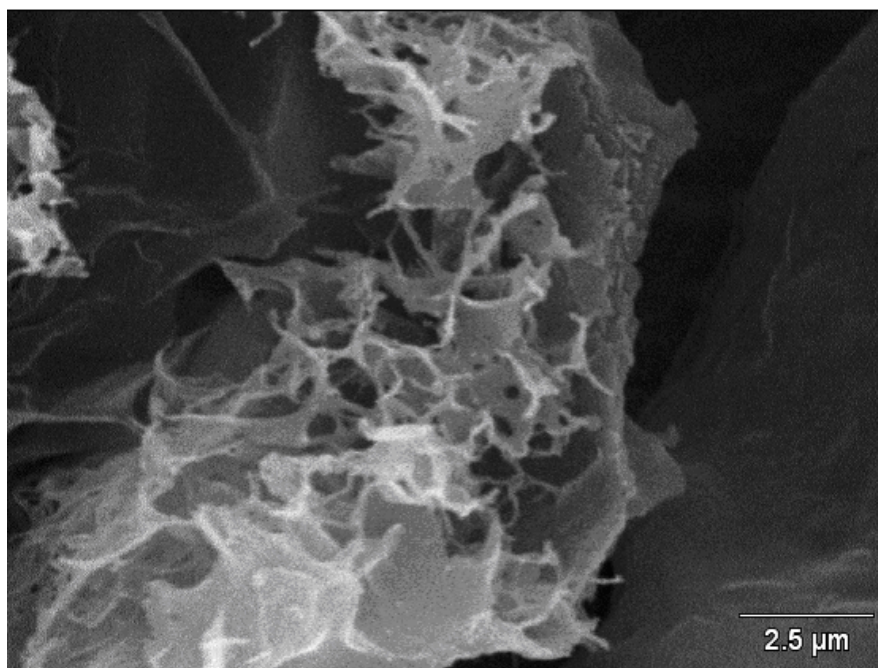


Figura 5.22: Micrografia de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 3% m/v reticuladas com TPP.

Pode-se observar a partir da Figuras 5.21 e 5.22, que as micropartículas de TPP possuem macroporos na superfície, apresentando uma aparência folicular, diferenciando-se das micropartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

Para evidenciar a real existência de poros, foi utilizado um procedimento de fixação das micropartículas com epícloridrina e a incorporação das partículas numa matriz polimérica que foi, posteriormente, fraturada a frio. A micrografia resultante é mostrada na figura 5.23.

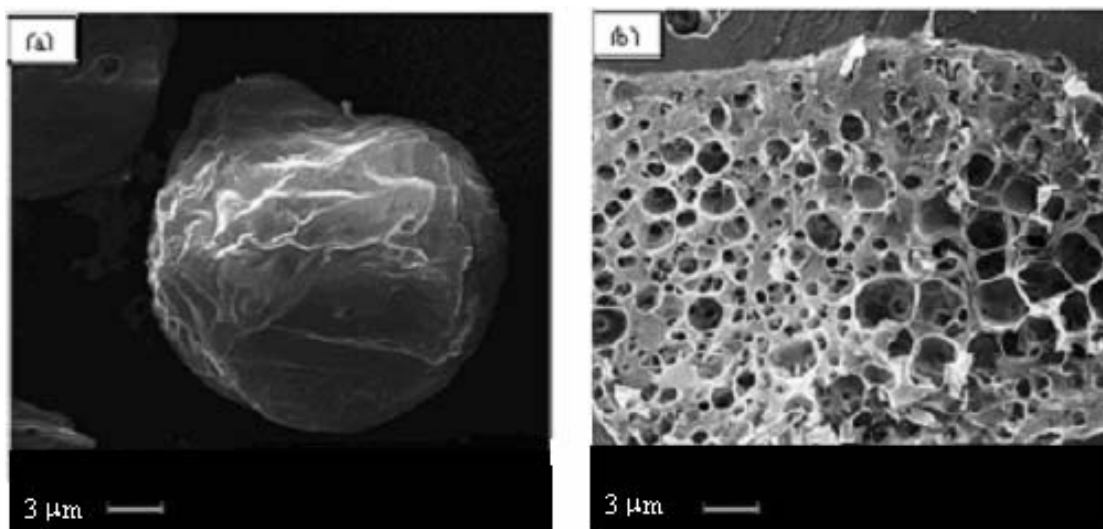


Figura 5.23: Micrografia de fratura da superfície de uma micropartícula de quitosana reticulada (fixada com epícloridrina, para fins de melhorar a visualização dos poros). Estas micrografias foram gentilmente cedidas pelo doutorando Marco A. Torres.

5.5.5. Difração de raios-X para as micropartículas reticuladas com TPP

Este método foi utilizado para a caracterização da cristalinidade das micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e sorvidas com papaína, com a finalidade de verificar o quanto a reticulação estava afetando na cristalinidade das mesmas.

Segundo Fun (1989), o estado físico do polímero e do fármaco incorporado neste é de grande importância para o conhecimento do mecanismo de liberação do fármaco; sendo assim, quanto mais amorfo for o polímero e/ou o fármaco, maior será o seu coeficiente de difusão.

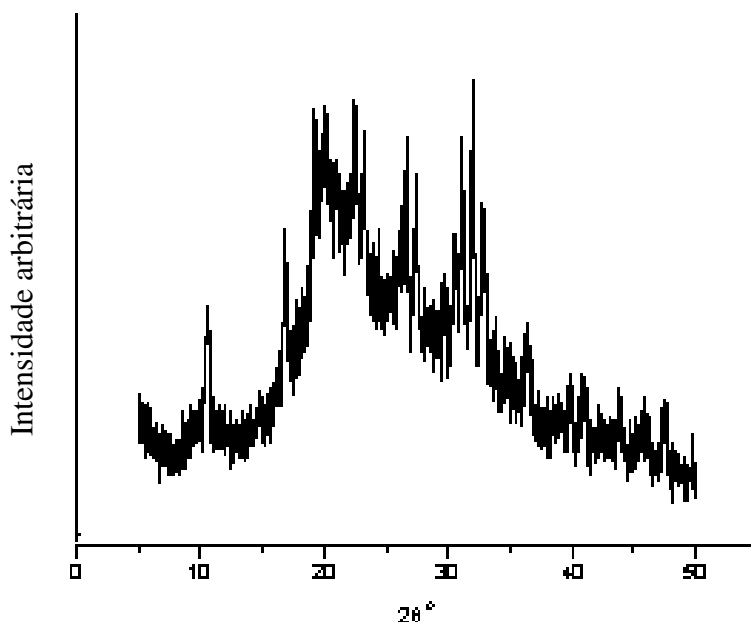


Figura 5.24: Difratograma de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de uma solução de papaína 1% m/v, reticuladas com TPP.

Observando-se a Figura 5.24, pode-se verificar que o processo de produção das micropartículas alterou o grau de cristalinidade da quitosana e que a adição de agente reticulante e da papaína também contribuíram para essa modificação em relação a quitosana. Segundo Kumar et al. (2004), a adição de papaína a quitosana provoca uma despolimerização que pode ser observado em 2θ igual a 20° , onde há formação de um pico relativamente pequeno logo após a formação do pico principal, isso não foi observado nas micropartículas reticuladas e com papaína sorvida.

A figura 5.24 confirma a mudança no pico que aparece com 2θ igual a 20° , pois nesse caso, a reflexão foi deslocada para direita, formando um pico duplo, provavelmente pela inserção de papaína entre as cadeias de quitosana, o que aumenta a distância interplanar das cadeias poliméricas. Isso pode também ser decorrente da reticulação com TPP, a qual modificou a organização da estrutura molecular da quitosana. Na prática, o possível aumento da distância interplanar implica na diminuição da cristalinidade da mesma, o que vai afetar a forma de liberação de drogas, podendo-se promover uma maior capacidade de difusão em polímeros mais amorfos. No caso de polímero cristalino, a

difusão é menor, devido a maior organização da rede cristalina o que acaba dificultando o processo de difusão. Entretanto, a estrutura deste difratograma apresenta o aparecimento de outros picos, os quais podem igualmente ser consequência da incorporação do TPP.

5.5.6. Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

A Figura 5.25 apresenta o espectro FTIR-ATR para micropartículas de quitosana natural, reticulada com TPP e reticulada com glutaraldeído. A partir dos espectros apresentados, pode-se observar as seguintes bandas de absorção:

a) o espectro para a quitosana natural apresentou bandas de absorção na região com comprimento de onda de 1100 cm^{-1} , que é referente a aminas alifáticas; 1650 cm^{-1} grupos -N-H; 1750 cm^{-1} grupos ésteres; 1700 cm^{-1} aparecimento de bandas de absorção referentes ao grupo carboxila, de acordo com a literatura;

b) no espectro referente às micropartículas de quitosana reticuladas, pode-se observar que realmente houve a reticulação com TPP, pelo aparecimento de bandas de absorção em 1150 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , as quais são características das ligações entre os grupos P=O, conforme indicado por Qi (2004). Ocorrendo ainda o aparecimento bandas de absorção a 1657 cm^{-1} , referente ao grupo -CONH₂ e a 1598 cm^{-1} referente aos grupos NH₂. Segundo Qi (2004) este comportamento reflete a interação entre os grupos aminos e os íons metálicos;

c) o espectro da quitosana reticulada com glutaraldeído apresentou bandas de absorção para os grupos alifáticos em 1100 cm^{-1} , em 1650 cm^{-1} devido ao grupo N=C; em 1560 cm^{-1} referente ao grupo -C=C e ainda pode-se observar o aparecimento de uma banda de absorção a 1720 cm^{-1} devido à ligação amídica livre.

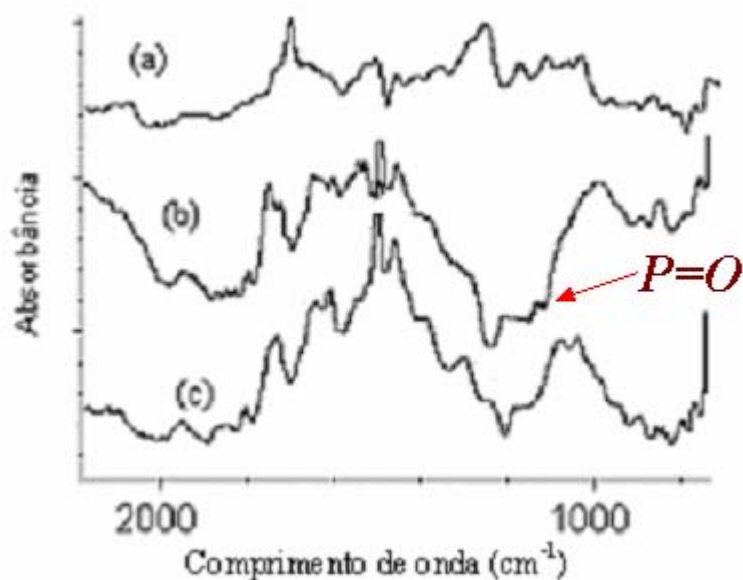


Figura 5.25: Espectros de infravermelho micropartículas de quitosana pura (a) e micropartículas de quitosana modificadas com TPP e papaína (b); e (c) micropartículas de quitosana modificadas com glutaraldeído e papaína.

5.5.7. Análises térmicas

5.5.7.1. Análise de Termogravimetria (TGA)

A Figura 5.26 mostra as análises termogravimétricas para micropartículas de quitosana natural e modificada com papaína e TPP. Observa-se que a degradação em ambos os casos ocorreu em dois estágios. O primeiro podendo ser referente à perda da água adsorvida no material e um segundo, em que já ocorreu uma degradação quase completa da amostra.

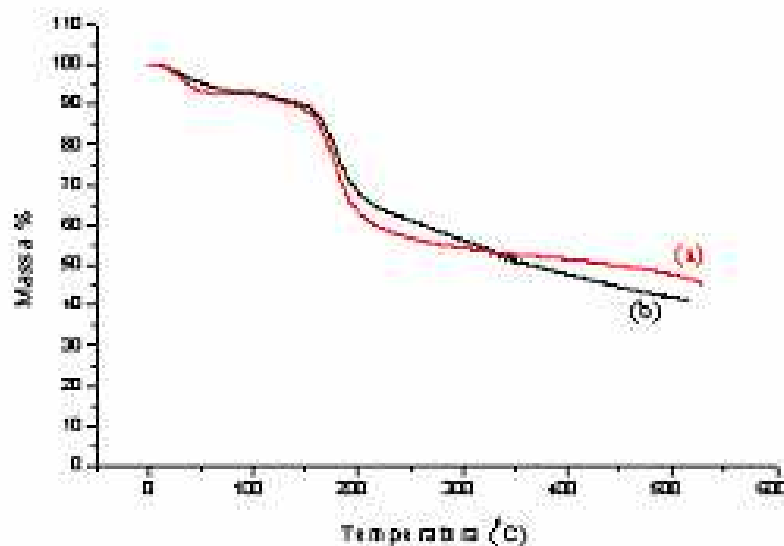


Figura 5.26: Termogramas das micropartículas de quitosana modificada com TPP e papaína (a) e quitosana natural (b).

A degradação no primeiro estágio, referente à perda da água ocorreu com pequena diferença entre as micropartículas contendo TPP e papaína curva (a) e as micropartículas de quitosana natural curva (b), pois parece que para o caso da curva (a) a perda de água foi mais acentuada do que para as micropartículas de quitosana natural (b). Tal fato pode ser atribuído à presença de TPP que é um composto higroscópico, mantendo assim maiores níveis de água no material. Nesta análise também pode ser observado que a curva (b) apresentou uma maior estabilidade térmica em relação à curva (a), indicando que realmente houve a obtenção de um novo material com a adição de TPP e papaína na matriz de quitosana.

5.5.7.2. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A partir da Figura 5.27, pode-se observar que o pico endotérmico presente na curva calorimétrica para micropartículas de quitosana pura em 100°C é referente à perda de água. Para as micropartículas modificadas, já ocorrem modificações nos picos endotérmicos bem antes de 100°C, provavelmente devido à maior higroscopicidade do tripolifosfato de sódio. Também apresenta picos exotérmicos entre 200°C e 300°C, porém com menor estabilidade do que na quitosana pura, o que pode estar indicando uma atividade da papaína que,

segundo Kumar e Tharamathan (2004) é utilizada para despolimerizar a quitosana. Os demais vales podem representar a decomposição da própria papaína.

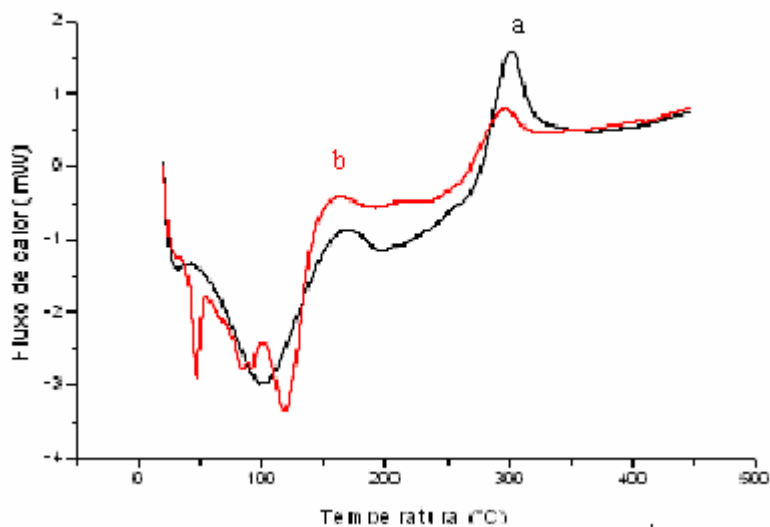


Figura 5.27: Análise de calorimetria exploratória diferencial para micropartículas de quitosana pura (a) e micropartículas de quitosana modificadas com TPP e papaína (b).

5.6. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS MICROPARTÍCULAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA

Foram efetuadas análises da atividade enzimática da papaína sorvida nas micropartículas de quitosana em diferentes tempos de armazenamento, tanto das micropartículas reticuladas quanto das não reticuladas, com o objetivo de verificar se existiria um efeito de interação da papaína com a quitosana o qual causaria uma diminuição da atividade enzimática. Juntamente com as análises de atividade enzimática também foi efetuada a análise de umidade de ambas as micropartículas de quitosana, onde se obteve um valor de umidade em torno de 11% para as micropartículas de quitosana com papaína sorvida e em torno de 16% para as micropartículas reticuladas com TPP.

O fator umidade é importante pelo fato de, em muitos casos, influenciar no tempo de armazenamento de um determinado produto, podendo diminuir drasticamente a vida útil do mesmo através de crescimento de fungos e bactérias, ou ainda, permitindo a ativação das enzimas e aumentando as propriedades difusivas na matriz polimérica.

5.6.1. Tempo de armazenamento para as micropartículas de quitosana com papaína sorvida

Os testes de atividade enzimática, realizados para as micropartículas de quitosana com papaína sorvida foram efetuados para os tempos de armazenamento de 5 e 15 dias, conforme pode ser observado nas Figuras 5.28 e 5.29.

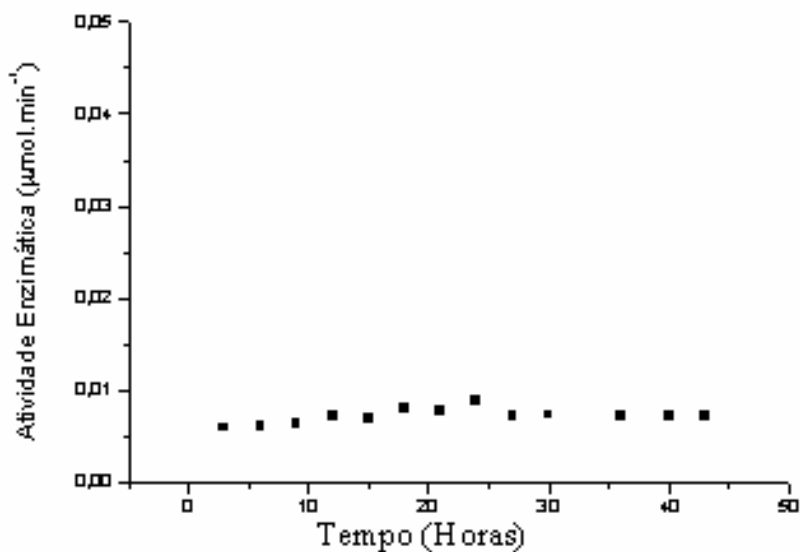


Figura 5.28: Gráfico do perfil de atividade da papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína, secas por liofilização com tempo de armazenamento de 5 dias.

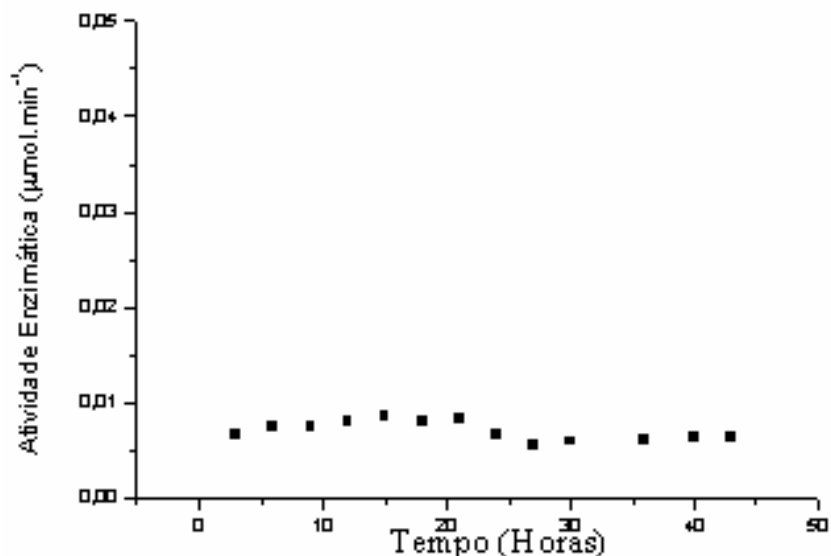


Figura 5.29: Gráfico do perfil de atividade de papaína a partir de micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 15 dias de armazenamento.

Através da análise dos resultados obtidos com os diferentes tempos de armazenamento nas Figuras 5.28 e 5.29, pode-se notar que não houve alterações significativas na atividade enzimática da papaína sorvida nas micropartículas de quitosana. Porém, as micropartículas permaneceram armazenadas por mais 30 dias e alguns lotes de micropartículas apresentaram crescimento microbiano, deteriorando o produto.

5.6.2. Tempo de armazenamento para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com papaína sorvida

Os testes de atividade enzimática realizados para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com papaína sorvida foram efetuados, da mesma forma que no caso anterior, para os tempos de armazenamento de 5 e 15 dias, conforme pode ser observado nas Figuras 5.30 e 5.31.

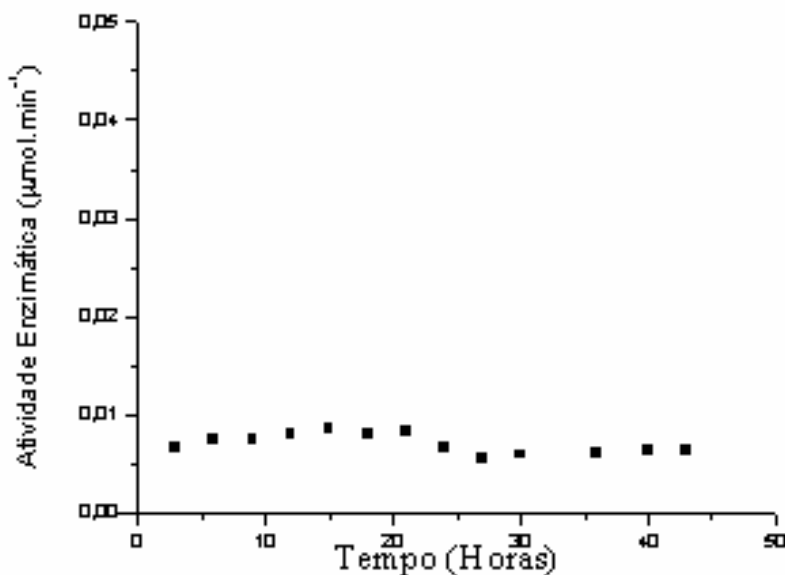


Figura 5.30: Gráfico do perfil de atividade de papaína para micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, reticuladas com TPP, com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 5 dias de armazenamento.

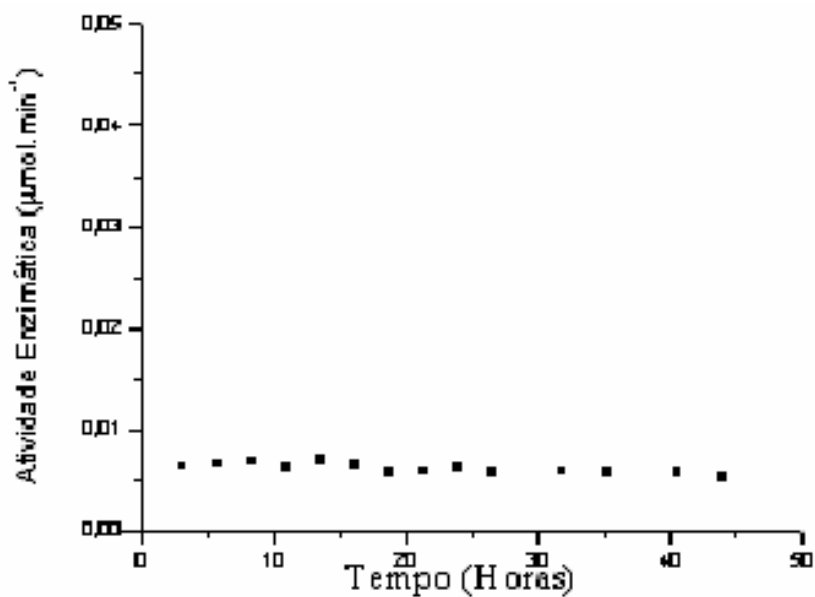


Figura 5.31: Gráfico do perfil de atividade de papaína para micropartículas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m, reticuladas com TPP, com papaína sorvida a partir de solução 1% m/v de papaína e secas por liofilização, com 15 dias de armazenamento.

A partir da análise das Figuras 5.30 e 5.31, pode-se observar que o comportamento da atividade enzimática, neste caso, foi análogo ao comportamento das micropartículas de quitosana não reticuladas, evidenciando que a atividade enzimática, não foi influenciada pelo tempo de armazenamento das micropartículas de quitosana com papaína sorvida. Porém, as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP, apesar de possuírem maior umidade, apresentaram melhor capacidade de conservação, pois ficaram acondicionadas por um período de aproximadamente 4 meses sem aparecimento de crescimento microbiano e mantendo a atividade enzimática inalterada. Indicando que tal processo pode ter conferido ao complexo micropartículas-enzima maior estabilidade, realmente imobilizando a papaína nas micropartículas de quitosana. Por esse motivo, decidiu-se utilizar as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.

5.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os resultados obtidos da análise estatística da matriz do planejamento observados na Tabela 5.2, com os fatores concentração de quitosana presente nas micropartículas reticuladas com tripolifosfato de sódio e concentração de papaína adsorvida na matriz polimérica, tendo como variável de resposta a atividade enzimática da papaína imobilizada na superfície das micropartículas, estão apresentados no quadro de ANOVA, Tabela (5.3).

Tabela 5.2: Matriz de planejamento experimental com os fatores de estudo e resposta considerada

Fatores	XQ	XP	Ae
1	-1	-1	0,007988
2	+1	-1	0,008315
3	-1	+1	0,008528
4	+1	+1	0,0096052
5	0	0	0,008498
6	0	0	0,008501
7	0	0	0,008495

Tabela 5.3: Quadro de ANOVA da análise estatística realizada.

	Coeficiente de regressão	Erro puro	p < 95% (nível de significância)
Média	$8,56 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	0
Concentração de quitosana (XQ)	$3,51 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$
Concentração de papaína (XP)	$4,58 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
(XQ) x (XP)	$1,88 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-5}$

$R^2 = 0,98$

A tabela 5.3 apresenta os coeficientes de regressão do modelo com um nível de significância dos fatores de 95%, ou seja, $p < 0,005$, demonstrando que o modelo apresenta um bom ajuste com os fatores estudados.

O ajuste do modelo é corroborado pelo coeficiente de regressão (R^2) apresentado pelo mesmo, o qual é de 0,98, o que indica um bom ajuste dos valores. No gráfico de Pareto, Figura 5.32, a ordenada representa os efeitos principais e a interação dos fatores de estudo e a abscissa a estimativa dos efeitos absolutos. Através desta Figura, pode-se verificar que os fatores de estudo foram significantes na análise estatística ao nível de 95%, pela linha vertical pontilhada, conforme apresentado no quadro de ANOVA da Tabela 5.3.

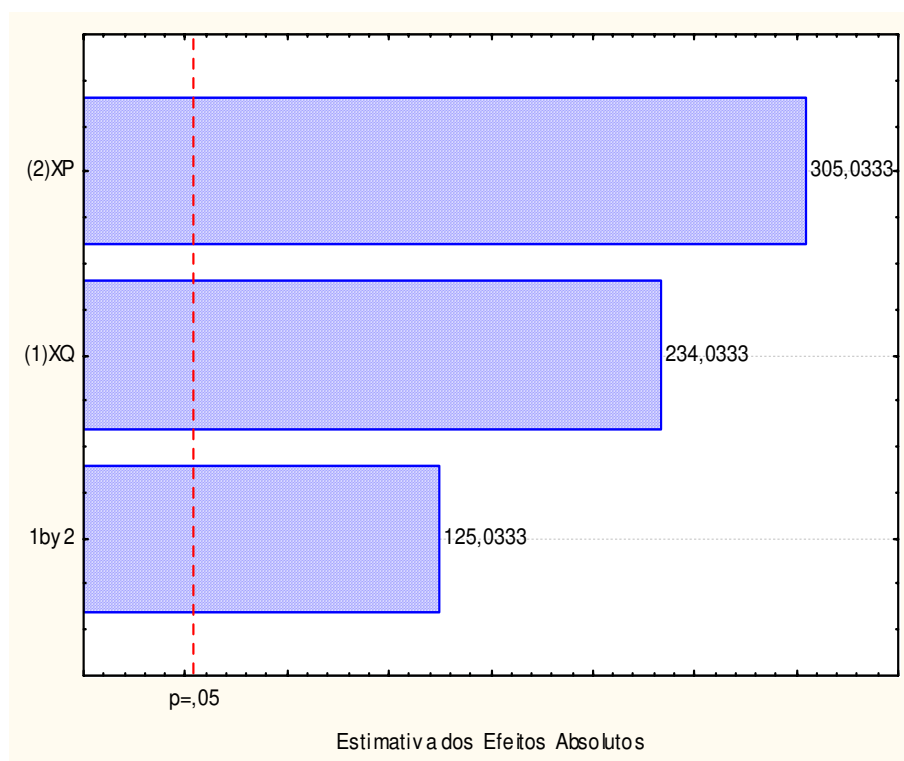


Figura 5.32: Gráfico de Pareto mostrando a influência das variáveis independentes na cinética de liberação das micropartículas.

O modelo estatístico de primeira ordem com interação, apresentado na Equação 5.1, apresenta o valor teórico para a resposta atividade enzimática.

$$A_e = 8,56 * 10^{-3} + 3,51 * 10^{-4} XQ + 4,58 * 10^{-4} XP + 1,88 * 10^{-4} XQXP \quad (\text{eq. 5.1})$$

A Figura 5.33 apresenta a superfície de resposta para atividade enzimática obtida pela Equação 5.1

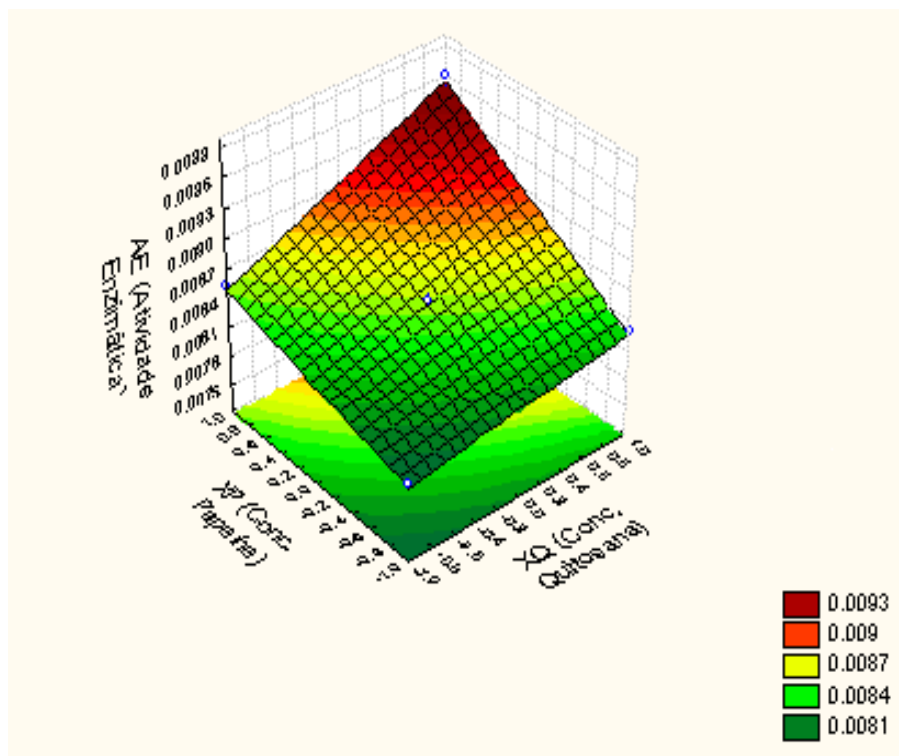


Figura 5.33: Gráfico de superfície de respostas para as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.

A superfície de resposta (Figura 5.33), mostrou que os pontos de maior liberação enzimática localizaram-se nas regiões de maior concentração de quitosana e também de maior concentração inicial de papaína sorvida às micropartículas de quitosana. Este resultado condiz com modelos físicos apresentados na literatura, que mostram que a concentração do fármaco utilizado na matriz polimérica é o fator que mais influencia o mecanismo de liberação controlada de fármacos.

5.8. ESTUDO DE APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Avaliação da eficiência do biomaterial (micropartículas de quitosana) foi verificada através de testes de liberação *in-vitro* da papaína, composto que foi incorporado nas micropartículas de quitosana, com uso de análise de atividade enzimática da papaína. Para os testes de liberação, optou-se pelo uso de micropartículas reticuladas com TPP, pelo fato de serem atóxicas e também por possuírem uma maior resistência em relação às micropartículas de quitosana natural.

5.8.1. Cinética de liberação *in vitro* para micropartículas de quitosana contendo papaína e reticuladas com TPP

A cinética de liberação *in-vitro* foi efetuada para diferentes concentrações de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP. Para este caso, os testes foram efetuados por período de tempo de aproximadamente 25 horas, pois já havia sido constatado em testes anteriores efetuados por período de 50 horas, que a liberação das micropartículas de quitosana não era alterada, mantendo-se constante. Por esse motivo, foi utilizado um tempo menor, de 25 horas para os ensaios em questão.

5.8.2. Cinética de liberação *in vitro* para micropartículas envelhecidas de quitosana contendo papaína e reticuladas com TPP

No caso dos ensaios de liberação a partir de micropartículas reticuladas com TPP, a liberação da papaína a partir das micropartículas foi praticamente constante para todos os casos, mostrando que a reticulação com TPP estava sendo realmente eficiente.

Os testes foram efetuados em micropartículas que estavam armazenadas há 30 dias. Isso foi feito para verificar se realmente não ocorriam alterações na atividade enzimática da papaína de acordo com a idade das micropartículas. Isso possibilitaria a verificação se a imobilização da enzima estava sendo efetiva.

Um fator interessante que pode ser observado em relação à cinética de liberação, é que, conforme a literatura, ela é dependente da concentração de fármaco e da concentração de polímero (biopolímero), Ko *et al.* (2002).

Geralmente, deseja-se que a matriz polimérica possua a propriedade de liberar lentamente o composto ativo (fármaco) no meio de ação, com a finalidade de se evitar superdosagens.

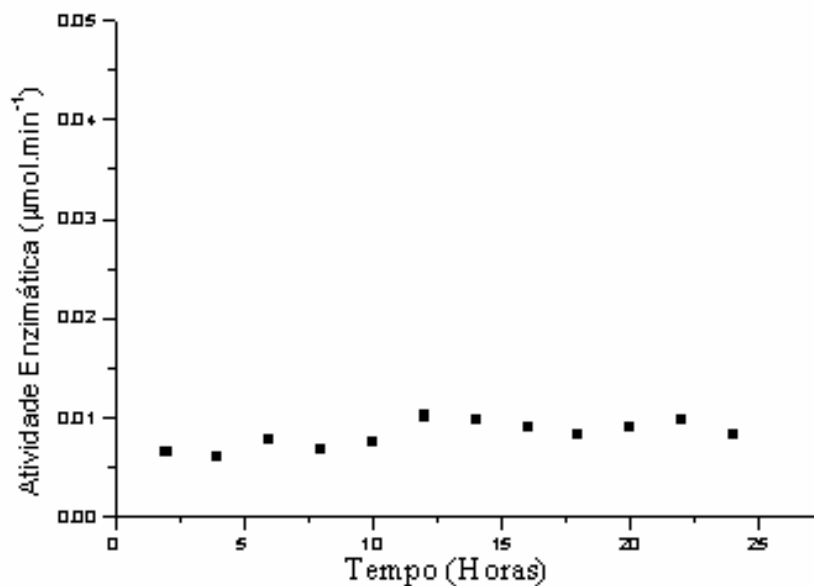


Figura 5.34: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.

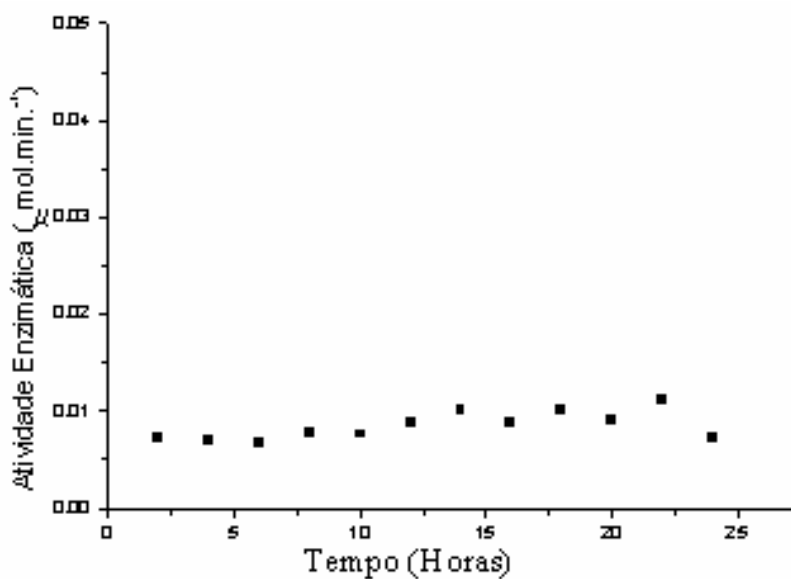


Figura 5.35: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2 % m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 1 % m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.

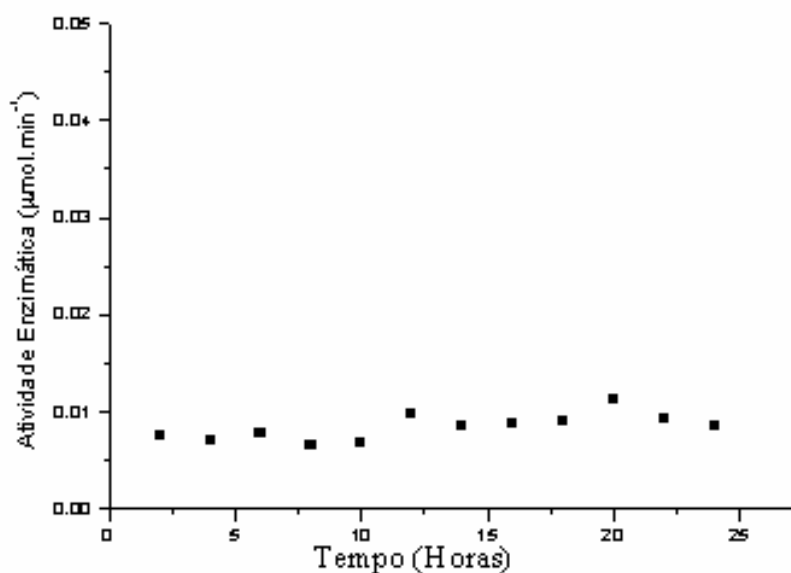


Figura 5.36: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana a partir de solução 1% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína obtidas a partir de solução de papaína 3% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.

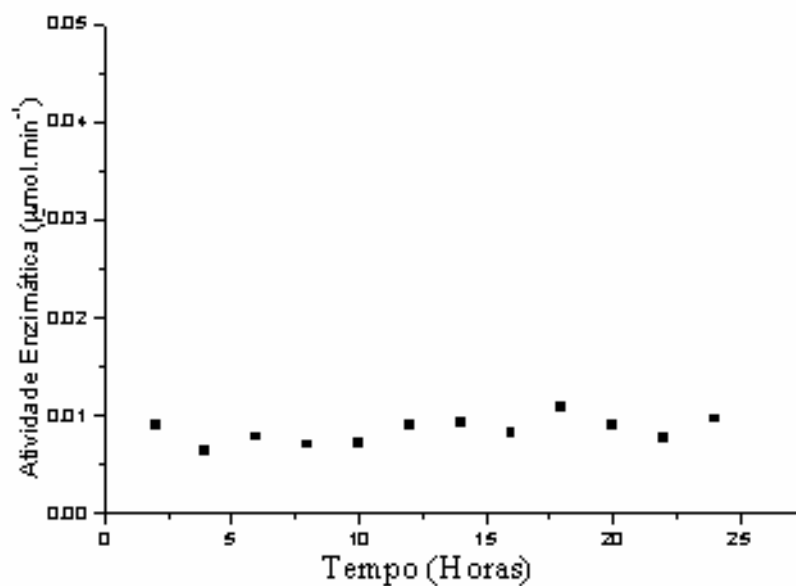


Figura 5.37: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 2% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 3% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.

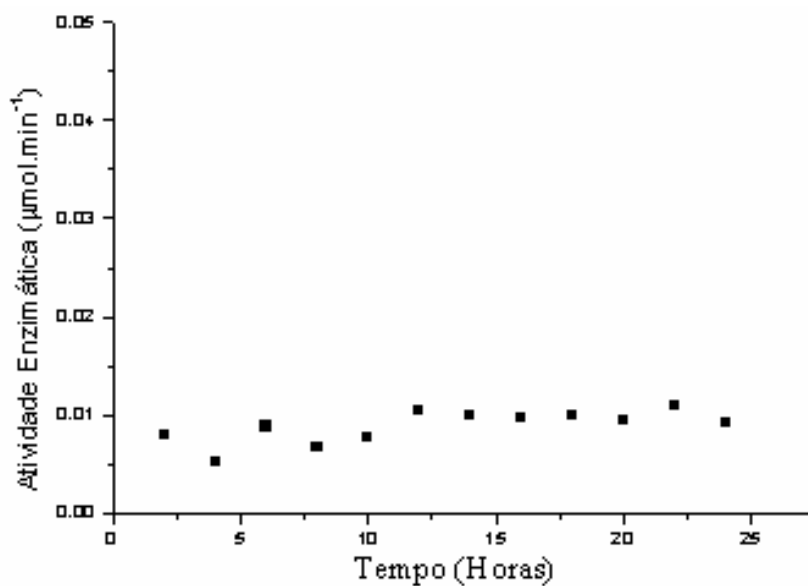


Figura 5.38: Gráfico de liberação de papaína a partir de micropartículas liofilizadas de quitosana obtidas a partir de solução de quitosana 1,5% m/m com papaína sorvida a partir de solução de papaína 2% m/v, reticuladas com TPP com 30 dias de armazenamento.

Através da observação destes gráficos pode-se concluir que a reticulação com TPP foi efetiva, mantendo um nível de liberação constante e não alterando a atividade enzimática da papaína com o tempo. Pode-se observar ainda que a liberação da papaína a partir das micropartículas de TPP possui uma tendência linear.

Para todos os casos foram efetuados estudos de liberação de papaína com a troca do sobrenadante (meio de liberação) e sem a troca de sobrenadante. E foi observado que em ambas as situações não houve alteração na liberação da papaína, permanecendo constante ao longo do tempo. Tal fator indica que as micropartículas de quitosana entram rapidamente em equilíbrio com o meio de liberação, mantendo a liberação da papaína numa taxa tal que se mantenha constante a sua concentração no meio, não importando se a liberação é efetuada com ou sem a troca do sobrenadante.

O material tem uso promissor na área de regeneração de tecido epitelial, curativo, devido às características bacteriostáticas da quitosana e também da papaína, mas principalmente pelo fato da papaína ser liberada lentamente no meio de contato, o que não provocará problemas com super dosagens da enzima.

5.8.3. Estudo de liberação *in vivo*

5.8.3.1 Resultados macroscópicos para os testes de cicatrização "*in-vivo*"

A análise macroscópica de cicatrização do tecido epitelial dos Hamsters foi efetuada através da avaliação do comportamento da cicatrização do tecido, observando sua variação ao longo do tempo, por períodos iniciais de 24, 48 e 72 horas, em que geralmente há formação acentuada de edema e 7, 14, 21 e 28 dias, em que a cada período de tempo, os animais foram sacrificados e então retirado o tecido lesado no qual foi aplicado o curativo. Esse procedimento foi efetuado com a finalidade de verificação do andamento do processo de cicatrização.

A fase de preparação e colocação dos curativos (implantes) pode ser observada através da Figura 5.39, que apresenta o início do processo de cicatrização do tecido ferido. Esta etapa da análise apresenta os animais com os curativos pós-cirúrgicos que, posteriormente, foram acompanhados para observação do processo de cicatrização ao longo do tempo.



Figura 5.39: Fotografia do procedimento de aplicação das micropartículas de quitosana, pura e modificadas com papaína e TPP, em lesões provocadas intencionalmente no tecido epitelial de Hamsters.

Foi observado que, após o procedimento cirúrgico, não houve o aparecimento de nenhum tipo de contaminação e também nenhum óbito entre os Hamsters estudados.

O processo cirúrgico foi efetuado no dorso lombar dos Hamsters, tanto no lado direito quanto no lado esquerdo, onde foram aplicados os curativos, provenientes de micropartículas de quitosana pura e de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e com papaína sorvida.

Através das análises macroscópicas, constatou-se que nas primeiras horas após a cirurgia, até 72 horas, houve uma pequena formação de edemas nos ferimentos, o que faz parte de um processo natural da cicatrização, porém com ausência de secreção, indicando que não houve nenhum tipo de processo infeccioso. Alguns outros fatores foram observados ao longo do tempo na análise macroscópica, tais como a coloração dos ferimentos, odor, aspecto do ferimento, adesão do curativo no mesmo.

Foi observado que todos esses aspectos transcorreram de forma aceitável sem alterações que pudessem prejudicar o processo de cicatrização dos ferimentos. O principal fator observado foi que a velocidade de cicatrização foi acentuada, pois com 28 dias pós-cirurgia houve o aparecimento de cicatrização com crescimento de pêlos.

Os experimentos *in-vivo* realizados apresentaram alguns resultados qualitativos interessantes.

- Com 24 horas pós-cirurgia: durante as primeiras 24 horas após a cirurgia e aplicação dos curativos a base de micropartículas de quitosana pura e de micropartículas de quitosana com papaína sorvida e reticuladas com TPP, foi observado os seguintes fatos:
 - não houve o aparecimento de secreção no leito do ferimento;
 - leve presença de edema, o que é natural no início do processo de cicatrização de ferimentos;
 - a coloração dos ferimentos apresentou-se normal após a aplicação de ambos curativos;
 - odor normal, devido ao sangramento (odor característico das hemácias, processo de coagulação);
 - os ferimentos apresentaram aspecto normal;
 - os ferimentos nesta etapa inicial de cicatrização apresentaram forte adesão dos curativos ao leito das feridas.

- Os grupos de Hamsters sacrificados com 48 e 72 horas de experimento pós-cirúrgico apresentaram características semelhantes ao grupo sacrificado com 24 horas pós-cirurgia, quanto à secreção, coloração, presença de edema, aspecto do ferimento em processo de cicatrização e adesão do curativo ao leito da ferida. Entretanto, a partir das 48 horas já foi percebida a ausência de odor nos ferimentos, para ambos os curativos aplicados, o que indicou que o leito dos ferimentos já se apresentava sem sangramento. Este fato também foi observado por Nogueira *et al.*, 2003, os quais trataram ferimentos em ratos com a utilização de membranas de quitosana.
- 7º dia pós-cirurgia:
 - A partir deste período, foi observada, nos Hamsters sacrificados, a ausência total de edemas nos ferimentos;
- 14º dia pós-cirurgia:
 - Nos animais sacrificados com 14 dias de experimento, foi observado que começou a haver modificação na coloração dos ferimentos, que até então se apresentavam com uma coloração vermelha, sendo que a partir deste período passaram a apresentar coloração rosa e aparecimento de tecido cicatrizado;
- 21º dia pós-cirurgia:
 - Os animais sacrificados neste período já apresentavam ferimentos com cicatrização;
- 28º dia pós-cirurgia:
 - Com 28 dias de experimentos, os animais sacrificados apresentavam um processo de cicatrização completo, com os ferimentos, em ambos os lados do dorso, fechado e com a presença de pêlos sobre as cicatrizes. Tal fator também foi observado por Nogueira *et al.*, 2003, onde os mesmos observaram que ferimentos em ratos eram completamente cicatrizados com 30 dias de aplicação de membranas de quitosana como curativo.

Os resultados citados podem ser observados também na Tabela 5.3, onde os mesmos são apresentados para ambos os lados do dorso dos animais, lado direito (D), que é o controle negativo do experimento (grupo quitosana) e lado esquerdo (E) onde foi

colocado o curativo de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e papaína sorvida .

Tabela 5.4: Tabela de resposta da cicatrização das análises de lesões provocadas na pele de Hamsters com o uso de curativos de micropartículas de quitosana e micropartículas de quitosana reticuladas com TPP e papaína sorvida.

Período de 24 horas												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	A	P	P
2	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	F	P	P
3	A	A	VE	VE	N	N	N	N	P	P	P	P
4	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	P	P
5	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	P	P
6	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	P	P
Período de 48 horas												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	VV	VE	N	N	N	N	F	F	P	P
2	A	A	R	VE	N	N	N	N	A	P	P	P
3	A	A	VE	R	N	N	N	N	P	A	P	P
4	A	A	VE	R	N	N	N	N	A	F	P	P
5	A	A	VC	VV	N	N	N	N	P	A	P	P
6	A	A	VC	VE	N	N	N	N	P	P	P	P
Período de 72 horas												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	A	P	P
2	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	F	P	P
3	A	A	VE	VE	N	N	N	N	P	P	P	P
4	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	P	P
5	A	A	R	R	N	N	N	N	P	A	A	A
6	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	P	P
Período de 7 dias												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	A	A	A
2	A	A	VV	VV	N	N	N	N	P	F	A	A
3	A	A	VE	VE	N	N	N	N	P	P	A	A
4	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	A	A
5	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	A	A
6	A	A	R	R	N	N	N	N	P	P	A	A
Período de 14 dias												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	V	V	N	N	N	N	-	-	A	A
2	A	A	V	V	N	N	N	N	-	-	A	A
3	A	A	V	V	N	N	N	N	-	-	A	A
4	A	A	Pr	VE	N	N	C	C	-	-	A	A
5	A	A	Pr	VE	N	N	C	C	-	-	A	A
6	A	A	Pr	Pr	N	N	C	C	-	-	A	A
Período de 21 dias												
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1	A	A	R	R	N	N	C	C	-	-	A	A
2	A	A	R	R	N	N	C	C	-	-	A	A
3	A	A	R	R	N	N	C	C	-	-	A	A
4	A	A	R	R	N	N	C	C	-	-	A	A
5	A	A	R	R	N	N	C	C	-	-	A	A
6	A	A	R	R	N	N	Cr	C	-	-	A	A

Período de 28 dias													
Hamster	Secreção		Cor		Odor		Aspecto		Adesão		Edema		
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	
1	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	
2	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	
3	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	
4	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	
5	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	
6	A	A	R	R	N	N	CP	CP	-	-	A	A	

A codificação da Tabela 5.4 é representada por (A) ausente para secreção, adesão e edema; (VV) vermelho vivo, (VE) vermelho escuro, (R) rosa, (Pr) preto, para a cor do ferimento; (P) presente, para a presença de edema e adesão do curativo ao leito do ferimento; (N) normal, para o odor e aspecto do ferimento durante o período de cicatrização; (C) formação de cicatriz, (Cr) formação de crosta e (CP) formação de cicatriz com pêlo, para o aspecto do ferimento durante o período de cicatrização

O processo de cicatrização foi avaliado também através de análises térmicas dos implantes de micropartículas em comparação com o tecido animal e com o biopolímero não implantado.

5.8.3.2 Análises térmicas efetuadas nos tecidos dos Hamsters coletados pós-cicatrização

Após o processo de cicatrização, os Hamsters foram sacrificados e os tecidos cicatrizados foram coletados e liofilizados, com a finalidade de verificação da eficiência de cicatrização promovida pelos curativos produzidos com micropartículas quitosana com papaína sorvida reticuladas com TPP e quitosana com papaína sorvida. Nas amostras foram efetuadas análises por TGA.

Em termogravimetria (TGA-DTG), a análise da massa da amostra é realizada em atmosfera controlada. Mede-se a massa da amostra em função da temperatura e/ou do tempo; esta análise pode ser usada para monitorar qualquer reação que envolva fase de gás como os processos de oxidação e/ou desidratação. Os estudos podem ser realizados a temperaturas de até 1550° C. Este método é útil para determinar e caracterizar o material e suas propriedades térmicas, a sua pureza; o conteúdo, tipo e as interações da água nas amostras; os conteúdos de carbonetos e outros orgânicos em estudo das reações de decomposição (Skoog *et al.*, 2002).

5.8.3.3. Análises termogravimétricas (TGA)

A análise do comportamento térmico por TGA dos biomateriais QT (quitosana pura) e QP (quitosana 1,5% mais 2% de papaína e tripolifosfato de sódio), apresentada na Figura 5.40, mostrou uma similaridade de comportamento térmico entre as duas amostras. Apenas nos estágios iniciais da análise térmica pode-se perceber uma diferença de hidrofiliicidade ou de conteúdo de água de constituição nas amostras, com 14,48% de água para QT e 11,42% para QP (todas as amostras foram liofilizadas). Esta composição do material em água é consistente com o fato da mudança na quantidade de sítios para a interação da água na quitosana pura (QT) e quitosana mais tripolifosfato e papaína - proteína (QP). Pode-se também perceber que a estabilidade térmica dos materiais é de até 166,38°C (QT) e de 152°C (QP); as perdas totais (decomposição do material sem água) para QT são de 40,01% e de 58,70% para QP e os resíduos de 44,88% de cinzas, incluindo carbono e minerais, para QT e de 29,66% para QP.

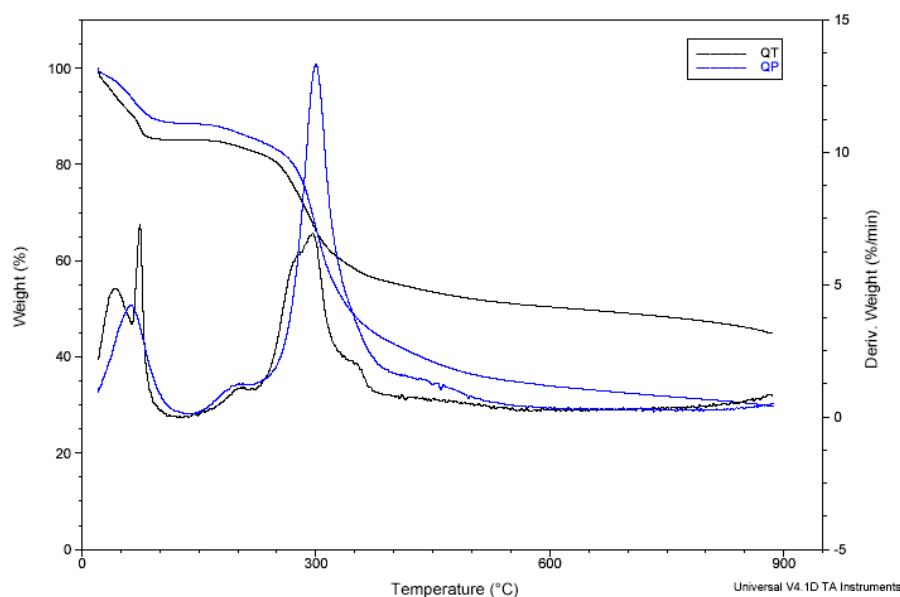


Figura 5.40: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana pura (QT) e micropartículas de quitosana 1,5% com papaína 2% sorvida reticuladas com TPP (QP).

5.8.3.4. Análise por TGA de TA (tecido animal), QT (controle positivo); QT 14 dias e QT 28 dias (implantadas nos animais – implantes *in vivo*)

O comportamento térmico das amostras por TGA do tecido do animal (TA) e dos biomateriais QT (quitosana pura); QT 14 dias e QT 28 dias dos implantes *in vivo* (Controle), apresentado na Figura 5.41, mostrou diferenças de comportamento térmico e de conteúdos. Nos estágios iniciais da análise térmica percebem-se diferenças significativas nos conteúdos de água (hidrofilicidade) das amostras do tecido, do polímero e de polímero mais tecido produzido pelo organismo animal, após 14 e 28 dias pós-implante, (todas as amostras foram liofilizadas) com 2,57% de água para TA, 14,48% para QT; 1,69% para QT 14 dias e 4,03% para QT 28 dias. Estas variações na composição de água das amostras sugerem diferenças da retenção de água no material, pela variação do tipo de sítio utilizado para a retenção e de intensidade das ligações utilizadas na sorção da água, pois as amostras foram liofilizadas da mesma maneira e no mesmo lote. Pode-se também perceber que a estabilidade térmica dos materiais é de até 166,36°C (TA), 166,38°C (QT); 144°C para QT 14 dias e de 165,12 °C para QT 28 dias; as perdas totais (decomposição do material sem água) são de 90,88% para TA, 40,01% para QT; de 95,35% para QT 14 dias e 87,99% para QT 28 dias e os resíduos de 6,45% de cinzas, incluindo carbono e minerais para TA, 44,88% para QT; 2,95% para QT 14 dias e de 7,98% para QT 28 dias. Estes resultados sugerem que o material é praticamente absorvido pelo organismo animal em torno de 14 dias e que, a partir daí, há uma formação de tecido com acúmulo de minerais nos tecidos formados, ou seja, a cicatrização está praticamente completada em torno de 28 dias. Pode-se ainda concluir que a estabilidade das amostras diminui em QT 14 dias e aumenta a partir de QT 28 dias; que as desidratações são consequência da saída de água residual das amostras e também das desidratações que ocorrem pela saída dos grupos hidroxila (-OH) do carboidrato e dos tecidos formados no processo de cicatrização, não se exclui também a possibilidade da saída de outros materiais voláteis.

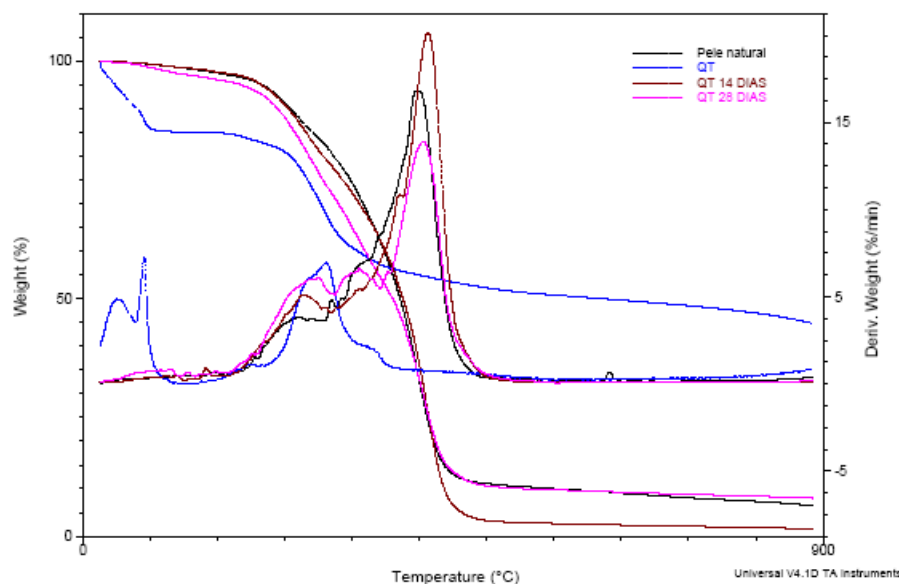


Figura 5.41: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana, onde pode ser observado: pele natural, quitosana pura (QT), quitosana pura implantada com 14 dias (QT 14 dias) e quitosana pura implantada com 28 dias (QT 28 dias).

Pode-se observar através da Figura 5.41 que o comportamento térmico do material implantado é muito próximo do comportamento térmico da pele natural de Hamster, sendo que para o polímero na forma de micropartículas não implantadas o comportamento térmico é muito diferente, o que vem corroborar afirmando que o material implantado após 14 dias já começa a ser absorvido pelo tecido vivo, tornando-se parte deste. Tal comportamento é melhor observado pelas micropartículas implantadas a partir de 28 dias, pois, neste caso, as mesmas possuem comportamento térmico muito semelhante à pele natural de Hamsters.

5.8.3.5. Análise por TGA de Tecido animal (TA); QT (controle positivo); QP 14 dias e QP 28 dias (implantadas nos animais - implantes *in vivo*)

O comportamento térmico das amostras por TGA do tecido animal (TA), dos biomateriais QP (quitosana mais papaína e tripolifosfato de sódio); QP 14 dias e QP 28 dias dos implantes *in vivo*, apresentado na Figura 5.42, mostrou também diferenças significativas de comportamento térmico. Nos estágios iniciais da análise térmica percebem-se diferenças significativas nos conteúdos de água (hidrofilicidade) das amostras do tecido, do biopolímero e das amostras de tecido de cicatrização (todas as amostras foram liofilizadas nos mesmos lotes) com 11,42% de água para QP; 1,69% para QP 14 dias praticamente sem umidade e QP 28 dias 2,90% de água. Estas variações na composição de água das amostras sugerem diferenças da retenção de água pelo tecido de cicatrização retirado dos animais, indicando que o tipo de tecido e célula e dos sítios utilizados para a retenção da água são diferentes, além da capacidade de interação da água e da intensidade dessa interação com o tecido resultante da cicatrização. Pode-se também perceber que a estabilidade térmica desses materiais é muito diferente, com 152°C (QP); 208°C para QP 14 dias e 173,95°C para QP 28 dias; as perdas totais (decomposição do material isento de água em atmosfera de nitrogênio) para QP são de 58,70%; de 98,56% para QP 14 dias e de 90,47% para QP 28 dias. Os resíduos da decomposição das amostras em atmosfera de nitrogênio mostram um conteúdo de 29,66% para QP; 0,8% para QP 14 dias e de 6,59% de resíduos para QP 28 dias em relação a cinzas (minerais) e carbono. Estes resultados mostram que o material implantado é praticamente absorvido pelo organismo animal em torno de 14 dias e que a partir desse período de tempo há formação de tecido com acúmulo crescente de material celular e de minerais nos tecidos formados, ou seja, a cicatrização está também completada em torno de 28 dias. Os resultados das análises térmicas também mostram que variação na estabilidade térmica das amostras teciduais, com a maior estabilidade do material sendo alcançada em torno dos 14 dias de cicatrização para o implante de QP e a partir daí, a formação de tecidos faz com que a estabilidade das amostras diminua continuamente, mostrando que há uma correlação entre o conteúdo mineral e a estabilidade térmica das amostras de tecido coletadas em tempos diferentes. Pode-se resumidamente dizer que há aumento gradativo da estabilidade térmica até 14 dias e a partir daí ocorre um decréscimo, mas ainda superior comparando o material implantado

in vivo com as micropartículas não implantadas. No caso do resíduo de final de decomposição pode-se dizer que num primeiro momento o resíduo mineral e conteúdo de carbono diminuem na ocorrência do processo de cicatrização com o passar do tempo.

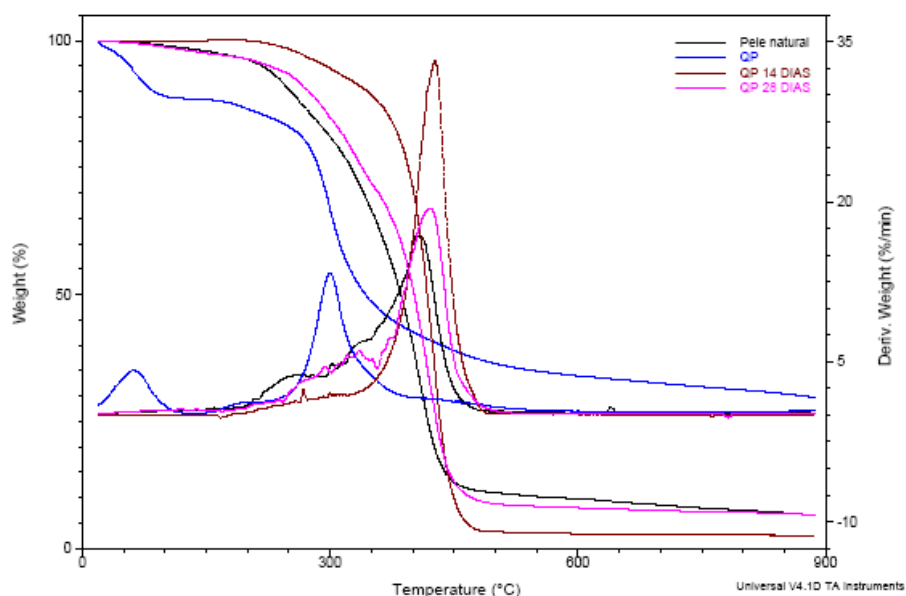


Figura 5.42: Termograma relacionando tecidos de Hamsters cicatrizados com curativos provenientes de micropartículas de quitosana, onde pode ser observado: pele natural, quitosana 1,5% com 2% de papaína sorvida reticulada com TPP (QP), 1,5% com 2% de papaína sorvida reticulada com TPP, implantada com 14 dias (QP 14 dias) e 1,5% com 2% de papaína sorvida reticulada com TPP, implantada com 28 dias (QP 28 dias).

Observando-se a Figura 5.42, pode-se constatar que o comportamento térmico das micropartículas implantadas (QP), com 28 dias, aproximaram-se do comportamento térmico da pele natural de Hamster, o que não aconteceu com o comportamento térmico das micropartículas de quitosana com papaína sorvida reticuladas com TPP não implantadas (QP). Este fator vem corroborar na afirmação de que com 28 dias já se tem um processo de cicatrização completo, conforme foi observado para as amostras de QT, quitosana pura.

CAPÍTULO 6

6. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho objetivou a obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana com papaína sorvida e com papaína imobilizada com tripolifosfato de sódio para o uso como biomaterial, na área de reparo tecidual (tecido epitelial).

6.1. PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A otimização do processo de preparação das micropartículas de quitosana fundamentou-se, principalmente, na forma como se iria incorporar a papaína as micropartículas. Existem inúmeros métodos de preparação de micropartículas, porém deve-se sempre levar em consideração alguns fatores que podem interferir na eficiência do método escolhido, tais como: tamanho de partícula, estabilidade térmica, estabilidade do produto final e toxicidade associada com o produto (Agnihotri, 2004).

6.2. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As micropartículas de quitosana passaram por modificações químicas e enzimáticas, para sorção da papaína, que é uma enzima proteolítica e possui inúmeras aplicações, incluindo a indústria farmacêutica.

A papaína é usada como "debridante" químico e agente amaciante de carne, em contato direto com a pele pode causar irritação, mas em concentrações baixas, em torno de 2 a 4% não causa danos nos tecidos, apenas age com agente bacteriostático e acelerador de regeneração de tecidos lesados. Entretanto, como possui capacidade de despolimerizar a quitosana eficientemente, a papaína deve ser preferencialmente imobilizada na matriz de quitosana (Muzzarelli *et al.*, 1994).

Alguns estudos foram efetuados com papaína e outras enzimas, tais como pepsina, com a finalidade de se diminuir a massa molecular da quitosana para ser aplicada como biomaterial na área médica (Muzzarelli *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001). Porém em nenhum destes estudos efetuou-se a utilização de papaína sorvida em micropartículas de quitosana

com propósitos farmacêuticos aproveitando as características antimicrobianas, antiinflamatórias e de cicatrização da quitosana e da papaína. Sendo utilizada a papaína diretamente em solução de quitosana para promover despolimerização da mesma, diminuindo assim sua massa molecular.

Liu *et al.*, 2001, afirmam que a quitosana parcialmente despolimerizada apresenta maior atividade antibacteriana em relação a quitosana de alta massa molecular.

Segundo Kumar *et al.*, 2004, devido à capacidade que a papaína possui de despolimerizar a quitosana, muitas vezes é interessante que se trabalhe com a papaína imobilizada na matriz de quitosana para garantir melhor estabilidade e atividade enzimática.

No presente trabalho não foi observado nenhum tipo de alteração da atividade enzimática da papaína em função da matriz de quitosana. Mesmo quando utilizada apenas sorvida às micropartículas de quitosana, a papaína manteve sua atividade enzimática constante.

Quando foi feita a comparação entre as duas formas de micropartículas de quitosana, o fator mais significativo foi o tempo de armazenamento das micropartículas, pois foi observado que para as micropartículas não reticuladas, esse tempo de armazenamento foi relativamente curto, não mantendo a estabilidade das micropartículas de quitosana com papaína sorvida devido ao aparecimento de crescimento de fungos num período de 30 dias. Este fato não aconteceu com as micropartículas reticuladas com TPP, pois estas se mantiveram conservadas por um período de no mínimo 4 meses, mantendo estável a atividade enzimática da papaína nesse período de tempo. Tal comportamento levou-nos a priorizar a utilização do TPP na tentativa de imobilização da papaína nas micropartículas de quitosana, pois se deduziu, a partir dos resultados obtidos, que a papaína sorvida nas micropartículas de quitosana não reticulada estava causando algum tipo de modificação na estrutura química da mesma, ocasionando diminuição da estabilidade das micropartículas durante o armazenamento.

Vários autores comentam as vantagens e desvantagens do tipo de reticulação que o glutaraldeído e o TPP promovem e afirmam que a utilização do TPP como agente reticulante é mais vantajosa em relação ao uso do glutaraldeído, devido à baixa toxicidade do TPP.

Conforme Ko *et al.* (2002), o tempo de reticulação das micropartículas de quitosana com TPP pode interferir no comportamento de liberação do fármaco encapsulado nas mesmas. Os respectivos autores observaram que existia um decréscimo na taxa de liberação do fármaco com o aumento no tempo de reticulação de 15 para 60 minutos, ou seja, quanto maior o tempo de reticulação menor a taxa de liberação.

No presente trabalho, esse fato não foi observado, pois não se avaliou o tempo de reticulação, neste caso o tempo foi fixado em 120 minutos e a reticulação com TPP foi comparada com o tempo de reticulação utilizado para o glutaraldeído, o qual foi utilizado como padrão de comparação, pois já se tinha bem definido o tempo necessário para reticular micropartículas de quitosana em solução de glutaraldeído. Porém, no decorrer do tempo pôde-se constatar que a reticulação com TPP estava atingindo o objetivo desejado, que era o de servir como suporte para imobilização da papaína nas micropartículas de quitosana, mantendo assim sua atividade enzimática.

Segundo Aydin *et al.*, 1996, as interações promovidas pelo TPP podem aumentar a eficiência de liberação do composto ativo, por tempo prolongado. Este fator foi observado no presente trabalho, pois a reticulação com TPP manteve constante a atividade enzimática da papaína por longo período de tempo.

6.3. MÉTODOS DE SECAGEM DAS MICROPARTÍCULAS

Existem diversos métodos de obtenção de micropartículas, bem como métodos de secagem diversificados. A secagem da micropartícula é um pré-requisito para sua estabilidade. A quantidade de água residual pode ser prejudicial para o *shelf life* das micropartículas produzidas, as quais, se não forem bem acondicionadas podem desenvolver fungos entre outros tipos de contaminação.

Dos dois métodos de secagem apresentados no presente trabalho somente a liofilização realmente mostrou-se eficiente para a preparação das micropartículas de quitosana com papaína, devido ao fato de manter intactas as características do material, não apresentando dificuldades operacionais durante o processo.

O processo de *spray-drying* não se adequou ao tipo de micropartícula requerida, pelo fato do material ficar exposto a altas temperaturas durante o período de secagem e devido à aglomeração do mesmo dentro da câmara de secagem, o que ocasionou perdas

excessivas de produto. Além do fato que as altas temperaturas podem provocar degradação enzimática.

6.4. MORFOLOGIA E CRISTALINIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

A morfologia das micropartículas é um parâmetro importante para o mecanismo de liberação controlada, ou seja, a forma como as partículas apresentam a sua porosidade, a distribuição de tamanhos de partículas, cristalinidade e etc.

Pode-se observar que a morfologia das micropartículas foi modificada primeiramente pelo processo de secagem, que como foi observado na literatura, afeta diretamente a organização da estrutura cristalina dos materiais, podendo aumentar ou diminuir a distância interplanar das cadeias poliméricas. Tal fato foi observado por (Malgorzata *et al.*, 2003). Essa alteração de distância interplanar entre cadeias do polímero vai afetar diretamente a cristalinidade do material, e assim sendo vai afetar também a forma de liberação de drogas no mesmo, pois vai afetar a difusividade do material.

A reticulação modificou a cristalinidade das micropartículas, isso pôde ser observado pelas análises de difração de raios-x. A quitosana natural, utilizada como matéria prima, apresentou cristalinidade conforme dados observados na literatura. Para a quitosana reticulada com TPP e com glutaraldeído e com papaína sorvida, foi observado que houve realmente uma alteração na cristalinidade das micropartículas. Este fato foi observado também por Kumar *et al.*, 2004, para quitosana despolimerizada com papaína, ele observou que a quitosana despolimerizada com papaína sofreu alterações na sua cristalinidade em relação a quitosana nativa utilizada pelo mesmo. Observou-se ainda que o método de secagem foi um fator importante para a cristalinidade das micropartículas, pois foram encontradas diferenças na cristalinidade de micropartículas de quitosana secas por *spray-drying* e por liofilização. Segundo Malgorzata *et al.*, 2003, estudos demonstram que o processo de secagem utilizado afeta a cristalinidade dos polímeros, fator principalmente observado na distância interplanar dos polímeros, conforme foi observado no presente trabalho.

A caracterização por FTIR-ATR nos mostrou que a reticulação com TPP foi eficiente, fato observado através do aparecimento de determinadas bandas de absorção em comprimentos de onda característicos de grupos P=O, conforme apresentado na literatura.

Pelo que foi observado, a concentração da solução de quitosana utilizada para a obtenção das micropartículas foi um fator importante para a distribuição granulométrica das micropartículas, pois ocorreram variações consideráveis na distribuição granulométrica das micropartículas, observando-se um comportamento bimodal na curva de distribuição granulométrica para as micropartículas de quitosana com menor concentração.

6.5. ESTUDO DA APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O estudo da aplicação das micropartículas de quitosana modificadas com papaína e TPP como biomaterial é muito importante, pois a quitosana exibe uma variedade muito grande de propriedades físicas, químicas e biológicas resultando entre elas em uma vasta aplicação biomédica, devido às propriedades bioativas da quitosana (Senel, 2004).

Na literatura não foi encontrado trabalho aplicando papaína imobilizada em micropartículas de quitosana com o objetivo de uso como agente cicatrizante, sendo a papaína mais utilizada em géis de quitosana com a finalidade de produzir quitosana despolimerizada, de baixa massa molecular .

A avaliação da cinética de liberação de papaína a partir das micropartículas de quitosana demonstrou que as mesmas apresentaram homogeneidade no comportamento de liberação de papaína. Pôde-se observar, também, que a atividade enzimática da papaína não foi modificada drasticamente com o tempo de armazenamento. Este fato indicou que a papaína foi imobilizada de forma eficiente nas micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.

O objetivo principal que se queria atingir era o de imobilizar a papaína de forma que fossem mantidas a atividade enzimática da papaína e as propriedades químicas, físicas e biológicas das micropartículas de quitosana o mais inalteradas possível. Este objetivo foi atingido pelo acompanhamento dos testes de liberação da papaína a partir das micropartículas de quitosana em tempos diferentes de armazenamento, onde foi demonstrado que após período de 6 meses de armazenamento, as micropartículas de quitosana reticuladas com TPP ainda mantinham estável a atividade enzimática da papaína.

Conforme observado pela análise dos resultados, estes se apresentaram de forma esperada, mostrando que o material em estudo tem aplicação promissora como biomaterial,

devido as suas propriedades hemostáticas, antiinflamatória, bactericida, fungicida e principalmente de cicatrização de tecidos epiteliais.

Os testes *in-vivo* efetuados com as micropartículas demonstraram que são muito grandes as possibilidades de utilização das mesmas como biomaterial, devido aos resultados satisfatórios obtidos durante os experimentos de cicatrização de ferimentos pós-cirúrgicos realizados em Hamsters, onde foi observado que a cicatrização dos ferimentos ocorreu de forma adequada, não sendo notado nenhum tipo de quadro inflamatório durante o período de testes, em ambos os métodos não houve o aparecimento de edemas e secreções em grande escala que pudesse conduzir a um processo infeccioso, facilitando o processo de cicatrização.

Outros trabalhos encontrados na literatura demonstraram a existência do uso de polissacarídeos no controle de infecções em ferimento provocados em animais, tal como é apresentada na pesquisa feita por Coelho *et al.*, 2001, e comprovaram que a utilização de tais substâncias são capazes de facilitar o processo de cicatrização.

A utilização de análises térmicas como recurso para verificação da eficiência de cicatrização dos tecidos lesados, demonstrou que houve pequena diferença na fase inicial de cicatrização dos mesmos pela utilização de quitosana pura e de quitosana com papaína sorvida e reticulada com TPP. Porém, foi observado que, para ambos os casos, quando comparados com a pele natural de Hamsters, o comportamento térmico foi semelhante, principalmente para o complexo formado por tecidos mais micropartículas implantadas com 28 dias, tanto para as micropartículas de quitosana pura (QT), quanto para as micropartículas modificadas (QP), onde foi evidenciada a cicatrização completa. Tal fato foi observado através do comportamento térmico dos implantes, o mesmo não foi observado para as micropartículas não implantadas, tanto para as micropartículas de quitosana pura (QT), quanto para as micropartículas modificadas (QP), pois estas apresentaram comportamento térmico bem diferente dos implantes e da pele natural, o que vem demonstrar que o material implantado como curativo pode estar desempenhando muito bem o papel de agente cicatrizante, ou indutor de cicatrização. Fato esperado, devido às

propriedades hemostáticas, bacteriostáticas e cicatrizantes da quitosana e também devido à capacidade antiinflamatória da papaína.

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSÕES

Deste trabalho concluiu-se que:

- As micropartículas de quitosana produzidas apresentaram uso potencial como biomaterial, apresentando um perfil adequado de liberação controlada de papaína;
- Testes efetuados em hamsters apresentaram resultados de tecidos cicatrizados, com formação de tecido cicatrizado com características próximas do tecido original, apresentando inclusive crescimento de pêlos, o que indicou a ausência de quelóides no processo de formação do tecido epitelial;
- O objetivo de cicatrização de tecidos epiteliais foi devidamente atingido com a utilização das micropartículas de quitosana como curativo. Através dos testes de cicatrização *in-vivo* e análises térmicas do material coletado após o sacrifício dos animais em tempos diferentes, pôde-se observar que não houve processo infeccioso nem contaminação no ferimento de nenhum animal, constatando-se ainda que a velocidade no processo de cicatrização foi diferente para as micropartículas de quitosana pura e para as micropartículas de quitosana modificada, onde se percebeu que a quitosana pura foi absorvida pelo organismo do animal com maior velocidade, ocorrendo cicatrização mais rapidamente; entretanto o desempenho da utilização das micropartículas de quitosana pura (QT) foi semelhante ao das micropartículas de quitosana com papaína sorvida e reticuladas com TPP (QP). Porém esse fato não descarta a utilização das micropartículas de quitosana com papaína sorvida e reticuladas com TPP, pois estas ainda possuem um uso potencial em tecidos necrosados, que tenham sofrido injúrias por queimaduras. E mesmo no caso de ferimentos onde existe tecido vivo, não foi observado prejuízo pelo uso destas micropartículas modificadas.

- O método de secagem que se mostrou mais adequado para se utilizar no processo de preparação de micropartículas de quitosana com papaína sorvida foi à liofilização, pelo fato de manter as características do material processado intactas, não acarretando desnaturação enzimática da papaína.
- A utilização de agentes reticulantes, como o TPP, mostrou-se interessante para o presente sistema, pelo fato do mesmo manter as características de liberação de papaína sorvida nas micropartículas de quitosana por um tempo prolongado (bom *shelf life*), e por não possuir toxicidade, comparações feitas entre o TPP e glutaraldeído comprovaram que ambos apresentaram eficiência na liberação de fármacos, onde se pode concluir que o TPP é mais uma alternativa viável para reticulação e liberação controlada de fármacos a partir de matrizes de quitosana.

7.1. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para continuação deste trabalho sugerem-se os seguintes passos:

- Verificação de um modelo matemático para explicar melhor o comportamento de liberação a partir das micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.
- Avaliação da utilização das micropartículas de quitosana com papaína sorvida e reticuladas com TPP para cicatrização de ferimentos provenientes de queimaduras.
- Estudo detalhado da técnica de TGA para consolidar a eficácia desta técnica na avaliação dos resultados de testes de cicatrização *in-vivo* comparando com análises histológicas para confirmar os resultados da cicatrização de tecidos dos hamsters obtidos através das análises térmicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APARECIDA, C.; Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro. Tese de Doutorado. Unicamp, Instituto de Química, 1994.

ABAZINGE, M. D. A.; FONTENOT, J. P.; ALLEN, V. G.; FLICK, G. J. J.; Ensiling characteristics of crab waste and wheat straw treated with different additives. *Agricultural and Food Chemistry*. 41, 657-661, 1993.

AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M.; Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *Journal of Controlled Release*. 96, 245-259, 2004.

ARAL, C.; AKBUGA, J.; Alternative approach to the preparation of chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics* 168, 9-15, 1998.

ARCIDIACONO, S.; KAPLAN, D.L.; Molecular-weight distribution of chitosan isolated from *Mucor-Rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnology Bioengineering*. 39, 281-286, 1992.

AYDIN, Z.; AKBUGA, J.; Chitosan beads for the delivery of salmon calcitonin: preparation and release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 131, 101-103, 1996.

AYDIN, Z.; AKBUGA, J.; Preparation and evaluation of pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics* 137, 133-136, 1996.

AZEVEDO, M.M.M.; Nanoesferas e a liberação controlada de farmacos. Monografia, Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003. Disponível em <http://lques.iqm.unicamp.br> (acessado em 30/09/2003).

BALDWIN, S. P.; SALTZMAN, W. M.; Materials for protein delivery in tissue engineering Advanced Drug Delivery Review, 33, 71, 1998.

BAKER, R.; Controlled release of biologically active agents. New York, Willey-Interscience, 279p, 1987.

BARKAI, A.; PATHAK, Y. V.; BENITA, S.; Polyacrylate (Eudragit Retard) Microspheres for Oral Controlled Release of Nifedipine .1. Formulation Design and Process Optimization. Drug Development and Industrial Pharmacy. 16,2, 1990.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Planejamento e otimização de experimentos. Editora da Unicamp, 1995.

BENSON R. S.; “Use of radiation in biomaterial science”, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 191, p. 752-757, 2002.

BLANCO, M. D., GÓMEZ, C., OLMO, R., MUÑIZ, E., TEIJIÓN, J. M.; Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release. International. Journal Pharmaceutics, 202, 29-39, 2000.

BODMEIER, R.; OH, K. H.; PRAMAR, Y.; Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. Drug Development and Industrial Pharmacy. 15, 1475-1494, 1989.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATA, J. L.; ALONSO, M. J.; Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for protein and vaccines. Pharmacological. Research. 14, 1431-1436, 1997a.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATA, J. L.; ALONSO, M. J.; Novel hydrophilic chitosan-propylene oxide nanoparticles as protein carriers. Journal of Applied Polymer Science. 63, 125-132, 1997b.

CALVO, P.; VILA-JATA, J. L.; ALONSO, M. J.; Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmacological Sciences*. 85, 530, 1996.

CANDIDO, L. C.; Nova abordagem no tratamento de feridas. SP., Ed. SENAC, 2001.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; Introducion a la bioquimica y tecnologia de los alimentos. Ed Acribia, Espanha, 1996.

CHEN, J.; WANG, M.; HO, C. J.; Volatile compounds generated from thermal degradation of N-acetylglucosamine. *Agricultural and Food Chemistry*. 46, 3207-3209, 1998.

COELHO C. O. C; CARRAZONI P. G; MONTEIRO V. L. C; MELO F. A. D.; MOTA A; FILHO F. T.; Biopolímero produzido a partir da cana-de-áçúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir. Bras.*; 17 (supl. 1):11-13, 2001.

CULLYT, B. D.; Elements of X Ray Diffraction, 1956.

FAN, L. T.; SINGH, S. K.; A quantitative treatment, springer-verlag. *Journal of Controlled Release*, 1989.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNER, P. M.; Pefloxacin Mesilate-Loaded And Ofloxacin-Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles - Characterization Of The Colloidal Drug Carrier Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 84, 895, 1995.

FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G ; PUGLISI, G.; WEHRLI, E.; Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials* 17, 751, 1996.

GEDDE, U. W.; Thermal-Analysis of Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 16, 2465, 1990.

GEHRKE, S. H.; Synthesis, equilibrium swelling, kinetics, permeability and applications of environmentally responsive gels. *Advances in Polymer Sciences*, 110, 81, 1993.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNET, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal controlled Release* 57, 171, 1999.

GRAHAM, N. B.; *Br. Poly. J.*, 10, 1978 , 260-266, apud DASH, A. K., CUDWOURT II, G. C.; Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Journal Pharmacological, Toxicol. Met*, 40, 1-12, 1998.

GUPTA, K. C.; RAVI KUMAR, M. N. V.; Drug release behaviour of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials*. 21, 1115-1119, 2000.

HAJDU, J.; FRIEDERICH, P.; Reaction of glutaraldehyde with NH_2 compounds - spectrophotometric method for determination of glutaraldehyde concentration. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 273-280, 1975.

HIGUCHI, T.; Rate of release of medicaments from ointment base containing drug suspension. *Journal Pharmaceutical Sciences*. V. 59, 3, 353, 1970.

HIRANO, S.; *Biotechnology. Annual Research*. 2, 237-258, 1996.

HIRANO, S.; *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York 37-43, 1989.

HORISAWA, E.; KUBOTA, K.; TUBOI, I.; SATO, K.; YAMANO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y.; Prolonged Anti-Inflammatory Action of DL-Lactide/Glycolide Copolymer Nanospheres Containing Betamethasone Sodium Phosphate for an Intra-Articular Delivery System in Antigen-Induced Arthritic Rabbit. *Pharmaceutical Research*. 19, 132, 2002.

IBAMA Lagosta, Carangueijo-uçá e Camarão do Nordeste, GPE-IBAMA, 1994.

JEON, H. L.; JEONG, Y. L.; JANG, M. K.; PARK, Y. H. NAH, J. W.; Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics ; International Journal Pharmaceutical. 207,99, 2000.

KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; TAKENAKA, H.; LIN, S. Y.; ANDO, Y.; Novel method for preparation the controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. Journal of Pharmaceutical Sciences. 74, 264-268, 1985a.

KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; KASAI, A.; TAKENAKA, H.; LIN, S.Y.; The effect of thickness and hardness of the coating film on the drug release of theophylline granules. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 33, 2469-2474, 1985b.

KO, J. A.; PARK, H. J.; HWANG, S. L.; PARK, J. B.; LEE, J. S.; Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 249, 165-174, 2002.

KOBELKE, D. N.; By-products from crustacean wastes - chitin production Food Australian. 42, 18-19, 1990.

KUMAR, M. N. V.; A review of chitin and chitosan applications. In: Reactive & Functional Polimers, Elsevier Science, june, 2000.

KUMAR, A. B. V.; THARANATHAN, R. N.; A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. Carbohydrate Polymers, 58, 275-283, 2004.

KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; LALITHA, R. G.; THARANATHAN, R. N.; Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. Biochimica et Biophysica Acta, 1670, 137-146, 2004.

KNORR, D.; Recovery and utilization of chitin and chitosan in food-processing waste management. Food Technology. 114-120, january, 1991.

KURITA, K.; Chitin in Nature and Technology, Plenum, New York 287-293, 1986.

KWEON; SONG, S. B.; PARK, Y. Y.; Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. In: Biomaterials, Elsevier Science, p 1595-1601, revista n 24, 2003.

LIM, L. Y.; WAN, L. S. C.; THAI, P. Y.; Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. Drug Development and Industrial Pharmacy, 23, 981-985, 1997.

LIMA, I. S.; Quitosanas e quitosanas química e morfologicamente modificadas com anidrido succínico-Propriedades, Adsorção e Termoquímica. Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, 2005.

LIU, X.F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YOO, K.; Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of Applied Polymer Science, 79, 1324-1335, 2001.

MALGORZATA, J.; KAROLINA, K.; PHELIPPE, G.; ERIC, G.; Influence of chitosan characteristics on polymer properties: II. Platinum sorption properties. Polymer International. 52, 206, 2003.

MARTINS, V. C. A.; GOSSI, G.; RAIBEIOR, A. C.; MARCONTÔNIO, J. E.; BET, M.; The controlled release of an antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. Artificial Organs, 22, n 3, 215-221, 1998.

MERKLI, A.; HELLER, J.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; Purity and stability assessment of a semi-solid poly(ortho ester) used in drug delivery systems. Biomaterials. 17, 897-902, 1996.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; LEE, S. T.; WONG, T. B.; Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-

tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. J. Polym. Sci: Polym. Phys. 37, 1551-1564, 1999b.

MI, F.L.; SHYU, S. S.; CHEN, C. T.; SCHOUNG, J. Y.; Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. Biomaterials, 20, 1603-1612, 1999c.

MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S.; Release of indomethacin from a novel chitosan microspheres prepared by naturally occurring crosslinker: examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction. Journal of Applied Polymer Science. 81, 1700-1711, 2001.

MIDDLETON, J. C.; TRIPTON, A. J.; Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. Disponível em <http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>. (Acessado em 30/09/03)

MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S.; MIRMA, S.; IR-Spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 2, 323-324, 1980.

MOORE, G. K.; ROBERTS, A. F.; Chitosan Gels .1. Study of Reaction Variables. International Journal of Biological Macromolecules. 2, 115-116, 1980.

MOULIN, V.; AUGER, F. A.; GARREL, D.; GERMAIN, L.; Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. Burns, 26, 3-12, 2000.

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S.; Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. Drug Development and Industrial Pharmacy. 26,343, 2000.

MUNJERI, O.; COLLET, J. H.; FELL, J. T.; Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *Journal of controlled release*, 46, 273-278, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A.; *Natural Chelating Polymers: Alginic Acid, Chitin and Chitosan*, Pergamon, New York, 1973.

MUZZARELLI, R. A.; ILARI, P.; TARSI, R.; DBINI, B.; XIA, W.; Chitosan from *absidia-coerulea*. *Carbohydrate Polymers*. 25, 45-50, 1994.

MUZZARELLI, R. A.; TECBOJEVICH, M.; MUZZARELLI, C.; Francescangeli, O. Chitosan depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines. *Carbohydrate Polymers*, 50, 69-78, 2002.

NIFANT`EV, N. E.; CHEMESTSKII, V. N.; *Mendeleev Chemical Journal*. 41, 96-100, 1998.

NOGUEIRA, A. C. ; FERREIRA, L. M. ; ENOKIHARA, M. M. S. S.; IHARA, S. S. M.; ABREU, M. M.; Felipe de ; ALCADIPANI, M.; SILVA, D. ; HORIBE, E. K.; Membrana de quitosana em processos de regeneração cutânea. In: XI Congresso de Iniciação Científica, 2003, São Paulo. XI Congresso de Iniciação Científica, 2003. p. 65-65.

OGAWA, M.; MAGALHÃES-NETO, E. O.; VI Congresso Brasileiro de engenharia de Pesca, 91-105, 1989.

OGAWA, M.; ALVES, T. T.; BRAS FILHO, R.; RODRIGUES, A . S.; MAIA, E. L.; *Arq. Ciênc. Mar* 13, 83-89, 1973.

OKAY, O.; GURN, C.; Formation and structural characteristics of porous ethylene-glycol dimethacrylate networks. *Journal of Applied Polymers Sciences*, 46, 421, 1992.

PEEPAS, N. A.; SCOTT, J. E.; Controlled release from poly(vinyl alcohol) gels prepared by freezing-thawing processes. *Journal of controlled release*, 18, 95, 1992.

PETER, M. G.; J. M. S.; Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Pure Applied Chemistry*. 4, 629-640, 1995.

QI, L.; XU, Z.; Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 251, 183-190, 2004.

RECUM, H. VON.; OKANO, T.; KIN, S. W.; Growth factor release from thermally reversible tissue culture substrates. *Journal of controlled release*, 55, 121, 1998.

RISBUD, M. V.; HARDIKAR, A. A., BHAT, S. V.; pH-Sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. *Journal of controlled release*, 68, 23-30, 2000.

SAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. DE L.; POHLMAN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química. Nova*, vol. 26, nº 5, 726-737, 2003.

SCZYCHER, M.; Sczycher's dictionary of biomaterial and medical devices, 1992.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J.; Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004.

SEZER, A. D.; AKBUGA, J.; Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 121, 113-116, 1995.

SGARBIERI, V. C.; Alimentação e nutrição, Fator de saúde e alimentação, pg (34-35), ed. Unicamp, Campinas, SP, 1987.

SHALABY, W. S. W.; PECK, G. E.; PARK, K.; Release of dextromethorphan hydrobromide from freeze-dried enzyme-degradable hydrogels. *Journal of controlled release* 16 (3): 355-364, 1991.

SHIRASHI, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M.; Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. *Journal of controlled release*, 25, 217-225, 1993.

SHEU, M. T.; LIU, C. H.; SOKOLOSKI, T. D.; Prolongation of drug delivery by covalent bonding of drugs to serum albumin microbeads. *Drug Des. Delivery*, 7, n 4, 251-257, 1991.

SHU, X.Z., ZHU, K. J.; A novel approach to prepare polyanion/chitosan complex beads as drugs delivery formulation. Preprints of 2nd International Symposium on High-tech Polymers and Polymeric Complex (HPPC-II), Zhengzhou, China, in press, 1999.

SHU, X, Z.; ZHU, K.J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 51-58, 2000.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, Review, 2004.

SKIBA, M.; NEMAT, F.; PUISIEUX, F.; DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEW, D.; Characterization of amphiphilic beta-cyclodextrin nanospheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 145,241, 1996.

SKOOG, F.; DOUGLAS, A.; JAMES H.; TIMOTHY, A.; NIEMAN; *Principios de análise instrumental*. 836p. 2002.

SOUZA, A. E.; O efeito de diferentes agents sobre a cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção no cavalo: estudo bacteriológico, histológico, histoquímico e morfométrico. Curso de Pós-Graduação em Ciências veterinárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1989.

SUPERAXO, A.; KOU, J. H.; TEITEBAUM, P.; MASKIEWICZ, R.; Preformed porous microspheres for controlled and pulsed release of macromolecules. *Journal of Controlled Release*, 23, 157, 1993.

SZYCHER M.; “Szycher’s dictionary of biomaterial and medical devices”, 1992.

TABATA, Y.; MATSUI, Y.; IKADA, Y.; Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination. *Journal Controlled Release*, 56, 135, 1998.

TENUTA FILHO, A.; ZUCAS, S. M.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 5, 78-85, 1985.

TENUTA FILHO, A.; ZUCAS, S. M. B.; *SBCTA.* 21, 163-169, 1987.

THACHARODI, D.; KAO, K. P.; Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery sistem for nifedine: development and in vitro evaluations. *Biomaterials*, v.17, 1307-1311, 1996

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S. H.; Differential Scanning Calorimetry as a Quick Scanning Technique for Solid-State Stability Studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1995,21,847.

VULCANI, V. A. S.; Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona. Tese de Mestrado, Instituto de química , Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

WATNASIRICHAIKUL, S.; DAVIES, N. M.; RADES, T.; TUCKER, I. G.; Preparation of biodegradable insulin nanoparticles from biocompatible microemulsions. *Pharmacological Research*. 17,684, 2000.

WITE, P. VAN DE; ESSELBRUGGE, H.; PETERS, A. M. P.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; GROENEWEGEN, R. J. J.; SMID, J.; OLIJSLAGER, J.; SCHAKENARAAD, J. M.; EENINK, M. J. D.; SAM, A. P.; Formation of Porous Membranes for Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, 24, 61, 1993.

WOLLINA, U.; HEIDE, M.; MÜLLER-LITZ, W; OBENAU, D.; ASH, J.; Functional textiles in prevention of chronic wounds, wound healing and tissue engineering. *Curr. Probl Dermatology Basel*, Karger, vol.31, 82-97, 2003.

WOUK, A. F. P.; DINIZ, J. M.; CÍRIO, S. M.; SANTOS, H.; BALTAZAR, E. L.; ACCO, A.; Membrana biológica (Biofill®). Estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: Aspectos clínicos, histopatológicos e morfológicos. *Archive of Veterinary Sciences*. 3,(1), 31-37, 1998.

Sites acessados:

- 1- <http://lques.iqm.unicamp.br> (acessado em 30/09/2003).
- 2- <http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html> (Acessado em 30/09/03).
- 3- <http://www.qca.ibice.unesp.br/BNR/BNR02-2003.html> (Acessado em 25/03/2004).
- 4- <http://geocities.com/timesquare/cauldron/5112/biologia/riqueza1.html> (Acessado em 25/03/2004).