



RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA

**MEMBRANAS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM ALGINATO E XANTANA:
COMPORTAMENTO NA PRESENÇA DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E
INCORPORAÇÃO DE ERITROMICINA**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA

**MEMBRANAS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM ALGINATO E XANTANA:
COMPORTAMENTO NA PRESENÇA DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E
INCORPORAÇÃO DE ERITROMICINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA MORAES.

CAMPINAS

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

So89m Souza, Renata Francielle Bombaldi de, 1989-
Membranas de quitosana complexada com alginato e xantana :
comportamento na presença de diferentes proporções de água e incorporação de
eritromicina / Renata Francielle Bombaldi de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Membranas. 2. Quitosana. 3. Alginatos. 4. Xantana. 5. Tecnologia de
liberação controlada. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chitosan-based membranes complexed with alginate and xanthan gum : behavior in different proportions of water and incorporation of erythromycin

Palavras-chave em inglês:

Membrane

Chitosan

Alginate

Xanthan gum

Controlled release technology

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

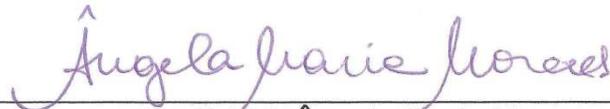
Marisa Masumi Beppu

José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 26-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Renata Francielle Bombaldi de Souza e aprovada em 26 de março de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes



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



Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva

RESUMO

A quitosana, o alginato e a xantana são polímeros naturais biodegradáveis e biocompatíveis muito utilizados na obtenção de curativos para tratamento de lesões de pele. Compostos ativos podem ser adicionados a dispositivos formados pela combinação destes biopolímeros a fim de torná-los mais efetivos para a aplicação desejada. Estes dispositivos podem ser expostos a diferentes condições de umidade durante seu processamento, armazenamento e uso. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a avaliação do comportamento de membranas constituídas de complexos de quitosana com alginato (Q-A) e com xantana (Q-X) na presença de diferentes proporções de água, e a incorporação do antibiótico eritromicina a estas membranas a fim de se obter dispositivos adequados para o tratamento de lesões de pele, infectadas ou não. Os ensaios de caracterização realizados incluíram a avaliação do aspecto visual, cor e opacidade, bem como da morfologia dos filmes, a determinação do ângulo de contato com água, a capacidade de absorção e perda de massa em etanol e em soluções aquosas, a taxa de transmissão de vapor d'água, a resistência mecânica e a espessura em diferentes condições de umidade, o espectro de absorção no infravermelho, a análise da eficiência de incorporação da eritromicina e a cinética de sua liberação. Os ensaios de incorporação foram realizados pelos métodos de adição direta à mistura polimérica (AD) e impregnação em solução etanólica contendo a droga (IE). Observou-se que os dois tipos de membranas estudados apresentam comportamentos diferentes em água, sendo que a de Q-X possui superfície menos hidrofílica, porém consiste na que absorve maior quantidade de água. As propriedades mecânicas de Q-A e Q-X só foram afetadas para condições de elevada umidade. A adição da eritromicina diminuiu a opacidade dos filmes, porém não alterou sua cor. A eficiência de incorporação da droga foi mais elevada para o método AD (máximo de 54%), porém maior quantidade do composto permaneceu retida nos filmes quando se utilizou o método IE (máximo de 2130 mg/g), para ambas as formulações. Devido ao tamanho relativamente grande da molécula de eritromicina, sua liberação das matrizes foi lenta, sendo a quantidade máxima de antibiótico liberada igual a 25 mg/g, para Q-X

por incorporação por IE. Logo, estes dispositivos podem atuar como agentes de liberação por longos períodos, exigindo assim trocas menos frequentes e resultando em tratamento menos traumático e mais confortável ao paciente.

Palavras-chave: quitosana, alginato, xantana, membranas, curativos, lesões de pele, eritromicina.

ABSTRACT

Chitosan, alginate and xanthan gum are biodegradable and biocompatible natural polymers widely used as wound dressings for the treatment of skin lesions. Active compounds can be added to devices constituted of the combination of these biopolymers to make them more effective for the intended application. These devices can be exposed to different humidity conditions during their processing, storage and use. In this context, this work aimed to evaluate the behavior of membranes made of chitosan associated with alginate (C-A) and xanthan (C-X) in the presence of different proportions of water, and the incorporation of the antibiotic erythromycin to these membranes to obtain devices suitable for the treatment of skin lesions. The membranes were characterized regarding to visual appearance, color, opacity, morphology, water contact angle, water vapor transmission rate, swelling capacity in ethanol and aqueous solutions as well as mass loss in the same media, tensile strength, strain at break and thickness in different humidity conditions, absorption spectra in the infrared region, drug incorporation efficiency and release kinetics. The incorporation of erythromycin was performed by two distinct methods: addition directly to the polymeric mixture (AD) and absorption of drug from solution (AS). The results showed that the two types of membranes exhibit different behaviors in water. The C-X films present less hydrophilic surface, but higher swelling capacity in water. The mechanical properties of C-A and C-X were only affected in high humidity conditions. The addition of erythromycin decreased the opacity of the films, but did not change their color. The drug incorporation efficiency was higher for the AD method (maximum 54%), but greater amount of the compound remained in the films when using the AS method (maximum of 2130 mg/g) for both formulations. Due to the large size of erythromycin molecule, its release from the matrices was slow. The maximum amount of antibiotic released was equal to 25 mg/g, obtained for C-X membranes wherein the antibiotic was incorporated by AS method. Therefore, these devices may act as release systems for extended periods, requiring less frequent exchange and enhancing patient comfort during the treatment.

Keywords: chitosan, alginate, xanthan gum, membranes, wound dressing, skin lesions, erythromycin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Lesões de pele	6
2.2. Curativos	9
2.3. Biomateriais e Biopolímeros	12
2.3.1. Quitosana	14
2.3.2. Hidrogéis e complexos polieletrólitos (PEC) contendo quitosana.....	20
2.3.3. Biopolímeros que formam complexos polieletrólitos com a quitosana.....	24
2.3.3.1. Alginato	24
2.3.3.2. Xantana.....	29
2.4. Incorporação de compostos biologicamente ativos em membranas	32
2.4.1. Eritromicina.....	34
2.5. Considerações finais	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Materiais.....	40
3.2. Métodos	40
3.2.1. Preparação das membranas.....	40
3.2.1.1. Membranas constituídas de quitosana e xantana.....	40
3.2.1.2. Membranas constituídas de quitosana e alginato	42
3.2.2. Incorporação de eritromicina nas membranas	43
3.2.2.1. Incorporação da eritromicina durante o preparo da membrana	43
3.2.2.2. Incorporação do composto ativo por impregnação em solução etanólica	44

3.2.3.	Caracterização das membranas	44
3.2.3.1.	Aspecto das membranas.....	45
3.2.3.2.	Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas	45
3.2.3.3.	Avaliação da cor e opacidade das membranas	45
3.2.3.4.	Ângulo de contato das membranas com água.....	46
3.2.3.5.	Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água.....	48
3.2.3.6.	Avaliação das propriedades mecânicas e espessura das membranas em diferentes umidades	49
3.2.3.7.	Capacidade de absorção e estabilidade em etanol	50
3.2.3.8.	Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas	51
3.2.3.9.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	52
3.2.3.10.	Eficiência de incorporação de eritromicina nas membranas pelo método da adição direta.....	53
3.2.3.11.	Eficiência de incorporação de eritromicina nas membranas pelo método da impregnação das amostras em solução etanólica	54
3.2.4.	Análise da cinética de liberação da eritromicina.....	55
3.2.5.	Análise estatística.....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1.	Aspecto visual, cor e opacidade das membranas	56
4.2.	Morfologia da superfície e da seção transversal	57
4.3.	Comportamento das membranas na presença de água	59
4.3.1.	Ângulo de contato com água	59
4.3.2.	Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas.....	61
4.3.3.	Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água	64
4.3.4.	Propriedades mecânicas e espessura em diferentes condições de umidade.....	66
4.4.	Caracterização de membranas contendo diferentes proporções de eritromicina	70

4.4.1.	Capacidade de absorção e perda de massa em etanol	70
4.4.2.	Eficiência de incorporação da eritromicina.....	72
4.4.3.	Aspecto visual, cor e opacidade das membranas	74
4.4.4.	Morfologia da superfície e da seção transversal	76
4.4.5.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	81
4.5.	Cinética de liberação da eritromicina.....	85
5.	CONCLUSÕES.....	96
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO I	114
ANEXO II	115
ANEXO III	116
ANEXO IV	117

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e pelas oportunidades maravilhosas que me concede.

A minha família, especialmente ao meu pai Ivonir e minha mãe Sueli, que sempre me apoiam e incentivam meu trabalho e, acima de tudo, agem com muito carinho, sempre acreditando no meu sucesso.

A minha irmã, Fernanda, que com certeza foi parte fundamental deste trabalho, por todos os momentos de união e crescimento, além de alegria e amor proporcionados.

Ao Carlos Henrique Furlan, pelo apoio e compreensão, e pelo amor e companheirismo demonstrados.

À professora Dr^a. Ângela Maria Moraes, pela oportunidade e confiança concedidas, pelos esclarecimentos e orientação dedicada e também pela amizade.

Aos amigos e colegas de laboratório, Cecília Bueno, Cecília Mourão, Gisele Atsuko, Gisele Pavan, Selma, Luízinha, Gabriela, Carla, Nemaila, Naimy, Mayra, Erik e Max, pela amizade, auxílio e pelos momentos alegres proporcionados.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Aos professores Dr^a. Marisa Masumi Beppu, Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre e Dr. André Luiz Jardim Munhoz, membros da banca de qualificação do Mestrado.

Ao professor Dr. José Alberto Fracassi da Silva, pelo uso das dependências de seu laboratório e ao seu aluno, Richard Piffer, pelo auxílio prestado durante os ensaios lá realizados.

Ao professor Dr. Theo Guenter Kieckbush, pelo uso das dependências de seu laboratório e à sua aluna, Andréa Bierhalz, pelos esclarecimentos e auxílio prestados e pela amizade.

À equipe do LRAC, em especial Adilson Brandão, Lucélia Silva e Celso Camargo, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia Química que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos os amigos que fizeram parte desta etapa da minha vida.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

NOMENCLATURA

A: alginato

ABS: absorvância

AD: adição direta do composto à mistura polimérica

A_e : área exposta do filme nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

A_i : massa de fluido absorvida pela amostra

Al: alongamento na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

A_s : área de secção transversal inicial da amostra nos ensaios de resistência mecânica

ASTM: *American National Standards Institute*

d_i : afastamento inicial das garras do equipamento nos ensaios de resistência mecânica

d_r : afastamento das garras no momento da ruptura nos ensaios de resistência mecânica

E: eritromicina

F: fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o CaCl_2 nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

FCS: fluido corpóreo simulado

FDA: *Food and Drug Administration*

F_m : força máxima de rompimento nos ensaios de resistência mecânica

FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, Fourier Transform Infrared)

G: bloco guluronato

GD: grau de desacetilação

G_m : taxa de ganho de massa do sistema nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

IE: impregnação em solução etanólica contendo o composto

M: bloco manuronato

$m_{C,i}$: massa inicial do composto adicionada à membrana

$m_{C,m}$: massa final do composto que permaneceu na membrana

MEV: microscopia eletrônica de varredura

m_{final} : massa da amostra após a exposição ao fluido e secagem

$m_{inicial}$: massa da amostra antes da exposição ao fluido

MM: massa molar

M_p : perda de massa da amostra

$m_{úmida}$: massa da amostra após a exposição ao fluido

PBS: tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PEC: complexo polieletrólito, do inglês *Polyelectrolyte Complex*

PVA: permeabilidade ao vapor d'água

Q: quitosana

Q-A: complexo polieletrólito constituído de quitosana e alginato

Q-X: complexo polieletrólito constituído de quitosana e xantana

SFB: soro fetal bovino

SS: solução salina

TR: tensão na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

TTVA: taxa de transmissão de vapor d'água

UR: umidade relativa

X: xantana

Y: opacidade

δ : espessura do filme

ΔP_{H_2O} : diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

ε : eficiência de incorporação do composto

1. INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e apresenta as importantes funções de servir de barreira de proteção contra fatores externos, tais como ataques mecânicos, químicos ou microbianos, e participar da regulação homeostática do organismo. Quando a pele é lesionada, seja por doenças crônicas ou por fatores externos, como queimaduras, sua função fica comprometida. Assim, é importante que se garanta uma cicatrização adequada da área afetada, a fim de que não haja danos à saúde do indivíduo (Penzer e Ersser, 2010; Korotkov e Garcia, 2012; Boateng *et. al.*, 2008). O tratamento de lesões é um tópico que merece grande atenção, pois um elevado número de pessoas sofre de ferimentos crônicos e estes constituem um problema de saúde pública (Ministério da Saúde do Brasil, 2002).

O uso de curativos é uma técnica antiga, utilizada para a obtenção de resultados mais rápidos e eficientes no tratamento de feridas em relação àqueles observados no processo de cicatrização natural. Nos últimos anos, tornou-se evidente a evolução desta técnica, e uma ampla gama de curativos vem sendo desenvolvida. Para que seja eficaz, o curativo deve possuir algumas características fundamentais, tais como: flexibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, além de ser capaz de permitir a troca de gases, absorver exudato do ferimento e protegê-lo contra infecções e desidratação, funcionar como uma barreira mecânica de proteção e ser de fácil remoção do ferimento (Ovington, 2007; Ehrenreich e Ruszczak, 2006; Sezer e Cevher, 2011). Dependendo da gravidade e do estágio de recuperação em que se encontra a lesão de pele, curativos com diferentes características são requeridos, uma vez que há variações na quantidade de exudato presente no local (Broussard e Powers, 2013), o que acarreta na exposição dos dispositivos a diferentes condições de umidade. É importante lembrar que, não só durante seu uso, mas também durante seu processamento e estocagem, os curativos são expostos a essas diferentes condições e é fundamental que eles sejam estáveis e atuem de forma eficiente em todas as situações.

As matrizes utilizadas para aplicações como curativos podem ser obtidas a partir de diferentes tipos de materiais de origem biológica. Por apresentarem uma vasta possibilidade de escolha quanto às suas estruturas e natureza química, além de se mostrarem biocompatíveis e biodegradáveis, participarem do processo de cicatrização da lesão e possuírem um custo acessível, os polímeros, de origem sintética ou natural, são os materiais mais empregados em aplicações desse tipo (Dias *et al.*, 2011). Dentre os polímeros de origem natural, ou biopolímeros, pode-se afirmar que os polissacarídeos são os que vêm apresentando maior aplicação na área médica e de engenharia de tecidos. Exemplos desses materiais são a quitosana, o alginato, e a xantana.

A quitosana é um biopolímero linear obtido por meio da desacetilação da quitina, um composto encontrado em crustáceos, além de outras fontes. Este polissacarídeo possui propriedades intrínsecas muito importantes, dentre as quais se destacam biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antibacteriana e antifúngica, além da capacidade de facilitar a coagulação sanguínea e a penetração de compostos pelas juntas intercelulares epiteliais. Por ser um polímero, em baixos valores de pH, este polímero é capaz de interagir com polímeros negativamente carregados, como o alginato e a xantana, formando os chamados complexos polieletrólitos (Berger *et al.*, 2004; Dash, 2011; Croisier e Jérôme, 2013). O alginato é um polissacarídeo linear aniônico natural tipicamente extraído de algas marrons, que vem sendo amplamente estudado e aplicado na área médica por apresentar baixa toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de formação de gel. Os curativos produzidos a partir de alginato têm a capacidade de promover rápida epitelização e cura da lesão, pois ajudam a manter o microambiente umedecido e minimizam infecções bacterianas (Yang *et al.*, 2011 ; Lee e Mooney, 2012). A xantana é um polissacarídeo polianiónico natural produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*, sendo que filmes de xantana são materiais bastante explorados para a liberação controlada de compostos químicos (Munday e Cox, 2000; Santos *et al.*, 2004; Coviello *et al.*, 2007).

A incorporação de compostos biologicamente ativos a curativos é uma abordagem que vem sendo cada vez mais estudada. Estes compostos possuem tanto

origem natural, como extratos ou princípios ativos de plantas, quanto sintética, como anti-inflamatórios e antibióticos, e atuam como auxiliares na cura da lesão. Os curativos passam então a funcionar como sistemas de liberação controlada, e são vantajosos em relação aos sistemas de dosagem convencionais por proporcionarem a liberação do composto bioativo a taxas predeterminadas, o que garante a presença do agente ativo na área tratada em concentrações apropriadas (Boateng *et al.*, 2008; Lima, 2012). A eritromicina é um exemplo de antibiótico que pode ser incorporado a curativos para torná-los mais ativos biologicamente.

A eritromicina é um antibiótico de espectro moderado pertencente à família dos macrolídeos, sintetizado pela bactéria *Streptomyces erythreus*. Possui caráter hidrofóbico e dentre suas principais aplicações encontra-se o tratamento de infecções de pele (Auto *et al.*, 1982; Schönfeld e Kirst, 2002). Apesar de possuir propriedade biológica adequada para o uso na terapia de lesões, este composto ainda é pouco explorado para esta aplicação.

Recentemente, pesquisadores têm voltado seus esforços para o desenvolvimento de curativos biologicamente ativos que sejam funcionais, facilmente processáveis e de baixo custo, e que cumpram o papel de atuar como um acelerador da cura da lesão, proporcionando ao paciente um tratamento mais confortável e eficaz. Tendo isso em vista, a produção de membranas compostas dos complexos poliméricos de quitosana e xantana e quitosana e alginato, e a posterior incorporação do antibiótico eritromicina a essas membranas, mostra-se uma proposta adequada e promissora no âmbito dos desenvolvimentos tecnológicos recentes nesta área.

No grupo da Professora Dr.^a Ângela Maria Moraes, existe um histórico de mais de dez anos de pesquisas acerca do uso de polissacarídeos para obtenção de dispositivos utilizados no tratamento de lesões de pele. A quitosana, a xantana e o alginato, em particular, são exemplos de polímeros amplamente investigados pelo grupo para a obtenção de curativos. Rodrigues (2008) desenvolveu uma metodologia escalonável de preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato contendo ou não bacitracina, e estudou o efeito da adição do plastificante glicerol na

preparação de tais membranas. Bueno (2010) testou diferentes estratégias de reforço das propriedades mecânicas de membranas constituídas de quitosana e alginato, dentre elas a adição de agentes reticulantes e surfatantes à matriz polimérica. Girata (2011) investigou a adição de um agente antimicrobiano à base de prata às membranas de quitosana e alginato. Pires (2013) avaliou os efeitos da correção do pH, da temperatura de secagem e das etapas de reticulação na obtenção de membranas de quitosana e alginato, contendo ou não um agente antimicrobiano à base de prata e, além disso, estudou o impacto da adição de um agente siliconado nas propriedades mecânicas dos filmes obtidos. Veiga (2009) desenvolveu uma metodologia escalonável de preparação de membranas de quitosana e xantana. Bellini (2012) avaliou o uso de dispositivos constituídos de quitosana e xantana como suportes para adesão e crescimento de células tronco mesenquimais. Por fim, Veiga (2012) estudou a incorporação e liberação de diferentes anti-inflamatórios de filmes de quitosana complexada com outros polissacarídeos, inclusive a xantana. No presente trabalho visou-se contribuir para os avanços atingidos pelo grupo nessa área, de modo a agregar informações relevantes a respeito dos dispositivos utilizados, especialmente no que se refere ao comportamento destes dispositivos em água e à introdução de um composto bioativo de massa molar relativamente elevada à matriz polimérica.

1.1. Objetivos

Neste trabalho foi enfocada a obtenção e a análise do comportamento de membranas polissacarídicas, contendo ou não um antibiótico, com potencial para utilização na terapia de lesões de pele. Para isso, teve-se como objetivo a produção e caracterização de filmes poliméricos constituídos de complexos de quitosana com alginato ou xantana e a incorporação do antibiótico eritromicina às membranas obtidas. Os objetivos específicos são listados a seguir:

- a) Avaliação do comportamento de membranas constituídas de complexos de quitosana e alginato e quitosana e xantana na presença de diferentes proporções de água por meio de caracterizações físico-químicas e mecânicas;
- b) Incorporação do antibiótico eritromicina em diferentes proporções às membranas obtidas, por meio dos métodos de adição direta ao complexo polimérico durante o preparo das membranas e por impregnação das amostras em solução etanólica contendo o agente ativo;
- c) Detecção e quantificação da eritromicina incorporada às matrizes poliméricas;
- d) Avaliação das membranas contendo ou não o composto ativo quanto às suas características físicas;
- e) Estudo da cinética de liberação da eritromicina das formulações de membrana que foram capazes de incorporar o antibiótico em quantidade significativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lesões de pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, representando 16% de seu peso e cobrindo uma área de aproximadamente 2 m². Sua espessura pode variar de 1 a 2 mm, dependendo da região do corpo em que se encontra. Este órgão possui como principal função servir de barreira protetora contra o ambiente externo, tanto em relação a aspectos físicos e químicos, quanto imunológicos. Além disso, outras de suas importantes funções incluem a homeostase e termorregulação do organismo, armazenamento de energia e sensibilidade a estímulos. Por desempenhar tão importante papel no corpo humano, pode-se afirmar que quando a pele é lesionada, dependendo da extensão e da profundidade da lesão, o indivíduo corre o risco de ficar debilitado fisicamente ou até mesmo morrer.

A pele possui estrutura complexa e é dividida em duas principais camadas: a epiderme e a derme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa, que está em contato com o ambiente, sendo a maior responsável pela proteção mecânica e contra infecções. Ela é bem mais fina que a derme, representando apenas 10% da espessura total da pele. A epiderme é composta majoritariamente de células chamadas queratinócitos, responsáveis pela constante renovação superficial do órgão. Outros tipos de células que a constitui são os melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, responsáveis pela pigmentação, reconhecimento de antígenos e recepção sensorial, respectivamente. Já a derme serve como um sistema de suporte para a epiderme, funcionando como fornecedora de oxigênio e nutrientes, e removendo resíduos da mesma. É composta de colágeno e elastina, que conferem resistência e elasticidade à pele. Abaixo das camadas anteriormente mencionadas, existe ainda a chamada hipoderme, ou tecido subcutâneo, composta principalmente por tecido

adiposo. Esta camada tem como função o armazenamento de energia, isolamento térmico e amortecimento de impactos (Penzer e Ersser, 2010; Korotkov e Garcia, 2012).

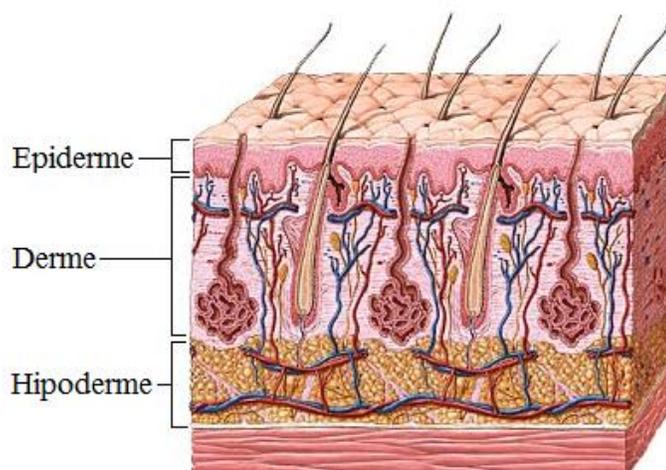


Figura 1: Representação das camadas da pele (adaptada de RUMC, 2013).

As lesões de pele, ou feridas, podem ser definidas como uma interrupção da estrutura e da função normais da pele, e são geralmente consequências de danos físicos, térmicos ou da presença de determinada condição médica. Levando em conta o tempo de reparação do tecido de determinada ferida, ela pode ser classificada como aguda ou crônica. A primeira é geralmente causada por traumas ou cirurgias e a reparação do tecido ocorre em um intervalo de tempo relativamente pequeno, sem complicações. Já as feridas crônicas levam mais tempo para serem curadas, o que se deve a complicações durante o tratamento, que podem ser atribuídas a repetidas agressões ao local ou mesmo a determinada condição fisiológica do indivíduo (diabetes, úlcera ou infecções). Além disso, as feridas podem ser classificadas quanto ao número de camadas ou área de pele afetada. Uma lesão superficial afeta apenas a epiderme, enquanto uma lesão parcialmente profunda pode afetar desde a epiderme até a hipoderme, incluindo vasos sanguíneos e glândulas ali presentes. Lesões

profundas são aquelas que além das três camadas da pele, atingem tecidos presentes sob essa região (Boateng *et. al.*, 2008).

A reparação do tecido lesado ocorre de maneira complexa, por meio do processo de cicatrização. Esta se dá de acordo com uma sobreposição de estágios, nos quais vários componentes celulares são liberados e interagem entre si para reestabelecer a integridade do tecido danificado.

A cicatrização é composta dos seguintes estágios: hemostasia e inflamação, proliferação, maturação e remodelagem. A hemostasia se dá logo após a ocorrência da lesão, consistindo na coagulação do sangue e ativação da resposta imune local. Logo após ou simultaneamente à hemostasia ocorre a inflamação, que consiste na remoção de corpos estranhos do tecido afetado, liberação de citocinas e de fatores de crescimento no local. Na fase de proliferação ocorre a reconstrução vascular, a formação do tecido de granulação, a produção de colágeno e a migração de células epiteliais da borda para o centro da ferida. Já os estágios de maturação e remodelagem são caracterizados pela reconstrução das células da epiderme, reorganização das fibras de colágeno, aumento da resistência do tecido formado e redução da cicatriz resultante (Goldberg e Diegelmann, 2010; Boateng *et. al.*, 2008).

O tratamento de lesões de pele é um tópico que merece muita atenção, pois a quantidade de indivíduos afetados é considerável. Só no Brasil ocorrem em média um milhão de queimaduras por ano. As queimaduras estão entre as principais causas externas de mortalidade no país (Vale, 2005; Mascarenhas *et. al.*, 2011). Além disso, embora os registros de atendimento sejam pequenos, um elevado número de pessoas sofre de ferimentos crônicos e estes constituem um problema de saúde pública, contribuindo para onerar o gasto público no país (Ministério da Saúde do Brasil, 2002). Portanto, pode-se notar que atualmente é de extrema importância o desenvolvimento e aprimoramento dos curativos disponíveis no mercado, capazes de se adequar a tipos específicos de lesões, tornando-os ainda mais acessíveis e eficazes para os pacientes.

2.2. Curativos

O uso de curativos é uma técnica antiga, utilizada para a obtenção de resultados mais rápidos e eficientes no tratamento de feridas. Os registros mais antigos sobre o tratamento de ferimentos pertencem aos egípcios, que descreveram como se realizava a limpeza do local afetado e como eram preparados os curativos feitos a partir de materiais de origem biológica, como gordura animal ou fibras de plantas, para seu posterior uso no recobrimento da ferida. Desde então, os materiais utilizados para a produção de curativos evoluíram lentamente, de materiais brutos encontrados na natureza até aqueles especialmente desenvolvidos para proporcionar um bom ambiente para a recuperação de uma lesão. A partir do século XIX, por exemplo, surgiu o conceito de que manter o ambiente do ferimento úmido torna a cicatrização mais rápida e eficiente. De fato, a manutenção de um microambiente umedecido pode levar à minimização da ocorrência de infecções bacterianas, uma vez que este ambiente é rico em leucócitos, bem como enzimas, citocinas e fatores de crescimento. Além disso, há uma redução do pH, que afeta de maneira adversa a proliferação bacteriana. Outra vantagem relacionada a esta condição é a aceleração dos estágios de inflamação e proliferação presentes na cicatrização, sendo possível atingir mais rapidamente a fase de remodelagem (Stashak et al., 2004). Dispositivos mais modernos podem apresentar compostos bioativos incorporados, como fármacos sintéticos ou naturais, cuja função é atuar como auxiliar no processo de cura. De fato, nos últimos anos, tornou-se evidente a evolução desta técnica, e uma ampla gama de curativos vem sendo desenvolvida (Ovington, 2007; Sezer e Cevher, 2011).

Para que seja adequado ao uso e apresente a eficácia desejada, os curativos utilizados no tratamento de ferimentos devem apresentar algumas características importantes, tais como: (i) flexibilidade, para que possa se adequar à superfície da pele do paciente; (ii) resistência; (iii) biodegradabilidade; (iv) bioadesividade na superfície da ferida, no caso de curativos permanentes; (v) não-toxicidade e não-antigenicidade; (vi) compatibilidade com agentes terapêuticos tópicos; além de ser capaz de (vii) permitir a

troca de gases; (viii) absorver exudatos do ferimento e (ix) protegê-lo contra infecções, proliferação de bactérias e desidratação; (x) funcionar como uma barreira mecânica de proteção; (xi) apresentar aparência translúcida, para que a observação do ferimento durante o tratamento seja facilitada; (xii) ser de fácil remoção, no caso de curativos temporários; (xiii) fácil esterilização; (xiv) fácil estocagem, e ainda (xv) ser confortável para o paciente e (xvi) apresentar baixo custo (Ehrenreich e Ruszczak, 2006; Sezer e Cevher, 2011, Broussard e Powers, 2013).

O principal objetivo da utilização de um curativo é proporcionar um ambiente adequado na superfície da ferida, de modo que a cicatrização possa ocorrer de forma rápida e sem complicações. Tendo isso em vista, os esforços voltados para esta área são cada vez maiores, a fim de que se possa desenvolver curativos que atendam satisfatoriamente os requisitos anteriormente mencionados.

Os curativos podem ser classificados de várias maneiras, sendo estas dependentes de diferentes fatores, como por exemplo: função desempenhada pelo curativo na lesão (debridamento, ação bactericida ou anti-inflamatória, absorção ou aderência); tipo de material empregado em sua produção (hidrocolóides, colágeno, alginato e outros biopolímeros) e forma física (filme, esponja, gel, pomada). Estes dispositivos podem ainda ser classificados como primários (possuem contato físico direto com a ferida), secundários (utilizados para cobrir os curativos primários) e do tipo ilha (possuem uma região central absorvente cercada por uma faixa larga de revestimento adesivo) (Boateng *et. al.*, 2008).

Segundo Sezer e Cevher (2011), os curativos podem ainda ser divididos em tradicionais, biológicos e artificiais. Os dispositivos tradicionais mais comuns são a gazes e outros tipos de bandagem de algodão. Apresentam alta capacidade de absorção e têm a tendência de se aderir facilmente à lesão, causando desconforto ao paciente durante sua retirada. As fibras remanescentes podem ocasionar infecções no local. A grande vantagem de seu uso é o baixo custo. Os curativos biológicos são aqueles provenientes de fragmentos de pele humana ou mesmo animal, como pele de porco. A fácil preparação, o conteúdo de colágeno e a boa adesão desses dispositivos

no local lesionado são as maiores vantagens que eles apresentam. Porém, estes materiais são antigênicos, apresentando alto risco de infecção e, além disso, podem apresentar custo elevado.

O uso de curativos tradicionais e biológicos possui limitações devido a problemas de estabilidade e riscos de contaminação que estes dispositivos apresentam. Portanto, há necessidade do desenvolvimento de curativos alternativos, os chamados curativos artificiais, que são preferíveis em relação aos demais por apresentarem características que atendem as necessidades específicas do tratamento de feridas. Existem vários tipos de curativos artificiais, como os provenientes de polímeros sintéticos (silicone, poliuretano e derivados, teflon, etc.) ou naturais (alginato, colágeno, quitosana, etc.). Os de alginato, por exemplo, estão dentre os mais usados no tratamento de feridas e são vantajosos, pois, por apresentarem alta absorção e serem hidrofílicos, formam um gel quando em contato com o exsudato proveniente do ferimento e, além disso, são capazes de minimizar a contaminação por bactérias (Ehrenreich e Ruszczak, 2006; Sezer e Cevher, 2011).

Os curativos podem se apresentar de diferentes formas, dentre elas filmes poliméricos, hidrocolóides, hidrogéis, espumas poliméricas e compósitos, e uma grande variedade se encontra comercialmente disponível (vide Anexo I). Os filmes, ou membranas, são compostos de uma rede polimérica homogênea e são eficientes para proteger o ferimento contra fatores externos. Suas características dependem do polímero do qual tem origem, mas em geral são translúcidos, flexíveis, hipoalergênicos e permitem uma troca de gases eficiente. Os hidrocolóides estão entre os tipos mais utilizados de curativos. São obtidos a partir de materiais coloidais (agentes formadores de gel, como pectina, carboximetilcelulose e gelatina) combinados com outros materiais, como elastômeros ou adesivos. Após absorver o exsudato proveniente da ferida, estes dispositivos sofrem uma mudança em seu estado físico, adquirem a forma de gel e passam a permitir a troca de gases no local. Os hidrogéis são sistemas semi-sólidos, compostos de um ou mais polímeros hidrofílicos. São de fácil aplicação e remoção, possuem ótima bioadesão e sua estrutura permite eficiente penetração de

oxigênio e facilita a permeabilidade ao vapor d'água. Já as espumas poliméricas são constituídas de poliuretano. Como têm estrutura porosa, possuem alta capacidade de absorção. As espumas são também de fácil aplicação, permitem boa troca gasosa no ferimento e podem servir também como isolantes térmicos, mas não são transparentes. Por fim, os compósitos podem ser descritos como combinações de diferentes tipos de curativos. A camada mais externa deve ser resistente e promover um ambiente úmido no local, enquanto a camada interna deve garantir a adesão do dispositivo à ferida (Mulder *et. al.*, 2002; Boateng *et. al.*, 2008).

Atualmente, a utilização de materiais de origem biológica para a obtenção de dispositivos médicos tem se mostrado crescente. Os biopolímeros, por apresentarem uma vasta possibilidade de escolha quanto às suas estruturas e natureza química, além de se mostrarem biocompatíveis e biodegradáveis e promoverem uma cicatrização eficaz da lesão, estão dentre os compostos mais empregados na produção de biomateriais para aplicações nas áreas da medicina e engenharia de tecidos, o que inclui a produção de curativos.

2.3. Biomateriais e Biopolímeros

Há mais de dois mil anos atrás, os romanos, chineses e astecas já utilizavam biomateriais no tratamento de lesões de tecidos. Exemplo disso são os olhos de vidro utilizados por alguns indivíduos, além de dentes de ouro ou madeira. Devido ao pouco entendimento sobre biocompatibilidade, os materiais utilizados antes dos anos 1960 não obtiveram sucesso. Após a Segunda Guerra Mundial, os novos materiais que haviam sido desenvolvidos exclusivamente para fins militares foram disponibilizados para uso clínico. No entanto, muitos desses materiais, como por exemplo, metais inertes, cerâmicas e polímeros (como o poli(metil-metacrilato), PMMA), ainda não apresentavam características desejáveis quanto à biocompatibilidade. Foi somente a partir dos anos 1960 que esforços foram voltados para este propósito e uma nova área

de pesquisa foi criada. A ciência dos biomateriais, como é conhecida hoje, foi consolidada no início dos anos 1970, através de um congresso sobre biomateriais na Universidade de Clemson (EUA) e da formação da “Society for Biomaterials” (Ratner *et al.*, 2013; Leeuwenburgh *et al.*, 2008). Atualmente, o foco do desenvolvimento de novos biomateriais tem se voltado para a mimetização de funções das matrizes extracelulares dos tecidos e para o uso conjunto de agentes terapêuticos, a fim de melhorar a resposta do organismo a esse tipo de abordagem clínica (Lee e Mooney, 2012).

A definição de biomateriais foi estabelecida pela Sociedade Europeia de Biomateriais, numa Conferência de Consenso, em 1992:

“Um material desenvolvido para interagir com sistemas biológicos a fim de avaliar, tratar, ampliar ou substituir um tecido, órgão ou uma função do corpo”.

Ou ainda, segundo Williams (1987, *apud* Dalapicula *et al.*, 2006):

“Uma substância, ou combinação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou integralmente tecidos e órgãos”.

Atualmente, a revista *Biomaterials* apresenta a seguinte definição:

“Um biomaterial é definido como uma substância que foi desenvolvida com o intuito de, por si só ou como parte de um sistema complexo, ser usada para conduzir, pelo controle de interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer processo terapêutico ou diagnóstico” (Biomaterials, 2013).

As características mais importantes a serem apresentadas por biomateriais são biocompatibilidade e biofuncionalidade. Biocompatibilidade pode ser definida como “um estado de mútua existência entre um material e o ambiente fisiológico, sem que um exerça efeito desfavorável sobre o outro”. Já a biofuncionalidade diz respeito às propriedades físicas e mecânicas que permitem que o material tenha capacidade de apresentar resposta apropriada à aplicação desejada (Dalapicula *et al.*, 2006). Além disso, outras propriedades a serem consideradas levam em conta as propriedades

físicas do material (resistência, elasticidade e durabilidade), facilidade de esterilização e manufatura.

Existem diferentes classes de constituintes de biomateriais, sendo elas: metais (aço inoxidável, ligas de titânio e cobalto); cerâmicas (óxido de alumínio, zircônia); e polímeros. Estes últimos podem ser sintéticos (silicone, polietileno, poliuretano, policaprolactona, ácido polilático), ou naturais (polissacarídeos, gelatina, fibroína da seda, colágeno) (Ratner *et al.*, 2013).

O uso de polímeros naturais na área de engenharia de tecidos é considerado atrativo, pois estes materiais e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não-tóxicos, o que os torna seguros para esta aplicação. Além disso, apresentam custo acessível, podem ser sujeitos a diferentes modificações químicas e são obtidos de fontes renováveis (Dias *et al.*, 2011). Atualmente, avanços na área da biotecnologia permitem a obtenção de polímeros naturais através de fermentação realizada por microrganismos ou por meio de processos enzimáticos *in-vitro*. No entanto, a grande maioria ainda é obtida via extração de fontes animais, vegetais ou até mesmo de algas (Mano *et al.*, 2007).

Dentre os polímeros naturais, pode-se afirmar que os polissacarídeos são os mais utilizados para a produção de curativos. Exemplos desse tipo de material são a quitosana, o alginato, e a xantana.

2.3.1. Quitosana

A quitosana é um biopolímero, polissacarídeo linear e semicristalino, de caráter básico, composto de unidades de N-acetil glicosamina (β -(1-4)2-acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose), ligadas por ligações glicosídicas do tipo β 1-4. Este biopolímero não é encontrado diretamente na natureza em grande quantidade (apenas em certos tipos de fungo, *Mucoraceae*), porém pode ser facilmente obtido por desacetilação alcalina de um polímero natural denominado quitina (Dash,

2011; Croisier e Jérôme, 2013). As estruturas da quitina e da quitosana estão representadas na Figura 2.

A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose (Dash, 2011). É encontrada no exoesqueleto de crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo), insetos e na parede celular de alguns fungos, e por isso é considerada uma fonte barata e com grande disponibilidade. A fonte animal apresenta características sazonais e, portanto dá origem a produtos finais com propriedades físico-químicas altamente variáveis. Já os fungos podem ter sua produção controlada, o que garante uma maior reprodutibilidade da quitosana resultante e, além disso, o produto é considerado menos alergênico (Kumar, 2000; Dash, 2011; Croisier e Jérôme, 2013).

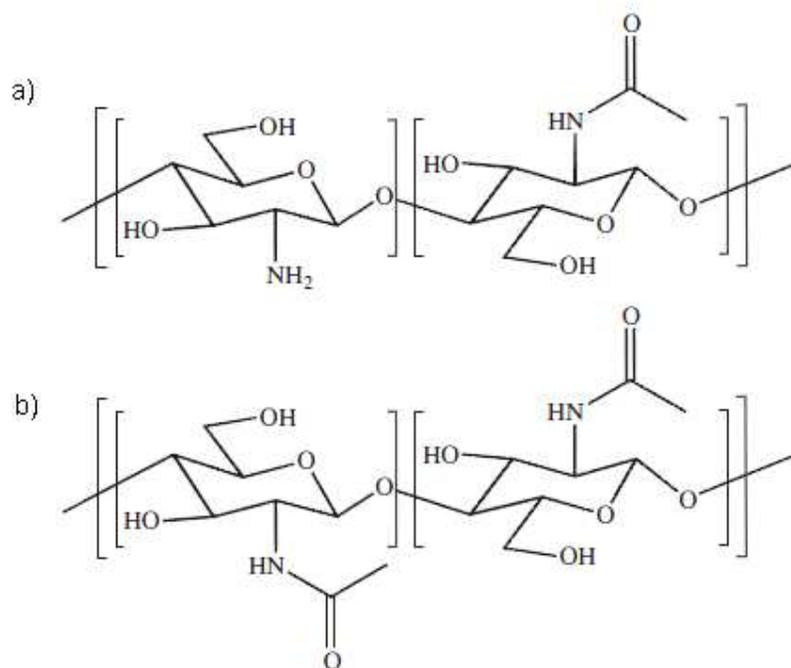


Figura 2: Representação das estruturas da (a) quitosana e (b) quitina (Croisier e Jérôme, 2013).

A obtenção da quitosana é realizada por desacetilação termoquímica da quitina em presença de álcali, ou por sua hidrólise enzimática. Há uma dificuldade no processo

no sentido de controlar as características desse biopolímero durante sua obtenção. Por isso, uma abordagem prática utilizada é determinar a composição do produto final, ao invés de se controlar os parâmetros de processo durante a produção para se obter uma característica pré-estabelecida. A caracterização da quitosana, no entanto, é considerada relativamente difícil, pois, por ser derivada de um polímero de origem natural, este polissacarídeo apresenta muitas impurezas, tanto orgânicas como inorgânicas (Croisier e Jérôme, 2013). Em geral, como propriedade final, este polímero apresenta uma estrutura cristalina rígida, o que se deve a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares nela presentes. Muitos métodos de desacetilação já foram propostos, e as condições utilizadas afetam diretamente a massa molar e o grau de desacetilação do produto final (Dash, 2011). O grau de desacetilação corresponde à quantidade de grupos amino ao longo da cadeia e é determinado pela razão entre os grupos D-glicosamina e a soma de N-acetil glicosamina e D-glicosamina. Dependendo de sua origem, a quitosana pode apresentar diferentes graus de desacetilação e massas molares. Ela deve conter no mínimo 60% de desacetilação, sendo tipicamente usados os biopolímeros que contêm desacetilação na faixa de 70% a 95%. A massa molar desses polissacarídeos geralmente varia de 10 a 1000 kDa (Berger *et al.*, 2004; Hamman, 2010; Croisier e Jérôme, 2013).

Conforme ilustrado na Figura 2, a presença dos grupos amina na estrutura da quitosana a diferencia da quitina e fornece propriedades interessantes. Tais propriedades são muito dependentes da quantidade presente de grupos amina, ou seja, do grau de desacetilação (Dash, 2011). Quitosanas com elevado grau de desacetilação apresentam cadeias alongadas com conformação mais flexível, já que podem apresentar maior densidade de cargas em sua estrutura. Opostamente, aquelas com menor quantidade de grupamentos amina podem apresentar menor carga em seu interior, e por isso apresentam cadeias mais enoveladas e menos flexíveis (Illum, 1998).

A quitosana é solúvel em soluções ácidas, com pH inferior a 6,3, o que se deve à protonação dos grupos amina presentes ao longo de sua estrutura, que possuem pKa igual a 6,3. Portanto, em baixos valores de pH, a quitosana é um polieletrólito catiônico,

e conforme o pH aumenta a partir de 6,3, o polímero é desprotonado e se torna insolúvel (Figura 3). Essa transição de solúvel para insolúvel se dá entre os valores de pH 6 e 6,5, dependendo do grau de desacetilação do composto (Dash, 2011; Croisier e Jérôme, 2013). A solubilidade também é influenciada pela adição de sal. Quanto maior a força iônica do meio, menor é a solubilidade apresentada (Illum, 1998).

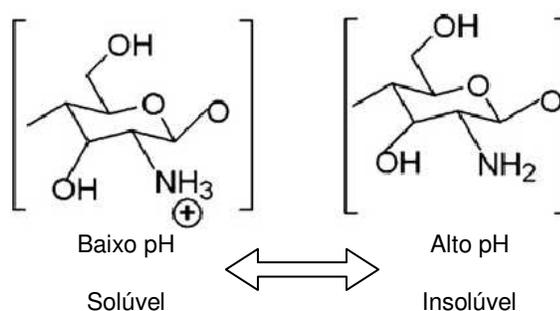


Figura 3: Representação da influência do pH na estrutura da quitosana. Para pH menor que cerca de 6,3 os grupos amina se protonam e a quitosana é solúvel. Para pH maior que aproximadamente 6,3, os grupos se desprotonam, tornando o polímero insolúvel (adaptado de Dash, 2011).

Como mencionado anteriormente, o biopolímero em questão possui propriedades altamente dependentes de seu grau de desacetilação. Pode-se dizer que sua massa molar também é um fator importante na determinação de suas características. A viscosidade da quitosana, por exemplo, aumenta com a elevação do grau de desacetilação e com a concentração de polímero presente na solução, e diminui com o aumento da temperatura. O grau de desacetilação influencia a viscosidade da quitosana, pois altera as forças inter e intramoleculares de repulsão (Dash, 2011 e Illum, 1998). A Tabela 1 mostra a relação do grau de desacetilação e da massa molar com algumas propriedades da quitosana.

Por apresentar estes grupos positivamente carregados, a quitosana é capaz de se complexar com diversas outras espécies, como íons metálicos, proteínas e

polímeros aniônicos, o que faz com que ela possua aplicações em áreas como tratamento de água, purificação, recuperação de metais pesados, além de várias outras na área médica, como será mencionado posteriormente. Além disso, os grupos amina e os grupos álcool presentes ao longo de sua estrutura permitem também a formação de ligações covalentes estáveis ou ligações de hidrogênio com outros compostos (Kumar, 2000; Croisier e Jérôme, 2013).

Tabela 1: Relação entre propriedades e características estruturais da quitosana (adaptado de Dash, 2011).

Propriedade	Características estruturais
Solubilidade	↑ GD
Cristalinidade	↓ GD
Biodegradabilidade	↓ GD, ↓ MM
Viscosidade	↑ GD
Biocompatibilidade	↑ GD
Bioadesividade	↑ GD, ↑ MM
Analgésica	↑ GD
Antimicrobiana	↑ GD, ↑ MM
Aumento da permeação de compostos ativos	↑ GD
Antioxidante	↑ GD, ↓ MM
Hemostática	↑ GD

↑ = Diretamente proporcional à propriedade

↓ = Inversamente proporcional à propriedade

GD = Grau de desacetilação

MM = Massa molar

A quitosana possui propriedades intrínsecas muito importantes, tais como: (i) atividade antibacteriana e antifúngica; (ii) mucoadesividade, devido à carga positiva característica, possibilitando sua interação com resíduos negativamente carregados de glicoproteínas que formam o muco; (iii) efeito analgésico; (iv) biodegradabilidade (pode ser biodegradada enzimaticamente em resíduos não-tóxicos, isto é, oligossacarídeos,

que são incorporados à rota metabólica do organismo e posteriormente excretados); (v) biocompatibilidade; (vi) baixa imunogenicidade; (vii) facilita a penetração de compostos bioativos pois abre as junções intercelulares epiteliais, (viii) facilita a coagulação sanguínea. Por ser não-tóxica, países como Japão, Itália e Finlândia aprovaram a quitosana para fins alimentícios e a FDA (Food and Drug Administration, EUA) a aprovou também para fins terapêuticos (Dash, 2011; Berger *et al.*, 2004; Croisier e Jérôme, 2013).

Por ser solúvel em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, formando uma solução viscosa, a quitosana é capaz de formar fibras, filmes e revestimentos. Este polissacarídeo possui boa miscibilidade com outros polímeros, formando complexos e quelatos e, além disso, a presença de grupos ativos em sua estrutura permite sua modificação química (Niekraszewicz, 2005).

Considerando todas as propriedades acima mencionadas, pode-se afirmar que a quitosana é um polímero adequado para inúmeras aplicações nas áreas médica e farmacêutica, além da engenharia de tecidos. Dentre elas se encontram lentes de contato, implantes ósseos, cápsulas, sistemas de liberação controlada de fármacos, curativos (Khor e Lim, 2003; Niekraszewicz, 2005; Berger *et al.*, 2004).

Como curativo para terapia de lesões, a quitosana é amplamente utilizada. Ela atua no ferimento acelerando a reparação do tecido, estimulando a proliferação e organização celular. Além disso, em baixo pH, facilita a coagulação do sangue e bloqueia as terminações nervosas, reduzindo a dor. Quando em contato com a lesão, adere fibroblastos, favorecendo a proliferação de queratinócitos e ordenando a deposição de colágeno, acelerando a regeneração epidérmica e reduzindo cicatrizes (Paul e Sharma, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011; Dash, 2011)

Em aplicações médicas e farmacêuticas, a quitosana é utilizada sobretudo na forma de hidrogéis (Berger *et al.*, 2004). Por ser um polícatión, este polímero é capaz de interagir com polímeros negativamente carregados, formando os chamados complexos polieletrólitos (PEC), que serão abordados no item seguinte.

2.3.2. Hidrogéis e complexos polieletrólitos (PEC) contendo quitosana

Os hidrogéis são compostos por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que possuem elevada capacidade de absorção. Estes materiais podem apresentar diversas composições químicas e conseqüentemente diferentes propriedades físicas, o que os permite ter uma vasta aplicação na área médica. Na engenharia de tecidos, os hidrogéis se destacam na aplicação como curativos para terapia de lesões, já que promovem um ambiente úmido no local do ferimento, são permeáveis a metabólitos, não aderem e não reagem com tecidos biológicos, não causam irritação no local e portanto possuem boa aceitação dos pacientes. Em geral apresentam limitada resistência mecânica, o que pode ser superado pela reticulação de suas cadeias, promovendo reforço na estrutura (Lee *et al.*, 1999; Hoffman, 2002; Boateng *et al.*, 2008; Hoare e Kohane, 2008).

Os hidrogéis são geralmente divididos em três classes, dependendo da natureza de sua rede polimérica, sendo elas: redes entrelaçadas; redes covalentemente ligadas e redes formadas por interações físicas, que incluem os casos intermediários entre as classes anteriores. Porém, os hidrogéis de quitosana são classificados de maneira ligeiramente diferente. Estes são divididos entre químicos e físicos. À primeira categoria pertencem os hidrogéis que possuem ligações covalentes irreversíveis, enquanto à segunda pertencem aqueles formados por interações reversíveis, como por exemplo as interações iônicas. Estas interações podem se dar entre a quitosana e íons pequenos ou entre a quitosana e polímeros de elevada massa molar. Neste último caso, têm-se os chamados complexos polieletrólitos (PEC) (Berger *et al.*, 2004).

Complexos polieletrólitos são formados a partir da interação de dois polieletrólitos de cargas opostas em solução aquosa (Figura 4). A rede formada é caracterizada por um ambiente hidrofílico com elevada quantidade de água e alta densidade de cargas elétricas. Os principais tipos de interações existentes nos complexos obtidos são as interações eletrostáticas, como as que ocorrem, por exemplo, entre os grupos amino da quitosana e grupos aniônicos de outro polieletrólito. Outros

tipos de interações podem também estar envolvidas, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de van der Waals (Lee *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2004).

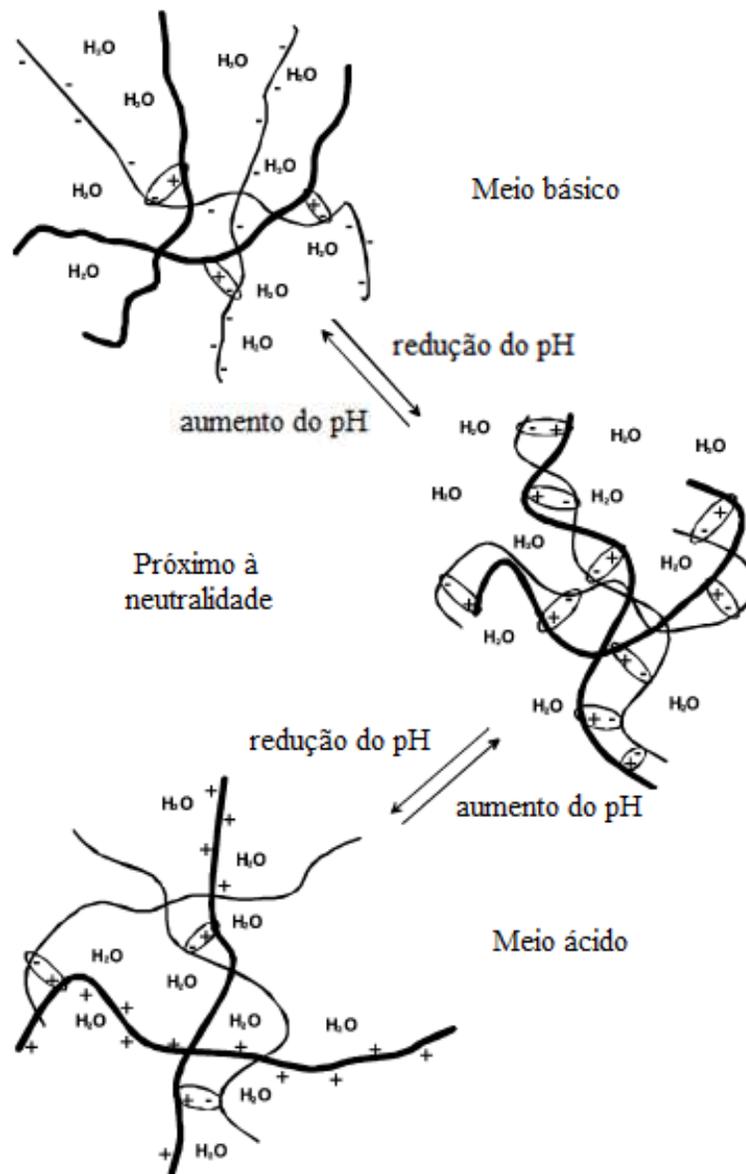


Figura 4: Efeito do pH no complexo de polieletrólitos formado por quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas (-) do alginato, representado pelas linhas mais finas, e as cargas positivas (+) da quitosana, representada pelas linhas mais espessas (adaptado de Lee e Mooney, 2012).

Para a obtenção dos complexos polieletrólitos, ambos os polímeros envolvidos devem estar ionizados, apresentando carga oposta. Isto significa que a reação deve ocorrer em condições apropriadas de pH, próximas do intervalo de pKa dos dois polímeros. Dependendo da interação iônica envolvida, podem ser formados coacervados e hidrogéis mais ou menos compactos. Se a interação iônica for muito forte, pode ocorrer precipitação e não há formação do hidrogel. Uma maneira de evitar que isso ocorra é adicionar sal, como NaCl, ao meio, o que enfraquece as interações iônicas entre os polieletrólitos. A estrutura formada pode ser reforçada por ligações cruzadas covalentes ou iônicas, como por exemplo é feito no caso de PECs de alginato e quitosana, nos quais é feita a adição de íons Ca^{+2} , conforme será discutido mais adiante, no item 2.3.3.1. A preparação dos PECs não exige a adição de agentes reativos ou catalíticos, o que os torna mais biocompatíveis e livres de qualquer processo de purificação antes da aplicação desejada.

A formação destes complexos pode alterar algumas propriedades dos polímeros utilizados, como solubilidade, reologia, condutividade, turbidez da solução, permeabilidade, além de propriedades mecânicas (Lee *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2004).

As propriedades e estabilidade dos PECs formados podem ser manipuladas controlando-se a reação de complexação. O fator principal, neste caso, é o controle do pH, porém outros fatores como temperatura, força iônica, concentrações mássicas, massa molar e flexibilidade das cadeias dos polímeros, além da relação mássicas entre os polímeros e ordem de mistura dos mesmos também são importantes (Berger *et al.*, 2004; Hamman, 2010).

As principais propriedades dos complexos polieletrólitos contendo quitosana são listadas a seguir: (i) sua capacidade de absorção é sensível ao pH e à presença de íons; (ii) dependendo do poliânion utilizado, há um aumento da resistência estrutural e da estabilidade mecânica; (iii) apresentam alta capacidade de absorção, mantendo a estabilidade estrutural; (iv) possuem elevada quantidade de água associada e densidade de cargas em sua estrutura; (v) são biocompatíveis e (vi) dependendo do outro composto formador do complexo, podem ser considerados biodegradáveis.

Portanto, estes PECs encontram vasta aplicação em diversas áreas, tais como sistemas de liberação controlada, cultivo celular, imobilização enzimática, medicina regenerativa e terapia de lesões (Berger *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009). Atualmente existe uma ampla variedade de biopolímeros adequados para a complexação com a quitosana para a formação de PECs (Tabela 2).

Tabela 2: Poliânions que formam PEC com a quitosana (adaptado de Berger *et al.*, 2004).

Classe química	Polieletrólito	Grupo	Tipo de complexo
Polissacarídeos	Alginato	– COO ⁻	Hidrogel, micropartículas com Ca ⁺²
	Carragena	– SO ₃ ⁻	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Carboximetil celulose	– COO ⁻	Precipitado, hidrogel com Al ⁺³
	Sulfato de dextrana	– SO ₃ ⁻	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Heparina	– SO ₃ ⁻	Precipitado
	Ácido hialurônico	– COO ⁻	Precipitado
	Pectina	– COO ⁻	Hidrogel, micropartículas com Ca ⁺²
	Xantana	– COO ⁻	Hidrogel
Proteínas	Colágeno	– COO ⁻	Precipitado, filmes
Polímeros sintéticos	Ácido poli-acrílico	– COO ⁻	Precipitado
	Polifosfato	– OPO ₃ ⁻	Micropartículas
	Poli (L-lactato)	– COO ⁻	Matrizes porosas

Dentre os biopolímeros utilizados, destacam-se os polissacarídeos xantana, alginato e pectina. Estes complexos estão sendo muito estudados para a preparação de membranas para fins terapêuticos (Silva *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Bueno e Moraes, 2011; Veiga e Moraes, 2011; Veiga, 2012; Bellini *et al.*, 2012; Pires, 2013), sendo que o alginato e a xantana serão mais detalhadamente discutidos a seguir.

2.3.3. Biopolímeros que formam complexos polieletrólitos com a quitosana

2.3.3.1. Alginato

O alginato é um biopolímero natural tipicamente extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. As algas são submetidas a tratamento alcalino, geralmente com NaOH, e em seguida adiciona-se cloreto de sódio ou cálcio ao extrato, de forma a se obter um sal de alginato precipitado. Este pode ser transformado em ácido algínico pelo tratamento com HCl diluído. Após a purificação, obtém-se o produto final na forma de pó. Alternativamente, o alginato pode ser obtido por síntese bacteriana (*Azotobacter* e *Pseudomonas*), obtendo-se assim um produto cuja estrutura química e propriedades físicas apresentam menor variabilidade (Lee e Mooney, 2012).

O alginato é um polissacarídeo linear aniônico que vem sendo amplamente estudado e aplicado na área médica por apresentar baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de formação de gel. Sua estrutura é composta de dois tipos de subunidades repetitivas denominadas (1,4)- β -D-manuronato (bloco M) e (1,4)- α -L-guluronato (bloco G), conforme ilustrado na Figura 5. Dependendo da fonte de obtenção utilizada, o biopolímero pode apresentar diferentes quantidades de blocos M e G, bem como diferentes comprimentos de cadeia referentes a cada bloco. Os blocos G formam ligações cruzadas com íons bivalentes (como Ca^{+2}) para a formação de hidrogéis. Portanto, a razão entre blocos M e G e a massa molar do polímero afetam as propriedades físicas do hidrogel obtido. Quanto maior o número de blocos G, maior a capacidade de formação de ligações cruzadas e, portanto, melhores são as propriedades mecânicas do gel (Yang *et al.*, 2011; Lee e Mooney, 2012).

A massa molar dos alginatos comercialmente disponíveis varia de 32 a 400 kDa. A viscosidade de soluções destes polímeros aumenta com a redução do pH,

apresentando maior valor para pH entre 3 e 3,5. O alginato é quimicamente estável em condições de pH entre 5 e 10. Os resíduos M e G apresentam pKa iguais a 3,38 e 3,65, respectivamente (Meng et al., 2010; Lee e Mooney, 2012).

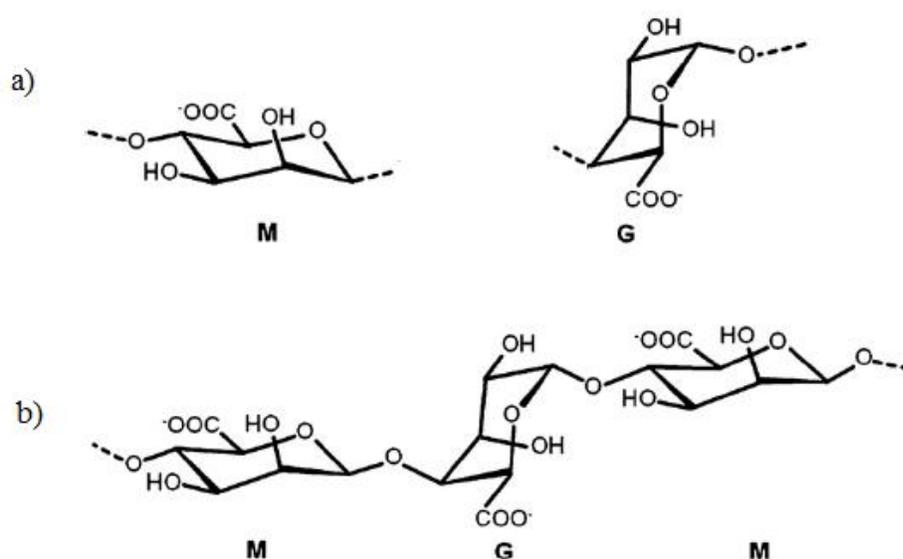


Figura 5: Estrutura do alginato: a) Representação dos blocos M e G que constituem o biopolímero. b) Conformação da cadeia de alginato com blocos M e G alternados (adaptado de Lee e Mooney, 2012).

Por apresentar propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes, o alginato possui diversas aplicações nas indústrias de cosméticos, papel, alimentos, têxtil e na área farmacêutica e médica (Müller *et al.*, 2011).

Os hidrogéis de alginato podem ser preparados de diversas formas, incluindo ligações cruzadas iônicas ou covalentes. A estrutura obtida é muito similar à da matriz extracelular de tecidos vivos, o que permite a aplicação destes dispositivos em terapia de lesões e liberação controlada de agentes bioativos, como fármacos e proteínas.

Os curativos produzidos a partir de alginato são obtidos na forma de gel, e em seguida processados de modo a formar uma membrana seca. Quando em contato com uma lesão, estes dispositivos atuam por troca iônica entre os íons cálcio presentes no recobrimento e os íons sódio provenientes do exsudato, o que leva à re-formação do gel. Este, por sua vez, é capaz de fornecer água para o ferimento, mantendo o microambiente umedecido e minimizando infecções bacterianas. É também por esse mecanismo de troca iônica que o gel se dissolve e é absorvido pelo organismo. Uma vez que estes dispositivos requerem umidade para uma atuação efetiva, eles não são adequados para o uso em ferimentos secos. Estes curativos podem promover a formação do tecido de granulação, rápida epitelização e cura da lesão, além de serem de fácil remoção (Boateng *et al.* 2008; Lee e Mooney, 2012).

Em valores de pH maiores que o pKa dos resíduos M e G do alginato, os grupos carboxila presentes em sua estrutura se ionizam (COO^-) e assim há possibilidade de interações iônicas com grupos positivamente carregados, como os grupamento amina presentes na quitosana. Quando essa interação ocorre, forma-se um complexo polieletrólito (PEC) (Meng *et al.*, 2010).

O PEC de quitosana e alginato (Q-A) mantém as características de biodegradabilidade e biocompatibilidade observadas para os polímeros isolados, porém apresentam melhor desempenho que estes quando utilizados como sistemas de liberação controlada para a terapia de lesões, mostrando-se adequados para o uso no tratamento de lesões altamente exsudativas e prevenindo infecções bacterianas (Hamman, 2010; Rodrigues, 2008). Fibras de Q-A são capazes de promover aderência e proliferação celular *in vitro* maiores que as observadas para fibras de alginato somente (Dash *et al.*, 2011).

Membranas formadas por complexos polieletrólitos de quitosana e alginato têm sido bastante estudadas para a encapsulação e liberação de drogas baixa massa molar para a aplicação na terapia de lesões de pele e engenharia de tecidos (Luo e Wang, 2014). Elmotasem (2008) desenvolveu filmes de Q-A para a administração transdérmica do anti-inflamatório meloxicam, obtendo matrizes seguras e eficazes para a aplicação

desejada. Meng *et al.* (2010) investigaram as características e perfil de liberação de sulfadiazina de prata impregnada em filmes de Q-A. Observaram que, levando em conta as propriedades físicas e mecânicas dos filmes, estes têm potencial aplicação como curativos e dispositivos de liberação controlada.

Enquanto que a quitosana é degradada pela lisozima, o efeito desta enzima no PEC é desprezível, em função da forte interação entre as cadeias de quitosana e alginato. A degradação do complexo pode ocorrer por meio de hidrólise, e pode ser manipulada variando-se as quantidades relativas dos dois polímeros nas formulações (Li *et al.*, 2009).

O reforço das propriedades mecânicas dos complexos de Q-A é feito pela adição à sua estrutura de agentes de reticulação como, por exemplo, os íons Ca^{+2} (Berger *et al.*, 2004). Pires (2013) observou que a reticulação com CaCl_2 é fundamental para a estabilização da estrutura das membranas de quitosana e alginato, uma vez que as membranas preparadas na ausência de qualquer etapa de reticulação não permaneceram íntegras após sua lavagem. Cheng *et al.* (2012) usaram a N, N'-metilenobisacrilamida e a carboxi-metilcelulose como agentes reticulantes de aerogéis de Q-A. Os resultados mostraram que estes agentes possuem forte interação com o alginato por ligações de hidrogênio, que aumentaram efetivamente a resistência mecânica do material. Bueno (2011) estudou a reticulação covalente de membranas de quitosana e alginato com glutaraldeído e também a reticulação iônica com CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A reticulação com glutaraldeído não forneceu resultados satisfatórios quanto às propriedades mecânicas dos filmes, porém os agentes de reticulação iônica geraram membranas com propriedades mais adequadas à aplicação na terapia de lesões de pele, quando utilizados nas concentrações de 0,05 M.

A formação do PEC de Q-A e suas características são afetadas pela proporção dos polímeros usados na sua produção, a massa molar dos polissacarídeos e o pH das soluções poliméricas usadas na mistura. A fração de monômeros acetilados na quitosana, bem como a quantidade de agente reticulante adicionado também são parâmetros determinantes das características do PEC formado (Sæther *et al.*, 2008;

Luo e Wang, 2014). Abruzzo *et al.* (2013) prepararam PECs de Q-A com diferentes proporções molares relativas dos polissacarídeos para a obtenção de dispositivos de liberação controlada usados em infecções genitais. Os resultados mostraram que a seleção da proporção molar adequada de quitosana/alginato e da quantidade de fármaco incorporada permitiram que os dispositivos desenvolvidos apresentassem capacidade de se hidratar, aderir à mucosa e liberar o fármaco na região tratada.

O alginato sofre encolhimento da sua estrutura em baixo pH e se dissolve em alto pH, já a quitosana é dissolvida em baixo pH e é insolúvel em valores altos do mesmo (George e Abraham, 2006). Membranas de Q-A apresentam maior estabilidade em relação a variações no pH quando comparadas aos polímeros isolados (Rodrigues, 2008).

A Figura 6 mostra as interações iônicas das cadeias de quitosana e alginato em pH igual a 5,4 e 2, sendo os valores de pKa da quitosana e do alginato de cerca de 6,3 e 3,5, respectivamente.

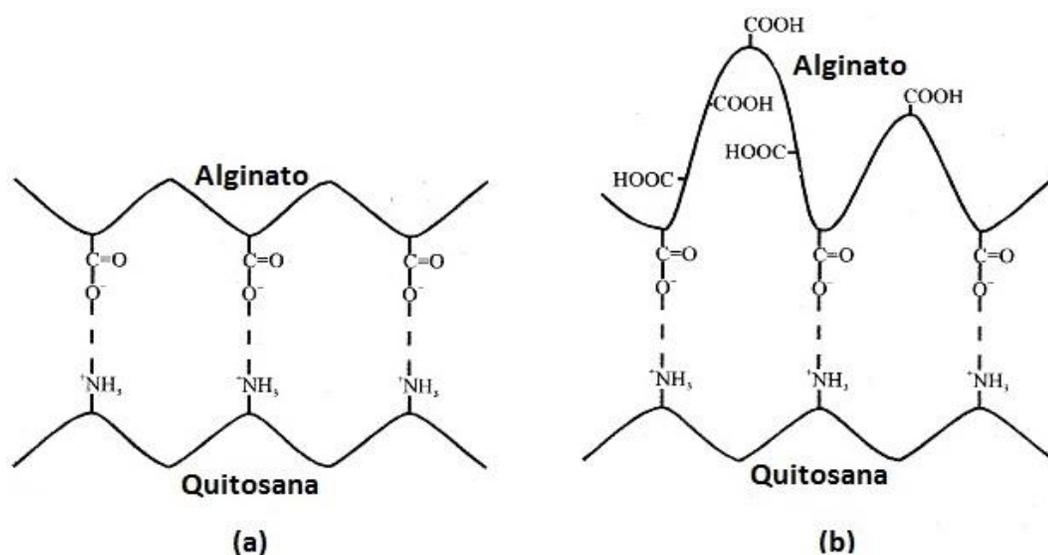


Figura 6: Representação esquemática das interações iônicas entre alginato e quitosana em: (a) pH 5,4; (b) pH 2,0 (adaptado de Majeti, 2000).

Em pH igual a 5,4, os grupos amino da quitosana estão protonados, enquanto os grupos carboxila do alginato estão desprotonados. Logo, as interações iônicas entre esses polímeros são apreciáveis, devido à elevada densidade de cargas presente. Já em pH igual a 2,0, tanto os grupos amino da quitosana como os carboxila do alginato estão protonados. A interação iônica neste caso é bem mais fraca, considerando que ocorre apenas para alguns grupos carboxila ainda não protonados.

2.3.3.2. Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Foi descoberta na década de 50 por pesquisadores norte-americanos, que faziam uma triagem para detectar microorganismos que produzissem gomas de interesse comercial. O início da produção industrial se deu em 1960 e a xantana finalmente se tornou comercialmente disponível em 1964 (Coviello *et al.*, 2007).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo polianiónico com uma estrutura primária que consiste de unidades de pentassacarídeos formada por duas unidades de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico na razão molar de 2,8:2:2. A cadeia principal é constituída de unidades de β -Dglicose unidas por ligação 1-4, sendo idêntica à da celulose. Na posição C3 de cada unidade de glicose alternada há uma cadeia lateral trissacarídica, contendo unidades de β -D-manose -1,4- β -D-ácido glicurônico- 1,2- α -D-manose, podendo apresentar na posição C6 da α -D-manose interna grupos O-acetil e na β -D-manose terminal substituinte 4,6-ácido pirúvico (Figura 7). A massa molar da xantana varia entre 2000 e 20000 kDa e esta distribuição de massas molares depende da associação entre as cadeias, que pode variar de acordo com as condições do processo de fermentação usado na produção do biopolímero. Seu pKa é de 2,9 (García-Ochoa *et al.*, 2000; Coviello *et al.*, 2007).

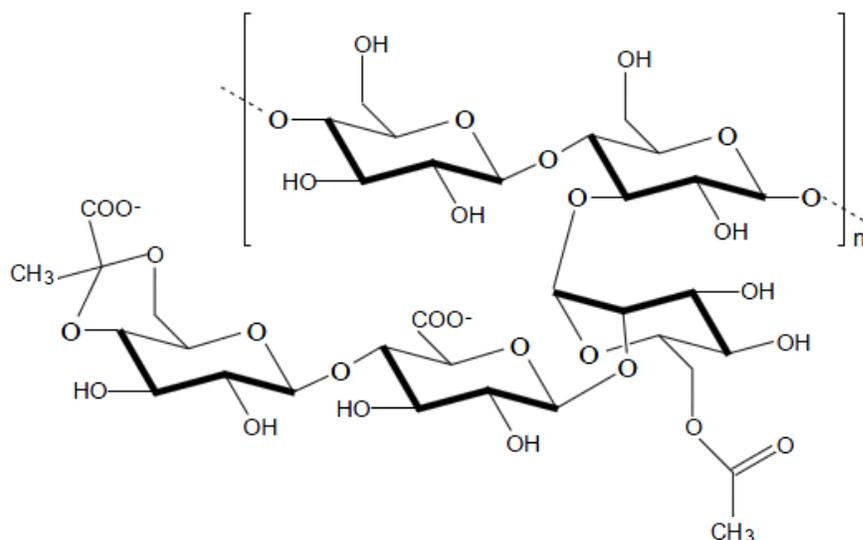


Figura 7: Estrutura química da xantana (adaptado de Hamman, 2010).

A xantana é não tóxica e não sensibilizante, isto é, não provoca irritação aos olhos ou à pele. Por este motivo, foi aprovada pelo FDA para uso como aditivo em alimentos sem nenhuma restrição a respeito da quantidade. Este biopolímero possui muitas propriedades físico-químicas que alavancaram o seu uso em vários setores da indústria (García-Ochoa *et al.*, 2000). A produção de xantana tem aumentado a uma taxa anual de 5 a 10% devido às suas propriedades reológicas favoráveis a diversas aplicações (Luo e Wang, 2014). A xantana é solúvel em água e forma soluções de alta viscosidade com características pseudoplásticas, é um excelente emulsificante, estabilizante e também dispersante (García-Ochoa *et al.*, 2000). A Tabela 3 mostra o uso da xantana em alguns dos setores da indústria.

Desde a sua descoberta, a xantana vem sendo bastante estudada e aplicada em pesquisas na área médica. Santos *et al.* (2004) avaliaram a liberação controlada de diclofenaco de sódio, lactose mono-hidratada, fosfato de cálcio tribásico e beta-ciclodextrina a partir de pellets de xantana, observando que a difusão dos compostos pela matriz e a sua erosão eram mecanismos de liberação competidores, para todos os casos. Munday e Cox (2000) produziram tabletes de xantana contendo cafeína ou

diclofenaco de sódio, verificando que a taxa de liberação dos compostos incorporados dependeu da velocidade de agitação, solubilidade e proporção do composto na matriz. Além disso, observaram que a liberação dos compostos se deu de acordo com uma cinética de ordem zero, com o mecanismo de erosão dominando o processo de transferência de massa.

Tabela 3: Aplicações da xantana em alguns setores da indústria (García-Ochoa *et al.*, 2000).

Setor da Indústria	Função
Têxtil	Controla propriedades reológicas, evita migração da tinta
Cerâmica	Previne aglomeração durante moagem
Petrolífera	Lubrificante das brocas de perfuração
Alimentícia	Espessante, Estabilizante, Dispersante
Farmacêutica e cosmética	Espessante, Estabilizante

A presença de resíduos dos ácidos acético e pirúvico em suas cadeias laterais faz da xantana um polieletrólito aniônico natural (Luo e Wang, 2014). A combinação da xantana com a quitosana, um policátion, e a formação de compostos eletrólitos também é foco de estudos na área médica. Uma grande variedade de PECs pode ser obtido alterando-se as propriedades da xantana e da quitosana, como massa molar, grau de acetilação da quitosana e conteúdo de ácido pirúvico da xantana, bem como mudando-se as condições de complexação como o pH, concentração dos polímeros, tempo de complexação e velocidade de agitação. Outro parâmetro que pode ser alterado também é o grau de reticulação entre os dois biopolímeros (Argin-Soysal *et al.*, 2009).

Argin-Soysal *et al.* (2009) estudaram o efeito da concentração inicial dos polímeros e do pH da solução de quitosana no grau de reticulação e na capacidade de intumescimento de microcápsulas de quitosana e xantana, observando que a concentração da xantana tinha maior influência em ambas as propriedades analisadas. Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) produziram um gel pela complexação de quitosana e

xantana e estudaram as propriedades reológicas deste gel em função da concentração de cada polímero e do meio de dispersão do hidrogel, verificando que o material se comporta como um gel fraco. Argin *et al.* (2014) produziram hidrogéis de quitosana e xantana nos quais encapsularam bactérias probióticas visando sua liberação no trato intestinal. Um estudo de viabilidade das células mostrou que a encapsulação das mesmas serve como excelente barreira de proteção e, além disso, a liberação das bactérias presentes nas microcápsulas foi considerada adequada para a aplicação desejada.

Veiga e Moraes (2012) investigaram o efeito da utilização de diferentes concentrações de polissacarídeos e da vazão de adição de quitosana durante o processamento nas características finais de filmes constituídos de quitosana e xantana aplicáveis à terapia de lesões de pele. As autoras observaram que um aumento na concentração dos polissacarídeos gerou filmes com maior capacidade de absorção de água e reduziu sua resistência mecânica, e que a vazão de 300 mL/h forneceu os filmes mais resistentes. Bellini *et al.* (2011) produziram membranas compactas e porosas de quitosana e xantana com diferentes razões mássicas. Para a obtenção das membranas porosas, testaram a adição dos surfatantes Tween 80 e Pluronic F68. Membranas compactas com proporção de quitosana e xantana de 1:1 se mostraram ideais para o uso como curativos, enquanto que membranas porosas preparadas com a mesma proporção dos polímeros na presença de Pluronic F68 apresentaram características mais favoráveis na aplicação como *scaffolds* para engenharia de tecidos.

2.4. Incorporação de compostos biologicamente ativos em membranas

Atualmente muitos estudos estão voltados para o desenvolvimento de curativos biologicamente ativos. A incorporação de compostos bioativos em membranas utilizadas no tratamento de lesões tem um papel importante no processo de cicatrização do ferimento. Os curativos passam a desempenhar o papel de sistemas de

liberação controlada e garantem que composto incorporado seja constantemente administrado ao paciente durante determinado período de tempo sem que haja necessidade de troca do dispositivo. Propriedades do agente bioativo como biodisponibilidade, estabilidade e estrutura química não são alteradas (Boateng *et al.*, 2008; Sikareepaisan *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2011; Veiga, 2012).

A liberação controlada do composto ativo ocorre de maneira pré-determinada. O principal objetivo deste tipo de administração é proporcionar uma terapia mais eficaz ao paciente, atingindo-se perfis de liberação adequados durante um longo período, evitando concentrações flutuantes do composto no local alvo e reduzindo a necessidade de administrações frequentes, o que promove um maior conforto e aceitação do paciente. (Duarte *et al.*, 2006; Shaik *et al.*, 2012).

Os curativos modernos utilizados como sistemas de liberação controlada são encontrados geralmente na forma de hidrogéis, hidrocolóides, filmes e espumas poliméricas. Para que atinjam o objetivo terapêutico desejado, estes curativos devem apresentar boa bioadesividade, flexibilidade e elasticidade, a fim de que o composto bioativo esteja sempre disponível para a pele danificada (Boateng *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

Uma grande variedade de compostos ativos pode ser incorporada às membranas utilizadas como curativos, podendo ser tanto de origem sintética como natural. Dentre eles, pode-se citar: proteínas, vitaminas, fatores de crescimento, anestésicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes, além de extratos ativos de plantas (Boateng *et al.*, 2008; Girata, 2011; Dash, 2011). Os agente ativos podem atuar direta ou indiretamente na cicatrização de uma ferida, como por exemplo removendo tecidos necróticos (debridamento), prevenindo infecções e mantendo a assepsia do local (Boateng *et al.*, 2008).

A incorporação de determinada substância pode ocorrer de modo que ela fique ligada, dispersa ou dissolvida na estrutura dos filmes. Existem diversas formas de incorporação dos compostos às membranas, já que eles podem ser incorporados em diferentes etapas do processo de produção. Uma dessas formas é a incorporação por

intumescimento (ou impregnação em solução) da membrana. Nesta abordagem, a membrana já pronta e seca é intumescida em um solvente contendo o agente ativo e em seguida o solvente utilizado é removido (Veiga, 2012). Para compostos não solúveis em água é importante considerar a toxicidade do solvente usado. Seus resquícios podem permanecer na membrana, afetando a biocompatibilidade. Este método apresenta desvantagens como menor rendimento de incorporação e dispersão heterogênea dos fármacos ao longo da matriz polimérica (Davies *et al.*, 2008). No entanto, a incorporação por impregnação fornece vantagens como a possibilidade da incorporação de uma gama de diferentes compostos após a obtenção da membrana, além da necessidade de condições mais brandas na secagem das mesmas, já que os solventes utilizados são geralmente bastante voláteis. Outro método de incorporação é a adição direta do composto durante o preparo da membrana. Esta é a técnica geralmente mais utilizada, pois o ativo é facilmente incorporado no dispositivo, favorecendo a distribuição homogênea ao longo do filme polimérico. Uma desvantagem desse método é a necessidade de evaporação do solvente, que em geral é feita através de aquecimento ou vácuo por um longo período de tempo, causando degradação do fármaco ou até mesmo do dispositivo polimérico. Outra abordagem utilizada é incorporação por meio de fluidos supercríticos (Girata, 2011; Veiga, 2012). Qualquer que seja o método de incorporação utilizado, é importante que o composto incorporado tenha afinidade pela matriz polimérica. Caso isso não ocorra, a eficiência de incorporação resultante poderá ser baixa.

Neste trabalho foi incorporado às membranas produzidas um antibiótico obtido por fermentação, denominado eritromicina, discutida a seguir.

2.4.1. Eritromicina

A eritromicina é um antibiótico da família dos macrolídeos e foi descoberta em 1952 por McGuire *et al.*, que a identificaram como um metabólito produzido pela

bactéria *Streptomyces erythreus*. Apresenta uma estrutura composta de um grande anel de 13 carbonos, ao qual dois açúcares são unidos por ligações glicosídicas. Sua fórmula empírica é $C_{37}H_{67}NO_{13}$ e possui massa molar de 733,47 Da (Auto *et al.*, 1982; Schönfeld e Kirst, 2002; International Pharmacopoeia, 2006; Levinson, 2008).

Este antibiótico é considerado uma substância quimicamente complexa, constituída por três subfrações, eritromicina A, B e C, sendo a fração A a mais representativa, que possui maior atividade antimicrobiana, e a única que recebeu a aprovação do FDA. A estrutura das frações A, B e C da eritromicina é apresentada na Figura 9. As eritromicinas B e C em conjunto representam menos de 10% da mistura total. À união das três subfrações se dá o nome de eritromicina básica. Devido a inconvenientes no uso, tais como sabor desagradável, instabilidade em meio ácido e baixa hidrossolubilidade, a indústria farmacêutica elaborou formas alternativas para o uso desse composto, combinando-o com ácido orgânicos para a formação de sais e ésteres. Assim, foram obtidos o estearato, estolato, etilsuccinato, glucepato e lactobionato de eritromicina. No Brasil, a eritromicina básica é a mais utilizada dentre as formulações para uso tópico, dentre as quais estão soluções e unguentos contendo o antibiótico. A dosagem comumente utilizada é de 20 mg/g de veículo. O estearato e o estolato são usados em formulações para administração oral, enquanto o glucepato e o lactobionato são mais aplicados em administrações intravenosas (Auto *et al.*, 1982; Schönfeld e Kirst, 2002; Weinstein e Wagman, 1978; Lancini *et al.*, 1995).

A eritromicina é encontrada na forma de pó (branco ou levemente amarelado) ou cristais (incolores ou levemente amarelados). Este antibiótico é pouco higroscópico, ligeiramente solúvel em água (1,44 mg/L), com menor solubilidade em altas temperaturas, e muito solúvel em solventes orgânicos da categoria dos alcoóis, como o etanol (50 mg/mL) e o metanol. É instável em meio ácido e a redução do pH de soluções aquosas provoca o aumento de sua solubilidade e acelera sua taxa de degradação. Possui pKa de 8,6, é opticamente ativo e possui absorção máxima em comprimento de onda de 278 nm (Kim, *et al.*, 2004; International Pharmacopoeia, 2006; Weinstein e Wagman, 1978). A eritromicina apresenta solvatomorfismo em solventes

orgânicos, como acetona, metiletilcetona, etanol e isopropanol (Mirza *et al.*, 2003), ou seja, a estrutura do cristal difere de sua composição elementar quando há inclusão de uma ou mais moléculas de solvente ao qual foi exposto. Estas moléculas ocupam posições definidas na estrutura, não ligadas à rede cristalina, mas ocupando espaços de cavidades e/ou falhas no interior do cristal (Aguiar, 2009).

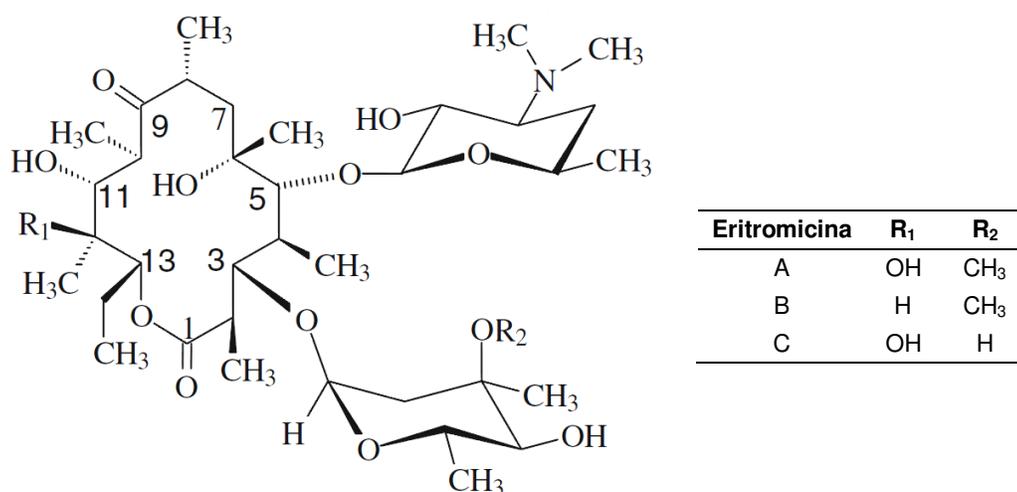


Figura 9: Estrutura da eritromicina (adaptado de Pendela *et al.*, 2012).

A eritromicina é um antibiótico de espectro antimicrobiano considerado médio. Os agentes suscetíveis incluem bactérias aeróbias Gram-positivas (estafilococo sensível à meticilina, estreptococos, corinebactérias, *Listeria monocytogenes*), cocos gram-negativos (gonococo e meningococo), espiroquetas (*Treponema spp.* e *Leptospira spp.*), actinomicetos, riquetsias, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, micobactérias não causadoras de tuberculose e outras, além de algumas bactérias anaeróbias (Auto *et al.*, 1982; Silva e Velasco, 2007).

O mecanismo de ação da eritromicina se dá pela ligação deste antibiótico à subunidade 50S dos ribossomos bacterianos, impedindo a transferência dos aminoácidos conduzidos pelo RNA transportador para a cadeia polipeptídica em

formação e resultando em inibição da síntese protéica (Levinson, 2008). A eritromicina possui uma meia-vida sérica de 1,5 hora, mas mesmo depois deste tempo ainda apresenta concentração maior que o mínimo exigido para atuação bacteriostática eficaz (Auto *et al.*, 1982).

Considerando seu espectro de ação, a eritromicina é o tratamento escolhido para pneumonia causada por *Legionella* (bacilo gram-negativo) e *Mycoplasma*, sendo também uma alternativa eficaz contra uma variedade de infecções causadas por cocos Gram-positivos em pacientes alérgicos à penicilina (Levinson, 2008). Tem seu uso indicado também em casos de difteria, coqueluche, eritrasma, uretrites e acne (Silva e Velasco, 2007). Aplicada por via tópica, a eritromicina suprime a *Propionibacterium acnes*, bactéria residente nos folículos sebáceos, reduzindo, assim, a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos mediada pela *P. acnes* e diminuindo, desse modo, a formação de ácidos graxos. Acredita-se que esse seja um fator responsável pela sua eficácia na redução das contagens de lesões de acne (ANVISA – Bula profissional Stiemycin®). A eritromicina é indicada também para o tratamento de ferimentos infectados, queimaduras de segundo e terceiro grau, úlceras tróficas, herpes e doenças pustulosas (Ferguson e Scott, 1955; Erythromycin Ointment, 2013)

Na literatura podem ser encontradas algumas publicações a respeito da incorporação de eritromicina em dispositivos poliméricos de liberação controlada. Sarisuta *et al.* (1999) incorporaram eritromicina em filmes de vários polímeros, dentre eles o polivinil acetato ftalato (PVAP), celulose acetato ftalato (CAP), hidroxipropil metilcelulose acetato ftalato (HPMCP) e goma-laca, a fim de se analisar as interações polímero-antibiótico obtidas. Park *et al.* (2005) prepararam, por emulsão, microcápsulas de policaprolactona (PCL)/poli(óxido de etileno) (PEO) e policaprolactona contendo eritromicina, a fim de avaliar o efeito dos segmentos de PEO adicionados às microcápsulas de PCL em sua degradação, distribuição de tamanho e eficiência de incorporação do agente ativo. Shweta *et al.* (2012) desenvolveram dispositivos para liberação controlada ocular da eritromicina, incorporando-a em filmes de hidroxipropil-

metilcelulose, metil celulose e polivinil-pirrolidona, tendo as formulações contendo polivinil-pirrolidona se mostrado promissoras para a aplicação desejada.

Diferentes métodos para quantificação da eritromicina podem ser encontrados na literatura (Ford *et al.*, 1953; Amin e Issa, 1996; Deubel *et al.*, 2006; Jessic *et al.*, 2011; Ashour e Bayram, 2012). Ford *et al.* (1953) desenvolveram um método para quantificação da eritromicina baseado na degradação do composto por uma solução concentrada de ácido sulfúrico, produzindo uma solução de cor amarelo intenso que é então avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda na região do visível, a 485 nm. Ashour e Bayram (2012) desenvolveram um método espectrofométrico simples e rápido baseado na reação do antibiótico com o composto colorimétrico 1,2-naftoquinona-4-sulfonato em meio alcalino a 25 °C com a formação de um produto alaranjado, que apresenta pico de absorção num comprimento de onda de 452 nm. Já Deubel *et al.* (2006) desenvolveram um método de alta sensibilidade para detecção do composto por meio de cromatografia líquida em fase reversa acoplada à espectroscopia de massa, o qual foi eficaz para detecção do antibiótico em amostras comerciais.

2.5. Considerações finais

Considerando-se os tópicos abordados na revisão bibliográfica, pode-se afirmar que há a necessidade de estudos acerca do desenvolvimento de curativos biologicamente ativos que sejam funcionais, facilmente processáveis e financeiramente acessíveis. A tendência atual na produção de curativos é a utilização de matérias-primas não onerosas, de fácil obtenção, capazes de conferir ao dispositivo as propriedades apropriadas e desejáveis à aplicação; e que cumpram o papel de atuar como um acelerador da cura da lesão, proporcionando ao paciente um tratamento mais eficaz. A incorporação de eritromicina em PECs de quitosana-xantana e quitosana-alginato para obtenção de curativos com as características anteriormente mencionadas é uma boa alternativa para a aplicação no tratamento de lesões de pele. Apesar de

possuir propriedade biológica adequada a esta aplicação, a eritromicina tem seu uso ainda pouco estudado nesta área, o que confere à proposta deste trabalho um caráter de ineditismo. A escolha dos polissacarídeos a serem estudados no presente trabalho deve-se ao fato de que o grupo de pesquisa já possui ampla experiência na utilização destes biopolímeros, conforme já mencionado anteriormente. A razão de se ter optado especificamente pelos poliânions alginato e xantana é a diferença estrutural apresentada pelos mesmos, já que o primeiro possui cadeia linear enquanto o segundo possui estrutura ramificada, e seria interessante explorar essa diferença na avaliação dos resultados obtidos para as diferentes formulações testadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a obtenção e caracterização das membranas contendo ou não eritromicina foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana (Q) de carapaça de camarão com grau de desacetilação mínimo de 75%, (produto com código C3646, lote nº 061M0046V), alginato de sódio (A) de baixa viscosidade obtido de algas marrons (produto com código A2158, lote nº 090M0092V), xantana (X, produto com código G1253, lote nº 108K0038) e eritromicina (produto com código E5389) da Sigma-Aldrich Co.; etanol e ácido acético glacial da Synth; cloreto de cálcio di-hidratado e hidróxido de sódio da Merck & Co. Inc. A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q[®] da Millipore.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das membranas

A metodologia utilizada para o preparo das membranas baseia-se na utilização de condições anteriormente estudadas e já pré-estabelecidas, conforme será mencionado a seguir para cada tipo de formulação.

3.2.1.1. Membranas constituídas de quitosana e xantana

As membranas de quitosana e xantana (Q-X) foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Veiga e Moraes (2012). Neste procedimento, são utilizadas

soluções de quitosana (solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) e de xantana (solução aquosa) em concentração de 0,5% (m/v). O volume empregado de cada solução foi de 90 mL. A solução ácida de quitosana foi adicionada a uma vazão de 300 mL/h através de uma bomba peristáltica (Modelo Minipuls 3, Gilson) em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm contendo a solução de xantana. A temperatura foi mantida em 25 °C durante todo o processo, utilizando-se para isso um banho termostático (Modelo 214 M2, Quimis). O sistema foi mantido sob agitação constante de 1000 rpm através de agitador mecânico (Modelo 251 D, Quimis) com hélice do tipo naval com raio de 2,5 cm durante o gotejamento. O sistema utilizado para a preparação das membranas é apresentado na Figura 10.

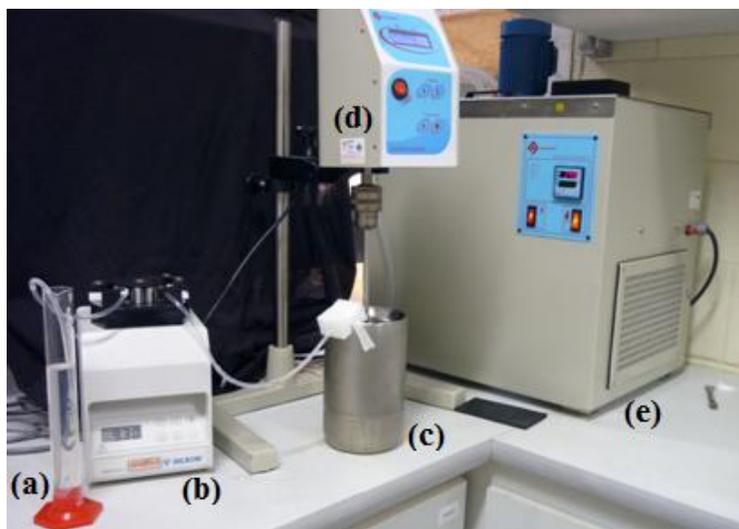


Figura 10: Sistema utilizado para o preparo das membranas (adaptado de Veiga, 2012). a) Proveta contendo solução de quitosana; b) bomba peristáltica; c) reator contendo solução de alginato ou xantana; d) agitador mecânico; e) banho termostático.

O complexo polimérico obtido foi desaerado em bomba de vácuo (Modelo Q-355B, Quimis) por duas horas e posteriormente transferido para uma placa de Petri de poliestireno de 15 cm. A mistura foi então colocada em estufa com circulação de ar

(Modelo 410D, Nova Ética), a 37 °C, durante 24 horas, para que fosse feita a evaporação do solvente. Em seguida, as membranas foram imersas duas vezes em 200 mL de água deionizada, por 30 minutos cada vez, a fim de se remover o ácido acético residual. Por fim, as amostras foram secas novamente a 37 °C por 24 horas.

3.2.1.2. Membranas constituídas de quitosana e alginato

O método de preparação das membranas contendo quitosana e alginato (Q-A) foi baseado nos procedimentos propostos por Rodrigues *et al.* (2008) e Bueno e Moraes (2011). O mesmo aparato utilizado no preparo das membranas de quitosana e xantana foi aqui utilizado. Soluções de quitosana a 1% (m/v) (em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) e de alginato a 0,5% (m/v) (solução aquosa) foram usadas. Neste procedimento, 90 mL da solução ácida de quitosana foram adicionados a uma vazão de 200 mL/h através de uma bomba peristáltica em um reator contendo 180 mL da solução de alginato. A temperatura foi mantida em 25 °C durante todo o processo, utilizando-se para isso um banho termostático. O sistema foi mantido sob agitação mecânica constante de 500 rpm através de agitador mecânico com hélice do tipo pás inclinadas com raio de 2,1 cm. Após o término da adição da solução de quitosana, o sistema foi submetido a uma agitação de 1000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 16,8 mL de uma solução aquosa de NaOH 1M, mantendo-se a agitação do sistema em 1000 rpm por 10 minutos. Finalmente, adicionou-se 3,6 mL de CaCl₂ a 2% (m/v) (solução aquosa), deixando o sistema sob agitação por mais 10 minutos. Após a reação, a mistura polimérica obtida foi desaerada em bomba a vácuo por duas horas. Em seguida, o material resultante foi dividido igualmente em termos mássicos em duas placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro e levado à estufa de circulação de ar por 24h a 37°C, para que houvesse a evaporação do solvente. Finalmente, o material foi lavado por 30 minutos com 150 mL de CaCl₂ 2% (m/v) e posteriormente com água (duas vezes em 200 mL por 30 minutos cada vez). A secagem final foi feita a temperatura ambiente.

3.2.2. Incorporação de eritromicina nas membranas

A incorporação do antibiótico eritromicina nas membranas foi realizada por duas metodologias diferentes, sendo elas por adição direta do composto à mistura polimérica durante seu preparo, ou por imersão das membranas já prontas em solução etanólica contendo o composto ativo. A seguir estão descritos os dois procedimentos.

3.2.2.1. Incorporação da eritromicina durante o preparo da membrana

Em membranas de quitosana e xantana, o composto ativo foi adicionado ao reator logo após a mistura completa dos polímeros. Já em membranas de quitosana e alginato, a adição do composto foi realizada após completos os 10 minutos depois da adição de CaCl_2 2%. Prosseguiu-se então com as etapas pré-estabelecidas para cada tipo de membrana (secagem, desaeração e lavagem). A incorporação foi realizada em triplicata.

A concentração de eritromicina utilizada foi estabelecida de acordo com a concentração geralmente utilizada desse composto em medicamentos de uso tópico, que é de 20 mg por grama de veículo. Considerando que há perdas do composto durante o processamento da membrana, que sua incorporação poderia não alcançar 100% de eficiência, e que somente determinada porcentagem dele seria liberada e disponibilizada para a lesão na aplicação final caso o agente bioativo não se solubilizasse totalmente quando em contato com a ferida, optou-se por utilizar também concentrações acima de 20 mg por grama de membrana (40 mg/g e 60 mg/g), a fim de se aumentar a probabilidade de alcançar a quantidade mínima livre utilizada para uso tópico. É importante ressaltar que os cálculos para determinar a quantidade de eritromicina a ser adicionada ao reator tiveram como base a massa de membrana em condição seca.

3.2.2.2. *Incorporação do composto ativo por impregnação em solução etanólica*

Neste método, a incorporação foi feita por imersão da membrana já pronta e seca em solução etanólica contendo o composto ativo. Para determinação da concentração a ser utilizada, levou-se em consideração que a eritromicina é muito solúvel em etanol (50 mg/mL) e então, tendo como base o volume de solução a ser utilizada no ensaio, valores arbitrários de concentração foram escolhidos, tendo como princípio evitar o uso de quantidades excessivas do composto ativo, que apresenta custo relativamente elevado. As concentrações estabelecidas foram então 1 mg/mL, 3 mg/mL e 5 mg/mL de eritromicina em etanol.

Neste procedimento, amostras de 1 cm² das membranas foram previamente armazenadas em condições de baixa umidade relativa, 22%, a fim de que, quando expostas à solução etanólica, pudessem apresentar máxima absorção, e em seguida pesadas para determinação de sua massa inicial. As amostras foram então incubadas por 1 hora com 4 mL de solução etanólica contendo ou não (branco) o composto ativo. A temperatura utilizada foi de 25 °C e agitação de 100 rpm. Após a incubação, as membranas foram secas a 25 °C durante 30 minutos e então pesadas para a determinação de sua massa final. A quantidade de composto ativo presente na solução etanólica remanescente foi determinada, a fim de se utilizar esse dado para o cálculo da eficiência de incorporação, que será descrito mais adiante, no item 3.2.3.8. A incorporação foi realizada em triplicata.

3.2.3. Caracterização das membranas

A caracterização das membranas foi realizada de acordo com procedimentos descritos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2011), Veiga e Moraes (2011) e Pires (2013).

3.2.3.1. Aspecto das membranas

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu e fotografadas com câmera digital (Modelo A410, Canon).

3.2.3.2. Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440, Leica.

Foram utilizadas amostras de dimensões de 2 cm x 1 cm previamente mantidas em ambiente com sílica-gel ativada por 24 h. Estas foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies. Para determinação de sua morfologia transversal, as membranas foram previamente criofaturadas com nitrogênio líquido.

3.2.3.3. Avaliação da cor e opacidade das membranas

A cor dos filmes foi avaliada com um colorímetro Hunterlab (Colorquest XE, EUA), utilizando-se os padrões CIELab. O equipamento possui lâmpada de xenônio. Neste sistema, conforme apresentado na Figura 11, são determinados os parâmetros de luminosidade L^* , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo. A partir desses dados, foi possível determinar o ângulo *Hue*, que dá a medida da tonalidade, pela Equação 1; e o *Croma*, referente à intensidade desta cor pela Equação 2.

$$Hue = \tan^{-1}(b^* / a^*) \quad (\text{Equação 1})$$

$$Croma = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad \text{(Equação 2)}$$

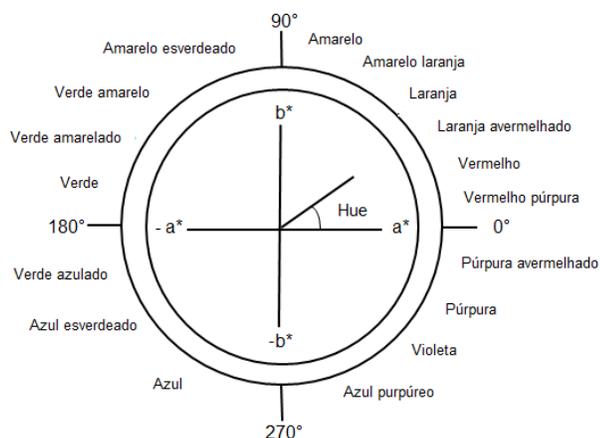


Figura 11: Seqüência *Hue* e orientação do ângulo *Hue* no diagrama CIE Lab com a seqüências das nuances de cores (Voss, 1992).

A opacidade, medida da obstrução à passagem de luz pelo filme, foi determinada seguindo o método Hunterlab (Sobral, 1999), utilizando-se o mesmo equipamento das medidas de cor, no modo de transmitância. Por este método, a opacidade (*Y*) da amostra é calculada como a relação entre a opacidade do filme colocado sobre o padrão preto (*Y_p*) e a opacidade do filme colocado sobre o padrão branco (*Y_b*), conforme a Equação 3.

$$Y = \left(\frac{Y_p}{Y_b} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

3.2.3.4. Ângulo de contato das membranas com água

As medidas de ângulo de contato visando a análise do caráter hidrofílico/hidrofóbico das membranas foram feitas através do equipamento DSA100

(Krüss GmbH, Alemanha) pela deposição de uma gota de 10 μL de água sobre a superfície de amostras das membranas (dimensões 6 cm x 1 cm) e registrando-se fotograficamente a gota imediatamente após ela atingir a superfície. O ângulo de contato foi então obtido por meio desta imagem. É importante destacar que o registro fotográfico foi feito de maneira rápida, de forma a se minimizar o risco de medição do ângulo após parte da água já ter sido absorvida pela membrana. Além disso, a fim de se evitar também a realização da medida numa superfície ondulada, que compromettesse o resultado final obtido, as bordas de cada amostra foram fixadas com fita adesiva na plataforma do equipamento de modo a tornar a superfície dos filmes o mais lisa possível. Foram realizadas 10 medições para cada amostra. As medidas foram feitas nas amostras dos polímeros quitosana, alginato e xantana isolados, bem como nos complexos Q-A e Q-X.

Para obtenção das amostras de filmes dos polímeros isolados, 100 mL de soluções de concentração 1% (m/v) de alginato e de xantana em água deionizada, e de quitosana em ácido acético 2% (v/v), foram preparadas e vertidas em placas de poliestireno. A solução de quitosana passou por secagem em estufa a 60°C por 24 horas e o filme formado foi lavado uma vez em 200 mL de solução de NaOH 1M por 30 minutos e duas vezes em 200 mL de água deionizada por 30 minutos. O filme de alginato foi obtido pela secagem da solução em estufa a 37°C por 24 horas, seguida da lavagem em 75 mL de solução de CaCl_2 2% (m/v) por 30 minutos e em 200 mL de água deionizada duas vezes por 30 minutos. A solução de xantana passou por secagem em estufa a 37°C por 24 horas e um filme foi formado, no entanto, na etapa de lavagem com água deionizada, o filme formado se desfez. Optou-se então por verter a solução de xantana diretamente sobre lâminas de vidro, pois assim a rede formada após a secagem é capaz de permanecer sobre a lâmina e não se desfazer totalmente na solução de lavagem, permitindo a obtenção de uma camada da rede polimérica, mesmo que fina, sobre a superfície lisa das lâminas, viabilizando assim a posterior medida dos ângulos de contato.

3.2.3.5. Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995), utilizando-se uma célula de acrílico com um volume interno de 30 mL e que dispõe de uma tampa com abertura central de 15,21 cm² na qual se fixa a amostra. Cloreto de cálcio granulado foi utilizado para preencher o fundo da célula até próximo à borda. A célula foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado. O fundo desse recipiente continha uma solução saturada de NaCl para manter o ambiente a 75% UR. O aparato experimental utilizado no ensaio é mostrado na Figura 12.



Figura 12: Aparato experimental utilizado no ensaio de determinação da permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água das membranas estudadas.

A variação de massa da célula com o tempo corresponde à taxa de água que permeia pelo filme e que foi usada na equação para calcular a PVA (Equação 4). Calculou-se também a taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) de acordo com a Equação 5.

$$PVA = \frac{G_m \cdot \delta}{A_e \cdot \Delta P_{H_2O}} \cdot F \quad (\text{Equação 4})$$

$$TTVA = \frac{PVA \cdot \Delta P_{H_2O}}{\delta} \quad (\text{Equação 5})$$

onde: PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água [g.mm/m².dia.kPa]; TTVA é a taxa de transmissão de vapor d'água [g/m².dia]; δ é a espessura do filme [mm]; G_m é a taxa de ganho de massa do sistema [g/dia]; A_e é a área exposta do filme [m²]; ΔP_{H_2O} é a diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme [kPa] e F é um fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o CaCl₂ e o filme (McHugh *et al.*, 1993).

3.2.3.6. Avaliação das propriedades mecânicas e espessura das membranas em diferentes umidades

As propriedades mecânicas das membranas foram determinadas com base em adaptações da norma ASTM D882 (2002) utilizando-se um texturômetro (Modelo TA.XT2, Stable Micro System). Foram utilizadas oito amostras de 8 cm x 2,5 cm de cada tipo de membrana, com espessuras pré-determinadas em micrômetro Digimess (média aritmética de cinco medidas em pontos aleatórios). Estas foram fixadas nos mordentes do equipamento, que foi montado com uma separação inicial de garras de 5 cm e operado com velocidade de afastamento de 1 cm/s, utilizando-se uma célula de carga de 5,098 kgf. As amostras foram então avaliadas quanto à tensão e o alongamento na ruptura em cinco condições de umidade relativa (UR), sendo estas 22%, 33%, 52%, 75% e 89% e também na condição úmida (após imersas por 15 segundos em água), a uma temperatura de *c.a.* 25°C. Para se obter as condições de umidade relativa desejadas, os corpos de prova foram previamente armazenados por no mínimo 48 horas em dessecador com um sal apropriado (Anexo II).

Através dos dados obtidos foi possível determinar tensão e o alongamento (Al) na ruptura de acordo com as Equações 6 e 7, respectivamente:

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Equação 6})$$

$$Al = \frac{d}{d_0} \quad (\text{Equação 7})$$

sendo TR a tensão de ruptura [MPa], Al o alongamento na ruptura [%], F_m a força máxima de rompimento [N], A_s a área transversal [mm²], d_0 [mm] o afastamento inicial das garras do equipamento e d [mm] o afastamento das garras no momento da ruptura.

3.2.3.7. Capacidade de absorção e estabilidade em etanol

Uma vez que um dos métodos de incorporação dos compostos ativos às membranas se dá por impregnação em solução etanólica, é importante que se entenda o comportamento das amostras utilizadas quando expostas a etanol, tanto em relação à sua capacidade de absorção quanto à sua capacidade de se manter estável estruturalmente neste solvente, sem apresentar perda de massa significativa.

Para avaliar a capacidade de absorção, foram utilizadas amostras de dimensões 6 cm x 1 cm previamente armazenadas em dessecador por 24 horas. A massa inicial ($m_{inicial}$) foi determinada e em seguida os corpos de prova foram expostos a 10 mL de etanol por 1 hora ou 24 horas a 25°C. O excesso de etanol foi removido com papel filtro e as amostras foram pesadas ($m_{úmida}$). O procedimento foi realizado em triplicata. A absorção de etanol (A_i , medida em gramas de etanol por grama de membrana) foi calculada segundo a Equação 8.

$$A_i = \frac{(m_{úmida} - m_{inicial})}{m_{inicial}} \quad (\text{Equação 8})$$

Para a avaliação da estabilidade das amostras incubadas em etanol, em termos de sua perda de massa, amostras de 6 cm x 1 cm previamente armazenadas em dessecador foram pesadas ($m_{inicial}$) e posteriormente expostas a 10 mL de etanol por 1 hora ou 24 horas, a 25°C. A fim de remover as moléculas de polissacarídeos e os íons fracamente ligados, cada amostra foi imersa em 20 mL de água deionizada por 5 min por cinco vezes após o período de exposição inicial. Finalmente, os corpos de prova foram secos por 24 h, a 37°C, mantidos em dessecador com sílica gel por 24 h e novamente pesados (m_{final}). O teste foi realizado em triplicata. A perda de massa, M_p , foi determinada por meio da Equação 9.

$$M_p = \frac{(m_{inicial} - m_{final})}{m_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

3.2.3.8. Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas

A capacidade máxima das membranas secas de absorver água e soluções aquosas foi determinada para as seguintes soluções: fluido corpóreo simulado (FCS, pH 7,4), com composição descrita na Tabela 4, soro fetal bovino (SFB, pH 7,2), solução salina de NaCl a 0,9% m/v (SS, pH 5,5) e tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*). O FCS foi utilizado com o objetivo de se avaliar o comportamento das membranas em uma solução de composição e concentração de sais próximas à do corpo humano, enquanto que o SFB é importante pois simula um ambiente mais complexo e mais próximo ao sangue animal, uma vez que contém proteínas, fatores de crescimento, lipídeos, açúcares, entre outros compostos. Já a solução salina é importante por ser usualmente utilizada na limpeza e hidratação das lesões.

Para este teste, foram utilizados corpos de prova retangulares de 6 cm x 1 cm, em triplicata. As amostras foram pesadas para determinação de sua massa inicial

(m_{inicial}) e posteriormente hidratadas com 5 mL das soluções aquosas anteriormente descritas por 24 h a 37°C. Após este período os corpos de prova foram novamente pesados para a determinação da massa final ($m_{\text{úmida}}$). A capacidade máxima de absorção das soluções aquosas foi então determinada também através da Equação 8.

Tabela 4: Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl. O pH da solução final é ajustado para 7,4 (Kokubo *et al.*, 1990).

Íons	Concentração (mM)
Na ⁺	142,0
K ⁺	5,0
Ca ²⁺	2,5
Mg ²⁺	1,5
Cl ⁻	148,8
HCO ₃ ⁻	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5

Para a análise da estabilidade das amostras através da determinação de sua perda de massa nas soluções aquosas anteriormente citadas, o procedimento adotado foi análogo ao descrito no item 3.2.3.4 para o solvente etanol.

3.2.3.9. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC – FEQ/UNICAMP) a fim de se verificar as possíveis interações entre os polímeros e a eritromicina após a obtenção das membranas. As análises foram feitas tanto para as membranas, quanto para os biopolímeros e o composto ativo isolados. Os espectros

foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Scientific (Modelo Nicolet 6700) operando no modo ATR (acessório SMART OMNI-SAMPLER) no intervalo de 675 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 varreduras acumuladas, para leitura de amostras na forma de filmes; e com o uso de pastilha de KBr, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras acumuladas, para a leitura de amostras na forma de pó.

3.2.3.10. Eficiência de incorporação de eritromicina nas membranas pelo método da adição direta

Para a medida da eficiência de incorporação de eritromicina nas membranas pelo método de adição, determinou-se a quantidade de composto perdida na etapa de lavagem e remanescente nas placas de poliestireno utilizadas durante a etapa de secagem.

Para isso, as soluções provenientes da lavagem das membranas foram evaporadas em estufa a 37 °C por 20 horas. Após o término deste período, o resíduo remanescente no recipiente foi ressolubilizado em etanol e então a solução obtida foi filtrada com filtro de porosidade 0,45 μm a fim de se remover resquícios de membrana que se soltaram durante a lavagem ou outras impurezas maiores. A quantificação da eritromicina no filtrado, constituído então de uma solução límpida do agente bioativo, foi realizada em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 205 nm. O espectro de absorção para comprimentos de onda na faixa de 200 nm a 800 nm, bem como a curva de calibração utilizada são apresentados no Anexo III. Para a determinação de antibiótico remanescente nas placas de poliestireno, estas foram lavadas com etanol e o processo de quantificação foi análogo ao anterior. Este procedimento foi realizado também para membranas que não continham eritromicina (branco), a fim de se quantificar compostos extratíveis em etanol que não fossem o composto de interesse.

Uma vez determinada a quantidade de eritromicina perdida durante o processo, e conhecendo-se a quantidade inicial de eritromicina adicionada à membrana, um simples balanço de massa fornece a quantidade de agente ativo incorporado no filme. A eficiência de incorporação (ε) pôde ser então calculada pela Equação 10:

$$\varepsilon = \frac{m_{c,m}}{m_{c,i}} \times 100\% \quad (\text{Equação 10})$$

sendo $m_{c,i}$ a massa inicial de composto adicionada à membrana e $m_{c,m}$ a massa final de composto ativo que permaneceu na membrana.

3.2.3.11. Eficiência de incorporação de eritromicina nas membranas pelo método da impregnação das amostras em solução etanólica

O cálculo da eficiência de incorporação de eritromicina incorporada por este método baseia-se na quantidade de composto que permaneceu na solução de impregnação após o término do ensaio. Portanto, logo após o fim do período de incubação das membranas realizado para o processo de incorporação, a quantidade de eritromicina presente na solução etanólica remanescente foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se para isso um comprimento de onda de 205 nm e a curva de calibração descrita no Anexo III mencionada anteriormente. Com esse valor foi possível calcular a quantidade de composto que não foi incorporado à membrana. Este procedimento foi realizado também para membranas que não continham eritromicina (branco), a fim de se quantificar compostos extratíveis em etanol que não fossem o composto de interesse. Como a concentração inicial da solução etanólica de incorporação é conhecida, um simples balanço de massa fornece a quantidade de agente ativo realmente incorporado à matriz. A eficiência de incorporação pôde ser então calculada também pela Equação 10.

3.2.4. Análise da cinética de liberação da eritromicina

Para avaliar a cinética de liberação da eritromicina foram utilizadas amostras de membranas de 1 cm x 1 cm, em triplicata. Os corpos de prova foram pesados e colocados em frascos contendo 3,0 mL de tampão PBS sob agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C. Cada conjunto de amostras, em triplicata, foi analisado em períodos de tempo pré-determinados. Para isso, o conteúdo dos frascos era analisado quanto à concentração do composto ativo por espectrofotometria utilizando-se o método descrito por Ford *et al.* (1953). Este método se baseia na produção de uma solução de cor amarelo intenso devido à degradação da eritromicina por uma solução concentrada de ácido sulfúrico. Segundo Danielson *et al.* (1993), esta degradação se dá pela reação dos açúcares presentes na estrutura molecular da eritromicina com o ácido sulfúrico. Dessa forma, é possível realizar a detecção do antibiótico em um comprimento de onda na região do visível.

Ácido sulfúrico 27 N foi adicionado na proporção de 1:1 (v/v) às amostras e após 30 minutos fez-se a leitura de absorbância a 482 nm. Para a preparação das soluções de referência e os ensaios de liberação, o PBS utilizado teve seu pH ajustado para 7,0 com ácido sulfúrico diluído pois, neste valor de pH, a eritromicina apresenta maior solubilidade neste solvente. A curva de calibração obtida é mostrada no Anexo IV.

3.2.5. Análise estatística

Os resultados numéricos obtidos referentes às propriedades das membranas foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão, sendo analisados através da abordagem de diferenças significativas entre médias de cada amostra (teste de Tukey, p menor que 0,05) através do software Statistica 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspecto visual, cor e opacidade das membranas

As membranas de quitosana e alginato e quitosana e xantana obtidas apresentaram o aspecto visual registrado na Figura 13.

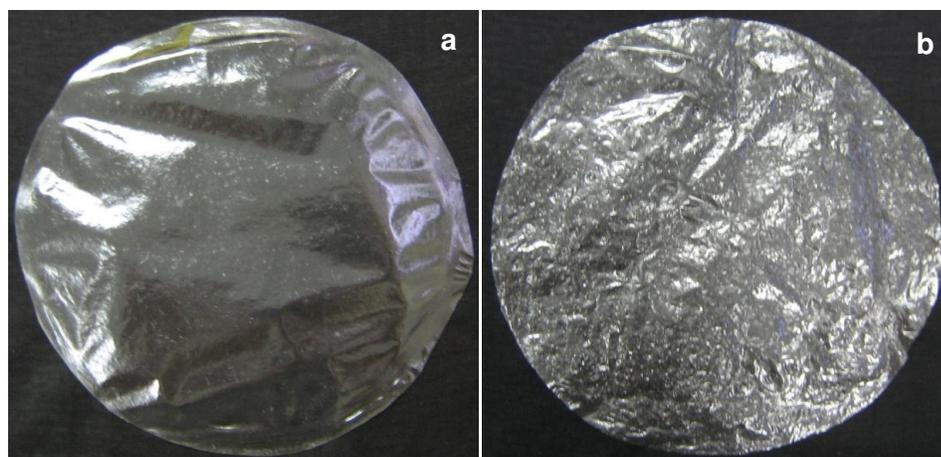


Figura 13: Aspecto visual das membranas de quitosana e alginato (a) e quitosana e xantana (b).

Pode-se observar que a membrana de Q-A apresenta superfície mais lisa e aspecto menos opaco que a membrana de Q-X. Comparando-se os filmes de Q-X obtidos no presente trabalho com aqueles obtidos no trabalho de Veiga (2012), alterações visíveis quanto ao aspecto podem ser notadas. Os filmes preparados no trabalho de referência parecem ser mais opacos e apresentam aspecto um pouco esponjoso, o que se deve à presença de maior quantidade de ar em sua estrutura, resultante provavelmente de um processo de desaeração menos efetivo. Além disso, estes filmes possuem o que aparentam ser fibras poliméricas ao longo da estrutura. As membranas do presente trabalho também apresentam tais fibras, porém em tamanho e

quantidade menores. Quanto às membranas de Q-A, verifica-se que estas apresentaram aspecto menos rugoso e aparentemente menos opaco que aquelas obtidas por Rodrigues (2008), Bueno (2010) e Pires (2013).

Na Tabela 5 são fornecidas informações a respeito da opacidade e os parâmetros de cor das membranas produzidas. Verifica-se que, como observado a olho nu, as membranas de quitosana e xantana apresentam opacidade superior às de quitosana e alginato. O parâmetro de cor *Hue* permite inferir, com base no diagrama de sequência de cores, que as membranas de Q-A têm tonalidade amarelo-esverdeada, enquanto que as membranas de Q-X são verde-amareladas. No entanto, a intensidade destas cores é bastante baixa, conforme indicado pelos reduzidos valores de *Croma*.

Tabela 5: Dados referentes aos parâmetros de cor e opacidade das membranas.

Membrana	Opacidade (%)	<i>Hue</i>	<i>Croma</i>
Q-A	16,8 ± 0,2 ^a	-81,7 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,0 ^a
Q-X	46,1 ± 0,4 ^b	-48,0 ± 5,3 ^b	0,3 ± 0,0 ^b

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Tendo em vista que uma das características desejáveis para curativos é que sejam translúcidos, a fim de permitir o acompanhamento da cura da lesão, pode-se afirmar que a membrana de quitosana e alginato seria mais adequada, já que apresenta menor opacidade.

4.2. Morfologia da superfície e da seção transversal

Nas Figuras 14 e 15 são apresentadas a morfologia da superfície e da seção transversal das membranas constituídas de quitosana-alginato e quitosana-xantana

obtidas neste trabalho. É possível observar que os filmes de Q-A possuem superfície levemente rugosa, o que não é visível a olho nu, e que há a presença de lamelas ao longo de sua espessura. Já os filmes de Q-X possuem uma superfície ondulada e apresentam fibras ao longo de sua estrutura, assim como também é possível se observar a olho nu. Além disso, a imagem da seção transversal revela que existe também a presença de lamelas nestas membranas, sendo estas menos compactas em relação às aquelas observadas nas membranas de Q-A. Nas escalas analisadas não foi possível observar a presença de poros em nenhuma das amostras.

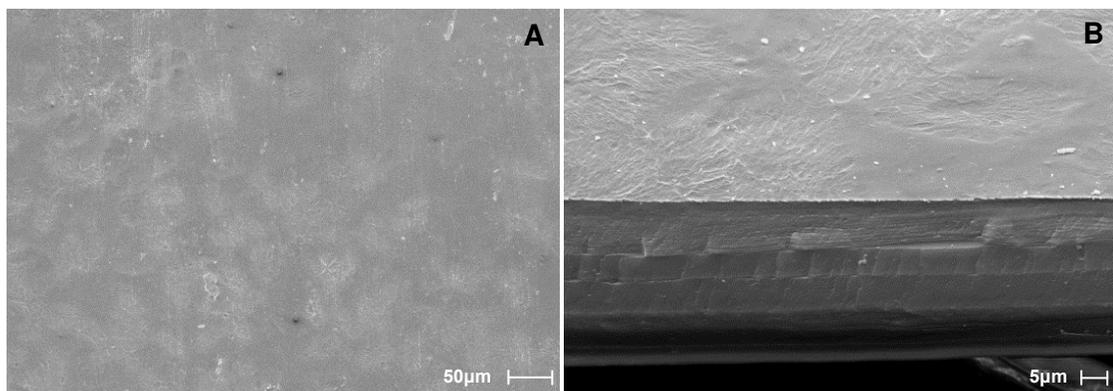


Figura 14: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de quitosana e alginato.

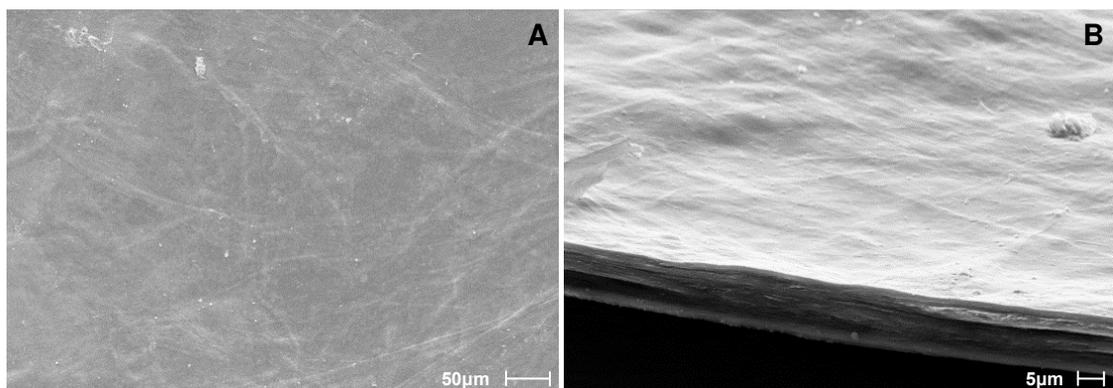


Figura 15: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de quitosana e xantana.

4.3. Comportamento das membranas na presença de água

4.3.1. Ângulo de contato com água

A medida do ângulo de contato fornece informações importantes sobre o caráter de hidrofiliicidade ou hidrofobicidade de uma superfície. Conhecendo-se essas informações a respeito de filmes utilizados como curativos é possível prever seu comportamento em resposta a um contato superficial com o exsudato proveniente da lesão.

Uma molhabilidade considerável ocorre para ângulos até 90°, sendo que um aumento do ângulo de 0° a 90° significa uma diminuição da hidrofiliicidade do material. Portanto, quanto maior o ângulo obtido, menor é a hidrofiliicidade da superfície (Florence e Attwood, 2003).

Na Tabela 6 são apresentados os valores de ângulo de contato com água obtidos para os filmes de quitosana, alginato e xantana individualmente, além dos dados para as membranas obtidas com os PECs de quitosana-alginato e quitosana-xantana. O aspecto típico das gotas de água depositadas na superfície dos materiais é indicado na Figura 16.

O ângulo de contato obtido para a membrana de quitosana-xantana foi de $83,2 \pm 6,3$ graus, indicando que sua superfície possui razoável molhabilidade, porém apresenta hidrofiliicidade moderada. Observa-se que este valor se encontra entre aqueles obtidos para os filmes dos polímeros isolados, ou seja, $71,7 \pm 6,3$ e $89,9 \pm 4,3$ graus para a quitosana e a xantana, respectivamente. Conforme mencionado no trabalho de Fernandes (2009), a quitosana apresenta ângulos de contato muito variáveis de acordo com a literatura, sendo que algumas publicações relatam valores próximos de 70 graus (Shi *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009), assim como o obtido neste trabalho. A hidrofiliicidade da quitosana está relacionada aos grupamentos amina presentes ao longo de sua estrutura. As cargas positivas, que surgem quando os

grupos amina são protonados, diminuem a energia livre da superfície, o que acarreta uma melhora da característica de molhabilidade. Quando a xantana é combinada com a quitosana, os grupos amina desta última passam a interagir com os grupos COO^- da xantana, o que ocasiona a redução da carga positiva líquida da quitosana e um consequente aumento do ângulo de contato. O fato de a própria xantana formar filmes de característica menos hidrofílica também justifica o aumento do ângulo de contato obtido para as membranas de quitosana-xantana quando comparado àquele obtido para o filme de quitosana.

Tabela 6: Ângulos de contato em água obtidos para as diferentes formulações

Formulação	Quitosana	Alginato	Xantana	Quitosana-Alginato	Quitosana-Xantana
Ângulo de contato (graus)	$71,7 \pm 3,2^a$	$45,4 \pm 5,1^d$	$89,9 \pm 4,3^c$	$53,3 \pm 3,3^b$	$83,2 \pm 6,3^e$

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

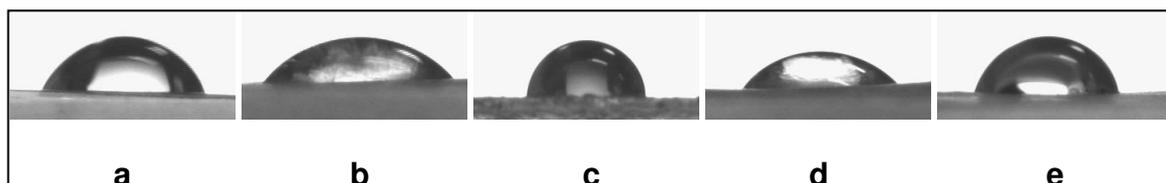


Figura 16: Aspecto típico das gotas de água depositadas na superfície das diferentes formulações de membranas: a) quitosana; b) alginato; c) xantana; d) quitosana-alginato; e) quitosana-xantana.

Já para as membranas de quitosana-alginato, obteve-se um ângulo de contato de $53,3 \pm 3,3$ graus, o que indica que sua superfície possui caráter mais hidrofílico que a superfície da membrana de quitosana-xantana. Observa-se que este valor é intermediário àqueles obtidos para os filmes dos polímeros isolados correspondentes,

sendo que o mesmo comportamento foi observado nos trabalhos de Shi *et al.* (2008) e Li e Ciou (2010). Os últimos mencionaram que a adição de quitosana, um polímero insolúvel em água, ao alginato, um polímero solúvel no mesmo solvente, fez com que a mistura resultante fosse menos hidrofílica que o alginato. Supõe-se, então, que este efeito é predominante em relação ao efeito do aumento do ângulo de contato da quitosana que seria ocasionado pelas interações entre os grupos carboxila do alginato e amina da própria quitosana, conforme explicado no parágrafo anterior.

Frente a estes resultados, pode-se afirmar que, em uma situação em que ocorre contato rápido com a água, como é a situação que se tem para a obtenção do ângulo de contato, a superfície da membrana de quitosana-xantana se mostra menos hidrofílica em relação à da de quitosana-alginato. Isso significa que, provavelmente, as ramificações presentes nas cadeias de xantana dificultem mais a entrada de água do ponto de vista instantâneo.

4.3.2. Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas

A capacidade de absorção e perda de massa das membranas em soluções aquosas foram avaliadas em diferentes fluidos, sendo eles água deionizada, solução salina (NaCl 0,9% m/v), tampão fosfato salino, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino. Na Tabela 7 são apresentados os valores das propriedades em questão para as duas formulações de membranas. A importância do uso de cada um dos fluidos foi anteriormente esclarecida, sendo que, em suma, pode-se afirmar que este ensaio fornece informações relevantes quanto ao comportamento e estabilidade das membranas no ambiente fisiológico, ou seja, quando em contato com o exsudato proveniente do ferimento ou mesmo quando em contato com soluções utilizadas para a limpeza do local.

Quanto à capacidade de absorção de soluções aquosas, pode-se observar que ambas as membranas apresentaram absorção de água mais elevada em relação aos

outros fluidos, sendo elas $18,6 \pm 1,1$ g/g e $58,0 \pm 2,6$ g/g, para Q-A e Q-X, respectivamente, assim como observado nos trabalhos de Girata (2011), Veiga (2012) e Pires (2013). Paralelamente a esta análise, pode-se dizer sobre o comportamento dessas membranas que, apesar de resultarem em maior ângulo de contato quando expostas rapidamente à água, quando em contato lento com este solvente, a membrana de quitosana-xantana é a que apresenta maior absorção, supondo-se que, uma vez que a água penetre em sua estrutura, suas ramificações atuam de modo a manter maior quantidade de moléculas aprisionadas na matriz polimérica.

Tabela 7: Valores obtidos para a capacidade de absorção de soluções aquosas por 24 h a 37°C e perda de massa das membranas por 7 dias a 37°C.

Solução	Capacidade de absorção (g/g)		Perda de massa (%)	
	Q-A	Q-X	Q-A	Q-X
Água	$18,6 \pm 1,1^{A,a}$	$58,0 \pm 2,6^{B,a}$	$8,5 \pm 1,3^{C,a}$	$25,3 \pm 4,5^{D,a}$
SS	$12,5 \pm 0,9^{A,b,c}$	$6,0 \pm 0,5^{B,b}$	$10,4 \pm 1,5^{C,a}$	$9,5 \pm 2,1^{C,b}$
PBS	$13,8 \pm 0,4^{A,b}$	$4,6 \pm 0,5^{B,b}$	$19,2 \pm 1,5^{C,b}$	$13,6 \pm 1,1^{D,b}$
FCS	$11,8 \pm 0,2^{A,b,d}$	$5,2 \pm 0,4^{B,b}$	$17,7 \pm 0,9^{C,b}$	$10,0 \pm 0,3^{D,b}$
SFB	$10,6 \pm 1,5^{A,c,d}$	$5,0 \pm 0,9^{B,b}$	$22,5 \pm 0,7^{C,c}$	$100^{*D,c}$

*Completa desintegração da membrana.

SS: Solução salina NaCl 0,9%; PBS: Tampão fosfato salino; FCS: Fluido corpóreo simulado; SFB: soro fetal bovino. Letras maiúsculas referem-se à comparação de membranas de formulações diferentes para a mesma solução e letras minúsculas à comparação de membranas de mesma formulação em diferentes soluções. Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Para as demais soluções, a absorção permaneceu praticamente inalterada, mantendo-se entre 10 e 14 g/g, e 5 e 6 g/g para os filmes de Q-A e Q-X, respectivamente. Pode-se atribuir este resultado ao fato de que a presença de grande quantidade de íons nos meios complexos diminui o potencial osmótico e faz com que a entrada de água na matriz seja reduzida.

Os valores obtidos foram próximos àqueles apresentados por Veiga (2012) para membranas de Q-X. Já Bellini *et al.* (2012) obtiveram valores superiores de absorção de água para filmes de Q-X, 86 g/g, o que provavelmente se deve à maior vazão de adição de quitosana à xantana utilizada durante o processamento (600 mL/h) do que a utilizada no presente trabalho (300 mL/h). Veiga e Moraes (2011) reportaram o aumento da capacidade de absorção de água de membranas de Q-X com o aumento da vazão de adição de quitosana durante a produção dos filmes. Pode-se atribuir este comportamento ao fato de que, ao se utilizar maiores vazões, a rede polimérica não consegue se estabelecer de forma tão organizada quanto para menores vazões e, por isso, existe uma maior quantidade de lacunas na rede formada, o que facilita a entrada e retenção de água em sua estrutura.

Em relação aos dados obtidos para a perda de massa em soluções aquosas, pode-se observar que, para as membranas de quitosana-alginato, exceto para a água, os valores obtidos são superiores àqueles apresentados no trabalho de Girata (2011) e similares aos obtidos por Pires (2013). Nota-se que a menor perda de massa foi obtida para filmes expostos à água e solução salina. Tendo em vista que as condições de pH dos meios são de 4,9; 5,5; 7,4; 7,4 e 7,2 para água, SS, PBS, FCS e SFB, respectivamente, pode-se afirmar que, quando expostas à água ou SS, as interações entre Q e A nas matrizes são favorecidas, uma vez que nessas condições de pH a quitosana estaria protonada e o alginato teria carga negativa. Já nas demais soluções, as interações entre Q e A seriam desfavorecidas, o que provocaria uma maior solubilização das cadeias livres, aumentando a perda de massa. Dessa forma, os valores relativamente elevados de perda de massa obtidos para esta formulação podem ser atribuídos à solubilização de cadeias de quitosana e alginato que não foram efetivamente complexadas durante o processamento.

Dentre os solventes em que não houve perda de integridade estrutural do material, a perda de massa nas membranas de quitosana-xantana foi maior em água, uma vez que esta é absorvida em maior quantidade pelos filmes, o que torna as cadeias poliméricas mais flexíveis, facilita a transferência de massa e promove seu

arraste para fora da matriz polimérica. No meio SFB, houve completa desintegração da membrana, o que pode ser justificado pelo fato de que as proteínas presentes no soro possivelmente enfraquecem ou até mesmo rompem as interações de natureza hidrofóbica, eletrostática ou de ligações de hidrogênio presentes entre os constituintes da matriz polimérica (Veiga, 2012).

4.3.3. Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água

Como já descrito anteriormente, dentre as principais características de um curativo ideal se encontram sua capacidade de absorver o excesso de exsudato proveniente do ferimento e permitir a troca gasosa no local, propiciando, dessa forma, um microambiente adequado para uma cicatrização eficiente. É importante que a lesão seja mantida úmida, uma vez que nessa condição o ambiente se torna mais rico em células sanguíneas, enzimas, citocinas e fatores de crescimento que favorecem uma rápida cicatrização, livre de infecções (Stashak *et al.*, 2004). Logo, ferimentos pouco exsudativos requerem curativos com baixa taxa de transmissão de vapor d'água, enquanto para ferimentos exsudativos tem-se o oposto. De fato, é necessário que haja um balanço no que se refere à remoção ou não de exsudato, uma vez que um ambiente excessivamente úmido em torno da ferida pode atrasar sua cicatrização e favorecer a proliferação de bactérias (Abdelrahman e Newton, 2011).

De acordo com White e Cutting (2006), a permeação de vapor d'água através de um filme polimérico utilizado como curativo ocorre segundo o seguinte mecanismo: inicialmente a matriz absorve o fluido proveniente do ferimento, que é então incorporado à sua estrutura, formando uma camada na qual as demais moléculas de água ali presentes podem se difundir facilmente. Parte destas moléculas é então perdida para o ambiente por um processo de evaporação e a eficiência deste processo depende, dentre outros fatores, da quantidade de fluido inicialmente absorvida.

Na Tabela 8 são apresentados os valores para permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) para as membranas de quitosana e xantana e quitosana e alginato.

Tabela 8: Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) obtidos para as membranas de quitosana-xantana e quitosana-alginato.

Formulação	PVA (g.mm/m².dia.kPa)	TTVA (g/m².dia)
Q-X	44,3 ± 1,8 ^a	1048,9 ± 106,6 ^a
Q-A	20,8 ± 1,7 ^b	707,5 ± 15,0 ^b

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Pode-se observar que o valor da taxa de transmissão de vapor d'água diária obtido para a membrana de Q-A foi inferior àquele apresentado por Rodrigues (2008), de aproximadamente 2700 g/m².dia, porém mais próximo daquele obtido por Meng *et al.* (2010), de aproximadamente 618 g/m².dia. No trabalho de Rodrigues (2008), o ensaio foi realizado a 35°C, enquanto no outro, a temperatura foi de 32°C, a mesma utilizada no presente trabalho, mais próxima da temperatura da pele normal. Veiga (2012) obteve um valor superior da taxa de transmissão de vapor d'água diária da membrana de Q-X, sendo ele de aproximadamente 1461 g/m².dia.

Segundo Lamke *et al.* (1977), a pele normal possui uma taxa de transmissão de vapor d'água de 204 g/m².dia, porém a pele lesionada perde uma maior quantidade de água, de forma dependente do tipo da lesão, conforme mostrado na Tabela 9.

Neste contexto, é possível afirmar que, por apresentarem TTVA não muito elevada, as membranas obtidas neste trabalho seriam mais adequadas para lesões pouco ou moderadamente exsudativas, porém poderiam também ser aplicadas em lesões mais exsudativas, uma vez que sua capacidade de absorção de fluidos é relativamente elevada. Dessa forma, seria possível garantir que o ambiente da lesão permaneça com uma umidade adequada para promover sua recuperação.

Tabela 9: Taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) para a pele normal e lesada (adaptada de Lamke *et al.*, 1977).

Área estudada	TTVA (g/m ² .dia)
Pele normal	204
Queimadura de 1º grau	278
Queimadura de 2º grau	4274
Queimadura de 3º grau	3436

4.3.4. Propriedades mecânicas e espessura em diferentes condições de umidade

A caracterização das propriedades mecânicas é importante pois as membranas utilizadas como curativos devem ser duráveis, apresentando um balanço entre resistência, flexibilidade e capacidade de alongamento, de modo a suportar os estresses mecânicos impostos pelas diferentes partes do corpo, principalmente aquelas próximas às articulações, como joelhos e cotovelos. Além disso, é importante que as membranas sejam facilmente aplicáveis e removíveis no local da lesão, evitando provocar danos maiores na região (Boateng *et al.*, 2008).

As propriedades mecânicas de membranas polissacarídicas dependem da umidade relativa do ambiente ao qual estas estão expostas. De acordo com resolução da Anvisa (2003), o ambiente hospitalar deve ter umidade relativa mantida entre 40% e 60%. Entretanto, as condições de umidade relativa às quais as membranas podem ser expostas incluem valores além dessa faixa, abrangendo as condições utilizadas durante seu processamento e armazenamento e até mesmo em seu uso como curativo. Tendo isso em vista, os resultados apresentados neste trabalho visaram o entendimento do comportamento das propriedades mecânicas das membranas em condições de umidade relativa variadas. A análise das membranas em condição úmida é importante, pois assim é possível se observar o comportamento exibido por elas quando utilizadas

em ferimentos de pele nos estágios iniciais de recuperação, nos quais maior quantidade de exsudato é liberada.

Os valores encontrados para a espessura, tensão e alongamento na ruptura das membranas encontram-se listados na Tabela 10.

Tabela 10: Espessura e propriedades mecânicas das membranas de quitosana-xantana e quitosana-alginato em diferentes condições de umidade relativa (UR).

Formulação	UR (%)	Espessura (µm)	Tensão na ruptura (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
Q-A	22	69 ± 12 ^{A,a}	38,0 ± 16,0 ^{A,a}	4,0 ± 0,9 ^{A,a}
	33	60 ± 6 ^{C,a,b}	48,1 ± 14,5 ^{C,a}	3,3 ± 1,6 ^{C,a}
	52	60 ± 7 ^{F,a,c}	40,3 ± 15,7 ^{F,a}	3,0 ± 0,8 ^{E,a}
	75	57 ± 8 ^{H,b,c,d}	52,6 ± 8,5 ^{I,a}	4,7 ± 0,7 ^{G,a}
	89	59 ± 5 ^{K,a,d}	19,3 ± 4,0 ^{L,b}	10,1 ± 3,1 ^{J,b}
	úmida	85 ± 7 ^{M,e}	4,2 ± 0,8 ^{N,b}	24,2 ± 5,3 ^{L,c}
Q-X	22	104 ± 13 ^{B,a}	9,4 ± 2,6 ^{B,c}	1,7 ± 0,4 ^{B,d}
	33	100 ± 8 ^{D,a,b}	9,1 ± 3,6 ^{D,c,f}	1,9 ± 0,4 ^{D,d}
	52	86 ± 11 ^{G,b}	8,8 ± 3,6 ^{G,c,f}	1,8 ± 0,6 ^{F,d}
	75	91 ± 8 ^{I,a,b}	4,5 ± 1,5 ^{J,d,e}	1,4 ± 0,2 ^{H,d}
	89	92 ± 13 ^{L,a,b}	5,4 ± 1,3 ^{M,d,f}	2,6 ± 0,3 ^{K,d}
	úmida	90 ± 4 ^{M,a,b}	0,9 ± 0,2 ^{O,e}	46,0 ± 6,1 ^{M,e}

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas referem-se à comparação de membranas de formulações diferentes para a mesma umidade. Letras minúsculas referem-se à comparação de membranas de mesma formulação para diferentes umidades.

Era esperado que, com o aumento da umidade relativa de exposição das membranas, a espessura destas aumentasse devido a uma maior absorção de água em umidades mais elevadas. Porém, analisando-se os resultados apresentados na

Tabela 10, pode-se afirmar que para ambas as formulações o comportamento esperado não foi observado, já que para todas as umidades a espessura foi pouco alterada. Isto se deve, provavelmente, à dificuldade da medida desta propriedade em amostras úmidas, uma vez que estas são mais compressíveis que as amostras secas. Além disso, a variação das espessuras ao longo de uma mesma amostra, possivelmente decorrente de uma distribuição não homogênea do material quando este foi transferido para a placa de Petri, ou mesmo de uma secagem não uniforme da membrana, deu origem a um desvio padrão elevado para cada conjunto de medições. Isso pode afetar os resultados na análise comparativa para determinação de diferença significativa entre amostras em diferentes umidades. Nota-se ainda que as membranas de Q-X apresentaram maior espessura para toda a faixa de umidade utilizada, exceto na condição úmida, o que pode ser atribuído à sua estrutura que, por apresentar lamelas, é menos compacta que a das membranas de Q-A.

Para evitar os problemas relativos às medidas de espessura, poderiam ter sido utilizadas, alternativamente, técnicas como a perfilometria óptica ou a elipsometria. No entanto, a dificuldade imposta pela necessidade de se fazer as medidas de espessura imediatamente antes do ensaio mecânico, para a obtenção das medidas em uma mesma condição de umidade, inviabilizou o uso destas técnicas.

Segundo Ma *et al.* (2001), substitutos artificiais da pele devem apresentar menor espessura que a derme humana, cujo valor varia de 500 μm a 3000 μm , dependendo da idade, sexo e área do corpo. Logo, do ponto de vista desta propriedade, é possível afirmar que as membranas de Q-X e de Q-A obtidas são adequadas à aplicação como curativos.

Para a formulação de Q-X, Veiga (2012) obteve os valores de $5,99 \pm 1,10$ MPa e $2,61 \pm 0,21$ % para a tensão e alongamento na ruptura, respectivamente, enquanto Veiga e Moraes (2011) obtiveram $5,23 \pm 1,07$ MPa e $1,82 \pm 0,78$ % para as mesmas propriedades, em umidade relativa aproximada de 40%. Comparando-se estes valores com os dados obtidos neste trabalho, nota-se que há similaridade nos resultados encontrados. Já para membranas de Q-A, os valores aqui obtidos para a tensão na

ruptura foram superiores àqueles dos trabalhos de Rodrigues (2008), Girata (2011) e Pires (2013), também a uma umidade relativa aproximada de 40%, sendo eles 28 ± 3 MPa, $9,79 \pm 1,51$ MPa e $2,33 \pm 0,58$ MPa, respectivamente. O alongamento na ruptura, por sua vez, foi inferior ao obtido por Rodrigues (2008), 8 ± 3 %, porém semelhante ao dos trabalhos das outras duas autoras, que apresentaram valores de $3,25 \pm 1,43$ % e $2,15 \pm 0,32$ %. Visto que pequenas variações no procedimento de preparação das membranas ocorreram nos diferentes trabalhos, materiais com características um pouco distintas na estruturação do PEC podem ter sido utilizados, o que explicaria a não coincidência dos valores alcançados.

Comparando-se os valores de tensão na ruptura apresentados no trabalho de Veiga (2012) para outras formulações de membrana, sendo elas quitosana-goma guar e quitosana-pectina (10 MPa e 24 MPa, respectivamente), e ainda os valores obtidos para esta propriedade para as membranas de Q-A neste trabalho, pode-se afirmar que os valores obtidos para a formulação de Q-X são relativamente baixos. As estruturas das cadeias poliméricas dos compostos utilizados podem explicar o comportamento observado. Enquanto o alginato é um polímero de cadeia linear, a xantana apresenta cadeia altamente ramificada. As forças intermoleculares que mantêm as cadeias poliméricas unidas tendem a ser mais fracas em polímeros ramificados, já que o impedimento espacial causado pelas ramificações torna mais difícil a aproximação dessas cadeias. Por isso, as membranas de Q-X, apesar de mais maleáveis, são mais frágeis e quebradiças, o que é refletido no seu baixo valor de alongamento na ruptura em umidades mais baixas. Pode-se então afirmar que a linearidade da cadeia de alginato explica o fato de a formulação Q-A ser a mais resistente.

Nota-se que, para as membranas de Q-A, ambas as propriedades analisadas começam a ter variação significativa somente ao atingir a umidade de 89%. Isto significa que, nesta umidade, a quantidade de moléculas de água que penetra em sua estrutura já é capaz de desorganizá-la. Assim como para o filme de Q-A, pode-se observar que tanto a tensão quanto o alongamento na ruptura das membranas de Q-X, sofrem variações apreciáveis quando as membranas estão úmidas, isto é, na condição

para a qual elas foram submergidas em água por 15 segundos. Isto se deve à entrada massiva das moléculas de água na estrutura da membrana, fazendo com que ocorra a desestruturação do empacotamento das lamelas e a desorganização das cadeias do complexo polimérico. Esse comportamento foi mais pronunciado nas membranas de Q-X, uma vez que a cadeia mais ramificada da xantana possivelmente promoveu aprisionamento de maior quantidade de moléculas de água, e por isso esta formulação apresentou o maior alongamento na condição úmida. Rodrigues (2008) observou o mesmo comportamento para membranas de Q-A.

Segundo Edwards e Marks (1995), a tensão na ruptura apresentada pela pele varia de 5 a 30 MPa. Os valores obtidos para a formulação de Q-X neste trabalho estão compreendidos nesta faixa, exceto pelo valor encontrado para membranas úmidas, enquanto que para a formulação de Q-A, apenas na umidade de 89% é que se tem um valor dentro desta faixa. Sendo assim, pode-se afirmar que as membranas de Q-X analisadas entre as umidades de 22% a 89% e as membranas de Q-A analisadas a 89% de umidade apresentam característica de tensão na ruptura próxima à da pele e portanto seriam adequadas para serem empregadas como curativos na terapia de lesões a este órgão.

4.4. Caracterização de membranas contendo diferentes proporções de eritromicina

4.4.1. Capacidade de absorção e perda de massa em etanol

A determinação da capacidade de absorção e perda de massa em etanol visa o entendimento do comportamento das membranas quando expostas a este solvente. Amostras capazes de absorver etanol tenderiam a reter em sua estrutura maiores proporções de agentes ativos nele dissolvidos quando de sua exposição à solução de incorporação. Dispositivos estáveis na presença deste solvente com relação à variação

de massa tenderiam a ser mais atrativos se esta abordagem de incorporação é pretendida.

A eritromicina apresenta alta solubilidade em etanol e baixa solubilidade em água e, por esse motivo, soluções etanólicas desse composto foram escolhidas para se realizar sua incorporação nas membranas de quitosana-xantana e quitosana-alginato por impregnação.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos para absorção e perda de massa das membranas em etanol.

Tabela 11: Resultados dos testes de absorção de etanol e perda de massa em etanol.

Período de exposição (h)	Amostra	Abs (g_{etanol}/g_{membrana})	M_p (%)
1	Q-A	0,6 ± 0,1 ^{a,A}	4,2 ± 0,5 ^{a,A}
	Q-X	0,7 ± 0,1 ^{a,C}	8,2 ± 0,6 ^{b,C}
24	Q-A	0,3 ± 0,1 ^{a,B}	6,2 ± 0,3 ^{a,B}
	Q-X	0,9 ± 0,2 ^{b,C}	11,7 ± 0,4 ^{b,D}

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se à comparação de membranas de diferentes formulações expostas ao solvente durante o mesmo tempo e letras maiúsculas referem-se à comparação de membranas de mesma formulação expostas por um período de tempo diferente.

De acordo com os resultados obtidos para o teste de absorção, pode-se dizer que ambas as formulações apresentaram absorção relativamente baixa de etanol quando comparada à absorção de água apresentada anteriormente. A membrana de Q-X apresentou maior absorção de etanol que a de Q-A, sendo possível perceber que a formulação de Q-X não apresenta alteração desta propriedade com o aumento do tempo de exposição ao solvente, ao passo que para a membrana de Q-A houve uma redução da absorção. Isso pode ser relacionado com os resultados de perda de massa. Por ter a maior absorção, possivelmente a formulação Q-X tenha também maior solubilidade em etanol e, portanto, maior facilidade de desestabilização neste solvente

do que os outros sistemas. A perda de massa da membrana de Q-X provavelmente foi maior devido à maior capacidade de penetração de etanol na matriz, facilitando a transferência de massa e assim o arraste das cadeias livres na membrana para fora de sua estrutura. Embora a perda de massa aumente com o tempo para ambas as formulações, os valores resultantes são relativamente baixos, e seu impacto no desempenho das matrizes seria pouco significativo.

Para o ensaio de incorporação por imersão das membranas em solução etanólica, optou-se então pela realização do mesmo durante um período de 1 h, já que não houve diferença significativa na quantidade de etanol absorvida pelas membranas para um tempo de exposição de 24 h.

4.4.2. Eficiência de incorporação da eritromicina

A Tabela 12 mostra os resultados de eficiência de incorporação da eritromicina às membranas de Q-A e Q-X pelo método da adição direta.

Tabela 12: Dados obtidos para incorporação da eritromicina a membranas de quitosana e alginato e quitosana e xantana pelo método da adição direta à mistura polimérica.

Formulação	Eritromicina adicionada (mg/g)	Eritromicina retida na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Q-A	20	8,1 ± 2,0	41,9 ± 3,0
	40	18,1 ± 3,2	47,7 ± 6,0
	60	25,5 ± 2,8	44,1 ± 1,9
Q-X	20	10,5 ± 2,0	49,9 ± 2,2
	40	22,4 ± 3,6	52,3 ± 3,2
	60	34,8 ± 5,1	53,6 ± 4,3

Observa-se que para ambas as formulações, os valores de eficiência de incorporação podem ser considerados satisfatórios, ficando entre 42 e 54%. Uma eficiência maior não foi obtida provavelmente porque grande parte das partículas de eritromicina adicionadas à mistura ficaram somente depositadas na matriz da membrana formada, acumulando-se preferencialmente na superfície voltada para a placa ou para o ar, o que pode ter ocorrido devido à falta de afinidade do composto pelas matrizes hidrofílicas. Essas partículas podem ter sido arrastadas durante a lavagem das membranas e por isso verificou-se perda apreciável de eritromicina nesta etapa. Provavelmente, as moléculas que permanecem são, em sua grande maioria, aquelas que conseguiram se depositar nas camadas subjacentes às superfícies ou mais internas à membrana.

Na Tabela 13 são apresentados os resultados da eficiência de incorporação da eritromicina às membranas pelo método da impregnação em solução etanólica. Observa-se que eficiências mais baixas de incorporação foram obtidas para ambas as formulações quando comparadas com o resultado da incorporação pelo outro método estudado. Essa baixa eficiência está relacionada à baixa absorção de etanol pelas membranas pois, tendo em vista que o etanol funciona como veículo para a incorporação do composto, seria já esperado que quanto menor a absorção deste solvente, proporcionalmente menor também seria a quantidade de composto retido nas matrizes poliméricas. Possivelmente pelo fato de que as membranas de Q-X possuem capacidade de absorção de etanol maior que as de Q-A, a quantidade de composto ativo retido na estrutura das membranas de Q-X é também maior. Vale ressaltar que, apesar da baixa eficiência de incorporação, as quantidades de droga retida nas membranas foram muito superiores às obtidas quando a eritromicina foi incorporada pelo outro método. O mesmo comportamento foi observado no trabalho de Veiga (2012), no qual a autora destacou a possibilidade de se reaproveitar o fármaco remanescente na solução de impregnação para processos posteriores, aumentando dessa forma a eficiência global do processo.

Tabela 13: Dados obtidos para incorporação da eritromicina a membranas de quitosana e alginato e quitosana e xantana pelo método de impregnação em solução etanólica

Formulação	Concentração inicial de eritromicina no solvente (mg/mL)	Eritromicina adicionada (mg/g)	Eritromicina retida na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Q-A	1,0	802,7 ± 57,9	82,7 ± 18,4	10,3 ± 2,4
	3,0	2178,3 ± 176,5	430,3 ± 65,7	19,8 ± 2,8
	5,0	3868,8 ± 677,4	673,8 ± 134,8	17,4 ± 0,4
Q-X	1,0	1684,3 ± 212,2	143,5 ± 7,1	8,6 ± 0,7
	3,0	5339,1 ± 1549,6	837,7 ± 190,5	16,6 ± 5,2
	5,0	10818,7 ± 413,5	2127,9 ± 130,4	9,7 ± 2,0

4.4.3. Aspecto visual, cor e opacidade das membranas

Neste item são apresentados o aspecto, cor e opacidade das membranas de quitosana e alginato e quitosana e xantana às quais a eritromicina foi incorporada pelo método da adição direta. É importante destacar que estas caracterizações não foram realizadas para os filmes nos quais a eritromicina foi incorporada pelo método da impregnação em solução etanólica. Isso se deve ao fato de que tais caracterizações requerem amostras de tamanho maior que aquelas obtidas no ensaio de incorporação e a obtenção dessas amostras maiores exigiria uma massa elevada de eritromicina que, no entanto, não estava disponível em quantidade suficiente.

Na Figura 17 é mostrado o aspecto visual das membranas de Q-A e Q-X contendo eritromicina em diferentes proporções. É possível observar que, para uma mesma formulação, o aspecto não se alterou com a variação da quantidade de droga incorporada. Também não houve alteração perceptível no aspecto destas membranas em relação àquelas mostradas na Figura 13, nas quais a eritromicina não havia sido incorporada, logo, a presença do agente ativo não afeta essa propriedade.

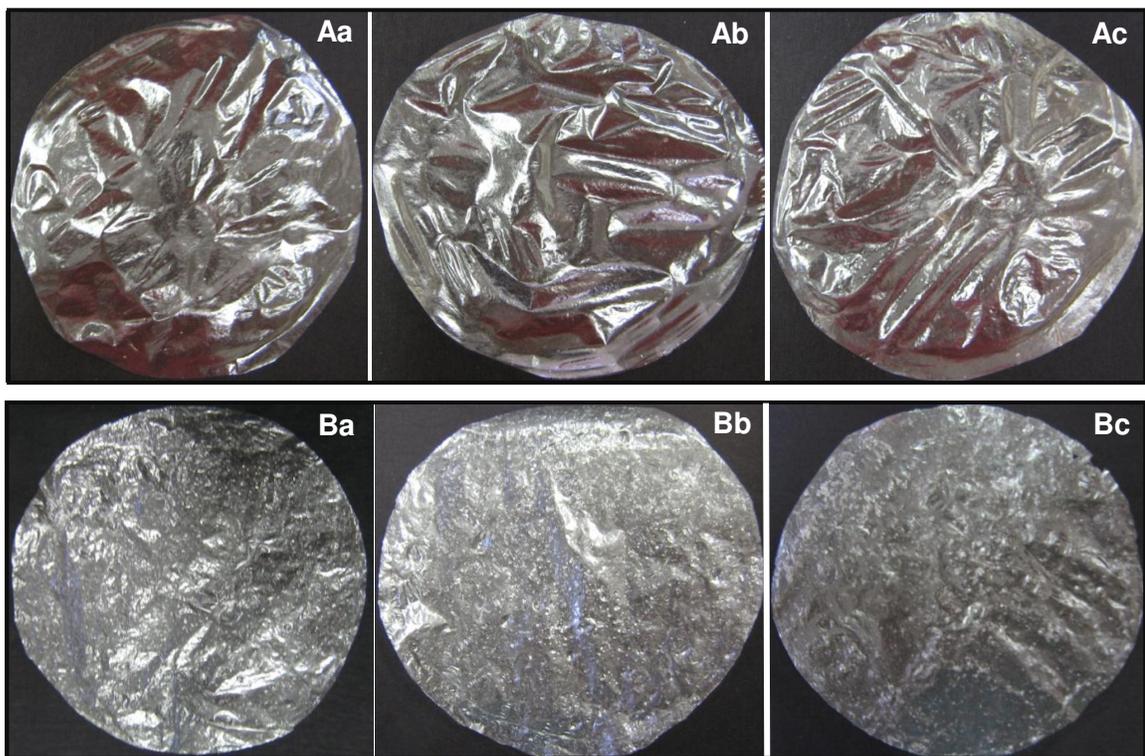


Figura 17: Aspecto visual das membranas de quitosana e alginato (A) e quitosana e xantana (B) às quais eritromicina foi incorporada por adição à mistura polimérica em diferentes concentrações. As proporções de droga adicionadas foram de 20 mg/g (a), 40 mg/g (b) e 60 mg/g (c).

Na Tabela 14 são mostrados os parâmetros de cor e opacidade das membranas que contêm eritromicina. Apesar da alteração não tão perceptível pela análise das imagens fotográficas, houve uma queda na opacidade das membranas de Q-X para todas as proporções de droga incorporadas, quando comparadas às membranas de Q-X nas quais o composto estava ausente (46,1%). Já para as membranas de Q-A com eritromicina, a opacidade se manteve próxima à das membranas de Q-A sem eritromicina (16,8%), ocorrendo uma pequena queda de opacidade com o aumento da quantidade de agente ativo incorporado. A variação da opacidade observada com a incorporação da eritromicina pode ter sido resultado do efeito ocasionado pela introdução do antibiótico, de massa molar relativamente grande,

à mistura polimérica, que acarretaria em uma descontinuidade da rede formada, ou mesmo do espalhamento da luz gerado pela presença das partículas do composto na matriz. No entanto não há evidências suficientes para se apontar a razão do comportamento observado.

Tabela 14: Informações a respeito dos parâmetros de cor e opacidade das membranas às quais eritromicina foi incorporada por adição direta à mistura de polissacarídeos.

Formulação	Proporção de eritromicina na mistura (mg/g)	Opacidade (%)	Hue	Croma
Q-A	20	12,4 ± 1,7 ^a	-78,80 ± 0,5 ^a	3,2 ± 0,1 ^a
	40	9,9 ± 0,9 ^a	-80,64 ± 0,5 ^a	2,4 ± 0,2 ^b
	60	5,3 ± 0,8 ^b	-79,25 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,1 ^c
Q-X	20	17,2 ± 0,6 ^{c,d}	-52,2 ± 6,2 ^b	0,3 ± 0,0 ^d
	40	18,9 ± 1,8 ^c	-46,5 ± 4,9 ^b	0,3 ± 0,0 ^d
	60	15,8 ± 0,2 ^d	-48,3 ± 4,1 ^b	0,3 ± 0,0 ^d

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Os parâmetros *Hue* e *Croma* permaneceram, para ambas as formulações e para todas as quantidades de eritromicina incorporada, muito próximos àqueles mostrados na Tabela 5 para membranas isentas da droga (-81,7 e 1,3 respectivamente para membranas de Q-A e -48,0 e 0,3 para Q-X), indicando que, também nestes parâmetros, a adição de eritromicina à mistura polimérica não tem efeitos significativos.

4.4.4. Morfologia da superfície e da seção transversal

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para todas as amostras contendo o agente ativo incorporado a fim de se verificar se o composto está presente na estrutura e como o mesmo estaria distribuído ao longo do filme.

Na Figura 18 mostra-se o aspecto típico verificado por MEV para a eritromicina. Observa-se que a mesma se apresenta na forma típica de seus cristais, com ampla distribuição de tamanho de partículas, com aspecto compatível com o relatado por Chen *et al.* (2013) para o mesmo fármaco.

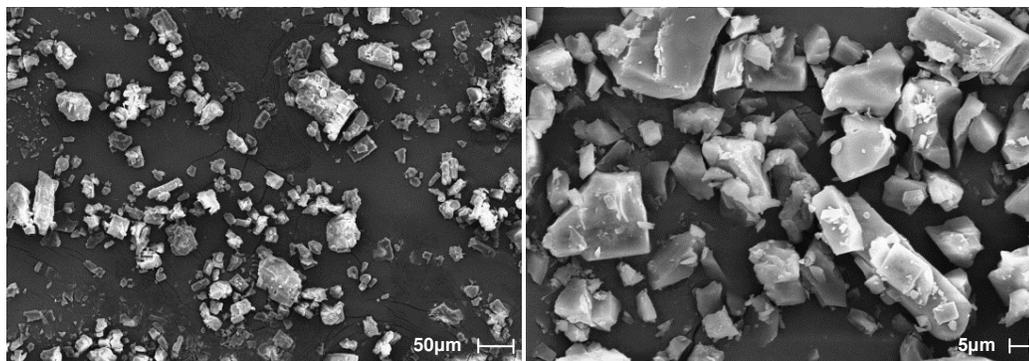


Figura 18: Micrografias da eritromicina obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Na Figura 19 são apresentadas a superfície e a seção transversal de amostras de quitosana-alginato contendo a droga. Nas membranas às quais se incorporou a eritromicina por adição, é possível observar que o antibiótico permaneceu na forma típica apresentada por seus cristais. Nota-se ainda que não há diferença significativa entre as superfícies de amostras às quais se incorporou diferentes quantidades do composto. Isto se deve ao fato de que a distribuição do mesmo pela matriz não é homogênea, e a imagem realizada para cada amostra pode ter abrangido regiões que continham maior ou menor quantidade do antibiótico. A imagem da seção transversal dessas membranas revela que a eritromicina permanece em maior proporção nas bordas inferior e superior, ou seja, na primeira camada e ambas as superfícies, e em pequena quantidade distribuída ao longo da espessura dos filmes. Provavelmente essa preferência pelas bordas seja devido ao fato de que, possuindo pouca afinidade pelo meio hidrofílico da matriz polimérica, a eritromicina sofra exclusão da fase aquosa, acumulando-se nos meios a sua volta com os quais tem mais afinidade, sendo eles a placa de poliestireno, hidrofóbica, e o ar.

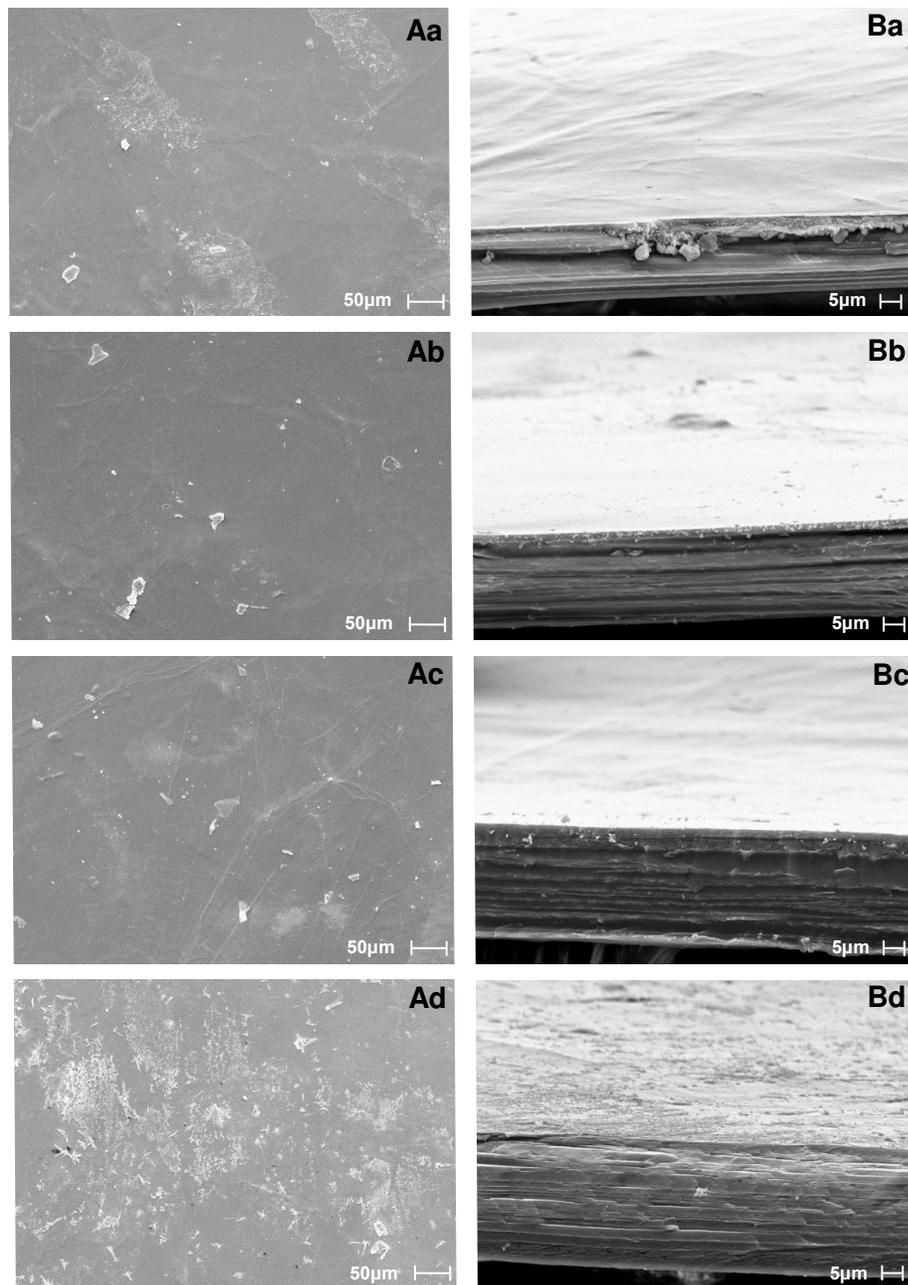


Figura 19: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de quitosana e alginato às quais foi incorporada a eritromicina (a) por adição à mistura polimérica na proporção de 20 mg/g de massa de polímeros, (b) por adição na proporção de 40 mg/g, (c) por adição na proporção de 60 mg/g, (d) por imersão em solução etanólica (concentração 5 mg/mL).

Já para as membranas às quais se incorporou a eritromicina por impregnação etanólica, nota-se que há um depósito do composto sobre a superfície do filme, e que ele está distribuído de forma heterogênea. É possível observar ainda que o antibiótico se encontra agora na forma de pequenas placas alongadas, comportamento este consequente do solvatomorfismo, decorrente do uso do solvente etanol. Analisando a imagem da seção transversal dessa amostra, pode-se dizer que não há presença visível de droga no interior da matriz polimérica, o que provavelmente se deve à baixa absorção de etanol por estas membranas, que acarreta uma baixa absorção do composto e seu depósito preferencial na superfície das mesmas.

Na Figura 20 são apresentadas a superfície e a seção transversal de amostras de quitosana-xantana contendo eritromicina. As imagens obtidas para as superfícies das membranas às quais se incorporou o composto ativo por adição revelam que ocorre o mesmo comportamento observado nas amostras de Q-A, ou seja, o composto se encontra na forma típica apresentada por seus cristais e é distribuído de forma não homogênea na superfície.

Analisando-se as imagens da seção transversal dos filmes é possível notar que a eritromicina se encontra distribuída no interior da matriz. Na micrografia da formulação Q-X-eritromicina 60 mg/g, é possível observar claramente a presença de grânulos na superfície da membrana, o que sugere que o antibiótico se encontra também no interior da primeira camada subjacente à superfície da amostra.

Para as membranas de Q-X às quais se incorporou a eritromicina por impregnação etanólica, nota-se que há um comportamento semelhante àquele das membranas de Q-A no que diz respeito à superfície: existe um depósito do composto sobre a superfície do filme, distribuído de forma heterogênea e na forma de placas alongadas. Analisando a imagem da seção transversal, pode-se notar uma discreta presença de antibiótico no interior da matriz, ao contrário do que se obteve para a formulação Q-A. Pode-se afirmar que, provavelmente, a maior capacidade de absorção de etanol pelas membranas de Q-X do que pelas de Q-A seja o motivo deste resultado.

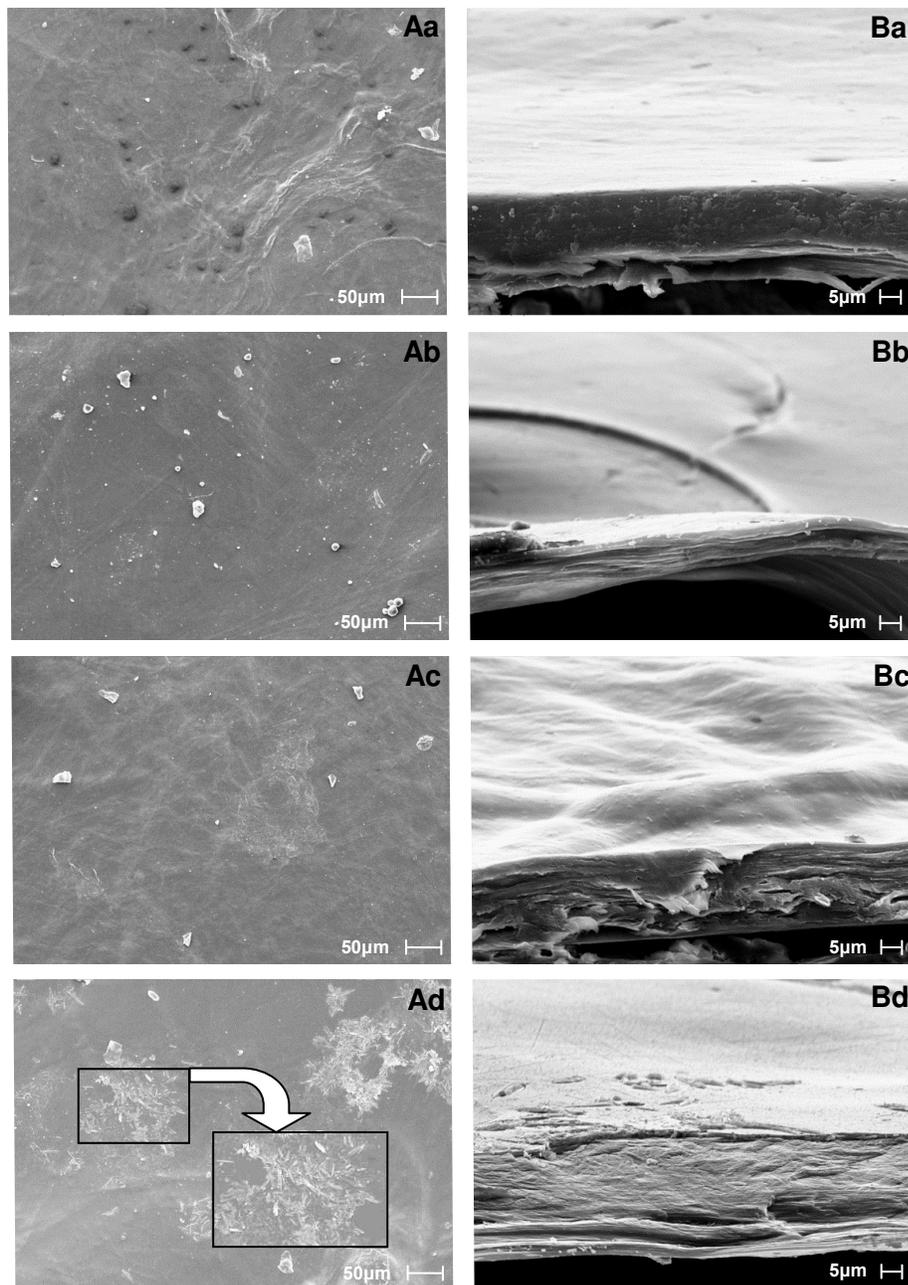


Figura 20: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de quitosana e xantana às quais foi incorporada a eritromicina (a) por adição à mistura polimérica na proporção de 20 mg/g de massa de polímeros, (b) por adição na proporção de 40 mg/g, (c) por adição na proporção de 60 mg/g, (d) por imersão em solução etanólica de concentração 5,0 mg/mL.

4.4.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Nas Figuras 21 e 22 são mostrados os espectros FTIR para as formulações de quitosana e xantana e quitosana e alginato e seus componentes isolados. As análises foram feitas a fim de se verificar as possíveis interações entre os polímeros após a obtenção das membranas, além de modificações na estrutura dos mesmos após a incorporação do composto ativo à matriz polimérica.

Observa-se que os espectros de quitosana, xantana e alginato apresentam uma banda de absorção entre 3600 e 3000 cm^{-1} , referente ao estiramento dos grupos hidroxila presentes na estrutura dos três polímeros. Outra banda aparece entre 3000 e 2800 cm^{-1} , sendo esta relacionada a vibrações axiais de grupos -C-H. Em números de onda próximos a 1000 cm^{-1} , observam-se picos característicos dos polissacarídeos, atribuídos a vibrações dos grupos -C-O, -C-C e -C-O-C (Veiga, 2012; Smitha *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2010; Lungan *et al.*, 2014).

No espectro da quitosana, verifica-se também a presença de um pico em 1643 cm^{-1} , referente à ligação C=O dos grupos amida I ainda acetilados, outro em 1581 cm^{-1} , que diz respeito ao grupamento amina, e mais um pico em 1380 cm^{-1} , relativo à deformação dos grupos -CH₂ (Li *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2010; Smitha *et al.*, 2005).

A xantana apresenta picos em 1730 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} , característicos de grupos acetato, piruvato e glicuronato (Popa *et al.*, 2010; Lungan *et al.*, 2014), conforme se observa no espectro mostrado na Figura 21. Além destes, há outro pico em 1420 cm^{-1} , relativo à vibração de flexão dos grupos -C-H (Gunasekar *et al.*, 2014). Já no espectro do alginato, mostrado na Figura 22, são destacados os picos em 1600 cm^{-1} , referentes à vibração assimétrica de grupos carbonila (-C=O) (Lawrie *et al.*, 2007), e também em 1415 cm^{-1} , que se refere ao estiramento de sais de carboxilato (Smitha *et al.*, 2005).

O espectro da eritromicina apresenta conjuntos de picos em várias faixas de números de onda. Na faixa de 1735 a 1700 cm^{-1} , há picos referentes à deformação do

ângulo do grupo cetona; já na faixa de 1460 a 1340 cm^{-1} , observam-se picos que dizem respeito à deformação angular dos grupos CH_2 e CH_3 . Deformações no grupo éter são indicadas pelos picos presentes na faixa de 1190 a 1000 cm^{-1} (Sotiro, 2007). Além destes picos, a eritromicina apresenta também as bandas características de vibrações de grupos -O-H e de grupos -C-H nas faixas de 3600 a 3000 cm^{-1} e 3000 a 2800 cm^{-1} , respectivamente, assim como observado para os polissacarídeos isolados.

No espectro da membrana de quitosana e xantana, mostrado na Figura 21, observa-se a presença de uma banda de absorção entre 1650 e 1540 cm^{-1} . A formação desta banda se deve à justaposição dos picos referentes aos grupos amino da quitosana, e aos grupos glicuronato da xantana, o que indica a ocorrência de interações entre estes grupos, assim como observado por Veiga (2012). Popa *et al.* (2010) verificaram o aparecimento de uma banda em 1663 cm^{-1} no espectro de hidrogéis de quitosana e xantana, banda esta que não estava presente no espectro da quitosana ou da xantana. Os autores explicaram a formação desta banda única pelo fato de ligações -C-O de grupos carboxila terem entrado em colapso após a complexação dos biopolímeros, comportamento este semelhante ao observado neste trabalho.

Analisando-se os espectros das membranas de quitosana e xantana às quais foi incorporada a eritromicina, tanto por impregnação em solução etanólica como por adição à mistura polimérica, verifica-se que estes espectros têm todos perfil idêntico àquele apresentado pela membrana à qual a eritromicina não foi incorporada. Logo, não foi possível identificar por espectroscopia FTIR, por meio do método ATR, a presença do composto ativo nas membranas de quitosana e xantana. Apesar de não ter sido detectada neste ensaio, as imagens de MEV apresentadas anteriormente comprovaram a presença da eritromicina nas membranas, portanto, supõe-se que houve uma sobreposição dos picos presentes no espectro da eritromicina com aqueles presente no espectro do filme, resultando assim no encobrimento dos picos da droga isolados. Existe também a possibilidade de que a droga não estava presente na região analisada do filme, o que pode ocorrer pois, devido à produção artesanal das membranas, a eritromicina não fica homogeneamente distribuída ao longo de toda a sua área. De fato, nas micrografias é possível observar essa heterogeneidade na

distribuição da eritromicina na superfície dos filmes. Para contornar este problema de detecção do composto ativo, sugere-se a realização da análise FTIR com microscopia acoplada. Este ensaio pode ser feito por meio de diferentes métodos, incluindo ATR, refletância ou transmitância, e permite o direcionamento da análise para uma região na qual a droga estaria efetivamente presente. Neste trabalho, no entanto, não houve tempo hábil para se testar a utilização deste tipo de análise.

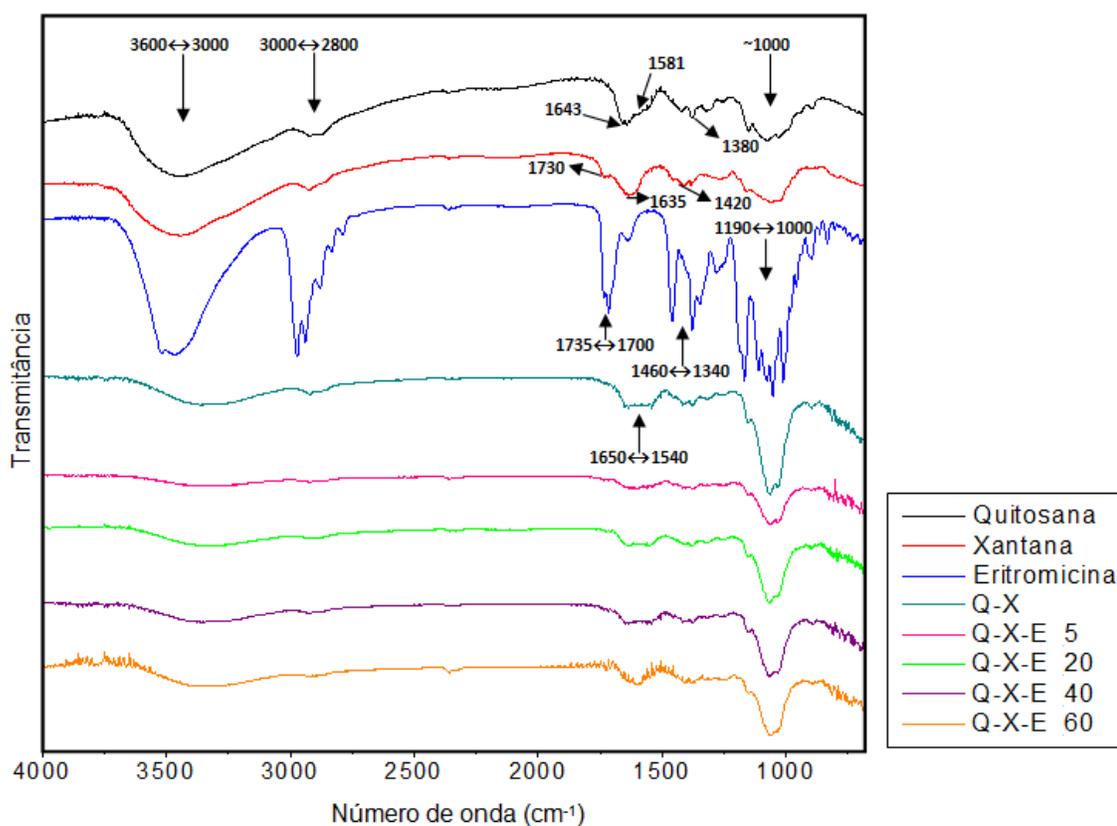


Figura 21: Espectro FTIR obtido para as membranas de quitosana e xantana contendo ou não eritromicina incorporada pelos métodos da impregnação do composto em solução etanólica de concentração 5 mg/mL (formulação Q-X-E 5) e adição do composto à mistura polimérica nas proporções de 20, 40 e 60 mg/g (formulações Q-X-E 20, Q-X-E 40 e Q-X-E 60, respectivamente). Também são mostrados os espectros dos componentes isolados. Para favorecer a visualização das diferenças e similaridades entre os espectros, a escala do eixo da transmitância foi expandida para as amostras Q-X, Q-X-E 5, Q-X-E 20, Q-X-E 40 e Q-X-E 60.

No espectro da membrana de quitosana e alginato, mostrado na Figura 22, observa-se a presença de dois picos de absorção, em 1600 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} . Espectro semelhante foi obtido por Li *et al.* (2005) para scaffolds de quitosana e alginato reticulados com cálcio. Os autores atribuíram a presença do pico na faixa de 1600 cm^{-1} à interação dos grupos amino da quitosana com grupos carboxílicos residuais do alginato, formando assim a rede polimérica.

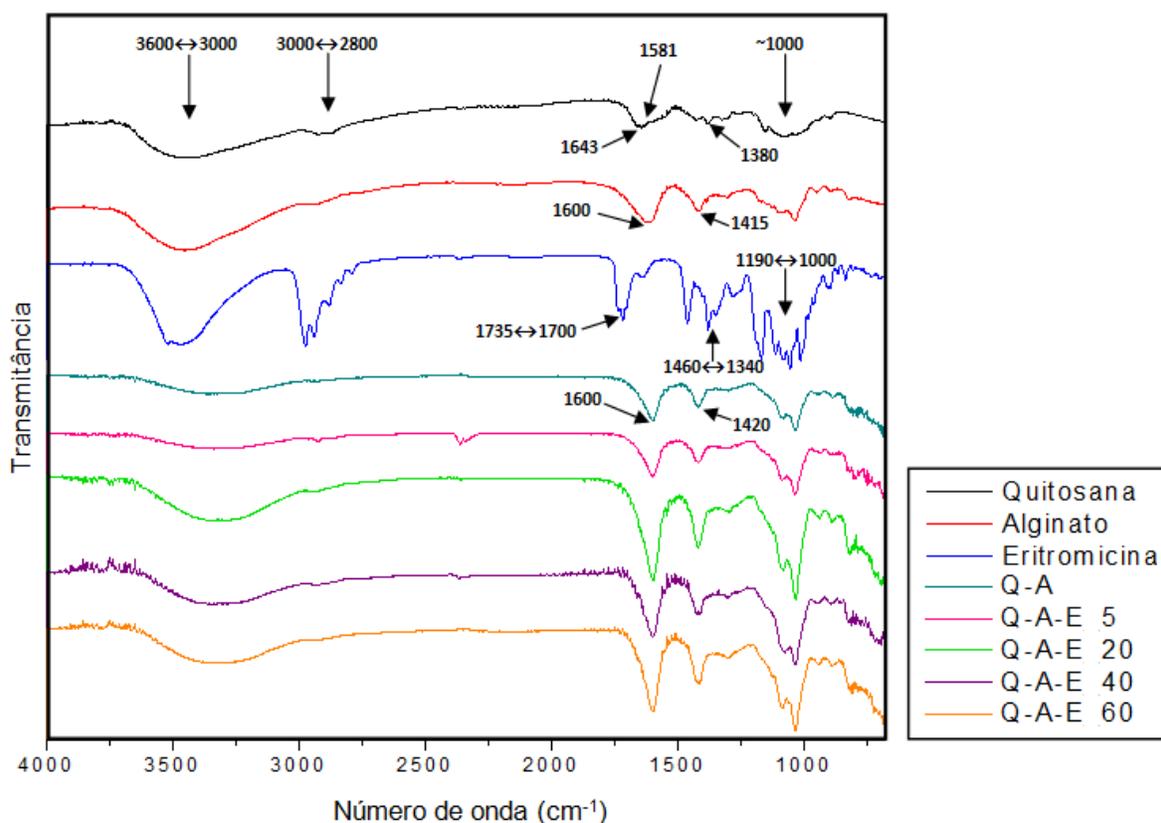


Figura 22: Espectro FTIR obtido para as membranas de quitosana e alginato contendo ou não eritromicina incorporada pelos métodos da impregnação do composto em solução etanólica de concentração 5 mg/mL (formulação Q-A-E 5) e adição do composto à mistura polimérica nas proporções de 20, 40 e 60 mg/g (formulações Q-A-E 20, Q-A-E 40 e Q-A-E 60, respectivamente). Também são mostrados os espectros dos componentes isolados. Para favorecer a visualização das diferenças e similaridades entre os espectros, a escala do eixo da transmitância foi expandida para as amostras Q-A, Q-A-E 5, Q-A-E 20, Q-A-E 40 e Q-A-E 60.

A análise dos espectros das membranas de quitosana e alginato contendo eritromicina mostra que, assim como no caso das formulações de quitosana e xantana, não houve alteração no perfil em relação ao espectro da membrana de quitosana e alginato à qual não foi incorporada a eritromicina. A explicação para este fato pode ser feita de forma análoga àquela feita para as membranas de Q-X.

4.5. Cinética de liberação da eritromicina

A detecção da eritromicina nos ensaios de liberação foi realizada de acordo com o método proposto por Ford *et al.* (1953), conforme descrito no capítulo de materiais e métodos. Entretanto, como a detecção precisa da concentração da droga é uma etapa crítica nos estudos de cinética de liberação, esta metodologia foi detalhadamente estudada, assim como outras abordagens alternativas.

O comprimento de onda utilizado no trabalho de referência foi de 485 nm, porém, a fim de se estabelecer no presente estudo o comprimento de onda no qual se observava o pico máximo de absorção especificamente para a eritromicina utilizada e a estabilidade desta medida, um teste preliminar foi realizado. Para isso, submeteu-se uma amostra de eritromicina em PBS (0,2 mg/mL) à qual foi adicionado ácido sulfúrico a uma varredura na faixa de comprimentos de onda de 200 a 800 nm. Duas varreduras foram feitas, 30 minutos e 2 horas após a adição do ácido sulfúrico à solução de eritromicina. Os picos de absorção determinados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Picos de absorção da solução de 0,2 mg/mL de eritromicina em PBS após adição de H₂SO₄ (vide espectro de absorção no Anexo IV).

Tempo (h)	ABS	
	270 nm	482 nm
0,5	1,1657	1,3792
2	1,1023	1,4181

Verifica-se pelos dados mostrados na Tabela 15 que havia dois picos de absorção mais significativos, em 270 nm e em 482 nm. Resultado similar foi observado por Danielson *et al.* (1993), que reportaram a presença de um pico máximo de absorção na região do visível em 470 nm, além de um pico com elevada absorbância na região do UV. Supõe-se que a fração de eritromicina ainda não degradada é responsável pela absorção a 270 nm, enquanto que a fração degradada corresponde ao pico em 482 nm. Observa-se que a fração degradada aumenta com o tempo, já que há uma pequena diminuição da absorbância a 270 nm para 2 horas, em relação à absorbância neste mesmo comprimento de onda para meia hora. Em paralelo, há um correspondente aumento na absorbância a 482 nm neste mesmo intervalo de tempo. No entanto este aumento não foi significativo e, portanto, o tempo de reação de meia hora foi considerado como adequado para a realização dos ensaios.

Nas Figuras 23 e 24 são apresentados os resultados do ensaio de liberação para os filmes de Q-X aos quais a eritromicina foi incorporada por adição à mistura polimérica em diferentes proporções, em termos da concentração do composto no meio de liberação, massa de composto liberada por grama de membrana e percentagem liberada, respectivamente.

Nota-se que há uma grande dispersão dos pontos obtidos, que pode ser atribuída ao fato de que o ensaio foi realizado com amostras destrutivas. Isto significa que a utilização de amostras diferentes para cada tempo de medida gerou um conjunto de dados com alto desvio, uma vez que cada amostra poderia conter uma quantidade inicial de droga diferente das demais, pois, conforme explicado anteriormente, a distribuição do composto na membrana não é homogênea. Além disso, a dispersão observada pode ser também relacionada à incerteza na própria medida obtida no espectrofotômetro, já que há falta de sensibilidade do equipamento para a análise de concentrações muito baixas da droga.

Devido a esta grande dispersão dos pontos, não é possível observar um perfil de liberação bem definido para as três proporções de eritromicina utilizadas. No entanto, pode-se notar a tendência de uma maior liberação em membranas contendo

mais antibiótico incorporado, ainda que a quantidade liberada seja pequena. Neste caso, atingiu-se um valor máximo de concentração no meio de liberação em torno de 0,008 mg/mL. Os baixos valores de concentração obtidos podem ser atribuídos à falta de afinidade do antibiótico pelo meio aquoso, o que significa que a força motriz para saída do composto da matriz é muito pequena. De fato, de acordo com as curvas de liberação obtidas, observa-se que a percentagem de droga liberada chegou a cerca de 13%, 31% e 34%, o equivalente a aproximadamente 1,4, 7,0 e 11,9 mg_{eritromicina}/g_{membrana}, para as formulações às quais foram adicionados 20, 40 e 60 mg_{eritromicina}/g_{membrana}, respectivamente.

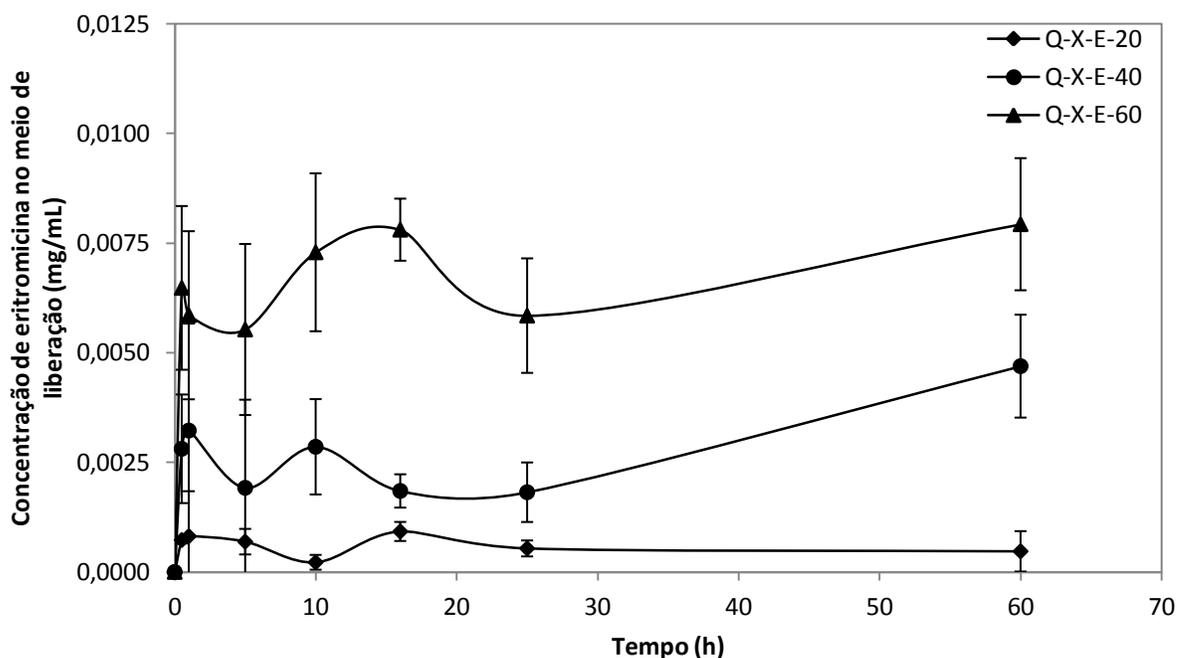


Figura 23: Concentração de eritromicina na solução de liberação em função do tempo para as membranas de quitosana-xantana às quais a droga foi incorporada por adição à mistura polimérica, sendo Q-X-E 20, Q-X-E 40 e Q-X-E 60 os filmes aos quais se incorporou 20, 40 e 60 mg/g do composto, respectivamente.

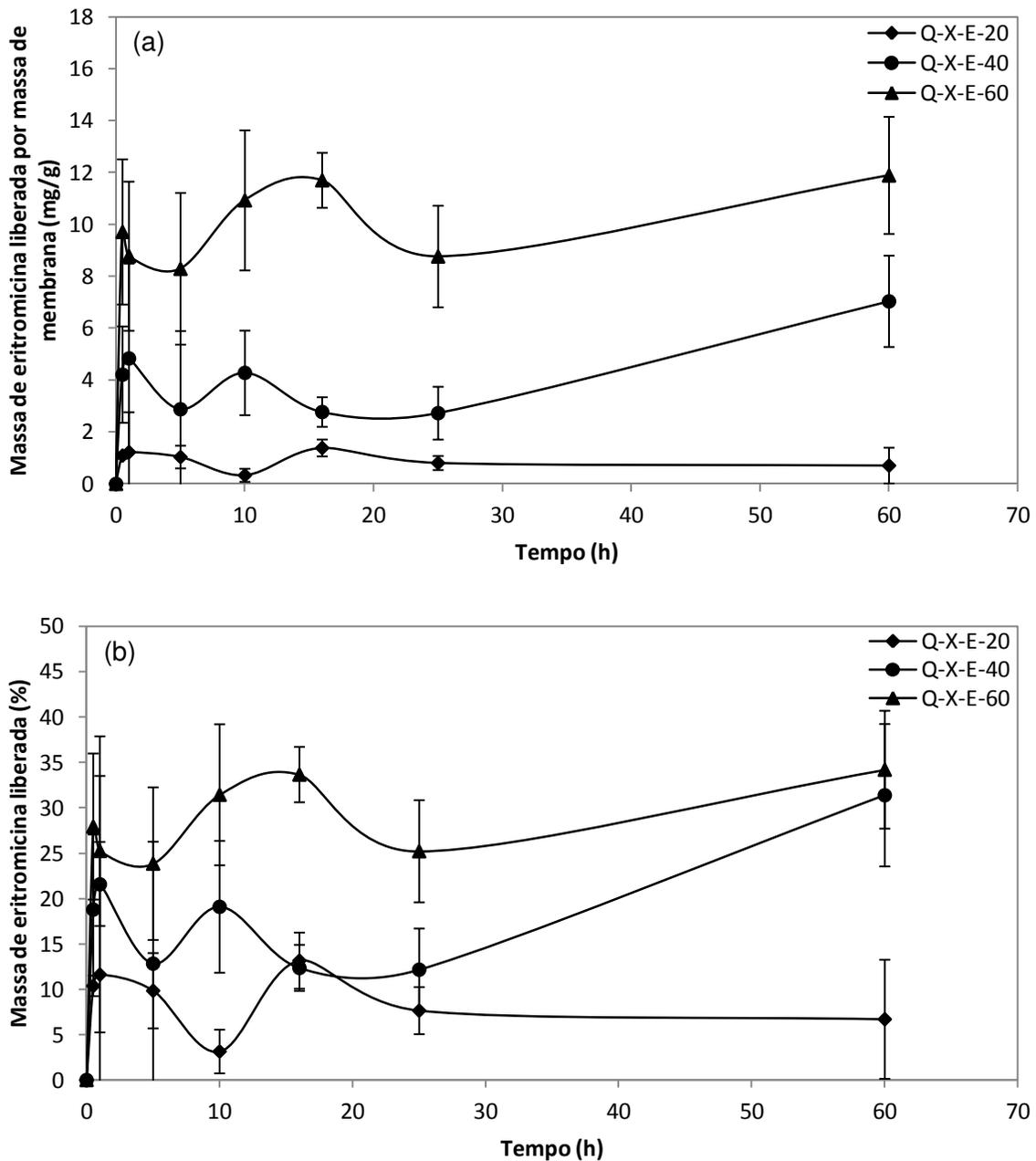


Figura 24: Quantidade de eritromicina liberada em função do tempo para os filmes constituídos de quitosana-xantana aos quais a droga foi incorporada por adição à mistura polimérica em termos de (a) mg de droga /g de membrana e de (b) porcentagem. As formulações Q-X-E 20, Q-X-E 40 e Q-X-E 60 se referem às membranas às quais se incorporou 20, 40 e 60 mg/g do composto, sendo a massa de eritromicina inicialmente retida igual a 10,53, 22,43 e 34,78 mg/g, respectivamente.

Nas Figuras 25 e 26 são apresentados os resultados do ensaio de liberação para os filmes de Q-A aos quais a eritromicina foi incorporada por adição à mistura polimérica em diferentes proporções, em termos da concentração do composto no meio de liberação, massa de composto liberada por grama de membrana e percentagem liberada, respectivamente.

É possível observar, que há também uma dispersão dos pontos obtidos, porém não tão pronunciada quanto aquela observada para a formulação de Q-X. Neste caso, o perfil de liberação é melhor definido para as três proporções de eritromicina utilizadas. Há uma liberação do composto em maior quantidade até o tempo de 15 horas e a partir de então ocorre uma liberação relativamente mais lenta, atingindo-se, no entanto, concentrações do composto no meio ainda baixas, sendo a máxima obtida de 0,006 mg/mL em membranas contendo maior quantidade de antibiótico incorporado.

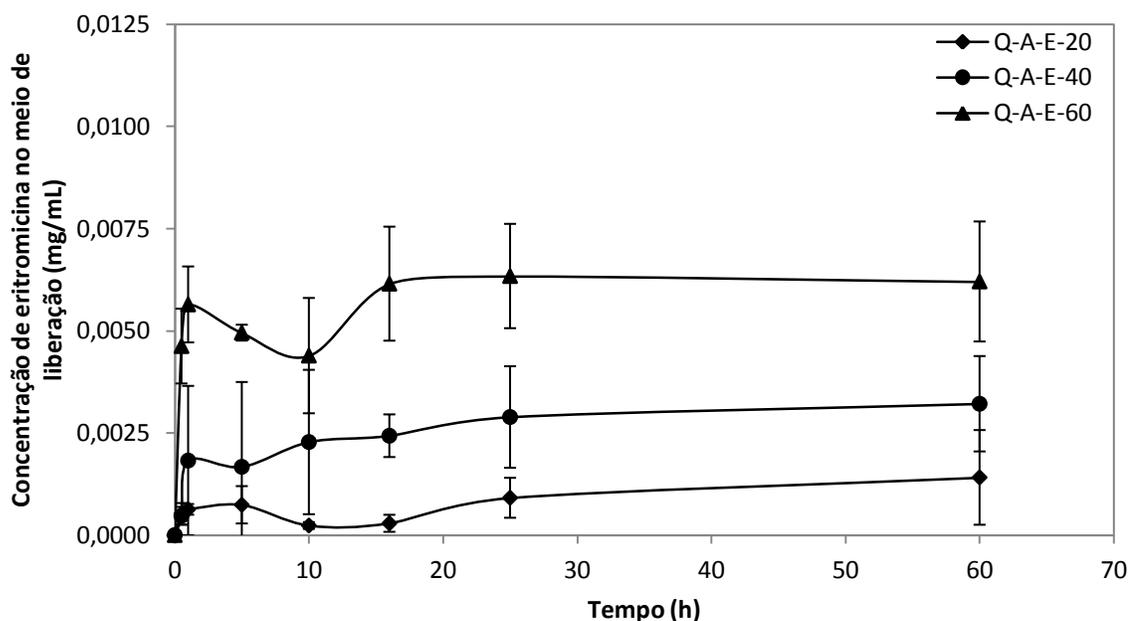


Figura 25: Concentração de eritromicina na solução de liberação em função do tempo para as membranas de quitosana-alginato às quais a droga foi incorporada por adição à mistura polimérica, sendo Q-A-E 20, Q-A-E 40 e Q-A-E 60 os filmes aos quais se incorporou 20, 40 e 60 mg/g do composto, respectivamente.

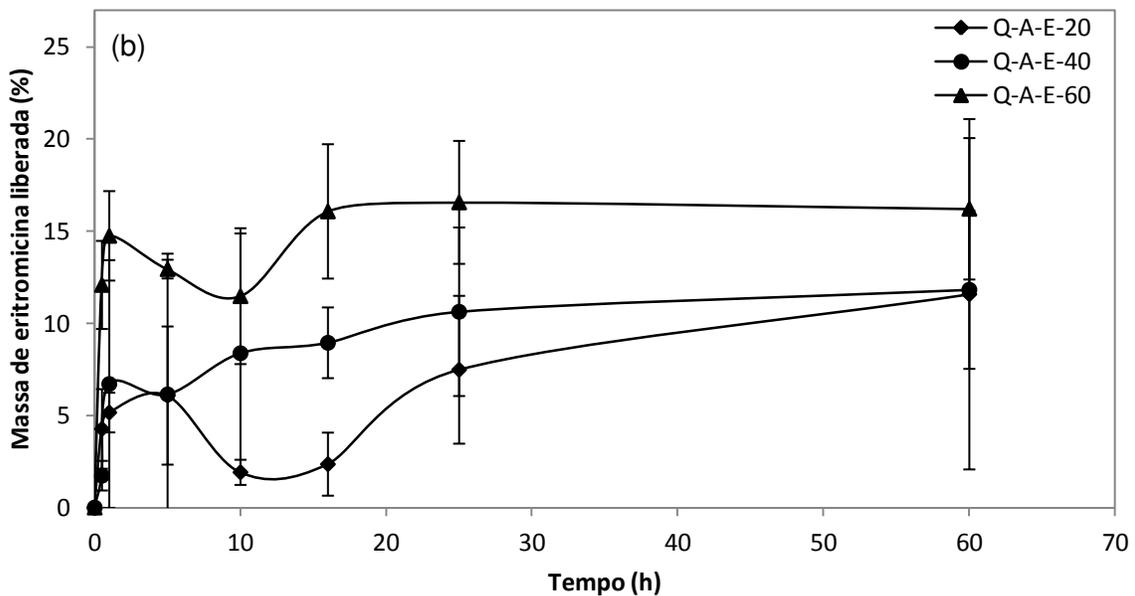
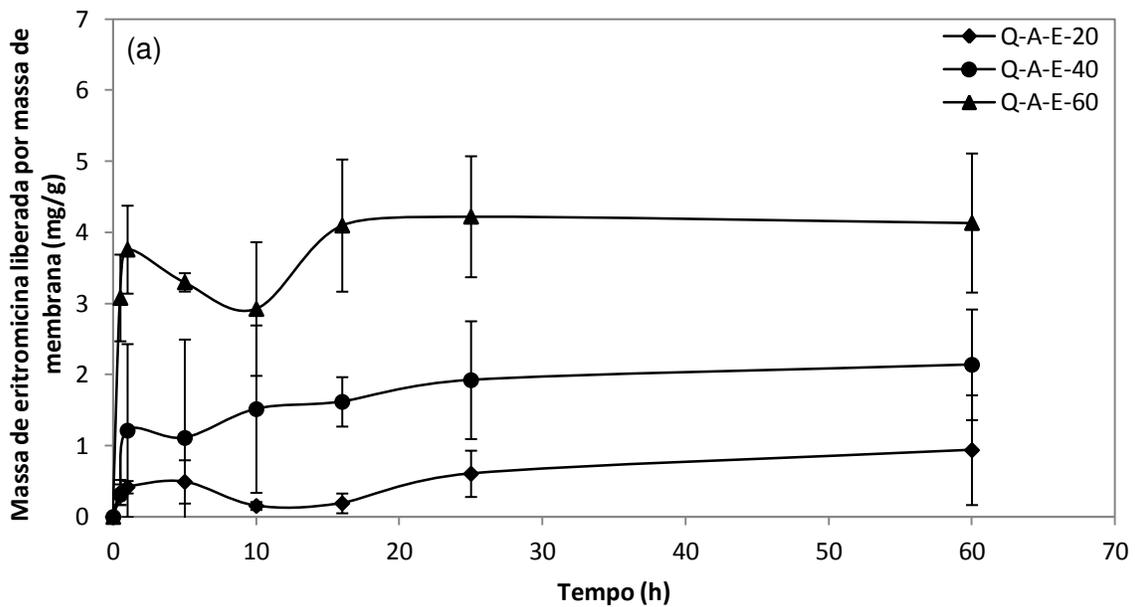


Figura 26: Quantidade de eritromicina liberada em função do tempo para os filmes constituídos de quitosana-xantana aos quais a droga foi incorporada por adição à mistura polimérica em termos de (a) mg de droga /g de membrana e de (b) percentagem. As formulações Q-A-E 20, Q-A-E 40 e Q-A-E 60 se referem às membranas às quais se incorporou 20, 40 e 60 mg/g do composto, sendo a massa de eritromicina inicialmente retida igual a 8,12, 18,11 e 25,50 mg/g, respectivamente.

Assim como para a formulação de Q-X, os baixos valores de concentração obtidos podem ser atribuídos à falta de afinidade do antibiótico pelo meio aquoso e, provavelmente, a eritromicina liberada inicialmente corresponde àquela que se encontrava depositada na superfície da matriz. De acordo com as curvas de liberação obtidas, observa-se que a percentagem de droga liberada chegou a cerca de 12%, 12% e 17%, o equivalente a cerca de 0,9, 2,1 e 4,2 mg_{eritromicina}/g_{membrana}, para as formulações às quais foram adicionados 20, 40 e 60 mg_{eritromicina}/g_{membrana}, respectivamente.

Nas Figuras 27 e 28 são apresentados os resultados do ensaio de liberação para os filmes de Q-X e Q-A aos quais a eritromicina foi incorporada por impregnação em solução etanólica de concentração 5,0 mg/mL, em termos da concentração do composto no meio de liberação, massa de composto liberada por grama de membrana e percentagem liberada, respectivamente. É importante ressaltar que para este ensaio foi analisada a quantidade de droga liberada apenas no tempo inicial e após 0,5, 1 h e 24 h, o que se deve à quantidade limitada de eritromicina disponível para a realização do mesmo com um maior número de medidas.

Na Figura 27 é possível verificar que a concentração máxima atingida no meio de liberação foi de aproximadamente 0,017 mg/mL para ambas as formulações analisadas, sendo este um valor superior que àquele atingido para as membranas às quais o antibiótico foi incorporado por adição. Este resultado já era esperado, tendo em vista que a relação final massa de droga/ massa de polissacarídeos para o método de adição era significativamente menor que o observado por impregnação em etanol.

Na Figura 28 nota-se que a formulação de Q-X, por conter maior quantidade inicial de droga retida em sua estrutura, apresentou maior liberação do composto, sendo que, em 24 h, cerca de 25 mg_{eritromicina}/g_{membrana} são liberados. No mesmo período, para a formulação de Q-A, ocorre a liberação de aproximadamente 11 mg_{eritromicina}/g_{membrana}. Embora as quantidades liberadas sejam elevadas, quando comparadas àquelas obtidas para os ensaios apresentados anteriormente em tempo relativamente maior, a percentagem equivalente de liberação do composto foi de apenas 1,2% e 1,7% para as formulações de Q-X e Q-A, respectivamente.

Pode-se observar que tanto no caso da liberação de eritromicina a partir de dispositivos aos quais o composto foi incorporado por adição à mistura polimérica, quanto no caso em que este foi incorporado por impregnação em solução etanólica, as membranas de Q-X são capazes de liberar maior quantidade do antibiótico incorporado.

Frente aos resultados anteriormente apresentados, pode-se afirmar que ocorre uma liberação lenta da droga em todos os casos analisados. No entanto, no caso das membranas às quais o composto foi incorporado por impregnação, ocorre liberação de maior quantidade do antibiótico em um menor período de tempo. Pode-se dizer que esta liberação lenta se deve, provavelmente, ao tamanho relativamente grande da molécula de eritromicina, que dificulta uma difusão mais rápida ao longo da matriz.

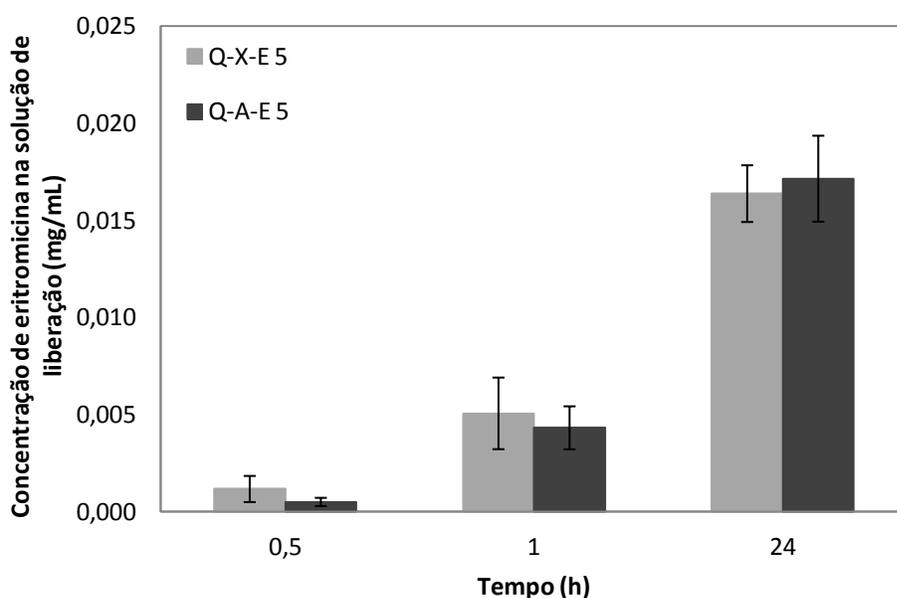


Figura 27: Concentração de eritromicina na solução de liberação em função do tempo para as membranas às quais a droga foi incorporada por impregnação em solução etanólica de concentração 5 mg/mL, sendo Q-X-E 5 as membranas constituídas de quitosana-xantana e Q-A-E 5 as membranas constituídas de quitosana-alginato.

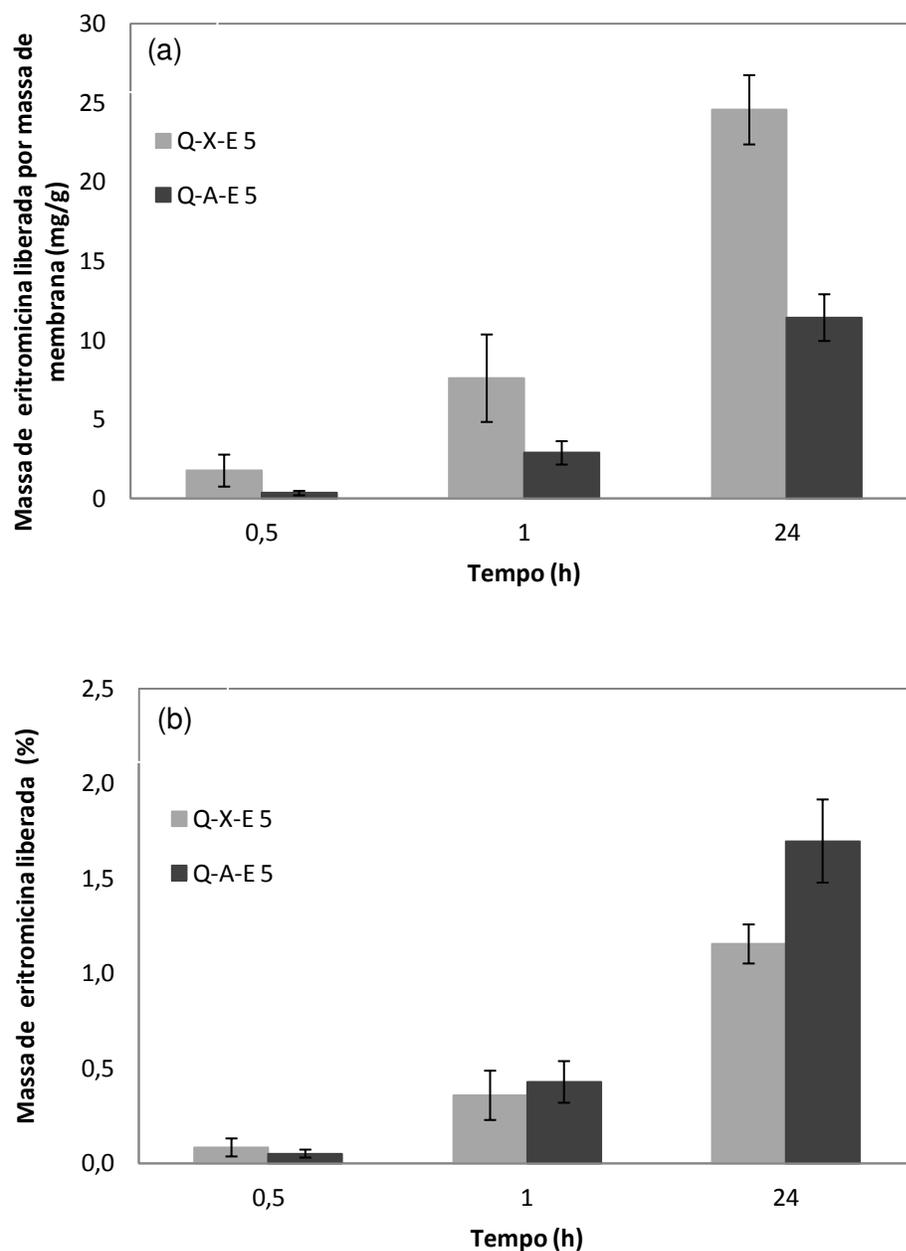


Figura 28: Quantidade de eritromicina liberada em função do tempo para os filmes aos quais a droga foi incorporada por impregnação em solução etanólica de concentração 5 mg/mL, sendo Q-X-E 5 as membranas constituídas de quitosana-xantana e Q-A-E 5 as membranas constituídas de quitosana-alginato. A massa do composto inicialmente retida nos filmes era de 2127,93 e 673,75 mg/g, para as formulações de Q-X e Q-A, respectivamente.

No trabalho de Veiga (2012), fármacos de tamanhos bem menores que o da eritromicina foram utilizados para a incorporação em membranas polissacarídicas, atingindo em alguns casos praticamente 100% de liberação em períodos relativamente curtos. Em seu trabalho, a autora obteve perfis de liberação nos quais há uma liberação rápida do fármaco da matriz, em aproximadamente 30 minutos, seguida de uma liberação mais lenta a partir desse ponto, para a maioria dos casos estudados. A vantagem do uso de dispositivos que apresentam liberação mais lenta é que estes podem funcionar como um reservatório da droga e possuem, portanto, potencial para atuar como agente de liberação por períodos muito mais longos do que dispositivos que apresentam liberação mais rápida, como os de Veiga (2012), por exemplo. Como consequência, estes dispositivos “reservatório” poderiam ser trocados com menor frequência, o que favoreceria a cura da lesão e traria mais conforto ao paciente. Considerando estes aspectos e tendo em vista que a dosagem tipicamente utilizada de eritromicina para tratamento de lesões de pele é de 20 mg/g, conforme mencionado anteriormente, pode-se afirmar que, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, o uso prolongado dos dispositivos em estudo poderia ser eficaz para a obtenção da dosagem requerida. Dessa forma, a droga seria disponibilizada lentamente à lesão, de forma a se evitar trocas constantes do dispositivo, o que traria maior conforto para o paciente.

É importante destacar que para se chegar aos resultados anteriormente apresentados, tentativas anteriores foram realizadas, porém não foram bem sucedidas. A seguir são descritas as metodologias empregadas nessas tentativas e o motivo de sua falha para alertar outros pesquisadores que desejem investigar os materiais testados.

A primeira abordagem utilizada consistiu na utilização de amostras de membrana 1 cm x 1 cm para liberação em 2 mL de meio PBS a 37°C. Alíquotas do meio de liberação eram retiradas em tempos pré-determinados, às quais se adicionava etanol, de modo a se obter uma proporção final de PBS:etanol de 40:60, uma vez que testes preliminares comprovaram a solubilidade da eritromicina nessa solução. No

entanto, esta abordagem não foi bem sucedida pois observou-se que, sendo a quantidade de eritromicina liberada muito pequena, como era necessário diluir a alíquota de meio de liberação em etanol para depois se fazer a leitura da absorbância a 205 nm, a amostra utilizada era muito diluída. Assim, as leituras realizadas se encontravam abaixo do limite de detecção da curva de calibração da eritromicina em PBS/etanol. Verificou-se que mesmo aumentando o tamanho da amostra, a quantidade de agente ativo liberado ainda não era suficiente para ser detectada.

A abordagem seguinte baseou-se então no princípio de que não seria adequado diluir a amostra de meio de liberação antes da leitura da absorbância e, por isso, seria necessário fazer a liberação em um meio no qual fosse possível fazer a detecção direta da eritromicina. Para tanto, decidiu-se fazer o ensaio no qual a liberação fosse realizada diretamente na cubeta onde seria feita a leitura da absorbância, utilizando para isso amostras de 1 cm x 1 cm em um volume de 3 mL de PBS a 37°C. Neste caso, o principal problema estava em obter a curva de calibração da eritromicina em PBS, já que o antibiótico é muito pouco solúvel neste meio e conseqüentemente, de difícil detecção por espectrofotometria.

Na tentativa de se trabalhar com um meio de liberação no qual a eritromicina fosse solúvel em maior proporção, utilizou-se um meio baseado naquele proposto por Taepaiboon *et al.* (2007), que consiste de PBS contendo 0,5% (v/v) de um surfatante não-iônico, o Tween 80[®] e 10% de metanol. Maiores concentrações de Tween 80[®] (1,0% v/v) foram utilizadas, além da troca do solvente de metanol para etanol. No entanto, a eritromicina não foi capaz de se solubilizar em nenhuma dessas soluções.

Frente aos resultados negativos até então obtidos, a nova tentativa baseou-se na liberação em PBS, novamente, porém agora utilizando para a detecção da eritromicina um método colorimétrico mais sensível, proposto por Ford *et al.* (1953), conforme já descrito anteriormente. Esta metodologia pôde, então, ser empregada com sucesso.

5. CONCLUSÕES

Quanto à avaliação do comportamento das membranas em diferentes proporções de água, os resultados mostraram que, em um contato rápido com água, a formulação de membrana constituída de Q-X possui superfície menos hidrofílica quando comparada à de Q-A. Entretanto, quando se considera um contato prolongado, a membrana de Q-X apresenta maior capacidade de absorção de água e também maior perda de massa nesse meio. Ambas as formulações se mostraram mais adequadas para o tratamento de lesões pouco exsudativas devido à sua baixa taxa de transmissão de vapor d'água, mas poderiam também ser aplicadas em lesões mais exsudativas, uma vez que sua capacidade de absorção de fluidos é relativamente elevada. Tanto as formulações de Q-X quanto as de Q-A apresentaram compatibilidade mecânica com a pele, sendo a segunda a mais resistente dentre elas. Além disso, observou-se que as propriedades mecânicas avaliadas são alteradas significativamente apenas em condições de umidade mais elevada no caso de ambas as formulações, tornando-se mais alongáveis, mas menos resistentes.

A incorporação de eritromicina às membranas de Q-X e Q-A foi feita pelos métodos de adição à mistura polimérica e impregnação em solução etanólica. A eficiência de incorporação da droga foi mais elevada para o primeiro método (máximo de 54%), sendo que os valores mais baixos obtidos para o segundo (em torno de 20%) foram atribuídos à baixa capacidade de absorção de etanol apresentada pelas membranas. Porém, maior quantidade do composto permaneceu retida nos filmes quando se utilizou o método de impregnação (máximo de 2130 mg/g), para ambas as formulações.

A adição da eritromicina diminuiu a opacidade dos filmes, porém não alterou sua cor e, no caso dos filmes de Q-A, particularmente, foi possível verificar maior redução da opacidade com o aumento da quantidade de composto ativo incorporada.

A análise da morfologia da superfície e da seção transversal revelou a presença do composto ativo distribuído de forma heterogênea ao longo da matriz em cada formulação. Além disso, para amostras às quais o antibiótico foi incorporado por impregnação, foi possível verificar que a presença de etanol conferiu às partículas de eritromicina uma conformação diferenciada, decorrente de seu solvatomorfismo. Apesar de as micrografias comprovarem a presença do composto incorporado nas matrizes poliméricas, a análise FTIR não forneceu informações que pudessem corroborar as observações anteriores.

Devido ao tamanho relativamente grande da molécula de eritromicina, sua liberação das matrizes foi lenta, sendo a quantidade máxima de antibiótico liberada igual a 25 mg/g, para Q-X quando a eritromicina foi incorporada por impregnação em solução etanólica de concentração 5 mg/mL. Logo, as membranas estudadas poderiam funcionar como reservatório da droga, atuando como agente de liberação por longos períodos, sendo que o uso prolongado desses dispositivos poderia ser eficaz para a obtenção da dosagem requerida no tratamento de lesões de pele, que é de 20 mg/g. Dessa forma, supõe-se que as membranas poderiam ser trocadas com menor frequência, o que favoreceria a cura da lesão e traria mais conforto ao paciente.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- a) A obtenção de membranas constituídas de quitosana complexada com os outros dois polissacarídeos, alginato e xantana, com o intuito de se obter filmes com propriedades intermediárias às dos complexos estudados no presente trabalho;
- b) A incorporação da eritromicina às membranas de Q-A e Q-X por impregnação em soluções constituídas do composto em uma mistura de água e etanol, pois já que há maior absorção de água que de etanol para ambas as formulações, espera-se que a água atue facilitando a penetração do composto nas matrizes e aumentando assim a eficiência de incorporação;
- c) A incorporação da eritromicina por adição direta à mistura polimérica seguida de sua incorporação por imersão dos filmes em solução etanólica, a fim de se obter maior eficiência de incorporação e melhor distribuição da droga ao longo da matriz;
- d) A caracterização mecânica e físico-química dos filmes contendo quantidade significativa de eritromicina;
- e) A adição de um agente dispersante à mistura polimérica contendo eritromicina, a fim de se obter filmes nos quais o antibiótico estaria homogeneamente distribuído;
- f) A utilização de técnicas como a perfilometria ótica ou a elipsometria para se fazer as medidas de espessura das amostras de filmes poliméricos;
- g) A realização do ensaio FTIR com microscopia acoplada, utilizando-se os métodos ATR, refletância ou transmitância, para que se possa direcionar a análise para regiões da membrana que contenham a droga, ou ainda a realização do ensaio de espectroscopia Raman para obtenção dos resultados desejados.

- h) A realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* para verificação do desempenho dos dispositivos contendo o antibiótico;
- i) O estudo da viabilidade econômica da ampliação da escala para produção das membranas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrahman, T.; Newton, H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery*, v. 29, n. 10, p. 491-495, 2011.
- Abruzzo, A.; Bigucci, F.; Cerchiara, T.; Saladini, B.; Gallucci, M. C.; Cruciani, F.; Vitali, B.; Luppi, B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers*, v. 91, p. 651-658, 2013.
- Aguiar, F. A. Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico; *Dissertação de Mestrado*; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; Ribeirão Preto, 2009.
- American Society for Testing and Materials - ASTM D882-02: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2002.
- American Society for Testing and Materials - ASTM E95-96: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 1995.
- Amin, A. S.; Issa, Y. M. Selective spectrophotometric method for the determination of erythromycin and its esters in pharmaceutical formulations using gentiana violet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, p. 1625-1629, 1996.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Consulta Pública nº109 de 11/12/2003 - Indicadores de Qualidade do Ar Ambiental Interior em Serviços de Saúde. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[6046-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[6046-2-0].PDF)>. Acesso em 27/03/2013.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Stiemycin Bula Profissional – Revisão RDC 47 GDS vfinal. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=34228>

72013&pIdAnexo=1595194>. Acesso em 20/06/2013.

Argin-Soysal, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. L. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 202-209, 2009.

Ashour, S.; Bayram, R. Novel spectrophotometric method for determination of some macrolide antibiotics in pharmaceutical formulations using 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 99, p. 74-80, 2012.

Auto, H. F.; Constant, J. M. C.; Constant, A. B. L. Antibióticos e Quimioterápicos. *Edufal*, 1982.

Bellini, M. Z.; Pires, A. L. R.; Vasconcelos, M. O.; Moraes, A. M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan–xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, p. E421-E431, 2012.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004

Biomaterials: aims and scope. Disponível em: <<http://www.journals.elsevier.com/biomaterials/>>. Acesso em: 21/06/13.

Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems - a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 2892-2923, 2008.

Broussard, K. C.; Powers, J. G. Wound dressings: selecting the most appropriate type. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 14, p. 449-459, 2013.

- Bueno, C. Z. Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele; *Dissertação de mestrado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2010.
- Bueno, C. Z.; Moraes, A. M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v.122, p.624-631, 2011.
- Carneiro-da-Cunha, M. G.; Cerqueira, M. A.; Souza, B. W. S.; Souza, M. P; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 379-385, 2009.
- Chen, K.; Ji, L.-J.; Wu, Y.-Y. Purification of erythromycin by antisolvent crystallization or azeotropic evaporative crystallization. In: *Advanced topics on crystal growth*; editado por Sukarno Olavo Ferreira, 2013. ISBN 978-953-51-1010-1. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advanced-topics-on-crystal-growth/purification-of-erythromycin-by-antisolvent-crystallization-or-azeotropic-evaporative-crystallization>
- Cheng, Y.; Lu, L.; Zhang, W.; Shi, L.; Cao, J. Reinforced low density alginate-based aerogels: Preparation, hydrophobic modification and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p.1093-1099, 2012.
- Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.. Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulation. *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 5-24, 2007.
- Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 780-792, 2013.

- Dalapicula, S. S.; Junior, G. M. V.; Conz, M. B.; Cardoso, E. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas: Uma revisão crítica. *Implant News*, v. 3; p. 487-491, 2006.
- Danielson, N. D.; Holeman, J. A.; Bristol, D. C.; Kirzner, D. H. Simple methods for the qualitative identification and quantitative determination of macrolide antibiotics. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v. 11, n. 2, p. 121-130, 1993.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.
- Davies, O. R.; Lewis, A. L.; Whitaker, M. J.; Tai, H.; Shakesheff, K. M.; How, S. M. Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 373-387, 2008.
- Dias, A.M.A.; Braga, M.E.M.; Seabra, I.J.; Ferreira, P.; Gil, M. H.; Sousa, H.C. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, p. 9-19, 2011.
- Deubel, A.; Fandiño, A. S.; Sorgel, F.; Holzgrabe, U. Determination of erythromycin and related substances in commercial samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1136, p. 39-47, 2006.
- Duarte, A. R. C.; Costa, M. S.; Aguiar-Ricardo, A.; Simplício, A. L.; Cardoso, M. M.; Duarte, C. M. M. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, p. 168-174, 2006.
- Edwards, C.; Marks, R. Evaluation of biochemical properties of human skin. *Clinics in Dermatology*, v. 13, p. 375-380, 1995.

- Ehrenreich M.; Ruszczak Z. Tissue-engineered temporary wound coverings. Important options for the clinician. *Acta Dermatoven APA*, v. 15, p. 5-13, 2006.
- Elmotasem, H. Chitosan–alginate blend films for the transdermal delivery of meloxicam. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 12-29, 2008.
- Erythromycin Ointment: Erythromycin Ointment. Disponível em: <<http://erythromycinointment.com/erythromycin-ointment/>>. Acesso em: 13/03/14.
- Ferguson, A. D.; Scott, R. B. Erythromycin-polymyxin ointment in the treatment of infected burns. *Journal of the National Medical Association*, v. 47, n.1, p. 18-20, 1955.
- Fernandes, L. L. Produção e caracterização de membranas de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas; *Projeto de graduação*; Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2009.
- Florence, A. T.; Attwood, D. Princípios Físico-Químicos em Farmácia. *Editores da Universidade de São Paulo*, 2003. ISBN 85-314-0160-7.
- Ford, J. H.; Prescott, G. C.; Iijima, J. W.; Carou, E. L. Colorimetric determination of erythromycin. *Analytical Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 1195-1197, 1953.
- García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 549-579, 2000.
- George, M.; Abraham, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-4, 2006.
- Girata, A. K. Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata; *Dissertação de mestrado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2011.

- Goldberg, S. R.; Diegelmann R. F. Wound healing primer. *Surgical Pathology Clinics*, v. 90, p. 1133-1146, 2010.
- Gunasekar, V.; Reshma, K. R.; Treesa, G.; Gowdhaman, D.; Ponnusami, V. Xanthan from sulphuric acid treated tapioca pulp: Influence of acid concentration on xanthan fermentation. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 669-673, 2014.
- Hamman, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1305-1322, 2010.
- Hoare, T. R.; Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, v. 49, p. 1993-2007, 2008.
- Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 3-12, 2002.
- Illum, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1326-1331, 1998.
- International Pharmacopoeia. *World Health Organization*, 4^a Ed., 2006.
- Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Kumar, P. T. S.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing application. *Biotechnology Advances*, v.29, p.322-337, 2011.
- Jessick, A. M.; Moorman, T. B.; Coats, J R. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. *Journal of Environmental Science and Health: Part B*, v. 46, p. 735-740, 2011.
- Khor, E.; Lim, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, p. 2339-2349, 2003.

- Kim, Y.; Heinze, T. M.; Beger, R.; Pothuluri, C.; Cerniglia, C. E. A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 271, p. 63-76, 2004.
- Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 721-734, 1990.
- Korotkov, K.; Garcia, R. Computerized analysis of pigmented skin lesions - A review. *Artificial Intelligence in Medicine*, v. 56, p. 69-90, 2012.
- Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.
- Lamke, L.O.; Nilsson, G. E.; Reithner, H. L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns*, v. 3, p. 159-165, 1977.
- Lancini, G.; Parenti, F.; Gallo, G. G. Antibiotics - A Multidisciplinary Approach. *Plenum Press*, 1995. ISBN 0-306-44924-2.
- Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007.
- Lee, J. W.; Kim, S. Y.; Kim, S. S.; Lee, Y. M.; Lee, K. H.; Kim S. J. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly (acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 73, p. 113-120, 1999.
- Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 37, p. 106-126, 2012.

- Leeuwenburgh, S. C.; Hansen, J. A.; Malda, J.; Dhert, W. A.; Rouwkema, J.; van Blitterswijk, C. A.; Kirkpatrick, C. J.; Williams, D. F. Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. *Biomaterials*, v. 29, p. 3047-3042, 2008.
- Levinson, W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. McGraw-Hill/Artmed, 10^a ed., 2008. ISBN: 9780071496209.
- Li, X.; Xie, H.; Lin, J.; Xie, W.; Ma, X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1-6, 2009.
- Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p.3919-3928, 2005.
- Lima, A. C. Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert opinion on drug delivery*, v. 9, p.231-248, 2012.
- Lin, H.; Ciou, S. Modifications of alginate-based scaffolds and characterizations of their pentoxifylline release properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 574-580, 2010.
- Lungan, M. A.; Popa, M.; Desbrieres, J.; Racovita, S.; Vasiliu, S. Complex microparticulate systems based on glycidyl methacrylate and xanthan. *Carbohydrate Polymers*, v. 104, p. 213-222 , 2014.
- Luo, Y.; Wang, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 353-367, 2014.
- Ma, J.; Wang, H.; He, B.; Chen, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, v.22, p.331-336, 2001.

- Majeti, N. V. R. K. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.
- Mano J. F.; Silva, G. A.; Azevedo H. S.; Malafaya, P. B.; Sousa, R. A.; Silva, S. S.; Boesel, L. F.; Oliveira, J. M. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 4, p. 999-1030, 2007.
- Martínez-Ruvalcaba, A.; Chornet, E.; Rodriguez, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 586-595, 2007.
- Mascarenhas, M. D. M.; Monteiro, R. A.; Sá, N. N. B.; Gonzaga, L. A. A.; Neves, A. C. M.; Roza, D. L.; Silva, M. M. M. A.; Duarte, A. C.; Malta, D. C. Epidemiologia das causas externas no Brasil: mortalidade por acidentes e violências no período de 2000 a 2009. In:
- Ministério da Saúde do Brasil. Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. *Ministério da Saúde*, 2011. cap 11. ISBN 978-85-334-1851-6.
- McHugh, T. H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, F. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 899-903, 1993.
- Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C.; Xing, N.; Li, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science*, v. 21, p. 1751–1759, 2010.
- Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. *Ministério da Saúde*, 2002. ISBN 85-334-0562-6.

- Mirza, S.; Miroshnyk, I.; Heinamaki, J.; Christiansen, L.; Karjalainen, M.; Yliruusi, J. Influence of Solvents on the Variety of Crystalline Forms of Erythromycin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2003.
- Mulder, M.; Small, N.; Botma, Y; Ziady, L; Mackenzie, J. Basic principles of wound care. *Maskew Miller Longman*, 2002. ISBN 1-8689-1136-5.
- Müller, J. M.; Santos, R. L.; Brigido, R. V. Produção de alginato por microrganismos. *Polímeros*, v. 21, p. 305-310, 2011.
- Munday, D. L.; Cox, P. J. Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 203, p. 179-192, 2000.
- Niekraszewicz, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13, p. 16-18, 2005.
- Ovington, L. G. Advances in wound dressings. *Clinics in dermatology*, v. 25, p. 33-38, 2007.
- Park, S.; Kim, K.; Kim, S. Effect of poly(ethylene oxide) on the release behaviors of poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing erythromycin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 43, p. 238-244, 2005.
- Paul, W.; Sharma, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 18-23, 2004.
- Pendela, M.; Béni, S.; Haghedooren, E.; Van den Bossche, L.; Noszál, B.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J.; Adams, E. Combined use of liquid chromatography with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for the identification of degradation compounds in an erythromycin formulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 781-790, 2012.

- Penzer, R.; Ersser, S. Principles of Skin Care - A Guide for nurses and health care practitioners. *Wiley-Blackwell*, 2010. ISBN 978-1-4051-7087-1.
- Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 1-12, 2012.
- Pires, A. L. R. Desenvolvimento de curativos flexíveis e neutralizados de quitosana e alginato contendo Alphasan® RC2000; *Dissertação de mestrado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2013.
- Popa, N.; Novac, O; Profire, L.; Lupusoru, C. E.; Popa, M. I. Hydrogels based on chitosan–xanthan for controlled release of theophylline. *Journal of Materials Science*, v. 21, p. 1241-1248, 2010.
- Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. *Elsevier*, 3ª Ed., 2013. ISBN 978-0-12-74626-9.
- Rodrigues A. P.; Sanchez E. M. S.; da Costa A. C.; Moraes A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 2703-10, 2008.
- Rodrigues, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões; *Tese de doutorado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2008.
- RUMC (Rush University Medical Center): Health Information. Disponível em: <<http://health.rush.edu/HealthInformation/InDepth%20Report/10/000032.ASPX>>. Acesso em 03/06/2013.

- Sæther, H. V.; Kolme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrod, O.; Støkke, T. S. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 813-821, 2008.
- Santos, H.; Veiga, F.; Pina, M. E. Compaction, compression and drug release characteristics of xanthan gum pellets of different compositions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, p. 271-281, 2004.
- Sarisuta, N.; Kumpugdee, M.; Müller, B. W.; Puttipipatkachorn, S. Physico-chemical characterization of interactions between erythromycin and various film polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 186, p. 109-118, 1999.
- Schönfeld, W.; Kirst, H. A. Macromolide antibiotics. *Birkhäuser Verlag*, 2002. ISBN 3-7643-6186-7.
- Sezer, A. D.; Cevher, E. Biopolymers as wound healing materials - challenges and new strategies. In: Pignatello, R. Biomaterials Application for nanomedicine. *In Tech*, 2011. Cap. 19. ISBN 978-953-307-661-4.
- Shaik; R. S.; Korsapati, M.; Panati, D. Polymers in controlled drug delivery systems. *International Journal of Pharma Sciences*, v. 2, p. 112-116, 2012.
- Shi, G.; Chen, Y.; Wan, C.; Yu, X.; Feng, T.; Ding, Y. Study on the preparation of chitosan–alginate complex membrane and the effects on adhesion and activation of endothelial cells. *Applied Surface Science*, v. 255, p. 422-425, 2008.
- Shweta, K.; Ganesh, K.; Preeti, K. Development and in vitro characterization of ocular insert containing erythromycin. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 8, p. 246-250, 2012.
- Sikareepaisan, P.; Ruktanonchai, U.; Supaphol. P. Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1457-1469, 2011.

- Silva, C. L.; Pereira, J. C.; Ramalho, A.; Pais, A. A. C. C.; Sousa, J. J. S. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science*, v. 320, p. 268-279, 2008.
- Silva, F. P.; Velasco, I. T. *Sepse*. Manole, 2007. ISBN: 85-204-2558-5.
- Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A. A. Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1859-1866, 2005.
- Sobral, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. *Ciência e Engenharia*, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.
- Sotiro, K. R. Estudo da estabilidade química, física e liberação *in vitro* da eritromicina veiculada em sistemas líquido cristalinos para tratamento da *Acne vulgaris*; *Dissertação de mestrado*; Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Araraquara, 2007.
- Stashak, T. S.; Farstvedt, E.; Othic, A. update on wound dressings: indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 3, p. 148-163, 2004.
- Taepaiboon, P.; Rungsardthong, U.; Supaphol, P. Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 387-397, 2007.
- Vale, E. C. S. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, p. 9-19, 2005.
- Veiga, I. G. Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para a liberação controlada de anti-inflamatórios; *Tese de doutorado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2012.

- Veiga, I. G. Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele; *Tese de mestrado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2009.
- Veiga, I. G.; Moraes, A. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *Journal of Applied Science*, v.124, p.154-160, 2011.
- Voss, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society colour chart. *HortScience*, v. 27, p. 1256-1260, 1992.
- Weinstein, M. J.; Wagman, G. H. Antibiotics: isolation, separation and purification. *Journal of Chromatograph Library, Elsevier*, v. 15, 1978. ISBN: 0-444-41727-3.
- White, R.; Cutting, K. Modern exudate management: A review of wound treatments. *World Wide Wounds*, v. 1.0, 2006.
- Williams D. F. Definition in Biomaterials. *Progress in Biomedical Engineering*, 1987, cap. 4.
- Yang, J.; Xie, Y.; He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 33-39, 2011.
- Zheng, Z.; Wei, Y.; Wang, G.; Ao, A. W. Q.; Gong, Y.; Zhang, X. Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 24, p. 63-82, 2009.

ANEXO I

Tabela A1: Exemplos de curativos comercialmente disponíveis (adaptado de Ovington, 2007).

Nome	Tipo/Composição	Fabricante
Sorbsan [®]	Alginato	Bertek Pharmaceuticals
Curasorb [®]	Alginato	Tyco Healthcare/Kendall
Acticoat absorbent [®]	Alginato/prata	Smith & Nephew Inc.
Optifoam [®]	Espuma polimérica	Medline Industries Inc.
Tielle Plus [®]	Espuma polimérica/ poliuretano	Johnson & Johnson/ Wound management
Contreet F [®]	Espuma polimérica/ poliuretano	Coloplast Corporation
DuoDERM CGF [®]	Hidrocolóide	Convatec, Skillman
Replicare [®]	Hidrocolóide	Smith & Nephew Inc.
Contreet H [®]	Hidrocolóide/prata	Coloplast Corporation
Tegaderm [®]	Filme Polimérico	3M Health Care
Transeal [®]	Filme Polimérico/poliuretano	DeRoyal
Purilon [®]	Hidrogel	Coloplast Corporation
Skintegrity [®]	Hidrogel	Medline Industries Inc.
Flexigel [®]	Hidrogel	Smith & Nephew Inc.
Silvasorb [®]	Hidrogel/Prata	Medline Industries Inc.
Kerlix AMD [®]	Gaze/PHMB	Tyco Healthcare/Kendall

Referência bibliográfica:

Ovington, L. G. Advances in wound dressings. *Clinics in dermatology*, v. 25, p. 33-38, 2007.

ANEXO II

Tabela All: Sais utilizados para manutenção da umidade constante em ambiente fechado e saturado, para T de cerca de 25 °C (adaptado de QUANTIFOIL Instruments GmbH, 2013).

Umidade Relativa (%)	Sal utilizado
22	Acetato de potássio
33	Cloreto de magnésio
52	Nitrato de magnésio
75	Cloreto de sódio
89	Nitrato de potássio

A solução salina saturada deve ser preparada e colocada dentro de um dessecador. A umidade relativa obtida estará em torno dos valores listados na tabela acima para cada sal, e poderá variar um pouco de acordo com a quantidade de água utilizada para saturar esta solução.

Referência bibliográfica:

QUANTIFOIL Instruments GmbH: Creating Constant air humidity in closed vessels. Disponível em: < <http://www.qinstruments.com/uploads/media/humidity.pdf>>. Acesso em: 21/06/13.

ANEXO III

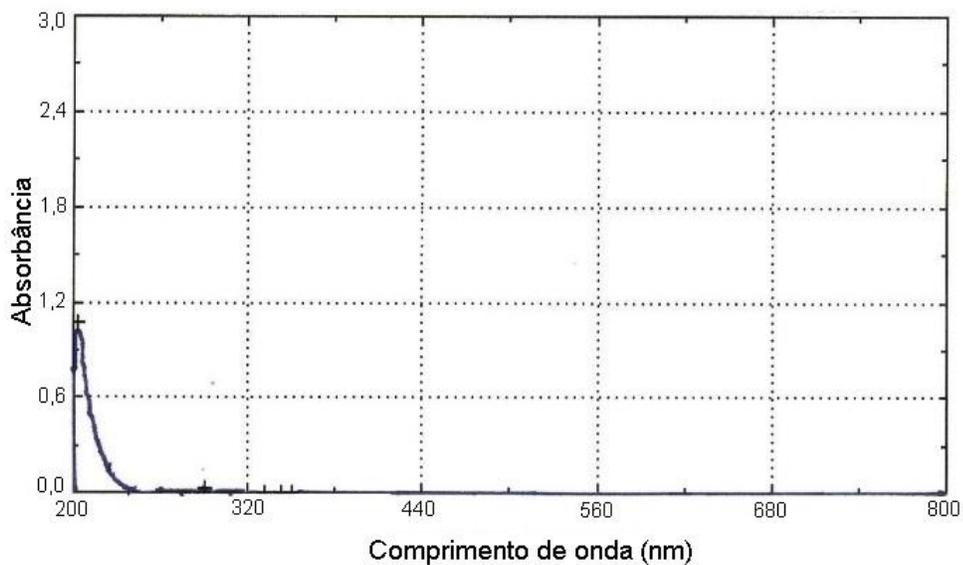


Figura AIII.1: Espectro de absorção obtido para a solução de eritromicina em etanol (concentração 0,5 mg/mL) na faixa de 200 nm a 800 nm.

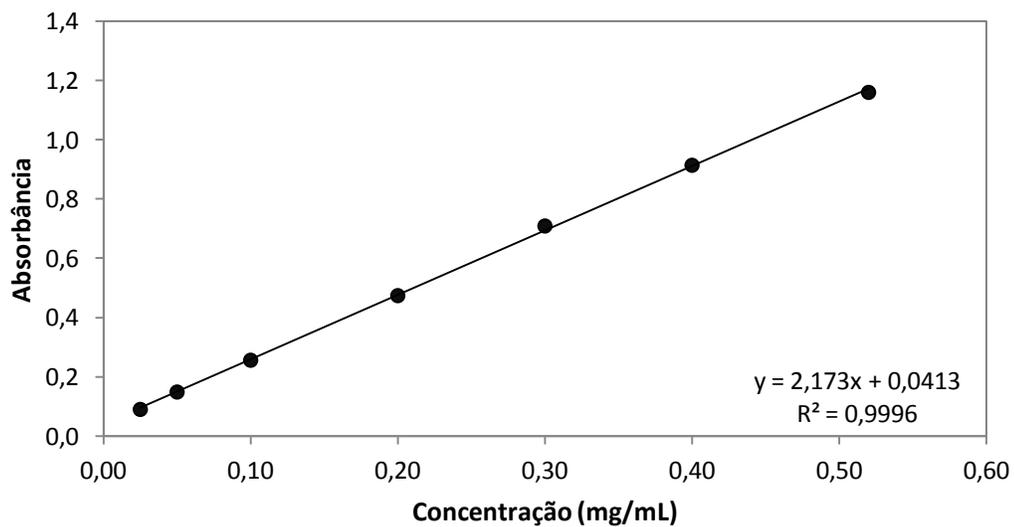


Figura AIII.2: Curva de calibração de eritromicina em etanol no comprimento de onda de 205 nm.

ANEXO IV

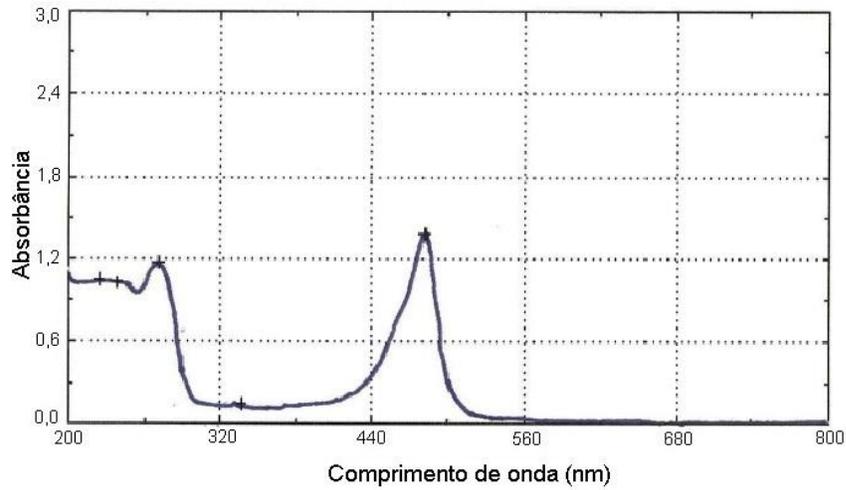


Figura AIV.1: Espectro de absorção obtido para a solução de eritromicina em PBS (concentração 0,2 mg/mL) após 30 minutos da adição de ácido sulfúrico, para a faixa de 200 nm a 800 nm.

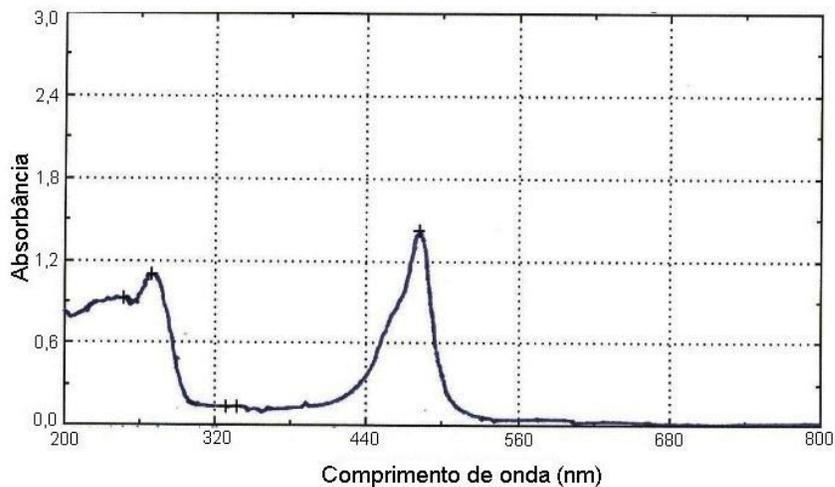


Figura AIV.2: Espectro de absorção obtido para a solução de eritromicina em PBS (concentração 0,2 mg/mL) após 2 horas da adição de ácido sulfúrico, para a faixa de 200 nm a 800 nm.

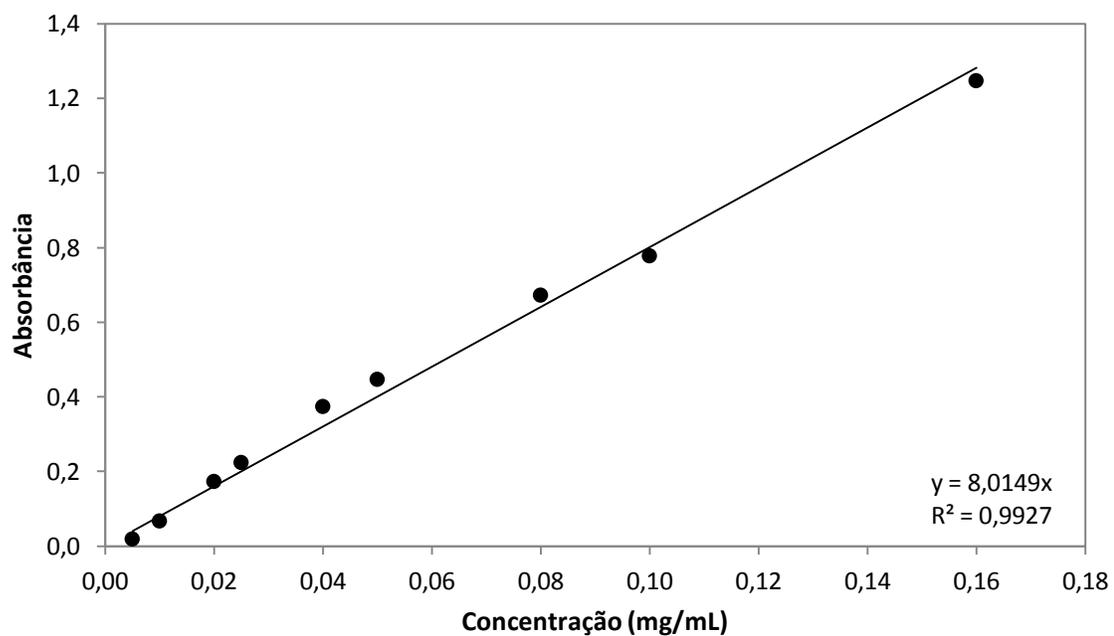


Figura AIV.3: Curva de calibração de eritromicina em PBS (pH 7) e ácido sulfúrico 27N no comprimento de onda de 482 nm.