



ITIARA GONÇALVES VEIGA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
ASSOCIADA COM OUTROS BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ANTI-INFLAMATÓRIOS**

CAMPINAS
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos

ITIARA GONÇALVES VEIGA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
ASSOCIADA COM OUTROS BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ANTI-INFLAMATÓRIOS**

Orientadora: Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Co-orientadores: Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa (Instituto de Química/Unicamp)

Prof. Dr. Hermínio Cipriano de Sousa (Universidade de Coimbra/ Portugal)

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Engenharia Química da
Faculdade de Engenharia Química para
obtenção do título de Doutora em Engenharia
Química**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ITIARA GONÇALVES VEIGA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA MORAES

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

V533p Veiga, Itiara Gonçalves
Produção e caracterização de membranas de
quitosana associada com outros biopolímeros para
liberação controlada de anti-inflamatórios / Itiara
Gonçalves Veiga. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Ângela Maria Moraes
Coorientador: Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Membranas (Tecnologia). 2. Quitosana. 3.
Pectina. 4. Tecnologia de liberação controlada. 5.
Xantana. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Rosa,
Paulo de Tarso Vieira e, 1966-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. IV. Título.

Título em Inglês: Production and characterization of chitosan-based films
associated with other biopolymers for the controlled
release of anti-inflammatory agents

Palavras-chave em Inglês: Membrane (Technology), Chitosan, Pectin,
Controlled release technology, Xanthan

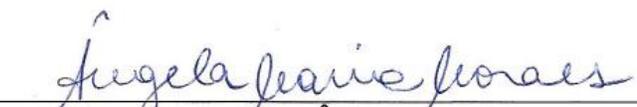
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

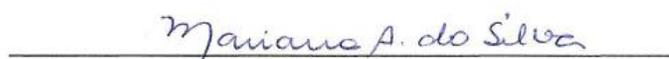
Banca examinadora: Marisa Masumi Beppu, Mariana Altenhofen da Silva,
Luismar Marques Porto, Ana Maria Antunes Dias

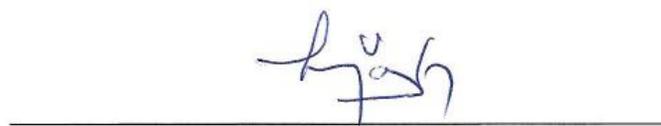
Data da defesa: 14-11-2012

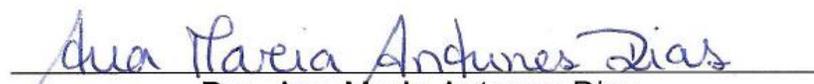
Tese de Doutorado defendida por Itiara Gonçalves Veiga e aprovada em 14 de novembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof. Dra. Ângela Maria Moraes


Prof. Dra. Marisa Masumi Beppu


Dra. Mariana Altenhofen da Silva


Prof. Dr. Luismar Marques Porto


Dra. Ana Maria Antunes Dias

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me protege e acompanha todos os dias da minha vida.

A minha família, meu pai Paulo, minha mãe Luciara e minha irmã Fernanda, que me apoiaram e incentivaram durante a realização deste trabalho, acreditando no meu sucesso e compreendendo minha ausência, como em todas as fases de minha vida.

Ao Eugênio, pelo amor, compreensão e companheirismo mesmo nos momentos mais turbulentos e ausentes, sem o qual eu não teria conseguido.

À professora Dra. Ângela Maria Moraes, pela sua dedicada orientação e amizade, pela sua constante atenção que nunca deixou perguntas sem respostas, tornando-se um exemplo a ser seguido em formação técnica e humana.

Aos professores Paulo Rosa e Hermínio de Sousa pela co-orientação e apoio em todas as fases deste trabalho e dos conselhos sempre motivadores.

A todos os amigos e colegas da Engenharia Química, em especial a Ana Kelly, Ana Luiza, Carla, Gisele Atsuko, Gisele Pavan, Nemailla e Silvia, pela amizade, auxílio e momentos inesquecíveis que proporcionaram, sendo parte fundamental ao longo do doutorado.

À Cecília, peça fundamental para a realização deste trabalho, pela amizade e apoio nos momentos mais importantes.

Aos amigos que fiz em Coimbra, em especial a Bianca, Carmen, Clara, Francesco, Gustavo, Maine, Maria, Mariline, Mercedes, Sofia, Renata e Walter, que proporcionaram momentos especiais e me acolheram como uma família.

Aos amigos Viktor e Cibelem, pelos momentos de descontração e por garantirem que tudo daria certo apesar dos obstáculos.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química que colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos, que mesmo indiretamente, se fizeram presentes em mais esta etapa da minha vida.

À Fapesp, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A mais nobre alegria dos homens
que pensam é haverem explorado o
concebível e reverenciarem em paz o
incognoscível.

Johann Goethe

Resumo

O corpo humano é recoberto por aproximadamente 2 m² de pele, e lesões cutâneas, além de causarem danos físicos, mecânicos e térmicos, podem também afetar as funções fisiológicas de outros tecidos, gerando desordens fisiológicas. As membranas desenvolvidas para o tratamento de lesões de pele podem ser constituídas por vários tipos de polímeros, sendo a quitosana um dos mais estudados. Diversos polissacarídeos como alginato, xantana, pectina, goma guar e goma arábica, são capazes de formar complexos com a quitosana, podendo tal combinação contribuir para a melhoria das propriedades das membranas usadas como curativos. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo o estabelecimento de metodologias de preparação e a caracterização de membranas de quitosana e outros biopolímeros, a fim de selecionar as formulações mais adequadas para uso como dispositivo de liberação controlada de fármacos, mais especificamente dos anti-inflamatórios não esteroides diclofenaco de sódio, cetoprofeno e piroxicam, utilizando três formas de incorporação (adição dos fármacos durante a formação da membrana, absorção de solução contendo o fármaco e impregnação de fármaco na presença de CO₂ supercrítico). As membranas foram caracterizadas quanto à morfologia, à espessura, à resistência mecânica, à capacidade máxima de absorção de diferentes soluções aquosas, à perda de massa quando expostas a diferentes soluções aquosas simulando fluidos corpóreos, à sorção e permeabilidade ao vapor, à biocompatibilidade *in vitro*, à eficiência de incorporação do fármaco e à cinética de sua liberação. Membranas de quitosana associada com os polímeros xantana, pectina ou goma guar foram obtidas com sucesso. Estas membranas foram caracterizadas de acordo com as metodologias citadas anteriormente e apresentaram propriedades adequadas para os processos de incorporação. A incorporação de diclofenaco de sódio e piroxicam pelos três métodos propostos foi realizada, apresentando melhores resultados quando a adição dos fármacos foi realizada durante o processamento. Foi possível também incorporar o diclofenaco de sódio por absorção, porém foram observadas baixas eficiências de incorporação (inferiores a 2,7 %) na presença de meio supercrítico. Já para o piroxicam e o cetoprofeno foram obtidas baixas eficiências na incorporação por absorção (menores que 1%), mas resultados relevantes foram alcançados no processo em alta pressão. Nas condições testadas, os fármacos apresentaram liberação na primeira hora de contato, verificando-se que as membranas produzidas não apresentam capacidade de controle da liberação dos agentes ativos.

Abstract

The human body is covered by approximately 2 m² of skin. Skin lesions, in addition to cause physical, mechanical and/or thermal damages, may also affect the physiological functions of other tissues. Membranes developed to treat lesions can be constituted by several types of polymers, being chitosan one of the most studied. Polysaccharides such as alginate, xanthan, pectin, guar gum and arabic gum are capable to form complexes with chitosan that may contribute to improve the properties of membranes used as wound dressings. In this context, this work aimed the development of methodologies to prepare chitosan-based membranes and their characterization, intending to select adequate formulations to be used as delivery devices for three anti-inflammatory agents, namely sodium diclofenac, ketoprofen and piroxicam. The drugs were incorporated by three techniques: addition directly into the polymeric mixture, absorption of drug from solution and supercritical impregnation. The membranes were characterized regarding to morphology, thickness, tensile strength, strain at break, swelling capacity in different aqueous solutions, percentage of mass loss after prolonged exposure to the same media, vapor sorption and permeability, biocompatibility *in vitro*, drug incorporation efficiency and release kinetic. Chitosan membranes associated with xanthan, pectin or guar gum were successfully prepared and showed properties suitable for the processes of drug incorporation. The incorporation of sodium diclofenac and piroxicam through the three methods proposed was performed, and the most appropriate results were attained when drug addition was performed during membrane processing. It was also possible to incorporate sodium diclofenac by absorption, but low incorporation efficiencies were observed (below 2.7%) in the presence of the supercritical fluid. For piroxicam and ketoprofen, low incorporation efficiencies were obtained by absorption (less than 1%), but significant results have been achieved in the process at high pressure. Under the conditions tested, the release of all drugs occurred in the first hour of contact, what indicated that the membranes produced were not capable to control the release of the active agents used.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biomateriais	4
2.2. Utilização de quitosana na produção de biomateriais	5
2.3. Formação de hidrogéis e de complexos polieletrólitos contendo quitosana.....	9
2.4. Biopolímeros alternativos para a complexação com quitosana.....	11
2.4.1. Xantana	11
2.4.2. Pectina	13
2.4.3. Goma Arábica.....	15
2.4.4. Goma Guar.....	17
2.5. Incorporação de fármacos em membranas	18
2.5.1. Incorporação dos fármacos utilizando tecnologia supercrítica	20
2.6. Liberação controlada de fármacos.....	24
2.7. Anti-inflamatórios não esteroides.....	26
2.7.1. Diclofenaco.....	27
2.7.2. Piroxicam.....	29
2.7.3. Cetoprofeno.....	30
2.8. Considerações finais	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Materiais.....	32
3.2. Métodos	32
3.2.1. Preparação das membranas.....	32

3.2.1.1.	Membranas constituídas de quitosana e xantana	32
3.2.1.2.	Membranas constituídas de quitosana e pectina.....	34
3.2.1.3.	Membranas constituídas de quitosana e goma guar	35
3.2.1.4.	Membranas constituídas de quitosana e goma arábica.....	35
3.2.2.	Incorporação dos fármacos	35
3.2.2.1.	Incorporação do fármaco durante o preparo da membrana.....	36
3.2.2.2.	Incorporação do fármaco por impregnação em solução.....	36
3.2.2.3.	Impregnação com CO ₂ supercrítico.....	37
3.2.3.	Caracterização das membranas	39
3.2.3.1.	Aspecto das membranas	39
3.2.3.2.	Morfologia da superfície das membranas.....	39
3.2.3.3.	Espessura das membranas.....	39
3.2.3.4.	Avaliação das propriedades mecânicas	40
3.2.3.5.	Perfil de hidratação das membranas.....	40
3.2.3.6.	Capacidade de absorção de soluções aquosas após 24 h.....	41
3.2.3.7.	Perda de massa durante exposição a soluções aquosas.....	42
3.2.3.8.	Capacidade de absorção de vapor de água.....	43
3.2.3.9.	Permeabilidade ao vapor de água.....	43
3.2.3.10.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	44
3.2.3.11.	Análise termogravimétrica.....	44
3.2.3.12.	Propriedades antimicrobianas.....	44
3.2.3.13.	Análise quantitativa do grau de citotoxicidade indireta	45
3.2.3.14.	Potencial hemolítico	46
3.2.3.15.	Trombogenicidade	47
3.2.3.16.	Eficiência de incorporação dos fármacos	48

3.2.3.17.	Análise da cinética de liberação do fármaco	48
3.2.3.18.	Análise estatística	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1.	Obtenção das membranas	50
4.1.1.	Membranas de quitosana e xantana.....	50
4.1.2.	Membranas de quitosana e pectina.....	51
4.1.3.	Membranas de quitosana e goma guar.....	53
4.1.4.	Membranas de quitosana e goma arábica	53
4.1.5.	Caracterização das membranas obtidas	54
4.1.5.1.	Morfologia da superfície das membranas.....	54
4.1.5.2.	Espessura e propriedades mecânicas.....	56
4.1.5.3.	Perfil de hidratação das membranas	57
4.1.5.4.	Capacidade de absorção e perda de massa	59
4.1.5.5.	Avaliação da capacidade de sorção de vapor de água	62
4.1.5.6.	Permeabilidade ao vapor de água.....	63
4.1.5.7.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	64
4.1.5.8.	Análise termogravimétrica.....	67
4.1.5.9.	Propriedades antimicrobianas.....	71
4.1.5.10.	Citotoxicidade	72
4.1.5.11.	Hemocompatibilidade.....	73
4.1.5.12.	Trombogenicidade	74
4.1.6.	Estabilidade das membranas em CO ₂ supercrítico	75
4.2.	Incorporação de fármacos nas membranas.....	77
4.2.1.	Incorporação de diclofenaco de sódio nas membranas	77
4.2.1.1.	Adição do fármaco à mistura polimérica.....	77

4.2.1.2.	Incorporação por absorção do fármaco em solução.....	80
4.2.1.3.	Impregnação com CO ₂ supercrítico.....	84
4.2.1.4.	Análise da cinética de liberação de diclofenaco de sódio.....	86
4.2.2.	Incorporação de piroxicam nas membranas.....	89
4.2.2.1.	Adição do fármaco à mistura polimérica.....	89
4.2.2.2.	Incorporação por absorção do fármaco em solução.....	92
4.2.2.3.	Impregnação com CO ₂ supercrítico.....	95
4.2.2.4.	Análise da cinética de liberação de piroxicam.....	104
4.2.3.	Incorporação de cetoprofeno nas membranas.....	106
4.2.3.1.	Adição do fármaco à mistura polimérica.....	106
4.2.3.2.	Incorporação por absorção do fármaco em solução.....	109
4.2.3.3.	Impregnação com CO ₂ supercrítico.....	111
4.2.3.4.	Análise da cinética de liberação de cetoprofeno.....	115
5.	CONCLUSÕES.....	117
5.1.	Sugestões para trabalhos futuros.....	118
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
	ANEXO I.....	139
	ANEXO II.....	140
	ANEXO III.....	144
	ANEXO IV.....	145

1. INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, e é caracterizada como um sistema de defesa extremamente eficiente, pois serve de barreira mecânica contra agentes infecciosos, regula a temperatura corpórea e a entrada e saída de eletrólitos, além de armazenar uma grande quantidade de terminações nervosas. Em vista disto, qualquer lesão a esse órgão pode ocasionar apreciável desequilíbrio fisiológico e representar uma porta de entrada para organismos patogênicos oportunistas.

Os danos à pele podem ser classificados como lesões sem perda de tecido (em cirurgias), e com perda de tecido. Nessa segunda classificação estão incluídas queimaduras e lesões causadas por trauma, abrasão e eventos secundários em doenças crônicas, como úlceras diabéticas e lesões de pressão (Paul e Sharma, 2004).

Várias tecnologias já estão disponíveis para acelerar a cicatrização da pele ou de outros tecidos lesados ou fornecer substitutos temporários enquanto ocorre a recomposição do tecido. O uso de curativos na área danificada, assim como o implante de células, ou ainda a combinação de ambas as técnicas, vêm sendo estudados para melhorar a cicatrização das lesões. Vários destes dispositivos desenvolvidos estão incluídos na categoria de biomateriais (Hench, 1998).

A utilização de curativos pode acelerar o processo de cicatrização e, se estes não fossem tão dispendiosos, os gastos hospitalares finais poderiam ser reduzidos. Portanto, um dos grandes desafios nessa área consiste em buscar matérias-primas de baixo custo, de fácil acesso e que resultem em biomateriais com características adequadas para a função a que se destinam (Dallan, 2005). Dentro desse contexto, diversos estudos têm explorado o potencial da quitina e seus derivados, principalmente a quitosana, na área de Engenharia de Tecidos (Muzzarelli *et al.*, 1988; Hayashi, 1994; Madihally e Mathew, 1999; Yosof *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Khor e Lim, 2003; Azad *et al.*, 2004; Dallan, 2005; Adekogbe e Ghanem, 2005).

Devido às características econômicas do Brasil, a busca por curativos temporários compostos de matérias-primas acessíveis é de grande relevância, pois possibilitaria ampliar sua utilização nos tratamentos de lesões de pele. E, certamente,

seu uso resultaria na contribuição para o aumento da qualidade de vida dos pacientes, pois possibilitaria a regeneração dos tecidos lesados mais rápida e eficientemente, reduzindo o período de internação hospitalar.

Neste contexto, a utilização de membranas compostas de quitosana e outros materiais como poliânions diversos como curativos vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa. Já foram estudados pelo grupo de trabalho do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides da FEQ/Unicamp, nos últimos anos, membranas à base de quitosana isolada ou complexada com alginato e xantana (Marreco *et al.*, 2004; Dallan *et al.*, 2007; Paulo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Paulo *et al.*, 2009; Bueno e Moraes, 2011; Veiga e Moraes, 2012; Bellini *et al.*, 2012). Outros biopolímeros aniônicos como a pectina ou neutros como a goma guar e a goma arábica podem ser combinados com a quitosana para a produção de curativos com diferentes características para aplicações na área de tratamento de lesões de pele de variados tipos.

A inclusão de medicamentos como anti-inflamatórios às membranas de quitosana combinada com poliânions é também de interesse, pois permitiria não só a recuperação dos tecidos lesados pela ação dos biopolímeros, mas também o controle de processos inflamatórios e da dor local. Dentre vários anti-inflamatórios, destacam-se o diclofenaco, o cetoprofeno e o piroxicam por suas características diferentes de solubilidade, que permitem o uso de distintas abordagens para sua incorporação em membranas, além da existência de formulações tópicas comerciais destes fármacos. Estes fármacos derivam de ácidos diferentes e apresentam distintas estruturas químicas, podendo interagir com os polissacarídeos de formas diferentes afetando assim sua liberação. Apesar destas atraentes características, não foram localizadas publicações enfocando a incorporação deste tipo de fármaco em membranas compostas simultaneamente por quitosana e os biopolímeros mencionados, o que confere o caráter de ineditismo ao presente trabalho.

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projeto CAPES/FCT intitulado produção e caracterização de dispositivos à base de quitosana e outros polímeros para aplicação em sistemas de liberação controlada de agentes bioativos voltados ao uso como biomateriais ou embalagens, envolvendo a realização dos estudos em duas unidades diferentes da Unicamp (Faculdade de Engenharia Química e Instituto de Química) e também no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, em Portugal, com apoio da FAPESP.

1.1. Objetivo

Este trabalho teve por objetivo contribuir para os estudos de obtenção de membranas a serem utilizadas em processos de cicatrização de lesões de pele, tendo-se por meta a obtenção de membranas constituídas por quitosana associada a outros polissacarídeos incorporando agentes anti-inflamatórios. Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) A seleção de um ou mais biopolímeros dentre a xantana, a pectina, a goma guar ou a goma arábica que melhor se adéquem para a produção de membranas por associação com quitosana, para utilização como dispositivos de liberação controlada de anti-inflamatórios;
- b) A incorporação dos fármacos diclofenaco, cetoprofeno e piroxicam por adição à mistura polimérica, por impregnação em solução ou por deposição com CO₂ supercrítico nas membranas obtidas, selecionando os métodos que melhor se adaptem a cada caso;
- c) A caracterização física, mecânica, biológica e referente à incorporação dos fármacos nas membranas preparadas, com a finalidade de selecionar a composição e a metodologia de produção de membranas mais adequada do ponto de vista de desempenho esperado do biomaterial;
- d) A avaliação das características de liberação dos fármacos incorporados nas membranas em condições fisiológicas, visando selecionar o dispositivo mais apropriado do ponto de vista da aplicação *in vivo*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento deste trabalho demandou que se tivesse conhecimento de algumas características básicas dos tipos de materiais que podem ser empregados para a composição das membranas e dos anti-inflamatórios de interesse para o tratamento de lesões de pele. Assim, os tópicos que se seguem enfocam aspectos relevantes destes assuntos fundamentais.

2.1. Biomateriais

O uso de biomateriais artificiais para o tratamento de lesões teciduais é relatado há mais de 2000 anos. Porém, os desenvolvidos antes de 1960 não atingiram alto nível de sucesso devido ao pouco conhecimento sobre biocompatibilidade (Leeuwenburgh *et al.*, 2008). Com o final da Segunda Guerra Mundial, os materiais inicialmente desenvolvidos para fins militares tornaram-se disponíveis para uso médico. Desta forma, uma área totalmente nova de pesquisa foi enfocada, que incidiu sobre a concepção de biomateriais com melhor desempenho biológico (Leeuwenburgh *et al.*, 2008) e que permitissem a adição de agentes terapêuticos.

Em 1987, durante a Conferência de consenso de definição em biomateriais, o termo biomaterial foi definido como “qualquer material não viável empregado em dispositivos médicos que interagem com sistemas biológicos” (Williams, 1987). Tal conceito vem sendo expandido nos últimos anos, por exemplo, com relação ao tipo de interação com sistemas biológicos, compreendendo materiais capazes não somente de tratar distúrbios em um órgão ou em uma dada função do corpo, mas também de estimular ou substituir qualquer tecido (incluindo, portanto, materiais bioativos).

Um material adequado deve apresentar uma série de características, como ser biocompatível, atóxico, não carcinogênico e estável quimicamente. Deve também apresentar propriedades mecânicas, massa específica e forma adequadas, ter um custo acessível, ser de fabricação fácil e reprodutível, além de ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado adequadamente (Hench, 1998).

A engenharia de tecidos enfoca processos de reparação e regeneração de lesões, utilizando biomateriais como sistemas de suporte que servem para apoiar, reforçar e em alguns casos, organizar a regeneração tecidual (Madhally e Matthew, 1999). Recentemente, alguns dos principais esforços na área de biologia molecular têm sido aplicados na compreensão da cicatrização de feridas e no desenvolvimento de estratégias para sua cicatrização.

Há uma vasta quantidade de curativos modernos comercialmente disponíveis e vários em desenvolvimento. Boateng *et al.* (2008) estabeleceram uma classificação desses dispositivos, dependendo de alguns fatores como: a função que o dispositivo desempenha na lesão (bactericida, absorvente, aderente), o tipo de material utilizado para sua produção (hidrocolóides, colágeno, biopolímeros) e a forma física do curativo (filme, gel, esponja, unguento). Há ainda classificações mais avançadas, como o modo que o curativo interage com o ferimento. Por exemplo, em curativos denominados primários, há contato físico entre o curativo e a pele lesada, enquanto que os secundários são aqueles utilizados para cobrir curativos primários.

Biopolímeros são frequentemente empregados no desenvolvimento de avançadas terapias de lesões de pele, tanto agudas como crônicas (Metcalf e Ferguson, 2007). Dentre os polímeros de origem biológica biocompatíveis considerados de relevância na constituição de biomateriais e de outros dispositivos úteis nas áreas médicas, farmacêuticas e odontológicas, incluindo também sistemas para a liberação de fármacos e materiais com aplicações na área de alimentos, destaca-se a quitosana.

2.2. Utilização de quitosana na produção de biomateriais

A quitina, composto do qual se origina a quitosana é um dos materiais orgânicos naturais renováveis mais abundantes no mundo, sendo de grande interesse na área de biomateriais. É um importante componente do exoesqueleto de animais, especialmente de crustáceos, moluscos e insetos e também o principal polímero fibrilar constituinte da parede celular de alguns fungos (Khor e Lim, 2003; Dash *et al.*, 2011). Comercialmente é obtida de carapaças de caranguejos, camarões e lagostas, representando de 20 a 50%

em massa (seca) dos subprodutos do processamento destes animais (Dumitriu, 1996). Milhões de toneladas de quitina são comercializadas anualmente e, portanto, esse biopolímero representa uma fonte de baixo custo e amplamente disponível (Dash *et al.*, 2011).

A quitosana é obtida através da desacetilação alcalina da quitina. Sua fórmula estrutural consiste de um copolímero de N-acetil glicosamina (β -(1-4)2-acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) (Yamaura, 2008; Dash *et al.*, 2011). As estruturas da quitina e da quitosana são mostradas na Figura 2.1. O grau de acetilação, uma das importantes características variáveis deste material refere-se à proporção de unidades de N-acetil-D-glucosamina em relação ao número total de monômeros. A quitosana apresenta grau de desacetilação maior que 50% e possui, geralmente, grau de desacetilação (G.D.) entre 70 a 95%, com massa molar de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹. O grau de desacetilação é um parâmetro estrutural que influencia propriedades físico-químicas como a massa molar, o alongamento e a tensão na ruptura (Chatelet *et al.*, 2001; Canella e Garcia, 2001).

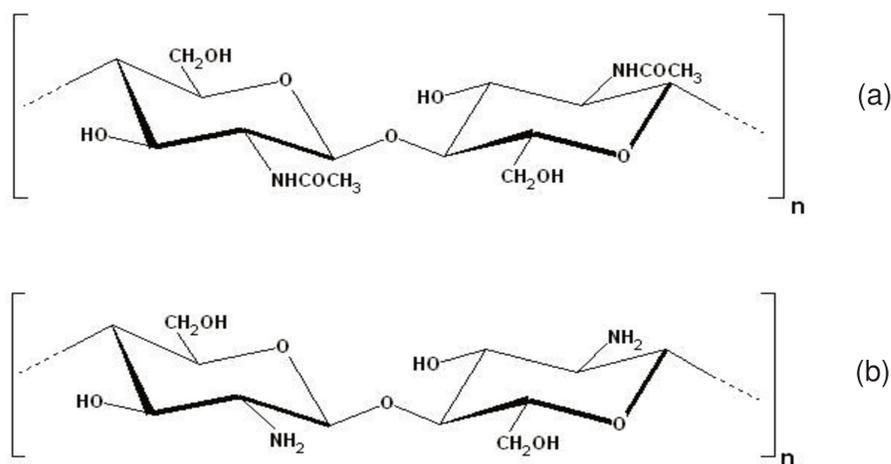


Figura 2.1: Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana (baseada em Kumar, 2000).

Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, a quitosana tem sido muito estudada em diversas aplicações na área de biomateriais (Kumar, 2000;

Niekraszewicz, 2005; Dash *et al.*, 2011). Este composto possui também propriedades bacteriostáticas e fungistáticas, capacidade de ativação de macrófagos, estimula a migração e proliferação celular, além de promover a orientação durante o crescimento celular, o que contribui para a reorganização da histo-arquitetura do tecido regenerado (Dumitriu, 1996; Paul e Sharma, 2004; Clasen *et al.*, 2006). A quitosana é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), dos EUA, na composição de alguns curativos.

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, formando uma solução viscosa. Suas soluções são propensas a formar fibras, filmes e revestimentos, e possuem boa miscibilidade com outros polímeros, formando complexos e quelatos. Devido a estas propriedades, a quitosana pode ser utilizada de diversas formas, como gel, partículas, membranas, esponjas e em solução. Suas aplicações médicas englobam lentes de contato, cápsulas, sistemas de liberação controlada de fármacos e curativos (Niekraszewicz, 2005; Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b).

Testes clínicos em condições normais feitos com o intuito de avaliar biomateriais constituídos de quitosana não reportaram reações inflamatórias ou alérgicas após o implante, a injeção, a aplicação tópica ou a ingestão por humanos (Muzzarelli, 1995; Dash *et al.*, 2011). Este composto também estimula o sistema imune do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas (Rabea *et al.*, 2003), além de possuir propriedades curativas de feridas e favorecer a regeneração de tecidos (Muzzarelli, 1993; Muzzarelli *et al.*, 1994; Pillai *et al.*, 2009).

Membranas densas de quitosana mostraram influenciar todos os estágios de cicatrização tecidual em experimentos com modelos animais, envolvendo vários mecanismos, como coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem (Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Niekraszewicz, 2005; Howling *et al.*, 2001). Uma vez colocado sobre a lesão, ao filme de quitosana aderem fibroblastos, favorecendo a proliferação de queratinócitos, e assim, a regeneração epidérmica (Dash *et al.*, 2011). Diversos tipos de lesões tratadas com quitina e quitosana em diferentes tipos de animais apresentaram diminuição no tempo de tratamento, com formação mínima de cicatrizes (Paul e Sharma, 2004; Paulo *et al.*, 2009).

Dallan (2005) realizou um estudo sobre membranas densas de quitosana para uso potencial no tratamento de queimaduras, bem como a substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol, analisando também a influência da técnica de esterilização nas características das membranas produzidas. A utilização de quitina e glicerol permite a obtenção de membranas com capacidade de absorção de líquidos e propriedades mecânicas inferiores às observadas para as membranas formadas exclusivamente por quitosana, reduzindo também a cristalinidade do material, não sendo vantajosa para a aplicação requerida. Nenhuma das composições empregadas mostrou-se favorável à adesão de células Vero (fibroblastos aderentes e comumente utilizados na análise de citotoxicidade de biomateriais) em suas superfícies e a utilização de óxido de etileno mostrou-se como a técnica de esterilização mais apropriada em termos de manutenção das características originais dos biomateriais. Os resultados obtidos indicaram que a maioria das composições apresentou características adequadas para utilização como curativos temporários não biodegradáveis, sendo as membranas compostas somente por quitosana as que mostraram os resultados mais promissores para a finalidade pretendida.

Entretanto, membranas densas constituídas unicamente de quitosana apresentam algumas desvantagens quando utilizadas em lesões úmidas, como a permeabilidade insuficiente ao exsudato e ao oxigênio, além da baixa flexibilidade no estado seco, o que ocasiona dificuldades na aplicação (Clasen *et al.*, 2006). Tais problemas podem ser contornados pela adição de compostos que melhorem tais propriedades, como agentes porogênicos e plastificantes, ou mesmo a complexação com outros polímeros.

A quitosana apresenta alta densidade de cargas positivas, podendo interagir com polímeros de carga oposta para a constituição de novas matrizes (Dumitriu, 1996). Há relatos na literatura sobre a preparação de complexos polieletrólitos contendo quitosana e diversos poliânions naturais como carboximetilcelulose, alginato, sulfato de dextrana, heparina, carboximetildextrana, carragena, pectina, colágeno e xantana (Dumitriu e Chornet, 1998; Martínez-Ruvalcaba *et al.*, 2007). Frente a isto, é de grande relevância o estudo sistemático da complexação de quitosana com outros polissacarídeos na área de biomateriais.

2.3. Formação de hidrogéis e de complexos polieletrólitos contendo quitosana

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que intumescem em meio aquoso e retêm uma grande quantidade de água em sua estrutura sem se dissolver (Dumitriu, 1996; Horn, 2008). A habilidade dos biopolímeros de formar géis, mesmo em baixa concentração, constitui uma de suas mais importantes propriedades funcionais, assim como a permeabilidade a solutos e o adequado desempenho *in vivo*. Em vista desta característica, vários polímeros estão sendo estudados para a preparação de hidrogéis com aplicação nas áreas de farmácia, medicina e biotecnologia, particularmente para o tratamento de feridas e como membranas, matrizes ou outros dispositivos para a liberação controlada de fármacos (Khurma *et al.*, 2006).

Diversos métodos de classificação de hidrogéis são encontrados na literatura, dependendo da natureza e da estrutura do sistema. Um dos métodos de classificação fundamenta-se nos tipos de redes formadas: redes entrelaçadas, redes covalentemente ligadas e redes formadas por interações secundárias, categoria que inclui todos os casos intermediários (Berger *et al.*, 2004a). A maior desvantagem dos géis, referente à baixa resistência mecânica, pode ser superada pela reticulação das cadeias, que promove reforço na estrutura (Lee *et al.*, 1999).

Os hidrogéis de quitosana são classificados como químicos e físicos. Os químicos são mantidos por ligações covalentes irreversíveis, enquanto os hidrogéis físicos são formados por vários tipos de ligações reversíveis, como as interações eletrostáticas nos hidrogéis ligados ionicamente e nos complexos polieletrólitos (PECs) formados com moléculas aniônicas de alta massa molar. Devido à natureza das interações ser a mesma nos hidrogéis ligados ionicamente e nos PECs, não há uma divisão precisa entre tais estruturas. Assim, consideram-se hidrogéis ligados ionicamente aqueles nos quais a quitosana se liga a íons pequenos, e como PECs, quando a quitosana interage com outros polímeros carregados (Berger *et al.*, 2004a; Rodrigues, 2008).

Os PECs são formados pela interação de polímeros com cargas opostas ligados, principalmente, por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, mas também por interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ou pela combinação destas (Chu *et al.*, 1996; Dumitriu e Chornet, 1998; Lee *et al.*, 1999; Argin-Soysal *et al.*, 2009; Zhao *et al.*,

2011). Esse tipo de complexo evita o uso de precursores orgânicos, catalíticos ou agentes reativos, diminuindo o risco de toxicidade ou reações com o agente terapêutico cuja incorporação no dispositivo seja desejável (Dash *et al.*, 2011). A formação destes complexos pode afetar fortemente algumas das propriedades dos polímeros isolados, como solubilidade, reologia, condutividade, propriedades mecânicas, permeabilidade e condutividade elétrica, além de modificar a turbidez das soluções (Lee *et al.*, 1999). Os PECs possuem propriedades físicas únicas, como superfície altamente hidrofílica, insolubilidade em solventes orgânicos comuns e em água, estrutura estável quimicamente, não apresentando, entretanto, transição vítrea (Zhao *et al.*, 2011).

A formação dos PECs pode variar conforme as condições de reação, como pH, força iônica, concentrações poliméricas, relações mássicas entre os polímeros e temperatura (Dumitriu e Chornet, 1998). Durante a complexação, os polieletrólitos podem formar coacervados ou formar um hidrogel mais ou menos compacto. Contudo, se as interações iônicas forem muito fortes, pode ocorrer precipitação, impedindo a formação de hidrogéis (Berger *et al.*, 2004b). Além disso, hidrogéis podem ser formados também pela interação entre a quitosana e outro polímero hidrofílico neutro, como a goma guar e o poli(vinil álcool) (Dash *et al.*, 2011).

Uma grande variedade de polímeros capazes de formar hidrogéis e complexos polieletrólitos tem sido apontada como possíveis candidatos para utilização em diversas aplicações biomédicas. A vantagem da utilização de PECs ao invés dos polímeros isolados é a formação de uma estrutura única, capaz de absorver maior quantidade de soluções aquosas e ainda manter sua estrutura estável. A quitosana complexada a variados poliânions é muito estudada para a preparação de membranas para fins terapêuticos (Rodrigues, 2008; Paul e Sharma, 2004; Mao *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000; Muzzarelli *et al.*, 1988).

Uma técnica de preparação de membranas contendo simultaneamente quitosana e alginato (um polissacarídeo aniônico extraído de algas marinhas) foi proposta por Yan *et al.* (2000) e adaptada por Rodrigues (2008). Tal metodologia fundamenta-se na produção controlada de coacervados das matérias-primas e em sua moldagem e posterior secagem. Membranas com 78 μm de espessura, capacidade de drenagem de água de 14,3 $\text{kg/m}^2\cdot\text{dia}$, capacidade máxima de absorção de até 19,2 g $\text{H}_2\text{O/g}$ membrana,

permeabilidade ao vapor de água de 2,7 g/m².dia, eficiência de incorporação de bacitracina de até 25% e resistência à tração em torno de 30 MPa foram obtidas. Os resultados indicaram que as membranas de quitosana-alginato obtidas têm potencial para utilização como curativos temporários na terapia de lesões (Rodrigues *et al.*, 2008).

Outros polímeros úteis na produção de membranas contendo quitosana são mais detalhadamente discutidos a seguir.

2.4. Biopolímeros alternativos para a complexação com quitosana

A obtenção de um complexo polieletrólito contendo quitosana requer o uso de polímeros do tipo poliânions e a reação é geralmente realizada em solução aquosa, favorecendo assim o aspecto do produto final. Os poliânions mais comumente usados são polissacarídeos contendo grupos carboxílicos, tais como alginato, pectina, xantana, carboximetilcelulose, dextrana, heparina, ácido hialurônico e carragena, assim como algumas proteínas e polímeros sintéticos (Dumitriu e Chornet, 1998; Berger *et al.*, 2004b; Dash *et al.*, 2011). Os poliânions envolvidos no desenvolvimento deste trabalho são descritos em seguida.

2.4.1. Xantana

A xantana é um heteropolissacarídeo produzido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*, possuindo massa molar em torno de 2×10^6 Da, podendo chegar a 50×10^6 Da (Rosalam e England, 2006). Sua estrutura primária consiste em unidades que se repetem de um pentassacarídeo formado por duas moléculas de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico, além de grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glicose com ligações nas posições 1 e 4, conforme mostra a Figura 2.2 (García-Ochoa *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2012).

A xantana é um produto atóxico que não promove sensibilização e não causa irritação na pele e nos olhos, tendo sido aprovada pela *Food and Drug Administration*

(FDA) dos EUA em 1969 como aditivo em alimentos (García-Ochoa *et al.*, 2000). No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871 da Legislação Brasileira de Alimentos (Lima *et al.*, 2001).

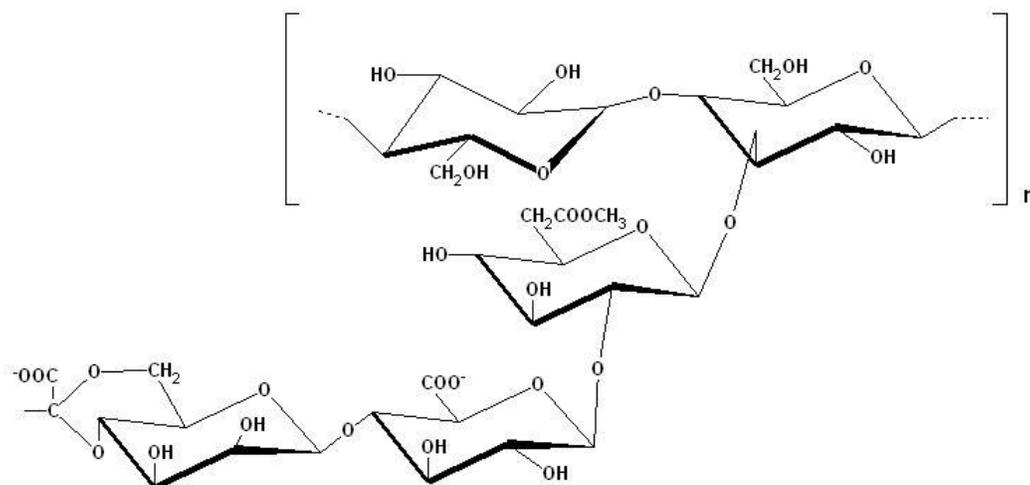


Figura 2.2: Estrutura química da xantana (García-Ochoa *et al.*, 2000).

Suas aplicações são diversas, principalmente como espessante em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos, em função de sua capacidade de estabilização de emulsões, estabilidade térmica, compatibilidade com ingredientes alimentícios e propriedades reológicas pseudoplásticas (García-Ochoa *et al.*, 2000; Kim e Yoo, 2006). Um exemplo da aplicação deste polímero em dispositivos comercialmente disponíveis para lesões de pele é o curativo Viscopaste[®], produzido pela Smith & Nephew, constituído por algodão impregnado com uma pasta contendo xantana, guar, glicerol e óxido de zinco.

Há relatos na literatura sobre o uso de xantana na produção de dispositivos para a liberação controlada de fármacos (Andreopoulos e Tarantili, 2001; Vendruscolo *et al.*, 2005; Jian *et al.*, 2012). Andreopoulos e Tarantili (2001) descreveram o estudo de liberação controlada de ácido salicílico utilizando matrizes preparadas com xantana e este fármaco em proporções de 1 a 5% em relação à xantana. Vendruscolo *et al.* (2005) e Jian

et al. (2012) descreveram a preparação de comprimidos utilizando xantana isolada e também associada à galactomana como matrizes para a liberação controlada de teofilina.

Magnin *et al.* (2003) utilizaram um hidrogel composto de quitosana e xantana para a imobilização de três enzimas (endopeptidase, serinoprotease e lípase), no qual estas mantiveram sua atividade. Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) avaliaram o comportamento reológico de um hidrogel composto de quitosana e xantana utilizando modelos matemáticos aplicáveis para géis fracos. Os resultados revelaram que a estrutura e as propriedades finais destes hidrogéis são função de fatores tais como a concentração polimérica do hidrogel e a natureza do meio de dispersão. Argin-Soysal *et al.* (2009) avaliaram os efeitos das condições de complexação da quitosana com a xantana para a formação de microcápsulas, observando que o parâmetro mais importante para formação do complexo é a concentração de xantana e que seu aumento afeta significativamente a capacidade de intumescimento da partícula.

O uso de xantana associada à quitosana pode resultar em membranas com alta capacidade de absorção de soluções aquosas, adequadas para uso em lesões de pele que apresentam elevada liberação de exsudato (Veiga e Moraes, 2012). Bellini *et al.* (2012) produziram membranas de quitosana e xantana utilizando ou não o surfatante (Pluronic F68) e obtiveram efeito citotóxico baixo, menor que 20%, em fibroblastos L929. Não foram localizados outros relatos sobre formação de membranas para aplicação como dispositivos de liberação controlada de fármacos com estes polímeros.

2.4.2. Pectina

A pectina é um polissacarídeo extraído da parede celular de algumas plantas e do albedo de frutas cítricas. É composta de segmentos galacturônicos metilados separados por resíduos de ramnose, conforme indicado na Figura 2.3, sendo usualmente classificada quanto ao grau de metoxilação como de baixa metoxilação quando abaixo de 50% e como de alta metoxilação quando acima de 50% (Sriamornsak, 2003; Hiorth *et al.*, 2005; Ghaffari *et al.*, 2007; Fellah *et al.*, 2009; Hagesaether *et al.*, 2009).

A capacidade de formação de gel depende do grau de metoxilação. Pectinas muito metoxiladas formam gel na presença de, por exemplo, açúcar como co-soluto, e esta gelificação ocorre, provavelmente, por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Pectinas com baixa metoxilação formam gel na presença de íons divalentes como o cálcio, que são capazes de formar pontes entre dois grupos carboxílicos pertencentes a cadeias diferentes de pectina próximas fisicamente (Chang e Lin, 2000; Hiorth *et al.*, 2005).

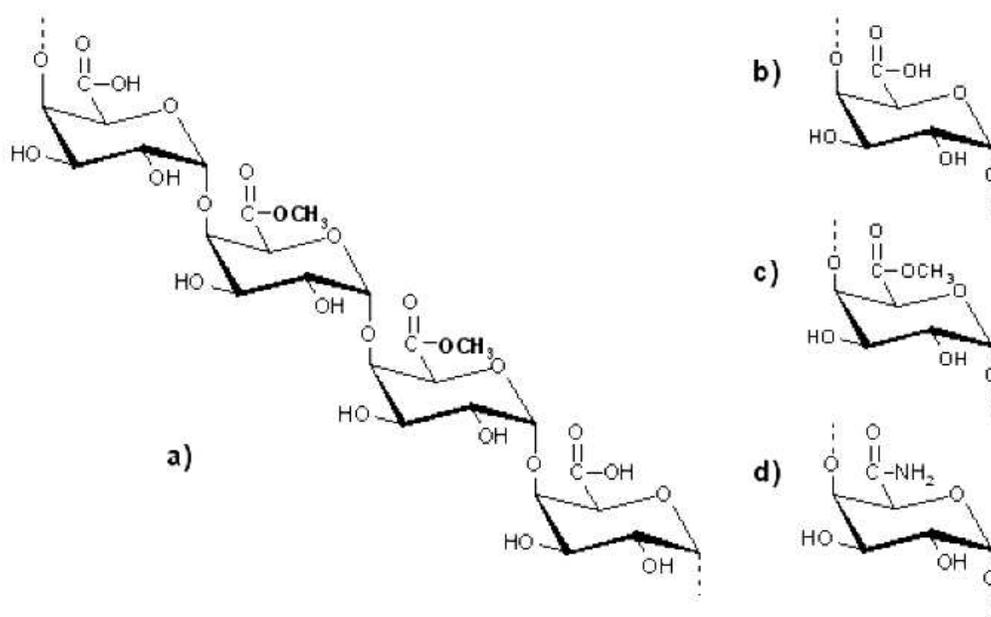


Figura 2.3: Segmento repetitivo na molécula de pectina (a) e grupos funcionais carboxila (b); éster (c); amida (d) na cadeia de pectina (Sriamornsak, 2003).

Na indústria farmacêutica, a complexação de pectina e cálcio foi já investigada em várias formulações diferentes para administração de medicamentos. Esta combinação tem sido relatada na literatura para comprimidos revestidos, esferas de hidrogel e filmes de recobrimento para lesões de pele (Hiorth *et al.*, 2005; Ghaffari *et al.*, 2007). Estes curativos para pele já estão disponíveis comercialmente, como o Duoderm[®] (Convatec) e o Tegaserb[®] (3M), curativos hidrocolóides adesivos compostos por gelatina, carboximetilcelulose sódica e pectina.

Macleod *et al.* (1999) avaliaram o potencial de filmes de pectina, quitosana e hidroxipropil metilcelulose como sistema de revestimento para comprimidos, observando comportamento bimodal na liberação de medicamentos. Uma formulação adequada do filme é capaz de produzir sistemas que liberam o fármaco a diferentes taxas no trato gastrointestinal. Ghaffari *et al.* (2007) estudaram o potencial uso de filmes contendo quitosana (Q) e pectina (P) como sistemas de liberação controlada de teofilina. A razão mássica ótima entre os polímeros para formação do complexo foi de 2:1 P:Q. O material obtido apresentou capacidade de intumescimento prematura quando em contato com meio intestinal simulado. Hagesaether *et al.* (2009) investigaram a mucoadesão e a permeação de paracetamol em filmes de quitosana e pectina utilizando glicerol como plastificante. Foi constatado que filmes com menor proporção de pectina (1:3 P:Q) geralmente apresentam maior absorção de tampão fosfato salino, maior permeabilidade ao fármaco e maior força mucoadesiva. Isto confirma a relação direta entre mucoadesividade e permeabilidade a fármacos, uma vez que ambos tendem a aumentar quando a capacidade de intumescimento do material também aumenta.

2.4.3. Goma Arábica

A goma arábica é extraída de árvores como a *Acacia senegal* e *Acacia seyal* e é uma das gomas mais antigas e importantes industrialmente. É utilizada principalmente como emulsificante, mas também como espessante e estabilizante em alimentos e cosméticos, além de ter uso na indústria de tintas. É uma mistura complexa de macromoléculas (250-2000 kDa) composta predominantemente de carboidratos, entre eles D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e alguns derivados ácidos como os ácidos D-glicurônico e 4-O-metil-D-glicurônico e seus respectivos sais metálicos, responsáveis pelo caráter aniônico da goma. Estão presentes na estrutura também proteínas (cerca de 2%), compostas principalmente de resíduos de hidroxiprolina, prolina e serina. Estudos sugerem que a estrutura desta goma seja globular, com unidades polissacarídicas ligadas a uma cadeia polipeptídica comum e que esta característica seja responsável por sua atividade superficial e capacidade de formação de filmes. A abertura da estrutura globular

depende da dissociação das unidades de ácido úrico e seus respectivos sais (cálcio, magnésio e potássio) (Nishi e Jayakrishnan, 2005; Yadav *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Uma possível estrutura que abrange a maior parte das evidências encontradas até o momento está apresentada na Figura 2.4.

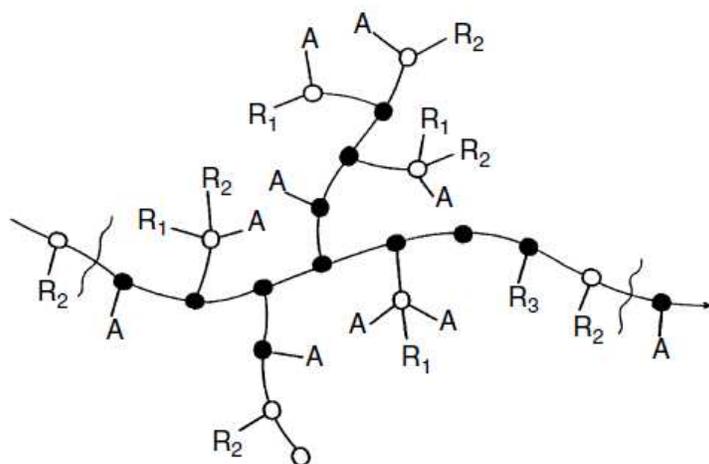


Figura 2.4: Suposta estrutura molecular da goma arábica. (A) arabinosil; (●) 3-galactose; (○) 6-galactose (galactose ou glicose); (R1) ramnose-4glicose (ramnose ocasionalmente ausente ou substituído por metil ou arabinose); (R2) galactose-3arabinose; (R3) arabinose-3arabinose-3 arabinose (Stephen *et al.*, 2006).

Esta goma é altamente solúvel em água, podendo-se preparar soluções com concentrações acima de 50%. A goma arábica forma uma solução de baixa viscosidade em comparação com outras gomas e apresenta um comportamento tipicamente Newtoniano em concentrações maiores que 40%. Próximo ao pH neutro, os grupos carboxila estarão desprotonados portanto, com carga elétrica negativa, resultando em sua repulsão, o que ocasiona a abertura da molécula, expandindo sua estrutura, que pode facilitar a complexação com polímeros positivamente carregados como a quitosana (Dumitriu, 2002; Nishi e Jayakrishnan, 2005; Espinosa-Andrews *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011).

Nos produtos cosméticos a goma age como estabilizante de emulsões, melhorando a suavidade do produto e formando um filme protetor na epiderme. Em baixas concentrações, é usada em detergentes e pastas de dentes (Dumitriu, 2002).

Espinosa-Andrews *et al.* (2007) concluíram que, para o gel, a melhor razão goma arábica-quitosana de acordo com a mobilidade eletroforética e a turbidez encontrada é de 5:1, independentemente da concentração total de polímero usada. Os autores observaram também que a máxima interação ocorre na faixa de pH entre 3,5 a 5. Espinosa-Andrews *et al.* (2010) confirmaram que o complexo é formado através da interação eletrostática entre os grupos amina da quitosana e os grupos carboxila da goma arábica.

2.4.4. Goma Guar

A goma guar é um polissacarídeo de alta massa molar, isolada do endosperma da semente da planta guar. Como outras galactomanas, a goma guar não forma géis físicos verdadeiros e é empregada como espessante principalmente na indústria de alimentos, além de ser um material promissor na confecção de plásticos biodegradáveis. Sua estrutura consiste em uma cadeia principal de (1-4)- β -D-manopiranosila parcialmente substituída na posição O-6 por grupos de α -D-galactopiranosila (Huang *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2011; Mudgil *et al.*, 2011). É apresentada na Figura 2.5 a estrutura química da goma guar. As moléculas de goma guar são capazes de reter grandes quantidades de água em uma larga faixa de temperatura (0 - 78°C).

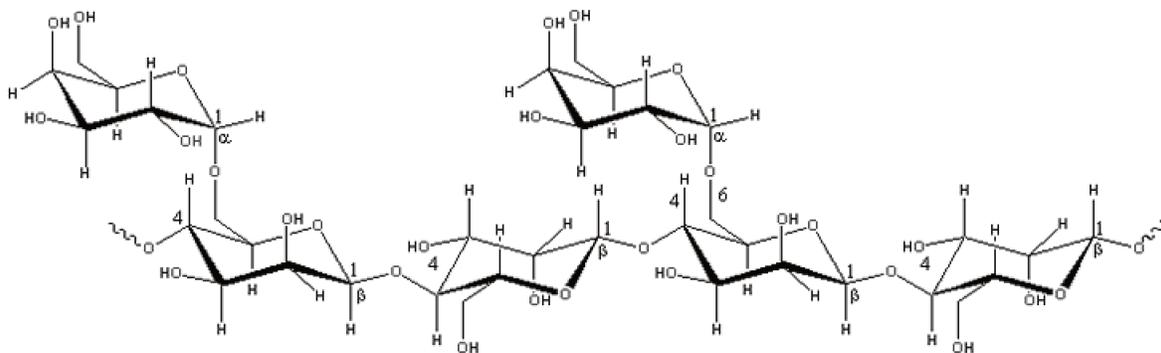


Figura 2.5: Estrutura química da goma guar (Mudgil *et al.*, 2011).

Filmes de quitosana e goma guar foram estudados como sistemas de liberação controlada tópica do anti-inflamatório Celecoxib para câncer de cólon, resultando em redução da proliferação de células tumorais (Haupt *et al.*, 2006). Estes filmes, formados provavelmente pela interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos hidroxila da goma guar, apresentaram boas propriedades mecânicas, além de possibilitarem a incorporação do fármaco durante o preparo do dispositivo. O curativo Viscopaste® (Smith & Nephew) é um exemplo de aplicação da goma guar no tratamento de lesões de pele.

Nota-se, portanto, que há grande variabilidade nas características dos polímeros que podem interagir com a quitosana, características estas sumarizadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Características gerais de cada biopolímero

Polímero	Fonte	Grupo ionizável	pKa	Massa molar média (Da)
Quitosana	Carapaça de crustáceos	-NH ₂	6,3	5,49 × 10 ^{5A}
Xantana	Produto de <i>X. campestris</i>	-COOH	2,9	2,65 × 10 ^{6B}
Pectina	Frutas cítricas	-COOH	3,5-4,1	0,66 × 10 ^{5C}
Goma Guar	Planta guar	-OH	NE	1,45 × 10 ^{6B}
Goma Arábica	Planta Acácia	-COOH	2,2	3,82 × 10 ^{5D}

NE: Não encontrado; ^A: Yen *et al.* (2009); ^B: Khouryieh *et al.* (2007); ^C: Guo *et al.* (2012); ^D: Yang *et al.* (2012)

2.5. Incorporação de fármacos em membranas

A incorporação de fármacos em sistemas poliméricos é um aspecto importante da tecnologia farmacêutica, facilitando a administração do agente bioativo ao paciente, interferindo em seu perfil de biodisponibilidade, ou modificando sua estabilidade (Oliveira *et al.*, 2004), além de controlar a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química do composto ativo.

Muitos dos fármacos possuem forma cristalina, apresentam baixa solubilidade em soluções aquosas e geralmente são comercializados na forma não solubilizada (comprimidos, cápsulas, géis, suspensões). Devido a estes fatos, os sistemas convencionais fornecem elevada concentração de fármaco no organismo, podendo facilmente atingir níveis potencialmente tóxicos. Posteriormente, há um período de decaimento da concentração até que uma nova administração ocorra (Duarte *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2007).

A incorporação de fármacos em matrizes poliméricas vem sendo explorada a fim de melhorar a aplicação dos ativos. A liberação controlada ocorre quando o sistema polímero/fármaco é projetado para liberar o ativo de uma maneira previamente determinada. Um dos objetivos é atingir perfis de liberação adequados durante um longo período, evitando flutuações da concentração e reduzindo a necessidade de administrações frequentes (Duarte *et al.*, 2006).

Numerosos sistemas de liberação de drogas são descritos na literatura, nos quais o agente ativo a ser incorporado pode estar quimicamente ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (Oliveira *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). De forma geral, os fármacos podem ser incorporados às membranas durante sua preparação, se adicionados à mistura resultante das soluções dos constituintes do filme, ou por impregnação após a preparação do filme usando solventes aquosos ou orgânicos. A escolha do método utilizado depende diretamente das características do fármaco escolhido e do tipo de matriz a ser formada (Lin e Metters, 2006).

A incorporação do fármaco durante o preparo da membrana é o método geralmente mais utilizado, devido à facilidade de inclusão do fármaco no dispositivo, favorecendo a distribuição homogênea ao longo do filme polimérico, como no caso do hidrocloreto de ciprofloxacina em filmes de quitosana e polietilenoglicol (Wang *et al.*, 2007). Mas, dependendo das condições empregadas durante o processo de produção do dispositivo, o fármaco pode sofrer alterações químicas, perdendo sua atividade terapêutica, por exemplo, em função do uso de altas temperaturas de secagem ou mesmo durante a esterilização do filme.

A incorporação do fármaco na membrana já pronta e normalmente seca ocorre durante o intumescimento da mesma na presença de um solvente contendo o fármaco

dissolvido. A solubilidade em água é um dos principais fatores que afetam a biodisponibilidade *in vivo* de qualquer fármaco, visto que muitos deles são insolúveis ou pouco solúveis em soluções aquosas. Para que haja a incorporação por imersão, o ativo deve estar dissolvido e, devido à baixa solubilidade em água, a utilização de solventes orgânicos pode ser requerida (Coimbra *et al.*, 2008). É importante, nestes casos, considerar a toxicidade dos solventes e sua remoção. No entanto, este método apresenta desvantagens como a necessidade de evaporação do solvente, que por vezes ocorre com o uso de aquecimento ou vácuo, causando degradação do fármaco e até do dispositivo polimérico, além do baixo rendimento de incorporação e da dispersão heterogênea dos fármacos (Davies *et al.*, 2008). Um exemplo desta metodologia é a incorporação de celecoxib em filmes de quitosana e goma guar que atingiu uma eficiência de 87% de incorporação (Haupt *et al.*, 2006).

Opcionalmente, a incorporação de fármacos pode ser realizada utilizando tecnologia de fluidos supercríticos, descrita no próximo item.

2.5.1. Incorporação dos fármacos utilizando tecnologia supercrítica

O fluido supercrítico (FSC) pode ser definido como uma fase densa em que a pressão e a temperatura estão acima do ponto crítico da substância em questão. A aparência macroscópica do FSC é de um sistema homogêneo, sem separação de fases. Este apresenta propriedades intermediárias entre gases e líquidos (densidade, viscosidade, compressibilidade e coeficiente de difusão). Como um líquido, o FSC apresenta densidade apreciável, com alto poder de solvatação, enquanto que a viscosidade e a difusividade são similares às de um gás, facilitando a transferência de massa no sistema (Brunner, 1994; Pasquali *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009; Masmoudi *et al.*, 2011).

Diversas substâncias podem se utilizadas na região supercrítica, mas a escolha do fluido, assim como da temperatura e da pressão utilizadas irá depender de suas propriedades físico-químicas e do tipo de sistema em que será empregado. O dióxido de carbono está entre os fluidos supercríticos mais utilizados, especialmente por possuir baixas temperatura e pressão crítica ($T_c = 31^\circ\text{C}$ and $P_c = 73$ bar). Esta característica

torna-o muito atraente para utilização em sistemas termosensíveis, como os que envolvem fármacos e outros compostos bioativos. Este também apresenta outras vantagens, como não causar danos ao meio ambiente (em grande escala, pode ser recuperado e reutilizado), ser atóxico, não inflamável, não corrosivo, e possuir baixo custo associado a alto grau de pureza em comparação a outros fluidos (Duarte *et al.*, 2009).

A tecnologia de fluidos supercríticos tem sido aplicada na área de polímeros para a polimerização, intumescimento, impregnação, fracionamento, purificação e formação de partículas. Isto é atribuído aos importantes efeitos causados por estes fluidos, como diminuição da temperatura de transição vítrea (efeito plastificante), intumescimento reversível de polímeros rígidos ou elastômeros e redução da viscosidade do material fundido (Kikic e Vecchione, 2003).

O processo de impregnação só é viável quando o fármaco é solúvel no fluido supercrítico, o polímero é intumescido pela solução supercrítica e o coeficiente de partição é favorável, permitindo incorporar quantidades suficientes de soluto (Kikic e Vecchione, 2003). Neste caso, o princípio ativo é solubilizado, por exemplo, em CO₂ supercrítico e, em seguida, introduzido em uma célula de alta pressão contendo o dispositivo polimérico para que haja a impregnação. Posteriormente é feita a descompressão lenta desta célula para que haja remoção do CO₂ (Braga *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2008).

A maior vantagem deste processo está na obtenção de um produto final livre de solvente residual, principalmente quando se considera a área farmacêutica e de alimentos, reduzindo-se também os custos de remoção do solvente, que pode ser totalmente recuperado manipulando-se a pressão (Kikic e Vecchione, 2003). Outra vantagem é a capacidade de intumescimento do dispositivo polimérico pelo fluido supercrítico, facilitando a difusão dos fármacos pela matriz (Braga *et al.*, 2008; Masmoudi *et al.*, 2011).

A concentração e a penetração do fármaco nos dispositivos são controladas através da manipulação da taxa de despressurização do sistema, do tempo de impregnação ou mesmo alterando a densidade do solvente (e conseqüentemente a solubilidade do fármaco no meio) pela variação da pressão e da temperatura. Na maioria dos casos, e dependendo das condições utilizadas, não há alteração das propriedades

físicas, químicas e mecânicas dos materiais poliméricos e nem degradação dos fármacos (Braga *et al.*, 2008).

No processo de impregnação com solvente supercrítico (SSI), este age como transportador do fármaco para o interior da matriz polimérica. Esta impregnação pode ocorrer estática ou dinamicamente. No primeiro caso, o fármaco e o dispositivo polimérico estão contidos na mesma célula de pressão e o fluido é adicionado a este sistema. No segundo caso (dinâmico), ocorre pré-saturação do FSC com o agente ativo e, posteriormente, este é transferido para a célula onde está o dispositivo (Kikic, 2009). Este sistema tem como vantagem a possibilidade de remoção do ativo que precipita na superfície do material, muitas vezes indesejável, como por exemplo, em lentes de contato. Muitos autores vêm explorando a utilização da tecnologia de fluidos supercríticos para a impregnação de dispositivos poliméricos, e alguns exemplos são apresentados na Tabela 2.2.

Diversos trabalhos sugerem o uso de um cossolvente para aumentar a solubilidade do fármaco no fluido supercrítico e facilitar a incorporação, sendo água e etanol os mais utilizados (Bush *et al.*, 2007; Natu *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010a; Costa *et al.*, 2010b). Seu uso pode resultar em modificações na interação do fármaco com a matriz polimérica ou mesmo com o fluido pressurizado, alterando a taxa de impregnação. Os cossolventes podem contribuir significativamente para o aumento da eficiência do processo, elevando a polaridade do dióxido de carbono e, assim, a solubilidade de fármacos mais polares. Estes também são capazes de melhorar a impregnação de compostos hidrofóbicos em hidrogéis, como no caso do etanol, que reduz a polaridade global da água presente na matriz polimérica (Masmoudi *et al.*, 2011).

As condições de despressurização aplicadas ao sistema são fundamentais para definir as características do material impregnado. Se a despressurização for rápida, pode causar danos aos polímeros, devido à expansão rápida do fluido supercrítico incorporado na matriz, e alta precipitação de fármaco na superfície do material.

Tabela 2.2: Comparação de vários trabalhos de incorporação de fármacos por tecnologia supercrítica utilizando dióxido de carbono.

Polímero	Fármaco	Forma do dispositivo	Condições de impregnação	Quantidade impregnada	Referência
PVP e etilcelulose	Nimesulida	Matriz	40°C, 130 - 220 bar	9,7 e 2,12 mg/g	Cortesi <i>et al.</i> , 2000
PLGA	5-fluorouracil β-estradiol	Matriz	35 - 55 °C, 207 bar	26,80 e 0,49 mg/g	Guney e Akgerman, 2002
PS	ECDA	Filme	38 - 65°C, 90 - 205 bar	0,5 - 1 mg/g	Nikitin <i>et al.</i> , 2003
Etilcelulose/ metilcelulose	Naproxeno	Microesferas (SAS)	35 °C, 80 bar	2,1 - 4,1% (m/m)	Duarte <i>et al.</i> , 2006
Quitosana	Indometacina	Pó	70°C, 207 bar	Não mencionado	Gong <i>et al.</i> , 2006
PVPP	β-estradiol	Não mencionado	40 - 50 °C, 172 bar	28,0 - 36,0 mg/g	Bush <i>et al.</i> , 2007
PVP	Cetoprofeno	Partículas	50 °C, 190 bar	Não mencionado	Manna <i>et al.</i> , 2007
P(MMA-EHA- EGDMA)	Flurbiprofeno	Filme	35 - 40°C, 180 bar	0,18 - 0,82 %	Duarte <i>et al.</i> , 2008
PCL/Lutrol F PCL/Luwax EVA	Maleato de timol	Filme	40°C, 110 - 200 bar	12 - 18 mg/g 18 - 33 mg/g	Natu <i>et al.</i> , 2008
PVP	Piroxicam	Pó	100°C, 300 bar	13 - 15 %	Banchero <i>et al.</i> , 2009
Quitosana	Dexametasona	Filme	35 - 55 °C, 80 - 140 bar	Até 0,54 % (m/m)	Duarte <i>et al.</i> , 2009
PMMA	Triflusal HTB	Cilindro	35°C, 160 e 200 bar	Até 20 % (m/m)	López- Periago <i>et al.</i> , 2009
Hidrogel de silicone	Acetazolamida Maleato de timol	Lente de contato	40°C, 170 bar	0,05 e 0,35 mg/lente	Costa <i>et al.</i> , 2010a
Lentes comerciais	Furbiprofeno Maleato de timol	Lente de contato	40 °C, 90 - 160 bar	Até 30 mg/g	Costa <i>et al.</i> , 2010b
Lentes intraoculares PMMA	Cefuroxima de Sódio	Lente intraocular	35 - 60 °C, 80 - 200 bar	Até 1,22 mg/lente	Masmoudi <i>et al.</i> , 2011

PVP - polivinilpirrolidona, PLGA - poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PS - poliestireno, ECDA - etil-2-ciano-3(4-dimetil aminofenil)acrilato, SAS - *supercritical antisolvent*, PVPP - polivinilpirrolidona reticulada, P(MMA-EHA-EGDMA) - poli(metilmetacrilato-co-etilhexilacrilato-co-etilenoglicoldimetacrilato), PCL - policaprolactona, EVA - etileno-vinil acetato, PMMA - polimetil-metacrilato, HTB - ácido 2-hidroxi-4-trifluorometil benzóico.

2.6. Liberação de fármacos

Após a incorporação do fármaco, o dispositivo deve ser capaz de liberá-lo em doses controladas. Frente a isto, o estudo da liberação da molécula ativa da matriz polimérica é de grande importância para o desenvolvimento do sistema.

A liberação controlada tem como vantagem a presença contínua de uma determinada dosagem do medicamento no corpo do paciente, permanecendo acima dos limites mínimos de eficácia requeridos e não excedendo valores altos que podem ser nocivos ao paciente (Figura 2.6). A quantidade de fármaco total administrada durante a terapia é menor quando se utiliza dispositivos de liberação controlada em comparação com os métodos convencionais (comprimidos e injeções).

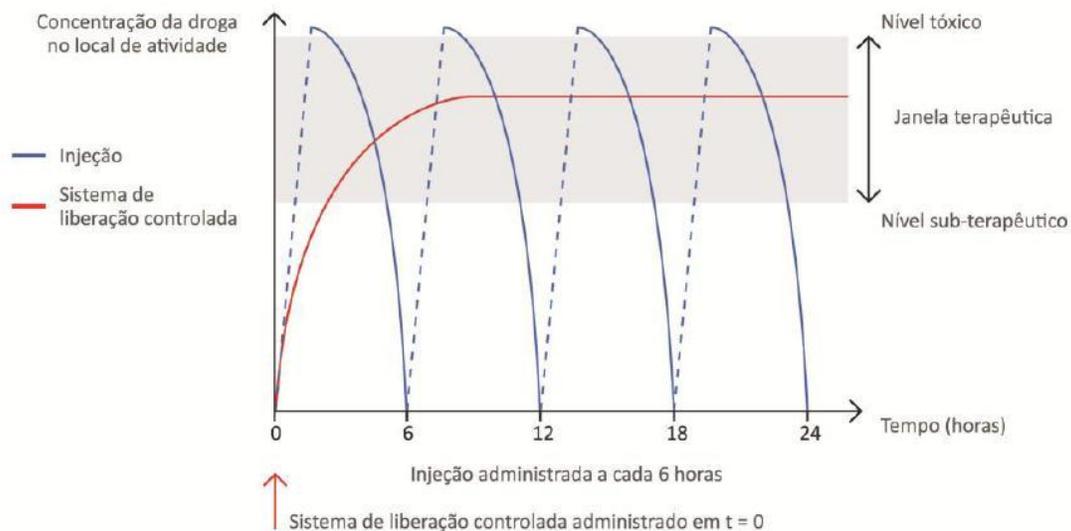


Figura 2.6: Concentração da fármaco na região da lesão utilizando-se o tratamento convencional de injeções (—) e utilizando-se um sistema de liberação controlada (—) (adaptado de Uhrich *et al.*, 1999).

Esta abordagem possui restrições como assegurar a liberação da droga em uma taxa constante para que não haja situações de risco como o aumento indesejado da dosagem. Há também a necessidade de retirada de dispositivos, caso estes sejam

implantados no paciente e não sejam biodegradáveis, além dos custos elevados do tratamento.

O controle da liberação do fármaco é atribuído à permeabilidade do dispositivo polimérico que o contém. Estes dispositivos são normalmente classificados em dois tipos, reservatório ou matriz. No primeiro tipo, o fármaco fica armazenado em um reservatório recoberto por uma membrana polimérica, enquanto que no segundo tipo, o fármaco se encontra dissolvido ou disperso homogeneamente na forma de partículas sólidas na matriz polimérica (Comyn, 1985).

A seleção do polímero ou polímeros utilizados nos dispositivos de liberação controlada é influenciada, então, não só por aspectos como biocompatibilidade e segurança, mas também pelas suas características de solubilidade e estabilidade. A degradação e dissolução do polímero afetam diretamente a liberação do fármaco durante a utilização do dispositivo (Comyn, 1985).

Os dispositivos do tipo reservatório têm a liberação do fármaco governada pela difusão deste através da membrana polimérica. O perfil de liberação é dependente da atividade termodinâmica do fármaco no interior do reservatório (Comyn, 1985).

Quando o mecanismo de liberação envolve a difusão do fármaco através do polímero, as matrizes podem ser classificadas como matrizes não porosas ou porosas. No caso de membranas hidrofílicas, a quantidade de água absorvida pela membrana afeta a taxa de liberação, pois proporciona a abertura das cadeias da matriz através do intumescimento, facilitando a saída da molécula de fármaco (Comyn, 1985). Ainda se pode classificar a liberação em espontânea (quando ocorre rápida e naturalmente), retardada ou prolongada (quando é afetada pela capacidade de barreira do dispositivo), e controlada ou programada (quando se utiliza um fator externo como agente disparador da liberação, por exemplo, temperatura, pH ou campo eletromagnético).

Os fármacos passíveis de incorporação em membranas à base de quitosana e poliânions podem ser de várias categorias. No âmbito deste trabalho, os de maior relevância são os anti-inflamatórios, como discutido a seguir.

2.7. Anti-inflamatórios não esteroides

No Brasil os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) são medicamentos de venda livre e disponíveis em grande parte das associações medicamentosas disponíveis no mercado. Conseqüentemente, seu acesso é facilitado e caracteriza esta classe de medicamentos como a mais prescrita por médicos e dentistas, já que apresenta um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, atividade anti-inflamatória, antipirética e de profilaxia contra doenças cardiovasculares. Este fato é confirmado por estudos sobre o uso de medicamentos no país, nos quais os anti-inflamatórios não-esteróides estão entre os fármacos mais consumidos pela população (Kummer e Coelho, 2002; Souza e Ferrão, 2006). Na Tabela 2.2 estão apresentados alguns AINEs, seus nomes comerciais e dosagens tradicionalmente empregadas.

Tabela 2.3: Nomes comerciais e dosagens indicadas de alguns AINEs (adaptado de Katzung, 2007).

Agente ativo	Nome comercial	Dosagem diária recomendada
Diclofenaco	Voltaren [®] , Biofenac [®] , Cataflam [®]	50-75 mg qid
Ácido acetil salicílico	Aspirina [®]	1200-1500 mg tid
Ibuprofeno	Artril [®] , Motrin [®]	600 mg qid
Piroxicam	Feldene [®] , Flogene [®]	20 mg qd
Indometacina	Indocid [®] , Agilisin [®]	50-70 mg tid
Cetroprofeno	Profenid [®]	70 mg tid

qid: quatro vezes ao dia; qd: uma vez ao dia; tid: três vezes ao dia

A aspirina foi o primeiro AINE desenvolvido no mundo, patenteado pela Bayer em 1897. Sua popularidade cresceu durante a primeira metade do século XX, impulsionada pela suposta eficácia no tratamento de gripe espanhola. Entretanto, recentemente sugere-se que a alta taxa de mortalidade da gripe de 1918 foi, em parte, devida à má utilização deste medicamento. Em decorrência do fato da aspirina ter apresentado uma série de

efeitos adversos, muitos outros AINEs têm sido desenvolvidos na tentativa de melhorar sua eficácia e diminuir sua toxicidade. Os AINEs compreendem classes diversas de produtos químicos e esta diversidade resulta em uma ampla gama de características farmacocinéticas. Embora haja muitas diferenças na cinética de AINEs, estes têm algumas propriedades gerais em comum, como o fato de serem quase todos ácidos orgânicos fracos (Katzung, 2007).

Estes medicamentos atuam inibindo a atividade da enzima ciclo-oxigenase, que catalisa a biossíntese das prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico, diminuindo a intensidade do processo inflamatório. Este processo consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (Kummer e Coelho, 2002; Parisotto *et al.*, 2005).

De acordo com Puzzi*, apesar deste tipo de medicamento retardar a recuperação do tecido lesado, seu emprego em lesões de pele reduz as infecções e diminui a sensação de dor do paciente, contribuindo também no sentido de resultar em cicatrizes com melhor aspecto estético. A incorporação de um composto anti-inflamatório em curativos pode ser de interesse, pois este auxiliaria no tratamento da lesão e na diminuição da dor. Alguns anti-inflamatórios indicados para uso em lesões de pele interessantes para a inclusão em membranas preparadas com polímeros de origem biológica pela versatilidade de abordagens de incorporação resultante de suas características de solubilidade são descritos a seguir, mais explicitamente o diclofenaco, o cetoprofeno e o piroxicam.

2.7.1. Diclofenaco

O diclofenaco é utilizado em 120 países diferentes, sendo hoje o AINE mais amplamente utilizado no mundo. Existente há mais de 80 anos, é o fármaco mais comercializado no mercado mundial. No ano 2000, o diclofenaco de potássio foi o medicamento mais vendido na indústria farmacêutica brasileira (Souza e Ferrão, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006).

*Puzzi, M. B. (Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Clínica Médica, Laboratório de Cultura de Célula da Pele, UNICAMP). Comunicação pessoal, 2009.

O diclofenaco, ou ácido 2(2, 6-dicloroanilino) fenil acético, é derivado do ácido fenilacético e é usualmente formulado como sais de sódio, potássio e dietilamina, como indicado na Figura 2.7. É pouco solúvel em água e solúvel em metanol (24 mg/mL) e tampão fosfato a pH 7,2 (6 mg/mL). Possui massa molar de 296,1 g/mol e pKa de 4,2. Apresenta ação anti-inflamatória e analgésica, atribuídas aos seus efeitos sobre a síntese periférica de prostaglandinas (Florey, 1990; Ahuja *et al.*, 2008).

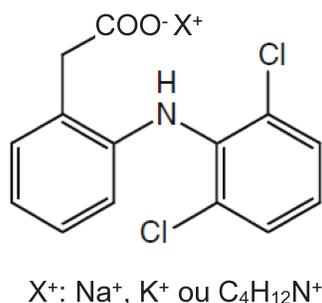


Figura 2.7: Estrutura molecular do diclofenaco (Ahuja *et al.*, 2008).

Este fármaco está disponível em várias formas de apresentação, como comprimidos, em solução para o uso oftalmológico, como supositório e em preparações intramusculares. O gel tópico contendo 3% de diclofenaco é efetivo para queratoses solares (Florey, 1990; Katzung, 2007; Ahuja *et al.*, 2008).

O diclofenaco também é passível de ser incorporado às membranas por todos os métodos citados no item 2.5. Há relatos na literatura sobre a incorporação de diclofenaco em microesferas de quitosana (Kumar, 2000) e em hidrogel de quitosana e carragena (Piyakulawat *et al.*, 2007), ambos incorporados durante o preparo do matriz polimérica. Há também matrizes de quitosana e alginato contendo diclofenaco de sódio incorporado por imersão em solução aquosa contendo o fármaco (Fahmy e Fouda, 2008), mostrando a potencial aplicação deste em sistemas de liberação controlada.

2.7.2. Piroxicam

O piroxicam (4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dioxido) é um derivado do ácido enólico e é praticamente insolúvel em água e soluções ácidas de baixa molaridade. É levemente solúvel em alcoóis e soluções alcalinas, e ciclodextrinas podem ser empregadas para melhorar sua solubilidade. Apresenta pKa de 6,3 e massa molar de 331,3 g/mol (Ahuja *et al.*, 2008). Este fármaco apresenta polimorfismo, podendo ser encontradas duas formas (α e β), entretanto, não há dados sobre diferença na atividade das duas formas (Florey, 1986; Bazzo, 2008). A estrutura do piroxicam está apresentada na Figura 2.8.

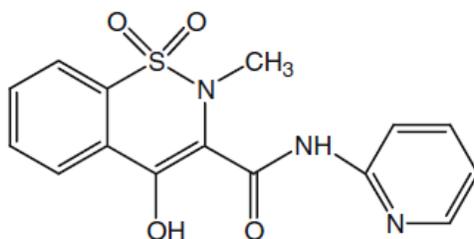


Figura 2.8: Estrutura química do piroxicam (Ahuja *et al.*, 2008).

Possui ação anti-inflamatória e analgésica e também propriedades anti-tumorais. Por apresentar tempo de meia-vida alto (57 h), pode ser administrado em dose única diária (Katzung, 2007). É comercializado no Brasil em forma de cápsulas, comprimidos e suspensão para uso oral, solução intramuscular, supositório, creme e gel para uso tópico. Em função de sua baixa solubilidade em solventes polares, poderia ser potencialmente incorporado em membranas de quitosana e poliânions por deposição com CO₂ supercrítico.

Há relatos na literatura sobre a utilização de piroxicam incorporada em partículas de alginato (Aquino *et al.* 2012) ou de poli(3-hidroxiбутирато) (Bazzo *et al.*, 2009) e até dispersa em polivinil pirrolidina (pó) utilizando tecnologia supercrítica (Banchemo *et al.*, 2009).

2.7.3. Cetoprofeno

O cetoprofeno (ácido 3-benzoil- α -metilbenzeno acético) é derivado do ácido fenilpropiónico acético e consiste de uma mistura racêmica de dois enantiômeros, sendo que o enantiômero dextrógiro (+) apresenta duas vezes mais atividade anti-inflamatória que a mistura de ambos (Ahuja *et al.*, 2008). Este fármaco apresenta inibição não seletiva de Cox e de lipoxigenases (Katzung, 2007). Na Figura 2.9 é apresentada a estrutura do cetoprofeno.

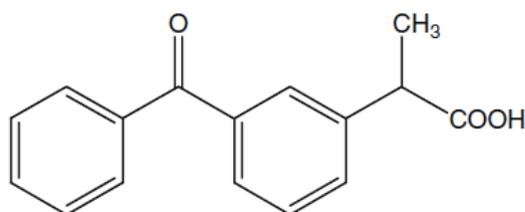


Figura 2.9: Estrutura química do cetoprofeno (Ahuja *et al.*, 2008).

Este fármaco é solúvel em solventes orgânicos tais como etanol, acetona, éter e pouco solúvel em água (Florey, 1981), e apesar de possuir características lipofílicas, não é considerado como completamente hidrofóbico. Possui um pKa de 4,5 e massa molar de 254 g/mol (Ahuja *et al.*, 2008). Apesar de apresentar solubilidade limitada em água, sua incorporação poderia ser realizada durante a mistura dos polímeros e também por impregnação com etanol ou com CO₂ supercrítico. Apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e como antidismenorréico (Lozano e Martínez, 2006). É comercializado no Brasil em forma de cápsulas, comprimidos e gotas para uso oral, ampolas de pó liofilizado para uso intramuscular, supositório e gel para uso tópico. É reportado na literatura o uso de cetoprofeno em nanoestruturas lipídicas dispersas em hidrogel de xantana (Cirri *et al.*, 2012), esferas de poli(3-hidroxi-butirato) (Bazzo *et al.*, 2009) e em nanofibras de poli(vinil álcool) (Kenawy *et al.*, 2007) e de quitosana-policaprolactona (Wang *et al.*, 2011).

2.8. Considerações finais

Com base nos temas abordados na revisão da literatura, e com o propósito de obter membranas contendo agentes anti-inflamatórios a serem utilizadas em processos de regeneração de pele lesada, propôs-se o trabalho em questão. Contudo, há a necessidade de estudar de forma mais detalhada a produção destas membranas, bem como metodologias de incorporação de agentes bioativos a fim de se obter curativos com características adequadas para aplicação como dispositivos de liberação de fármacos. Idealmente, tais dispositivos deveriam apresentar propriedades de intumescimento e resistência mecânicas adequadas para uso como curativos, além de possibilitar a incorporação estável e, preferencialmente, com alta eficiência, dos fármacos testados. Visou-se obter membranas com liberação contínua dos fármacos em até 24 h e em concentrações próximas às disponíveis comercialmente nas formulações tópicas de cada um (10 mg/g de diclofenaco de sódio, 5 mg/g de piroxicam e 10 mg/g de cetoprofeno).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana de carapaça de camarão com desacetilação de 96% (lote 068K00851), pectina de frutas cítricas 9,1% metoxilada (lote 098K0032), xantana com viscosidade de 1100 cP em solução aquosa 1% (lote 056K0007), goma arábica da árvore acácia (lote 1419328-12209109) e goma guar (lote 087K0128) da Sigma-Aldrich Co.; ácido acético glacial da Synth; cloreto de cálcio di-hidratado e hidróxido de sódio da Merck & Co., Inc. Os fármacos utilizados foram diclofenaco de sódio, piroxicam e cetoprofeno da Sigma-Aldrich Co. A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q[®] da Millipore.

3.2. Métodos

3.2.1. *Preparação das membranas*

Os procedimentos de preparação das membranas, descritos a seguir, variaram conforme o tipo de polímero usado, sendo adaptados baseando-se no método descrito por Veiga e Moraes (2012) para membranas de quitosana-xantana.

3.2.1.1. *Membranas constituídas de quitosana e xantana*

Neste procedimento, 90 mL de solução ácida de quitosana (quitosana a 0,5% m/v em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) foram adicionados através de bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls na vazão de 300 mL/h em 90 mL de solução aquosa

de xantana a 0,5% m/v em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 9 cm e capacidade de 700 mL. A temperatura foi mantida, durante todo o processo, a 25°C utilizando-se um banho termostático Quimis modelo 214 M2. O sistema foi mantido sob agitação constante de 1000 rpm através de agitador mecânico Quimis modelo 251 D com hélice do tipo naval com raio de 2,5 cm durante o gotejamento. Na Figura 3.1 é apresentado o sistema utilizado para o preparo das membranas.



Figura 3.1: Sistema de preparação das membranas.

A mistura polimérica obtida foi desaerada em bomba de vácuo Quimis modelo Q-355B por 2 h. Em seguida, foi transferida para uma placa de Petri de poliestireno de 15 cm e seca a 37°C em estufa com circulação de ar, por 24 h. Para a secagem ser mais homogênea, a membrana foi mantida em uma plataforma giratória automática com diâmetro de 25 cm da Autoart operando a 3 rpm. Após a secagem, as membranas foram imersas duas vezes em 200 mL de água deionizada por 30 min cada vez para remover o

ácido acético residual. O tempo e o volume de água utilizados durante as lavagens foi estabelecido anteriormente, acompanhando-se o pH do meio até que este ficasse próximo à neutralidade, visto que amostras ácidas poderiam ser citotóxicas a células animais ou mesmo sofrer dissociação. Posteriormente, as amostras foram secas novamente a 37°C por 24 h.

As membranas obtidas ao final do processo foram esterilizadas com óxido de etileno (Oxyfume-30) na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP) sob as seguintes condições: vácuo de 400 mmHg, tempo de exposição das amostras ao gás por 8 horas, pressão de 0,5 kgf/cm², umidade entre 40 e 50%, temperatura de 40°C e aeração de três trocas com nitrogênio. Antes de sua utilização, as amostras esterilizadas foram armazenadas em condições ambientes por um período mínimo de 72 horas, conforme recomendação da empresa. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens apropriadas constituídas por uma face plástica e outra de papel, fornecidas pela própria empresa de esterilização, sendo tais embalagens seladas a quente.

3.2.1.2. *Membranas constituídas de quitosana e pectina*

As membranas contendo quitosana e pectina foram preparadas de acordo com os procedimentos propostos por Bernabé *et al.* (2005) e Veiga e Moraes (2012). Neste procedimento foram utilizadas soluções de quitosana em concentração de 0,5 a 1,0% e soluções de pectina em concentrações de 0,5 a 2%. O volume de cada solução empregada foi de 90 mL e as condições do processo foram mantidas iguais às do procedimento referente às membranas contendo quitosana e xantana. Após a mistura das soluções, algumas amostras tiveram seu pH ajustado para 5,5 que, conforme Bernabé *et al.* (2005), é o pH em que é favorecida a complexação destes polímeros e às outras amostras foram adicionados 1,8 mL de solução aquosa de CaCl₂ a 2% visando a reticulação das cadeias livre da pectina. Após a etapa de mistura, o complexo foi então desaerado, seco e lavado com água nas condições já mencionadas no item anterior, sendo as membranas produzidas também esterilizadas com óxido de etileno.

3.2.1.3. *Membranas constituídas de quitosana e goma guar*

As membranas contendo quitosana e goma guar foram preparadas de acordo com os procedimentos propostos por Haupt *et al.* (2006) e Veiga e Moraes (2012). Neste procedimento foram utilizadas soluções de quitosana e de goma guar (solução aquosa) em concentração de 0,5%. O volume de cada solução empregada foi de 90 mL com vazão de adição da quitosana de 300 mL/h, agitação de 1000 rpm e temperatura 25°C. Após a etapa de mistura, o complexo foi seco por 24 h a 37°C, lavado por 1 min com 100 mL de NaOH 1M 1:1 v/v (água:álcool) para neutralização do ácido acético e posteriormente com água (duas vezes em 200 mL por 30 min cada vez). Todas as membranas produzidas foram esterilizadas com óxido de etileno.

3.2.1.4. *Membranas constituídas de quitosana e goma arábica*

As membranas contendo quitosana e goma arábica foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Espinosa-Andrews *et al.* (2007) adaptado baseando-se no trabalho de Veiga e Moraes (2012). Neste procedimento foram utilizadas solução de quitosana em concentração de 0,5% e solução de goma arábica de 0,5 a 2%. O volume de cada solução empregada foi de 90 mL e as condições do processo foram mantidas iguais às empregadas na obtenção das membranas de quitosana e xantana. Após a mistura das soluções o pH foi ajustado para 4,5 que, conforme Espinosa-Andrews *et al.* (2007) está na faixa de pH em que ocorre a máxima interação destes polímeros. Após a etapa de mistura, o complexo foi então desaerado, seco e lavado com água nas condições já mencionadas.

3.2.2. Incorporação dos fármacos

A incorporação dos fármacos foi realizada através de três metodologias, adicionando-se os mesmos à mistura resultante dos polímeros constituintes da

membrana, por impregnação em solução ou por deposição com CO₂ supercrítico, conforme descrito a seguir.

3.2.2.1. Incorporação do fármaco durante o preparo da membrana

A adição ocorreu imediatamente após a mistura completa dos polímeros. Foram estabelecidas concentrações crescentes de fármaco de modo a não se exceder o limite de solubilidade do diclofenaco de sódio em água (22, 55 e 111 mg por grama de membrana) e este foi solubilizado em 10 mL de água deionizada. Para o piroxicam e o cetoprofeno foram utilizadas duas proporções (22 e 55 mg/g de membrana), o primeiro adicionado em pó e o segundo solubilizado em 10 mL de etanol. A adição ocorreu sob agitação de 1000 rpm por 1 min. Posteriormente, seguiram-se as etapas pré-estabelecidas para cada tipo de membrana (secagem, desaeração, neutralização e esterilização).

3.2.2.2. Incorporação do fármaco por impregnação em solução

Neste método, a adição do fármaco ocorreu por impregnação a úmido, após a segunda secagem da membrana. Foram também estabelecidas três proporções para o diclofenaco de sódio (2,17, 5,43 e 10,85 mg/mL de água) e duas proporções para o cetoprofeno (2,08 e 5,03 mg/mL de etanol) e uma para o piroxicam (1,2 mg/mL de etanol). A incorporação ocorreu em amostras de 16 cm² (de aproximadamente 30 mg) a 37°C sob agitação de 50 rpm por 24 h utilizando 10 mL de cada solução. Em seguida, fez-se, como anteriormente descrito, a secagem a 37°C e esterilização com óxido de etileno.

Para esta metodologia fez-se um estudo da temperatura de incorporação. Para tanto foram utilizadas membranas de quitosana-xantana, solução aquosa de diclofenaco de sódio a 5,43 mg/mL e exposição por 24 h às temperaturas de 20, 30 e 37°C.

3.2.2.3. Impregnação com CO₂ supercrítico

Anteriormente ao início dos estudos de impregnação dos fármacos via CO₂ supercrítico, o comportamento das membranas poliméricas após o contato com o fluido supercrítico foi avaliado, analisando-se eventuais variações das massas e do aspecto das amostras. Foram utilizadas amostras de membranas de 16 cm² dispostas em uma célula de pressão separadas por algodão para que não houvesse adesão entre elas. As amostras foram mantidas a 200 bar e 40°C por 2 h e, após este período, o sistema foi depressurizado a uma taxa média de 1,7 bar/min.

O sistema de impregnação supercrítica usado está esquematicamente representado na Figura 3.2. O sistema é composto por uma célula de alta pressão de aço inoxidável (de volume interno de 11,5 cm³), um compressor de alta pressão para CO₂ líquido, um banho termostático (Haake DC30, Thermo Electron Corporation), uma placa de agitação magnética (Agimatic-Ver-W, P Selecta) e um manômetro digital (Lab DMM).

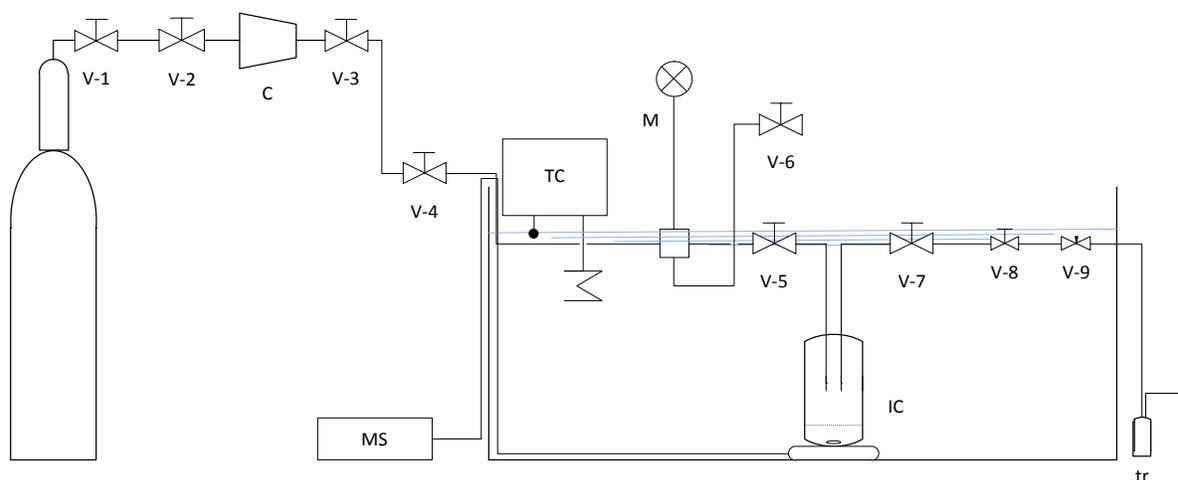


Figura 3.2: Representação esquemática do sistema de impregnação supercrítica.

Nos ensaios de incorporação, o fármaco em pó foi colocado no fundo da célula e as amostras (1 x 1 cm²) foram posicionadas em um suporte de aço inoxidável (ilustrado na Figura 3.3), na posição vertical acima do fármaco. A quantidade de fármaco foi

calculada considerando-se a saturação do sistema. Os ensaios com o diclofenaco ocorreram a 225 bar, 45°C e 9h de contato. Para o piroxicam optou-se por fazer um planejamento experimental 2^3 com 3 pontos centrais e testar a adição de etanol como cossolvente. Juntamente com o fármaco no fundo da célula, foram adicionados 5% em fração molar de etanol em relação ao CO₂ adicionado, concentração de etanol comumente empregada neste tipo de sistema (Braga *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2012). Variou-se o tempo de contato com o fluido supercrítico de 4 a 14h, a temperatura de 40 a 50°C e a pressão de 150 a 300 bar. Após este período, o sistema foi despressurizado lentamente a uma taxa média de 5 bar/min para manter a integridade dos filmes.



Figura 3.3: Suporte para acomodação das amostras instalado no interior da célula de alta pressão.

Os ensaios utilizando o fármaco cetoprofeno ocorreram em um sistema de impregnação montado posteriormente. Neste caso, a célula de alta pressão de aço inoxidável possuía um volume interno útil maior, de 15,7 cm³, a temperatura do sistema foi mantida através da instalação da célula de pressão no interior de uma estufa com circulação de ar (Nova Ética) e o CO₂ líquido foi comprimido utilizando-se bomba para cromatografia supercrítica (Thar SFC modelo P-50A). Para este fármaco fez-se um planejamento experimental 2^2 com 3 pontos centrais e testou-se a adição de etanol como cossolvente (0,5% em fração molar). Neste planejamento as variáveis independentes foram pressão (150 a 300 bar) e temperatura (40 a 50°C), mantendo-se o tempo de contato de 4 h e a mesma taxa de despressurização dos ensaios anteriores. Neste caso, foram utilizadas amostras de 1 x 1 cm² e massa de fármaco considerando-se a saturação do sistema.

3.2.3. Caracterização das membranas

As amostras esterilizadas foram caracterizadas fundamentalmente conforme descrito por Dallan *et al.* (2007), Rodrigues *et al.* (2008) e Veiga e Moraes (2012).

3.2.3.1. Aspecto das membranas

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu e este foi registrado através de fotografias digitais (modelo A410, Canon).

3.2.3.2. Morfologia da superfície das membranas

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

As membranas foram cortadas nas dimensões de 2 x 1 cm² e mantidas em ambiente com sílica-gel ativada por 24h. Estas foram então criofaturadas com nitrogênio líquido, 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.

3.2.3.3. Espessura das membranas

A espessura das membranas foi determinada pela utilização de micrômetro (Digimess), através de medições em sete diferentes pontos ao longo da extensão da membrana, calculando-se os valores médios.

3.2.3.4. Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas referentes à resistência à tração e à porcentagem de alongamento na ruptura foram determinadas com base em adaptações da norma ASTM D882, 2002 (não foram verificadas diferenças nos resultados quando utilizada a norma sem adaptações). Estes ensaios foram realizados com as membranas cortadas em corpos de prova de dimensões de 10,0 x 1,0 cm² e mantidas em dessecador com sílica gel ativada por 24h para manter a umidade uniforme nas amostras.

Os corpos de prova foram fixados nas garras pneumáticas do equipamento (Tinius Olsen modelo H5K-S) com mordentes de borracha e alongados a uma taxa de deformação constante de 10 mm/min, com distância entre garras de 4,5 cm, utilizando-se uma célula de carga de 200 N. Os ensaios foram realizados com oito a dez corpos de prova para cada tipo de membrana, utilizando-se apenas os cinco resultados mais próximos entre si, visto que ocorrem muitas rupturas prematuras no material em decorrência da presença de bolhas não detectáveis a olho nu e a eventuais problemas de dispersão pouco homogênea dos complexos nas amostras.

Através dos dados obtidos é possível determinar o módulo de Young (E) através da Equação 1:

$$E = \frac{(C_a \cdot l_0)}{a_t} \quad (\text{Equação 1})$$

onde C_a é o coeficiente angular do trecho reto do diagrama tensão x deformação em N/mm, l_0 é o comprimento inicial do corpo de prova em mm e a_t é a área transversal em mm².

3.2.3.5. Perfil de hidratação das membranas

O perfil de hidratação foi determinado através do grau de intumescimento paulatino das membranas em água. As membranas foram cortadas em corpos de prova

retangulares de 2 x 1 cm², pesados em balança analítica Sartorius e, posteriormente, hidratados com 5 mL de água deionizada em tubos fechados por períodos variando de 1 minuto a 24 h em estufa Nova Ética modelo 410, a 37°C. Após a hidratação, o excesso de água foi removido com a ajuda de papel de filtro, e os corpos de prova foram novamente pesados para a determinação da massa úmida. Para cada período, o grau de intumescimento, C, foi determinado através da Equação 2:

$$C = \frac{(M_{U,i} - M_0)}{M_0} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde $M_{U,i}$ refere-se à massa úmida no tempo i e M_0 refere-se à massa inicial das membranas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.3.6. Capacidade de absorção de soluções aquosas após 24 h

A capacidade das membranas de absorver diferentes meios aquosos, sendo eles água, fluido corpóreo simulado (FCS) com composição descrita na Tabela 3.1, soro fetal bovino (SFB) da Nutricell, tampão fosfato salino (PBS) e solução salina a 0,9% (SS), foi determinada empregando-se corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm², em triplicata. Estes foram pesados para a determinação da massa inicial e posteriormente hidratados com 5 mL das soluções aquosas acima descritas por 24 h a 37°C. Após este período os corpos de prova foram novamente pesados para a determinação da massa final. A capacidade de absorção de água neste período, C_{Wmax} , foi determinada também pela Equação 2.

Tabela 3.1: Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl. O pH da solução final foi 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

3.2.3.7. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

As membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm², em triplicata, pesadas e posteriormente expostas a 10 mL de água deionizada, FCS, SFB, PBS e SS, por 7 dias a 37°C. Após o período de exposição, cada amostra foi imersa em 20 mL de água deionizada por 5 min por cinco vezes para remover compostos fracamente ligados como sais, proteínas e polissacarídeos, dependendo da solução usada. Posteriormente os corpos de prova foram secos por 24 h, a 37°C, mantidos em dessecador com sílica gel por 24 h e novamente pesados para a determinação da massa final. A perda de massa em água, M_p, foi determinada através da Equação 3:

$$M_p = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}})}{M_{\text{inicial}}} \times 100\% \quad (\text{Equação 3})$$

onde M_{inicial} refere-se à massa inicial e M_{final} refere-se à massa final após o período de incubação nas diferentes soluções.

3.2.3.8. Capacidade de absorção de vapor de água

Para a avaliação de capacidade de absorção de vapor d'água foram cortadas amostras de 1 cm², as quais foram secas a 37°C. As amostras foram expostas a atmosfera com umidade relativa de 99% utilizando solução saturada de sulfato de potássio em dessecador a 32°C. A pesagem das amostras foi realizada periodicamente até 8h de contato e a capacidade de absorção de vapor (C) foi calculada através da Equação 2.

3.2.3.9. Permeabilidade ao vapor de água

A capacidade de permeação de vapor d'água foi determinada de acordo com a norma ASTM E96-90D (2010). Nesta análise foram utilizadas células de permeabilidade de 50 mL de capacidade e com área de contato do filme a ser analisado de 7,07 cm². As células foram mantidas em dessecador com sílica gel (para manter o ambiente com baixa umidade) a 32 °C. Para o teste foram utilizadas amostras de 3,0 cm de diâmetro no topo de frascos contendo 15 mL de água deionizada. Os frascos foram pesados a cada hora até completar 8 h de ensaio e depois novamente em 24 h. A transmissão de vapor d'água e a permeação ao vapor d'água das membranas foi determinada através das Equações 4 e 5:

$$TVA = \frac{\Delta m}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

$$PVA = \frac{TVA \cdot e}{\Delta p} \quad (\text{Equação 5})$$

onde *TVA* é a transmissão de vapor d'água, *PVA* a permeação ao vapor d'água, Δm a diferença entre a massa inicial e final das células, *A* a área em contato com a membrana, *e* a espessura média da membrana e Δp a diferença de pressão parcial do vapor d'água através da membrana.

3.2.3.10. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas com o intuito de verificar possíveis interações entre os polímeros após o preparo das membranas, bem como modificações nas estruturas dos mesmos. Estas análises ocorreram nos biopolímeros isolados, membranas e fármacos. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro JASCO 4200 FTIR operando no modo ATR (MKII GoldenGate™ Single Reflexion ATR System) no intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} , com 128 varreduras acumuladas.

3.2.3.11. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica foi analisada através das medidas de perda de massa utilizando um analisador termogravimétrico (TA Instruments, Q500, USA). Os experimentos foram conduzidos a partir da temperatura ambiente até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio (vazão de 40 mL/min). As amostras tinham massa em torno de 6 mg e todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.3.12. Propriedades antimicrobianas

As propriedades antimicrobianas foram avaliadas pela formação de halo de inibição e pela capacidade das membranas de prevenir a permeação de bactérias. Os ensaios aqui descritos foram realizados na Itibanyl Produtos Especiais Ltda (Jarinú, SP).

A avaliação de formação de zonas de inibição do crescimento de microrganismos foi realizada em amostras de 1,5 cm x 1,5 cm. No interior de uma câmara de fluxo laminar (VLFS 12, Veco, Brasil), as amostras foram hidratadas por 1 min em água esterilizada e posicionadas na superfície de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 a 25 mL de meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA) da Oxoid 40 g/l em água previamente inoculado com 0,1% (v/v) de suspensão de *Staphylococcus aureus* (na concentração de

$4,3 \times 10^8$ UFC/mL) ou *Pseudomonas aeruginosa* ($5,0 \times 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. Após este período, a formação de uma zona sem crescimento de células ao redor das membranas, chamada de halo de inibição, foi avaliada.

Para a avaliação da permeação de bactérias através das membranas foram utilizadas amostras esterilizadas de 2,5 cm x 2,5 cm. Primeiramente, em câmara de fluxo laminar, as amostras foram hidratadas em água estéril por 30 s e posicionadas no centro de placas de Petri contendo 20 a 25 mL de meio de cultura TSA. Em seguida, 100 μL de uma suspensão aquosa de *Staphylococcus aureus* ($4,3 \times 10^8$ UFC/mL) ou *Pseudomonas aeruginosa* ($5,0 \times 10^8$ UFC/mL) foram adicionados na superfície da membrana e as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. O meio ao redor da membrana, a face da amostra em contato com a atmosfera e a face da membrana em contato com o meio de cultura foram avaliados de acordo com o crescimento bacteriano. Para tal, placas contendo meio de cultura foram estriadas com o *swab* das superfícies das amostras e ao redor delas.

3.2.3.13. Análise quantitativa do grau de citotoxicidade indireta

Para este teste utilizou-se a linhagem fibroblástica L929, recomendada para estudos de citotoxicidade e de interações entre biomateriais e células. Utilizou-se meio de cultura RPMI suplementado com L-glutamina (0,3g/L), D-glicose(2,0g/L), NaHCO_3 (2,0g/L), penicilina (10.000 UI/L), estreptomicina (0,05g/L), Hapes (5,958g/L) e soro fetal bovino (SFB) 10%), todos obtidos da Nutricell. A técnica empregada neste ensaio utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimeteiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo), que é clivado somente por células metabolicamente ativas, formando o precipitado azul denominado *formazan*, detectável espectrofotometricamente.

Inicialmente, extratos das membranas foram obtidos após a manutenção das mesmas em meio de cultura RPMI suplementado durante 48 horas em estufa (Tecnal TE-399) a 37°C a 5% de CO_2 . A concentração recomendada pela ISO 10993-5E (1992) é de 0,2 g de material seco por mililitro de meio de cultivo, no entanto, devido ao material utilizado no presente trabalho apresentar alta absorção de meio de cultura, foi utilizadas uma concentração quatro vezes menor do que a recomendada, ou seja, 0,05g de material

seco por mililitro de meio. Foram utilizados como controles negativo e positivo o extrato de fragmentos da própria placa de cultura de células e de látex (na forma de torniquetes utilizados para coleta de sangue), respectivamente. O branco foi definido apenas como o meio de cultura, sem células.

Aliquotas de 100 µL de uma suspensão contendo 1×10^5 células/mL de meio RPMI suplementado foram transferidas para cada poço de uma placa de 96 poços (TPP) e esta foi mantida por 24 horas em estufa a 37° C a 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram retirados e 100 µL dos extratos das membranas foram adicionados em cada poço, colocando-se novamente a placa em estufa por 24 h. Os extratos foram então removidos e cada poço lavado duas vezes com 100 µL de tampão PBS/EDTA. Após estas lavagens, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de RPMI suplementado, etapa esta seguida da adição de 10 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL de tampão PBS/EDTA. A placa foi mantida em estufa 37° C a 5% de CO₂ por quatro horas e após este período, foram adicionados 100 µL de isopropanol ácido (30 µL de HCl em 10 mL de isopropanol) em cada poço. Após incubação por uma hora, a leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro de placas ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC) a 620 nm. Para a determinação da citotoxicidade utilizou-se a equação 6.

$$Citotoxicidade = \left(\frac{DO_{amostra} - DO_{branco}}{DO_{controle\ negativo} - DO_{branco}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

onde DO é o valor de densidade ótica a 620 nm para a amostra, o branco e o controle negativo.

3.2.3.14. Potencial hemolítico

A avaliação da capacidade hemolítica foi realizada de acordo com a norma ASTM F 756-00 (2000). Amostras de 21 cm² (cortadas em fragmentos de 1cm x 1 cm para aumentar a área de contato) foram colocadas em contato com 7 mL de solução sanguínea (sangue proveniente de coelho diluído em tampão fosfato salino, com

concentração de 10 mg/mL de hemoglobina) em tubos falcon de 15 mL por 3 h a 37 °C. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 2200 rpm por 20 min e 1 mL do sobrenadante foi retirado para a quantificação de hemoglobina presente através da medida da densidade ótica a 540 nm (curva de calibração apresentada no Anexo I). Os controles positivos e negativos foram o sangue em água e em tampão fosfato salino, respectivamente. O índice hemolítico foi determinado através da Equação 7 e os materiais foram classificados de acordo com a Tabela 3.2.

$$\text{Índice hemolítico} = \left(\frac{DO_{amostra} - DO_{controle\ negativo}}{DO_{controle\ positivo} - DO_{controle\ negativo}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

onde DO é o valor de densidade ótica a 540 nm para a amostra, o controle negativo e o controle positivo.

Tabela 3.2: Classificação dos materiais conforme o índice hemolítico.

Índice hemolítico (%)	Classificação
0-2	Não hemolítico
2-5	Levemente hemolítico
> 5	Hemolítico

3.2.3.15. Trombogenicidade

A capacidade trombogênica das membranas poliméricas foi avaliada segundo o método gravimétrico de formação de trombos (Imai e Nose, 1972). Amostras de 3 cm x 3 cm de cada membrana foram dispostas em placas de Petri de vidro e 250 µL de sangue de coelho fresco com anticoagulante ACD (citrato ácido dextrose; Probiológica, Portugal) foi adicionado sobre estas. O processo de coagulação foi iniciado pela adição de 25 µL de 0,1M CaCl₂ sobre o sangue e as placas foram incubadas a 37 °C por 30 e 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de água, fixando-se os coágulos com 1 mL de formaldeído a 37 %. Os coágulos foram transferidos para papel filtro e secos a 37 °C

até peso constante. Para o controle positivo foram utilizadas as próprias placas de Petri e o para o controle negativo não foi adicionado sangue na placa. Para a determinação da trombogenicidade foi utilizada a Equação 8:

$$Trombogenicidade = \left(\frac{m_{amostra} - m_{controle\ negativo}}{m_{controle\ positivo} - m_{controle\ negativo}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde m é a massa dos coágulos da amostra, controle negativo e controle positivo.

Após a incorporação, as membranas contendo os fármacos foram caracterizadas quanto à eficiência de incorporação e ao perfil de liberação do fármaco.

3.2.3.16. Eficiência de incorporação dos fármacos

Para mensurar a eficiência de incorporação (ε), fez-se a análise de extratos das amostras obtidos em PBS após 24 h por espectrofotometria (diclofenaco de sódio a 275 nm, piroxicam a 354 nm e cetoprofeno a 260 nm). A eficiência de incorporação foi calculada utilizando-se a Equação 9.

$$\varepsilon = \frac{(\text{massa final de fármaco}/\text{massa de membrana})}{(\text{massa inicial de fármaco}/\text{massa de membrana})} \times 100\% \quad (\text{Equação 9})$$

3.2.3.17. Análise da cinética de liberação do fármaco

Para avaliar a cinética de liberação do fármaco foram utilizadas amostras de membranas de 1 cm x 1 cm. Os corpos de prova foram pesados e posicionados em suportes (feitos a partir de telas de nylon) na parte superior de cubetas de quartzo contendo 3,5 mL de tampão PBS sob agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C. Periodicamente, as cubetas foram analisadas quanto à concentração de fármaco por espectrofotometria.

3.2.3.18. Análise estatística

Os resultados quantitativos obtidos foram analisados através da abordagem de diferenças significativas entre médias de cada amostra (teste de Tukey) através do programa computacional Statistica 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos neste trabalho, enfocando a preparação e seleção de membranas de quitosana-polímero (xantana, pectina ou guar), sua caracterização, a incorporação dos fármacos por diferentes metodologias e sua comparação.

4.1. Obtenção das membranas

Embora na literatura consultada a metodologia de preparação de complexos quitosana-polímero seja descrita para vários dos biopolímeros aqui enfocados, tal descrição não é bem detalhada. Em vista disto, algumas condições experimentais foram testadas com o intuito de estabelecer protocolos experimentais específicos para a obtenção de cada um dos tipos de membranas propostas.

4.1.1. Membranas de quitosana e xantana

As membranas de quitosana e xantana (QX) foram produzidas com base no procedimento proposto no trabalho de Veiga e Moraes (2012), mas com algumas modificações nos equipamentos utilizados (reator de aço carbono substituindo o de vidro e bomba peristáltica substituindo a de injeção por seringa) e na procedência dos reagentes (xantana da Sigma Aldrich substituindo a da CPKelco e quitosana de carapaça de camarão substituindo a de caranguejo). Aparentemente as membranas formadas (Figura 4.1a) mostraram-se muito semelhantes às membranas anteriormente preparadas, prosseguindo-se, então, para a etapa de caracterização.

4.1.2. Membranas de quitosana e pectina

As membranas contendo quitosana e pectina (QP) foram preparadas com base no procedimento proposto por Bernabé *et al.* (2005), como já mencionado anteriormente. Em vista do pouco detalhamento do procedimento fornecido pelos autores, tais como volume das soluções poliméricas, nível de agitação durante a mistura das soluções e falta de uma secagem com temperatura controlada, uma metodologia alternativa foi necessária para a preparação destas membranas.

Inicialmente foram testadas as mesmas concentrações poliméricas das soluções usadas na preparação das membranas de quitosana e xantana (0,5% m/v cada), mas as membranas formadas eram muito frágeis e romperam-se durante as lavagens com água. Frente a isso, testou-se a reticulação com cloreto de cálcio, adicionando-o durante a preparação e realizando uma imersão em solução aquosa 2% de CaCl_2 por 1 h após a secagem. A presença de Ca^{+2} pode ocasionar a formação de pontes entre os grupos carboxílicos da pectina, reticulando suas cadeias. Aparentemente as membranas não apresentaram melhora na estrutura, rompendo-se novamente durante as lavagens em água. Outra alternativa testada foi a correção do pH durante a preparação da mistura polimérica para 5,5, conforme proposto por Bernabé *et al.* (2005). Neste pH as cadeias de pectina apresentam os grupos carboxílicos desprotonados enquanto que os grupos amino da quitosana estão protonados, favorecendo a complexação. O pH foi elevado utilizando-se solução de hidróxido de sódio 1M adicionada lentamente e sob agitação de 1000 rpm. A mistura ficou sob agitação por 10 min e seguiram-se as etapas subsequentes. As membranas formadas a pH 5,5 aderiram às placas de poliestireno e ficaram quebradiças. Durante as lavagens, novamente houve rompimento e perda de material. O mesmo ocorreu para membranas reticuladas com cloreto de cálcio após ajuste do pH.

Optou-se, então, pelo aumento da concentração de ambas as soluções poliméricas para 1% (m/v), testando-se todas as condições operacionais anteriores. Neste caso, somente a mistura polimérica sem ajuste de pH e sem adição de CaCl_2 formou uma membrana homogênea e capaz de passar por todas as etapas propostas no processo, sem alterações visíveis na estrutura, conforme mostrado na Figura 4.1b. Com a membrana descrita, prosseguiu-se para a etapa de caracterização.

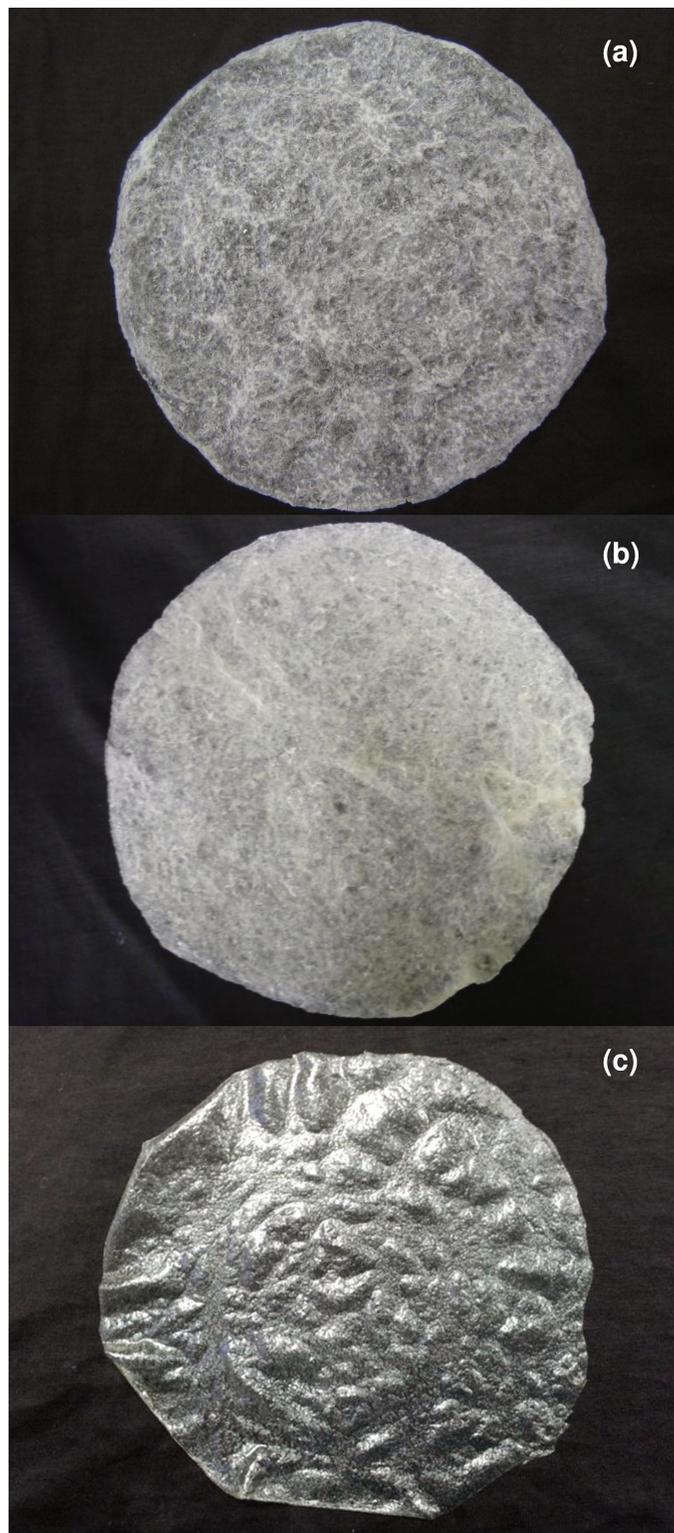


Figura 4.1: Aspectos típicos das membranas de (a) quitosana e xantana, (b) quitosana e pectina e (c) quitosana e guar após as lavagens.

4.1.3. Membranas de quitosana e goma guar

As membranas compostas de quitosana e goma guar (QG) foram preparadas baseando-se no procedimento proposto por Haupt *et al.* (2006). Para o preparo das membranas foram utilizadas soluções poliméricas de concentração 0,5% (m/v) cada. Após a mistura dos polímeros, não houve retenção de bolhas de ar, não necessitando a etapa de desaeração. As membranas formadas mostraram-se homogêneas, porém, durante a lavagem, a membrana se solubilizou completamente. Frente a isto, fez a imersão prévia em solução alcoólica básica indicada por Haupt *et al.* (2006) que neutraliza a membrana e previne a solubilização da quitosana. Após esta etapa foi possível obter membranas adequadas para o propósito deste trabalho (Figura 4.1c).

4.1.4. Membranas de quitosana e goma arábica

Com base no procedimento proposto por Espinosa-Andrews *et al.* (2007), foram preparadas membranas contendo quitosana e goma arábica. Neste procedimento os autores utilizam uma proporção maior de goma arábica em relação à de quitosana. Com isso, propôs-se o preparo das membranas com solução de quitosana a 0,5% (m/v) e de goma guar de 0,5 até 2% (m/v). Nenhuma das membranas formadas se mostrou aceitável para o fim proposto. Na Figura 4.2 são mostrados os aspectos das membranas durante as lavagens. Observa-se que as membranas tiveram aumento de tamanho e rompimento da estrutura durante as lavagens, mas, aparentemente, não houve solubilização dos polímeros. Não foi possível a caracterização das membranas devido a estes resultados.



Figura 4.2: Membranas de quitosana e goma arábica durante a lavagem preparadas a partir de soluções: (a) 0,5% Q: 0,5% GA; (b) 0,5% Q: 1,0% GA e (c) 0,5% Q: 2,0% GA.

Destaca-se, entretanto, que a presença de cadeias polipeptídicas na composição da goma arábica pode ser problemática para uso em curativos, pois já foram registrados casos de reações alérgicas ocupacionais (Sander *et al.*, 2006). Não foram localizadas na literatura consultada referências ao uso de goma arábica na composição de curativos disponíveis comercialmente.

4.1.5. Caracterização das membranas obtidas

As membranas consideradas mais promissoras para o objetivo deste trabalho foram caracterizadas de acordo com os métodos a seguir. Os dados de constituição polimérica das membranas, assim como as perdas ocorridas durante o processo estão apresentados no Anexo 1.

4.1.5.1. Morfologia da superfície das membranas

A análise por MEV da morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi avaliada visando auxiliar na compreensão das possíveis razões para o seu comportamento. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.3 a 4.5. Através das micrografias observou-se que as membranas com guar apresentaram superfícies mais lisas, as contendo pectina apresentaram rugosidade intermediária e as membranas com xantana, superfícies onduladas. Não foi observada a presença de poros perpendiculares às amostras.

As secções transversais apresentam diferenças na coacervação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, sendo que a amostra de quitosana e pectina parece um pouco menos lamelar que a amostra de quitosana e xantana, que apresenta múltiplas lamelas. A membrana quitosana-guar apresenta uma estrutura densa, sem formação de lamelas, diferenciando-se das demais amostras. Os resultados obtidos na análise de espessura destas membranas estão em concordância com os observados nas microscopias, nos quais se verifica que a membrana de pectina é mais espessa que a de xantana, como discutido mais à frente.

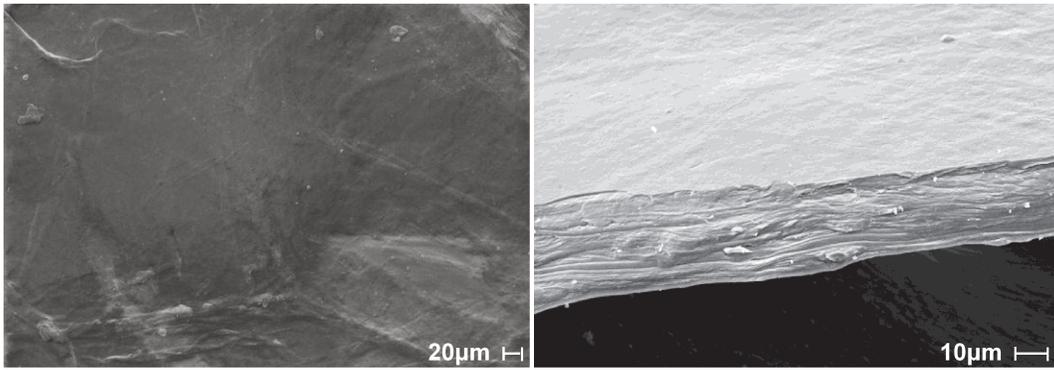


Figura 4.3: Morfologia de superfície e secção transversal das membranas de quitosana e xantana.

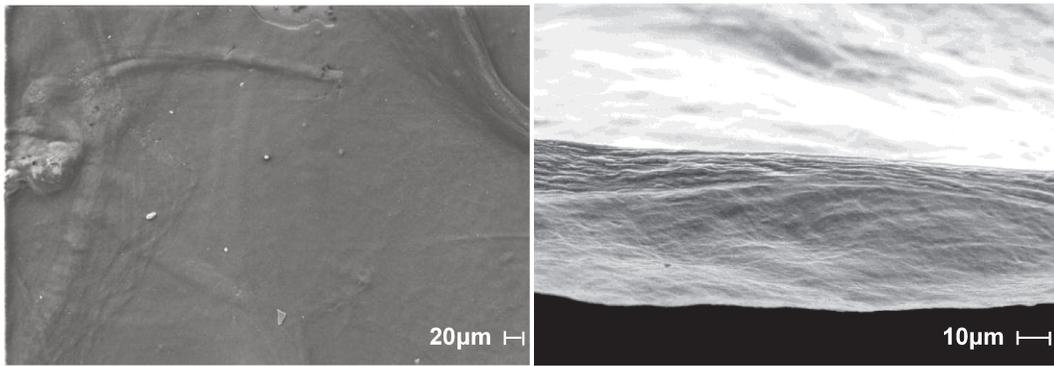


Figura 4.4: Morfologia de superfície e secção transversal das membranas de quitosana e pectina.

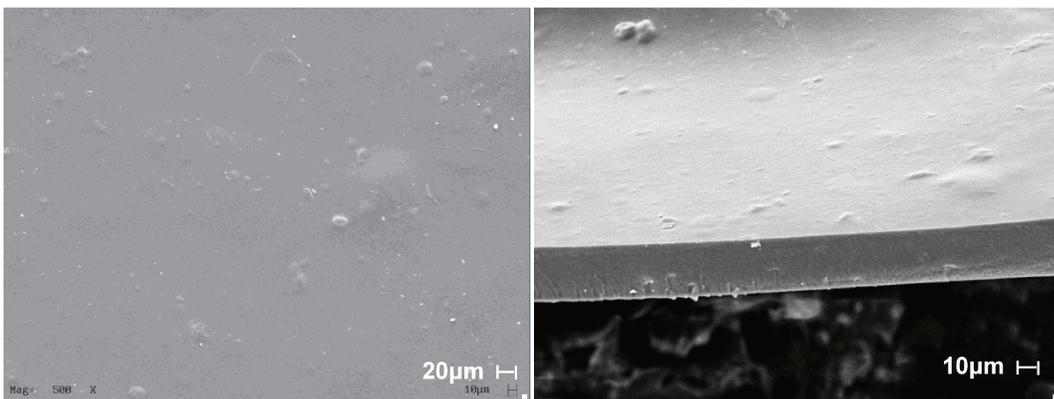


Figura 4.5: Morfologia de superfície e secção transversal das membranas de quitosana e guar.

4.1.5.2. Espessura e propriedades mecânicas

Uma das desvantagens do uso de polímeros naturais é a menor resistência mecânica quando comparados a polímeros sintéticos. Por esse motivo as propriedades físicas e mecânicas são importantes requisitos para o desenvolvimento de materiais projetados para uso como curativos. Os valores encontrados para a espessura, resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de Young das membranas encontram-se listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Espessura e propriedades mecânicas médias das membranas

Membrana	Espessura (μm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Módulo de Young (MPa)
QX	$135,00 \pm 16,43^a$	$5,99 \pm 1,10^a$	$2,61 \pm 0,21^a$	$226,92 \pm 43,52^a$
QP	$205,00 \pm 23,45^b$	$10,00 \pm 3,69^a$	$3,00 \pm 0,68^a$	$343,99 \pm 31,52^b$
QG	$108,10 \pm 15,01^a$	$23,84 \pm 2,75^b$	$3,33 \pm 0,94^a$	$1231,64 \pm 48,30^c$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey a 95% de confiança).

A média das espessuras dos filmes secos variou de 108 a 205 μm , correspondendo principalmente às diferentes massas de polímeros contidas em cada membrana (maiores no caso de membrana QP). Observou-se que os valores obtidos para o alongamento na ruptura não diferiram significativamente entre as membranas com diferentes polímeros e foi similar ao encontrado por Salgado *et al.* (2012) para filmes de quitosana isolada, sugerindo que o comportamento deste polímero se sobressai ao dos demais polímeros. A resistência à tração das membranas contendo xantana foi similar à encontrada por Veiga e Moraes (2012), de 6 MPa, mostrando que mesmo com as mudanças ocorridas no processo e nas propriedades anteriores, a resistência mecânica não foi alterada. A membrana de pectina apresentou uma resistência mecânica maior que a de xantana, fato que pode ser atribuído ao aumento da concentração dos polímeros na

membrana. A maior resistência mecânica encontrada foi da membrana QG, possivelmente pela estrutura densa, sem formação de lamelas. O mesmo comportamento é observado para o módulo de Young, que representa o grau de rigidez dos materiais. Rodrigues (2008) comparou as propriedades mecânicas de membranas de quitosana e alginato secas e hidratadas em água por 1 min e encontrou apreciável diminuição nos valores encontrados para a resistência à tração (de 28 para 3 MPa), porém observou aumento no alongamento na ruptura (de 8 para 46%). O mesmo comportamento é esperado das membranas obtidas neste trabalho.

4.1.5.3. Perfil de hidratação das membranas

A hidratação das membranas ao longo de 24 h a 37 °C foi monitorada em diferentes períodos, e os valores de absorção de água obtidos são apresentados na Figura 4.6.

Pode-se observar na Figura 4.6 que as membranas QX e QP absorveram quantidades crescentes de água durante boa parte do ensaio, sendo as taxas de absorção mais significativas nas primeiras horas de contato. Este comportamento está associado à presença de cargas no interior da matriz polimérica, que favorece o deslocamento da água para seu interior a fim de atingir o equilíbrio osmótico. Por esse motivo, a absorção da membrana QG é menor, pois este tipo de matriz sofre neutralização durante sua preparação. A absorção tende a estabilizar, no caso da formulação quitosana-guar, após a primeira hora, e da quitosana-xantana, após 6h de contato, porém não foi observada a estabilização na formulação quitosana-pectina durante as 24h. Observou-se também que após 24 horas as membranas que contêm pectina absorveram duas vezes mais água que as membranas contendo xantana. Este fato está relacionado com a maior quantidade de polímero que esta formulação contém e ao conseqüente aumento no número de cargas internas da matriz. Bernabé *et al.* (2005) observaram uma absorção de água de 3,84 g água/g membrana após 12 h de contato, resultado muito inferior ao encontrado neste trabalho, provavelmente pelo uso de Ca^{+2} para reticular as cadeias de pectina, dificultando a entrada de água na matriz. Observa-se também que a curva de hidratação destas membranas continua crescente e indica

possível solubilização das cadeias poliméricas internas da membrana, possibilitando uma maior entrada de água na estrutura.

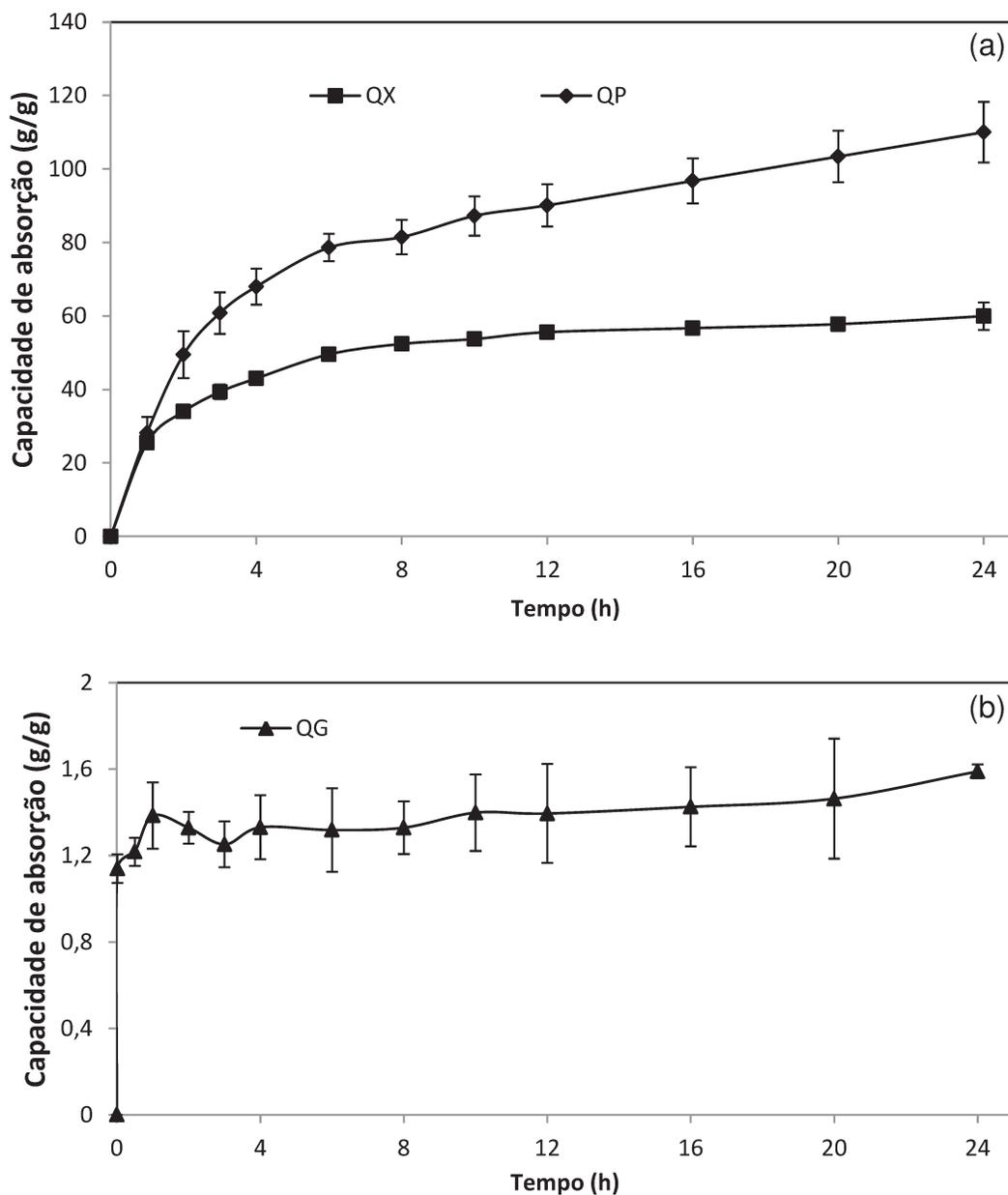


Figura 4.6: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de (a) quitosana-xantana, quitosana-pectina e (b) quitosana-guar durante 24 h de hidratação em água a 37 °C (amostras de 2 x 1 cm²).

4.1.5.4. Capacidade de absorção e perda de massa

A capacidade de absorção e a perda de massa das membranas foram mensuradas para prever seus comportamentos quando em contato com lesões, avaliando-se respectivamente a eficiência de remoção de líquidos eventualmente liberados pelas feridas e a estabilidade dos complexos formados. Foram utilizados como meios simulando fluidos fisiológicos água deionizada, três soluções isotônicas comparáveis a fluidos corporais, sendo elas solução salina a 0,9%, tampão fosfato salino e fluido corpóreo simulado (com forças iônicas respectivamente iguais a 0,154, 0,166 e 0,161 mol/L e osmolalidades iguais a 0,308, 0,315 e 0,311 mOsm/Kg, respectivamente) e soro fetal bovino (com características similares às soluções isotônicas, mas contendo adicionalmente proteínas, fatores de crescimento, lipídios e açúcares, dentre outros compostos). Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.2.

Nas análises de capacidade máxima de absorção observou-se que as membranas de quitosana-xantana apresentaram alta absorção de água, em torno de 65 g de água/g membrana, superior à descrita por Veiga e Moraes (2012) de 39 g H₂O/g membrana e por Argin-Soysal *et al.* (2009) de 12 g H₂O/g de cápsula, mas menos que a descrita por Bellini *et al.* (2012), de 86 g H₂O/g de membrana. Esta variação é devida, principalmente, ao tipo dos polímeros utilizados, uma vez que a xantana usada neste processo é de grau analítico em comparação com a xantana de grau alimentício utilizada por Veiga e Moraes (2012), que pode conter dispersantes e outros compostos. Nas demais soluções, a capacidade de absorção diminui conforme a complexidade do meio utilizado. Este resultado era esperado, uma vez que os íons presentes nessas soluções diminuem o gradiente osmótico entre o interior da matriz e o meio, diminuindo assim a entrada de água na estrutura polimérica para atingir o equilíbrio. As membranas de quitosana pectina absorveram em média 125 g H₂O/g após 24 h de contato, quantidade muito superior à encontrada por Macleod *et al.* (1999) e Bernabé *et al.* (2005), em torno de 4 g H₂O/g de membrana. Ambos os autores utilizaram Ca⁺² nas membranas, o que pode reduzir a absorção de água por reticular as cadeias de pectina e diminuir a quantidade de cargas internas na matriz, diminuindo a entrada de água na estrutura. Nas outras soluções, a capacidade de absorção foi mantida em aproximadamente 4 g/g independente da complexidade do meio. Nas condições testadas, as membranas de

quitosana e goma guar apresentaram baixa capacidade de absorção em todas as soluções, não alcançando 2 g/g de amostra, resultado este associado à neutralização desta membrana, como já discutido anteriormente.

Tabela 4.2: 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 (amostras de 6 x 1 cm²).

Propriedade	Solução	QX	QP	QG
Capacidade de absorção (24 h) (g/g)	Água	64,91 ± 1,42 ^{aA}	125,09 ± 7,54 ^{bA}	1,59 ± 0,03 ^{cA}
	SS	5,60 ± 0,86 ^{aB}	3,75 ± 0,02 ^{bB}	1,68 ± 0,15 ^{cA}
	FCS	4,74 ± 0,29 ^{aBC}	3,13 ± 0,10 ^{bB}	1,76 ± 0,07 ^{cA}
	PBS	3,78 ± 0,40 ^{aC}	4,21 ± 0,39 ^{aC}	1,90 ± 0,26 ^{bA}
	SFB	3,79 ± 0,11 ^{aC}	3,75 ± 0,32* ^{aB}	1,59 ± 0,26* ^{bA}
Perda de massa (7 dias) (%)	Água	22,25 ± 1,92 ^{aA}	34,37 ± 1,01 ^{bA}	3,25 ± 0,36 ^{cA}
	SS	1,06 ± 0,06 ^{aB}	7,81 ± 0,70 ^{bB}	7,54 ± 0,45 ^{bB}
	FCS	8,59 ± 1,51 ^{aC}	7,91 ± 1,29 ^{aB}	8,32 ± 0,54 ^{aC}
	PBS	9,85 ± 1,15 ^{aC}	28,04 ± 4,72 ^{bA}	1,17 ± 0,15 ^{cD}
	SFB	24,44 ± 2,61 ^{aA}	100** ^{bC}	100** ^{bE}

* Amostras na forma de gel viscoso ao final do ensaio; ** Completa desintegração; SS – solução salina 0,9%; FCS – fluido corpóreo simulado; PBS – tampão fosfato salino; SFB – soro fetal bovino Letras minúsculas na mesma linha ou letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias a 95% de confiança (teste de Tukey).

A perda de massa nas membranas de quitosana e xantana foi maior em água e SFB. Possivelmente, no primeiro caso, este fato é devido ao aumento da habilidade de penetração da água na matriz, facilitando a transferência de massa e assim a dissolução das cadeias livres na membrana. No caso do SFB (pH 7,6), a perda de massa é atribuída à interação de íons e proteínas. Aparentemente a estrutura da matriz é mantida por interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (em relação aos grupos -CH) (Rinaudo, 2008). Quando a força iônica do meio é elevada, estas interações

enfraquecem. No meio contendo proteínas (SFB), estas interações podem ser rompidas e causar a dissolução da membrana, fato ocorrido nas membranas QP e QG. Em FCS e PBS (pH 7,4) a perda foi em torno de 10%, enquanto em presença de SS, meio levemente ácido (pH 5,5), a perda foi de 1%. Esta diferença pode ser atribuída aos grupos amina da quitosana (pKa 6,3), que se encontram não ionizados em pH em torno de 7, reduzindo a solubilidade deste polissacarídeo e diminuindo a interação eletrostática com a xantana, ocasionando sua solubilização.

As amostras que contêm quitosana e pectina apresentaram, em geral, maior perda de massa em comparação às amostras de quitosana e xantana. Em presença de água e PBS, as amostras perderam seu formato inicial ($6 \times 1 \text{ cm}^2$), e apresentaram um aspecto de hidrogel, sugerindo que os polímeros não formaram um complexo estável nas condições da análise. Este resultado está em concordância com a hipótese de que as membranas estão se solubilizando ao longo do tempo, como observado na curva crescente de perfil de hidratação. Coimbra *et al.* (2011) relataram a perda de massa em torno de 12 % nas mesmas condições (PBS a 37° por 7 dias) para suportes de quitosana e pectina, menor do que o encontrado para as membranas deste trabalho, provavelmente devido ao método de secagem do suporte, liofilização. Mesmo o fluido corpóreo simulado apresentando a mesma força iônica que o PBS, a perda de massa foi menor neste meio, possivelmente como resultado da presença de Ca^{+2} e Mg^{+2} , cátions capazes de reticular as cadeias de pectina. Em SFB, as membranas QP e QG apresentaram completa dissolução, indicando que os diferentes componentes deste meio são capazes de romper as interações entre as cadeias poliméricas, desestruturando a matriz.

As membranas QG apresentaram menor perda de massa que as demais amostras, possivelmente pela menor capacidade de absorção desses fluidos, resultado da baixa presença de grupamentos ionizados no interior da estrutura polimérica. Frente a estes resultados, é possível obter membranas com diferentes comportamentos de intumescimento, o que é interessante do ponto de vista de aplicação em diferentes tipos de lesão.

4.1.5.5. Avaliação da capacidade de sorção de vapor de água

Na Figura 4.7 estão apresentados os resultados obtidos para a capacidade de sorção de vapor de água das membranas. A membrana de quitosana-pectina absorveu maior quantidade de vapor que as demais membranas. Sabe-se que a sorção de vapor está associada ao volume livre no interior da matriz e a sua porosidade. Este comportamento era esperado, uma vez que esta membrana apresenta provavelmente maior volume livre que as demais já que possui uma maior quantidade de polímero e consequentemente, uma maior espessura. Não foram observadas diferenças apreciáveis na taxa de absorção para as demais membranas, no entanto os elevados desvios padrão (barras de erro na Figura 4.7) sugerem a utilização de amostras de maiores dimensões para uma melhor definição do comportamento destes filmes em presença de vapor de água.

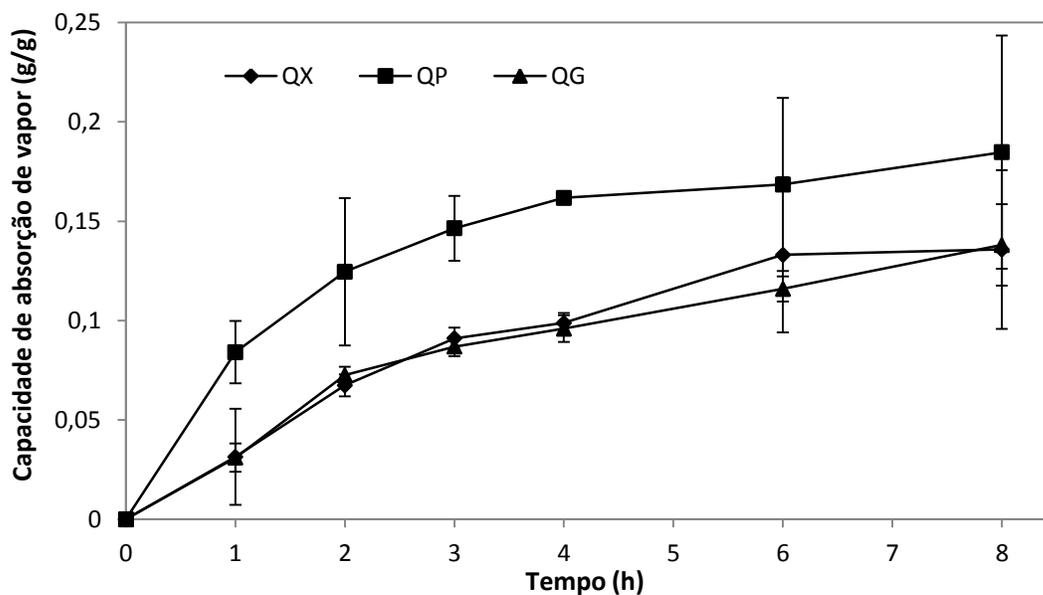


Figura 4.7: Sorção de vapor nas membranas QX (◆), QP (■) e QG (▲).

4.1.5.6. Permeabilidade ao vapor de água

A permeação de vapor de água através de materiais poliméricos ocorre em duas etapas principais: absorção e difusão. Primeiramente o vapor é incorporado nas estruturas poliméricas, condensa e posteriormente ocorre o processo de difusão através das demais moléculas. Por esta razão a permeabilidade em relação ao tempo não é linear nos períodos iniciais para a maioria dos hidrogéis e após um período entre 2 a 3 h, o comportamento tende a ser linear (Dias *et al.*, 2011)

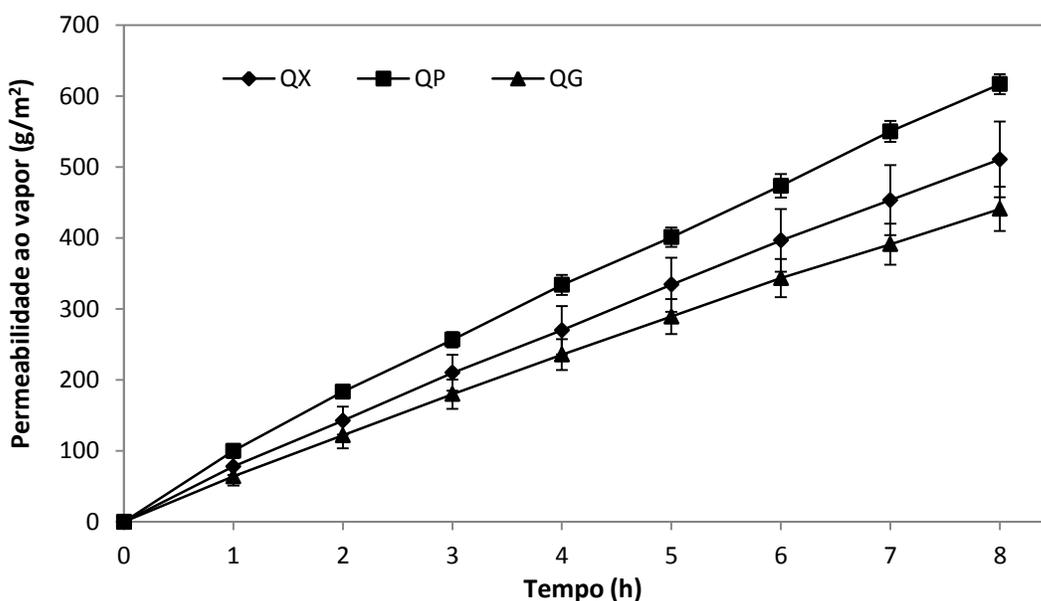


Figura 4.8: Permeabilidade ao vapor d'água para as membranas QX (◆), QP (■) e QG (▲).

Os resultados encontrados para a permeabilidade (Figura 4.8) são coerentes com a absorção de vapor (Figura 4.9); as amostras que apresentaram as maiores taxas de permeabilidade também foram as que absorveram maior quantidade de vapor. A sorção de água por biopolímeros frequentemente resulta em modificações conformacionais, uma vez que as moléculas de água agem como um agente plastificante na estrutura da membrana. Conseqüentemente, a matriz tende a apresentar uma estrutura menos densa e com cadeias mais flexíveis, aumentando, assim, a permeação

da água (Rao *et al.* 2010). As taxas de transmissão de vapor de água diária das amostras foram de 1217, 1461 e 1727 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ para as membranas QG, QX e QP, respectivamente. Porém, para uma melhor comparação entre os materiais, é indicado utilizar a permeação, que considera a espessura de cada membrana. Neste caso os valores encontrados ao final de 24h foram 39,2, 41,5 e 52,5 $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ para as membranas QP, QX e QG, respectivamente. Nota-se que tais dados estão em concordância com a espessura das amostras: quanto mais espesso o material, menor a permeação, sugerindo ser este o fator de maior significância nesta propriedade. Rao *et al.* (2010) reportaram taxas de permeação de vapor de 4000 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ para membranas QG, porém utilizaram temperatura de 37°C enquanto este trabalho utilizou 32° C conforme recomendação da norma ASTM E96-90D. De acordo com Lamke *et al.* (1977) a pele saudável evapora até 240 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$, porém a pele lesada perde uma quantidade maior de líquido, principalmente devido ao exudato liberado pelas lesões. Para queimaduras de 1°, 2° e 3° grau, a perda de água é de até 278, 4274 e 3436 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$, respectivamente. Nos dois últimos casos a permeabilidade seria insuficiente, porém, quando em contato com a lesão, as membranas de QX e QP provavelmente absorveriam o exudato também, causando um intumescimento das cadeias poliméricas e facilitando a evaporação. Já a membrana QG seria mais bem empregada em lesões com pouca liberação de exudato, como as queimaduras de primeiro grau ou mesmo em estágios mais avançados da cicatrização da lesão.

4.1.5.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Estão apresentados nas Figuras 4.9 a 4.11, os espectros obtidos para os polímeros isolados, as misturas físicas e as membranas. As análises foram realizadas a fim de avaliar possíveis interações entre os polímeros após a formação das membranas.

Nas Figuras 4.9 a 4.11 é possível observar regiões de absorção típicas dos polissacarídeos, como bandas em torno de 1000 cm^{-1} (C-O e C-C), a banda alargada entre 3700 e 3000 cm^{-1} correspondente à vibração axial O-H (νOH) e a banda situada entre 3000 e 2800 cm^{-1} relativa às vibrações axiais C-H (νCH). A quitosana apresenta bandas características em 1649 e 1579 cm^{-1} relativas à ligação (C=O) dos grupos amida

ainda acetilados e N-H₂ dos grupos amina, respectivamente (Pawlak e Mucha, 2003). Estas bandas estão em destaque no espectro referente à quitosana e estão relacionadas ao grau de desacetilação. O espectro da xantana apresenta picos em 1603 e 1723 cm⁻¹ relativo aos grupos carboxílicos ionizados (ν C=OO⁻) e de éster insaturado, típico dos grupos acetato e piruvato (Popa *et al.*, 2010; Shalviri *et al.*, 2010). Ao se observar o espectro da membrana de quitosana-xantana, nota-se que os picos referentes aos grupos NH₃⁺ da quitosana e COO⁻ da xantana não são nítidos, havendo sobreposição destes e a redução da intensidade, sugerindo interação iônica entre as cadeias. Popa *et al.* (2010) também observaram estas modificações em hidrogéis de quitosana e xantana e descrevem que todos os picos referentes a ligações C-O de grupos carboxílicos entraram em colapso depois da complexação para formar uma única banda em 1663 cm⁻¹. O mesmo não foi observado na mistura física.

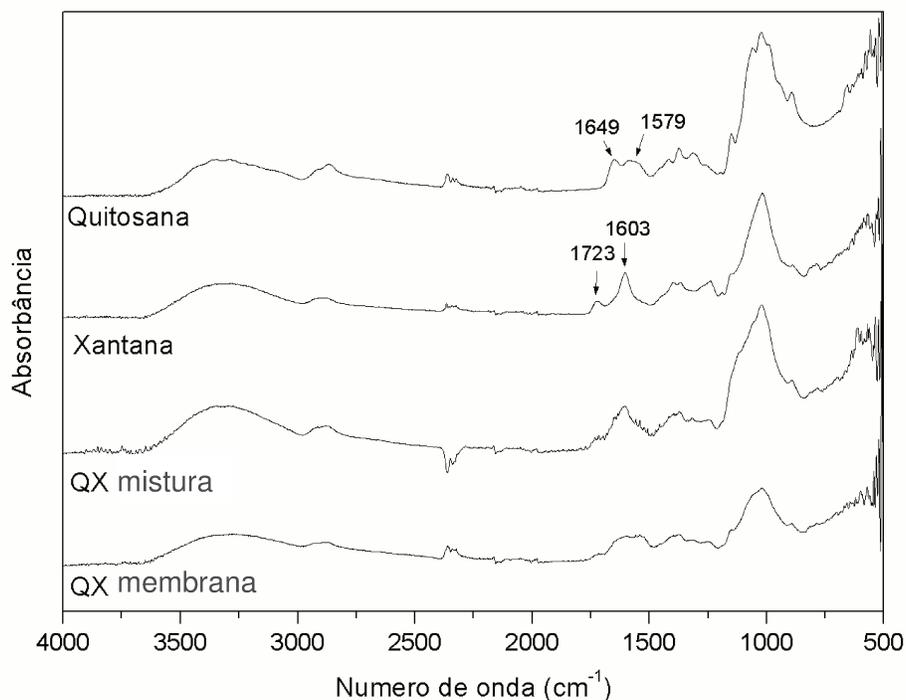


Figura 4.9: Espectro FTIR-ATR da membrana quitosana-xantana e seus respectivos biopolímeros.

Na Figura 4.10 o espectro da pectina apresenta picos em 1609 cm^{-1} (grupos carbonila do íon carboxilato) e 1730 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$ dos grupos metil éster e da carboxila não dissociada), enquanto que na membrana de quitosana-pectina este último pico está menos intenso, sugerindo interação com a quitosana (Coimbra *et al.*, 2011). Com a sobreposição dos picos de 1609 cm^{-1} da pectina com o de 1579 cm^{-1} da quitosana (N-H₂), não é possível afirmar que houve redução ou aumento de ambos.

A goma guar apresenta um pico a 1643 cm^{-1} típico dos grupos hidroxila e outras três bandas descritas como vibrações axiais das ligações C-O(H) (Wang e Wang, 2009). Na mistura física dos polímeros, observa-se uma sobreposição da banda dos grupos hidroxilas da goma guar com a banda do grupo amina da quitosana. Quando comparada com a membrana quitosana-guar, a intensidade deste pico conjunto é menor, sugerindo que há interação dos grupos na membrana, enquanto que na mistura física não há interação.

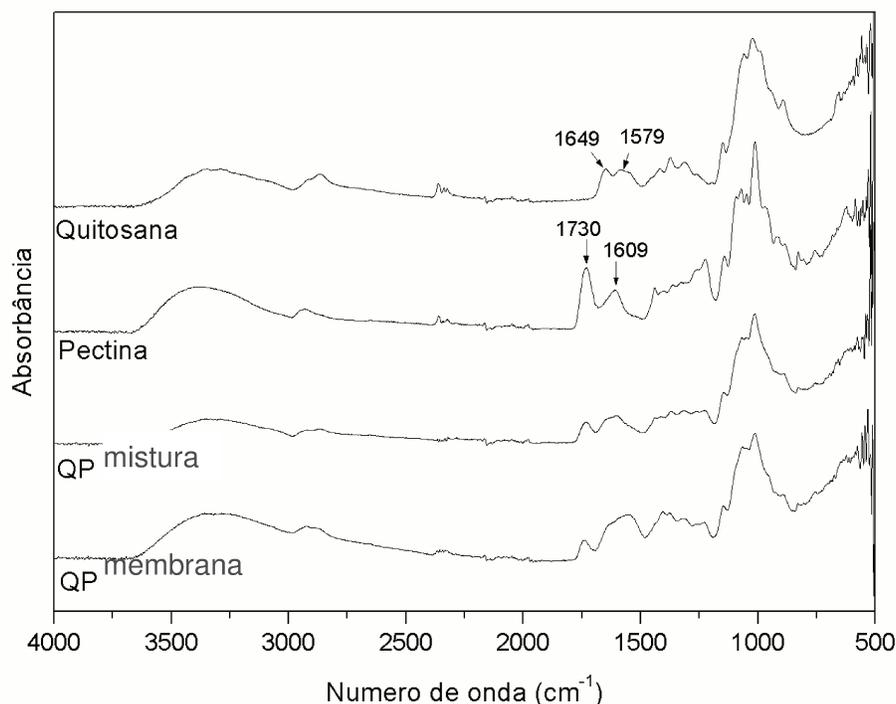


Figura 4.10: Espectro FTIR-ATR da membrana quitosana-pectina e seus respectivos biopolímeros.

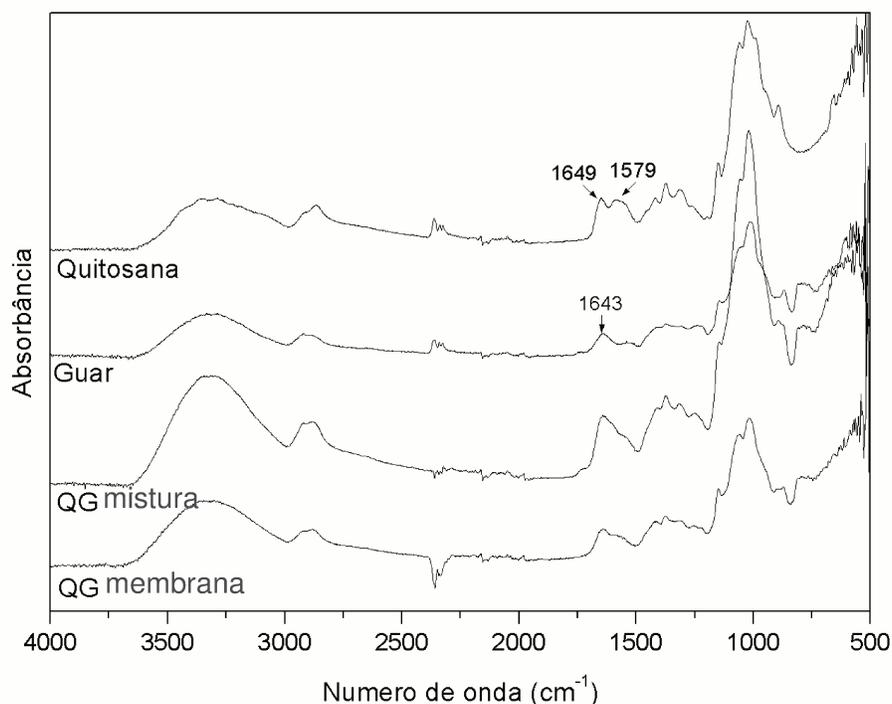


Figura 4.11: Espectro FTIR-ATR da membrana quitosana-guar e seus respectivos biopolímeros.

4.1.5.8. Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas (TGA) das membranas são utilizadas para observar a interação entre os polímeros e selecionar os materiais com as melhores propriedades térmicas para usos específicos. Na Tabela 4.3 estão apresentadas as temperaturas dos picos de degradação dos polímeros puros, na Tabela 4.4 as temperaturas dos picos de degradação das misturas físicas e na Figura 4.12 os termogramas da perda de massa e sua derivada para membranas.

O primeiro evento térmico identificado nos termogramas das membranas é uma perda de massa em torno de 10% na faixa de 50 – 150 °C, que é relacionada à evaporação de água presente nas amostras (Ghaffari *et al.*, 2007; Fahmy e Fouda, 2008). As membranas QX e QP apresentaram a fase de desidratação com perda de massa de 9,2 e 9,8 % terminando em 155 e 159 °C, respectivamente. Já na membrana QG há desidratação com perda de 8,8% da massa, que é finalizada em 190 °C. Este estágio

termina em uma temperatura maior que no caso das demais membranas provavelmente pela forte ligação das pontes de hidrogênio da água com os grupos hidroxila presentes na goma guar.

Tabela 4.3: Picos de degradação dos polímeros puros

Polímeros	Temperatura do pico de degradação (°C)
Quitosana	299,89
Xantana	274,70
Pectina	232,55
Guar	299,29

Tabela 4.4: Picos de degradação dos polímeros em misturas físicas com quitosana.

Polímeros	Temperatura do pico de degradação (°C)		
	Quitosana-xantana	Quitosana-pectina	Quitosana-guar
Quitosana	295,89	299,14	298,57
Xantana	282,50	-	-
Pectina	-	232,57	-
Guar	-	-	298,57

A degradação térmica da membrana QG acontece em apenas um estágio, iniciando-se em 221 °C e terminando em 332 °C, com perda de massa de 42%. Este evento pode ser atribuído à perda dos grupos hidroxila da goma guar, a decomposição dos anéis piranosídicos da quitosana e a despolimerização das cadeias polissacarídeas (Huang *et al.*, 2007; Zawadzki and Kaczmarek, 2010). Há apenas um pico identificável nesta membrana devido às temperaturas de degradação dos polímeros serem próximas e

estarem sobrepostas. Esta fase é continuada com a decomposição até 596°C restando 32% da massa inicial.

As membranas QX e QP, por sua vez, exibiram três eventos térmicos distintos. O segundo evento identificado termina em torno de 250 °C para ambas as formulações, com perda de massa de 17 % para a membrana QX e 25 % para a membrana QP. Este evento está provavelmente relacionado com a degradação dos poliânions, que apresentam temperatura de degradação menor que a quitosana (Tabela 4.3). A xantana pura tem seu pico de degradação em torno de 275 °C e este mesmo polímero quando em mistura física com a quitosana apresenta os picos sobrepostos com aumento da temperatura para 282 °C. O mesmo comportamento não é observado na membrana, em que a xantana apresenta a despolimerização de suas cadeias num evento em torno de 233 °C. Esta diminuição da temperatura do pico de degradação também foi observada para a pectina, em que o polímero puro e na mistura física com a quitosana apresenta degradação em torno de 232 °C e na membrana o pico é identificado em 220 °C. A degradação térmica em uma temperatura mais baixa nestas membranas sugere a complexação entre a quitosana e os poliânions através da formação de ligações iônicas entre os polímeros e está possivelmente associada com a perda de organização das cadeias (Bigucci *et al.*, 2008).

O terceiro evento observado nestas membranas é relacionado com a degradação da quitosana. Os eventos observados nas membranas ocorrem em torno de 279 °C com perda de massa de 25 % para a membrana de quitosana e xantana e de 272 °C com perda de massa de 16% para a membrana de quitosana e pectina. Estas temperaturas de degradação são menores que os picos encontrados para a quitosana, tanto pura, quanto em misturas físicas. Tal comportamento, associado com a diminuição da temperatura de degradação dos poliânions, sugere que houve a complexação entre os polímeros (Ghaffari *et al.*, 2007; Bigucci *et al.*, 2008).

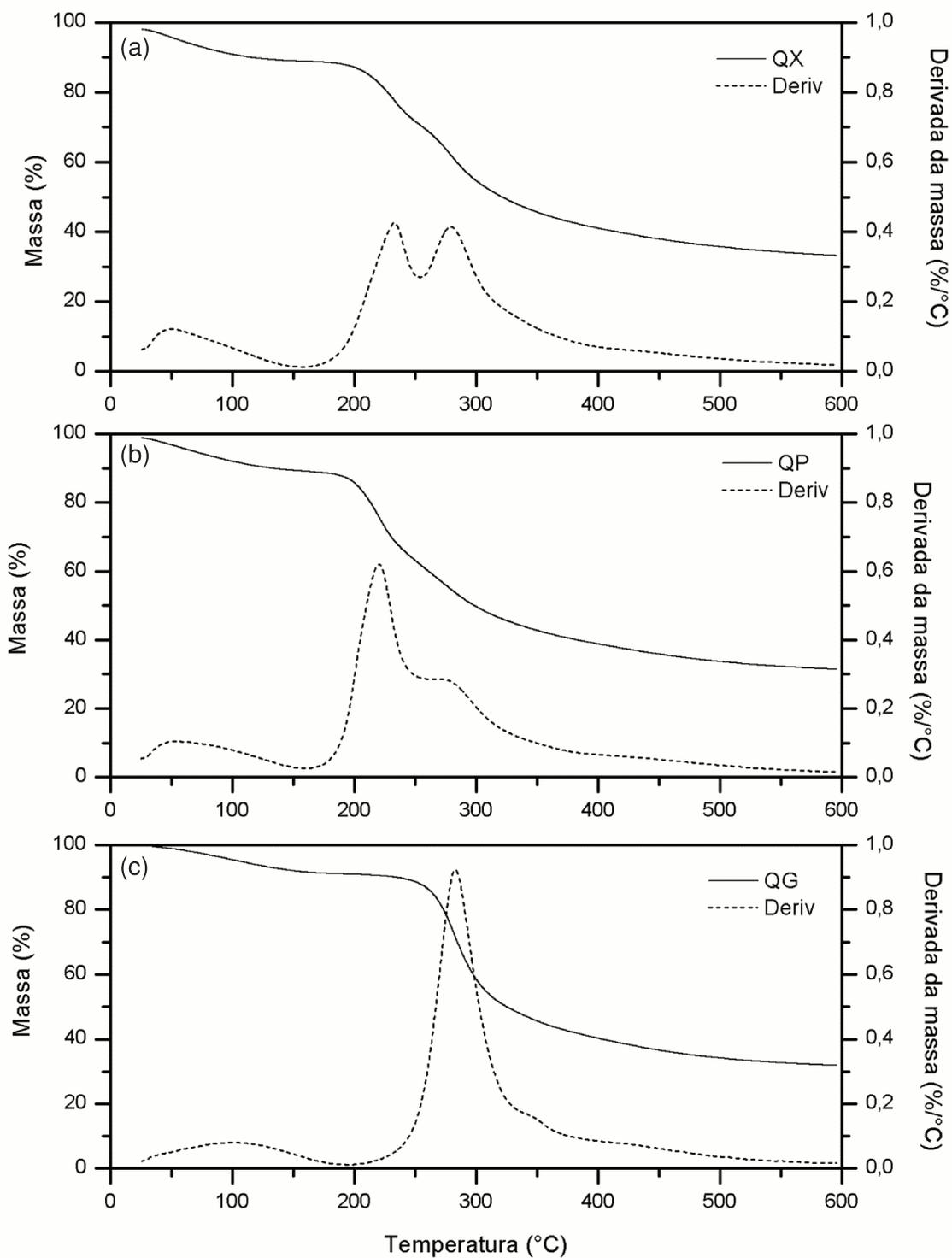


Figura 4.12: Termogramas das membranas de quitosana associada com xantana (a); pectina (b) e goma guar (c).

4.1.5.9. *Propriedades antimicrobianas*

A proteção contra a permeação e proliferação bacteriana são características desejáveis em curativos para lesões de pele. Na Tabela 4.55 estão apresentados os resultados das propriedades antimicrobianas avaliando-se seus efeitos sob bactérias comuns em ambientes hospitalares e no Anexo 2 encontram-se as imagens das placas de Petri destes ensaios.

Não foi observada a formação de halo de inibição pelas membranas. Este resultado já era esperado, uma vez que a quitosana coacervada com outros poliânions pode não apresentar atividade antimicrobiana. Resultados similares foram encontrados por Rodrigues *et al.* (2008) para membranas lamelares de quitosana e alginato e Bueno e Moraes (2011) para membranas porosas de quitosana e alginato. Estes autores relacionaram a atividade antimicrobiana atribuída à quitosana com a presença de cadeias positivamente carregadas deste biopolímero, o que não ocorre quando esta está complexada. Observou-se que as membranas que contêm xantana ou pectina não foram permeáveis a *P. aeruginosa* e não favoreceram o crescimento de nenhum dos tipos de bactérias no restante da placa. O mesmo não ocorreu com a membrana de quitosana e goma guar, que foi permeável aos dois micro-organismos e ainda possibilitou o crescimento destes na placa.

A membrana de goma guar foi permeável às duas espécies de bactérias, não oferecendo resistência ao seu crescimento. Este fato ocorrer devido a produção de mananases pelos micro-organismos, enzimas capazes de degradar a manose presente na estrutura da goma guar. Esta produção ocorre quando os micro-organismos encontram-se sem substrato para consumir, como no caso da superfície das membranas (Dhawan e Kaur, 2007). Também se observou que as membranas QP e QG foram completamente dissolvidas em soro fetal bovino no ensaio de perda de massa, provavelmente devido a compostos presentes neste meio, mas não nas demais soluções aquosas, como proteínas, açúcares e lipídios, dentre outros. De maneira similar, isto pode ter também ocorrido com as membranas em contato com o meio de cultura dos micro-organismos, facilitando a permeação das células pelas membranas. Em suma, as

formulações contendo xantana ou pectina seriam capazes de proteger mais eficientemente o leito de uma lesão da contaminação a estes dois tipos de bactérias.

Tabela 4.5: Propriedades antimicrobianas das membranas.

Bactéria	Resposta	Formulação da membrana		
		QX	QP	QG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Z.I.	Nenhum	Nenhum	Nenhum
	C.P.	Nenhum	Nenhum	Intenso
	C.A.	Intenso	Intenso	Intenso
	C.M.	Nenhum	Nenhum	Intenso
<i>Staphylococcus aureus</i>	Z.I.	Nenhum	Nenhum	Nenhum
	C.P.	Nenhum	Nenhum	Intenso
	C.A.	Intenso	Nenhum	Intenso
	C.M.	Intenso	Moderado	Intenso

Z.I., zona de inibição; C.P., crescimento microbiano ao redor da membrana; C.A., crescimento microbiano na superfície da membrana em contato com a atmosfera; C.M., crescimento microbiano na superfície da membrana em contato com o meio de cultura.

4.1.5.10. Citotoxicidade

Para que seja possível a aplicação das membranas como sistemas de liberação controlada, estas não devem conter substâncias tóxicas e nem causar reações adversas. Para tanto, a avaliação da citotoxicidade *in vitro* torna-se de grande importância no âmbito deste trabalho e os resultados estão apresentados na Tabela 4.6.

As membranas não apresentam toxicidade relevante, permitindo a proliferação celular em altos níveis para todas as formulações testadas, o que as torna passíveis de uso como sistemas de liberação controlada em lesões de pele. Resultados similares também foram encontrados por Chellat *et al.* (2000) para partículas de quitosana e xantana e por Bellini *et al.* (2012) para filmes de quitosana e xantana utilizando as

mesmas linhagens celulares. Coimbra *et al.* (2011) reportaram que *scaffolds* de quitosana e pectina não apresentaram efeito citotóxico em células osteoblásticas humanas.

Tabela 4.6: Citotoxicidade indireta das membranas a células L929.

Material	Citotoxicidade (%)
Controle positivo (látex)	100
Controle negativo	0
Quitosana-xantana	1 ± 0,5
Quitosana-pectina	1 ± 0,8
Quitosana-guar	4 ± 1,2

4.1.5.11. Hemocompatibilidade

A análise da hemocompatibilidade é baseada na quantificação da hemoglobina liberada no plasma decorrente do rompimento das hemácias do sangue, sendo considerado um teste importante, uma vez que pode não ser mensurável sob condições *in vivo*. Conforme relatado na literatura (ISO 10993-4, 1999), não é possível definir um nível universal dos valores aceitáveis ou inaceitáveis de hemólise. Embora, por definição, um material compatível com o sangue não deva ser hemolítico, na prática, vários dispositivos médicos podem causar algum grau de hemólise. Isto significa que quando há efeito hemolítico, é importante certificar-se que os benefícios superem os riscos clínicos e que os valores de hemólise estejam dentro dos limites aceitáveis para o tratamento (Santos *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008). As membranas produzidas com pectina e goma guar não foram consideradas hemolíticas (Figura 4.13), porém a amostra que contém xantana apresentou índice entre 3 e 5, sendo considerada levemente hemolítica.

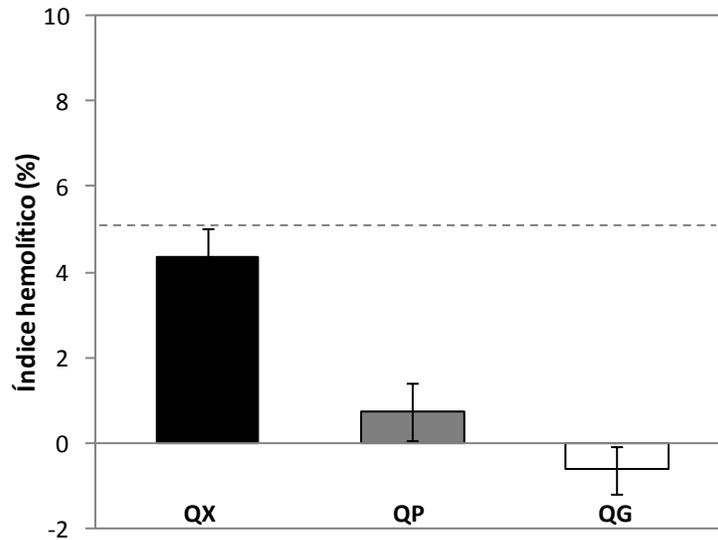


Figura 4.13: Hemocompatibilidade das membranas quitosana-xantana, quitosana-pectina e quitosana-guar. A linha tracejada indica o nível de hemólise geralmente aceito para biomateriais.

4.1.5.12. Trombogenicidade

O material não trombogênico é aquele cuja superfície, ao entrar contato com o sangue, não desencadeia o mecanismo de formação de trombos. Tal situação, embora indesejável para algumas aplicações dos biomateriais, como dos projetados para implantes, pode ser interessante para curativos (Ferreira *et al.*, 2008). Observa-se que as membranas obtidas são, em média, menos trombogênicas que o vidro (Figura 4.14), porém são também consideradas como trombogênicas e devido a este caráter, o material pode contribuir para estancar um possível sangramento, iniciando a coagulação e, conseqüentemente, ajudando na cicatrização da lesão. Em geral, as membranas QX são mais trombogênicas que as membranas QP, que por sua vez são mais trombogênicas que as membranas QG. Também se observa que a trombogenicidade aumenta conforme o tempo de contato com o sangue é maior.

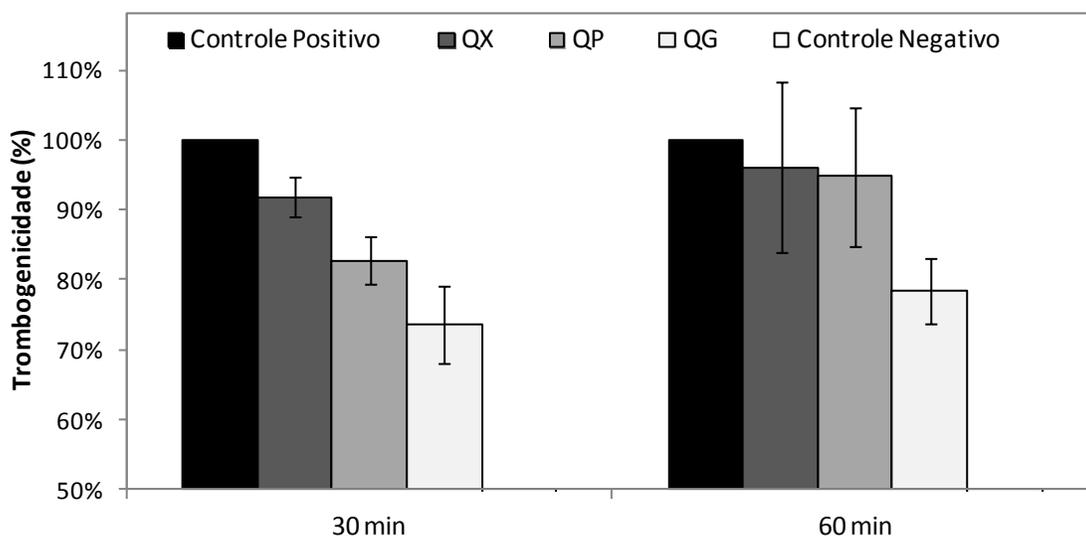


Figura 4.14: Trombogenicidade das membranas quitosana-xantana, quitosana pectina e quitosana-guar.

4.1.6. Estabilidade das membranas em CO₂ supercrítico

Este teste teve como objetivo avaliar o comportamento das membranas poliméricas frente às condições utilizadas durante os processos de tecnologia supercrítica. As variações de massa das amostras foram avaliadas (Tabela 4.7), assim como seus aspectos por microscopia eletrônica de varredura (Figura 4.15). A perda de massa encontrada foi atribuída à presença de água residual na estrutura, que pode ter sido removida durante o processamento com CO₂ supercrítico. Não foram observadas diferenças visuais nas membranas após o tratamento com CO₂ supercrítico, sugerindo que não há interação entre o fluido e as membranas a ponto de modificar suas estruturas e que as mesmas sejam suportes adequados do ponto de vista de estabilidade para processos de incorporação dos anti-inflamatórios selecionados.

Tabela 4.7: Diferença de massa após a exposição a CO₂ supercrítico por 2 h a 40°C e 200 bar.

Membrana	Perda de massa (%)
Quitosana-xantana	6,25
Quitosana-pectina	6,66
Quitosana-guar	7,69

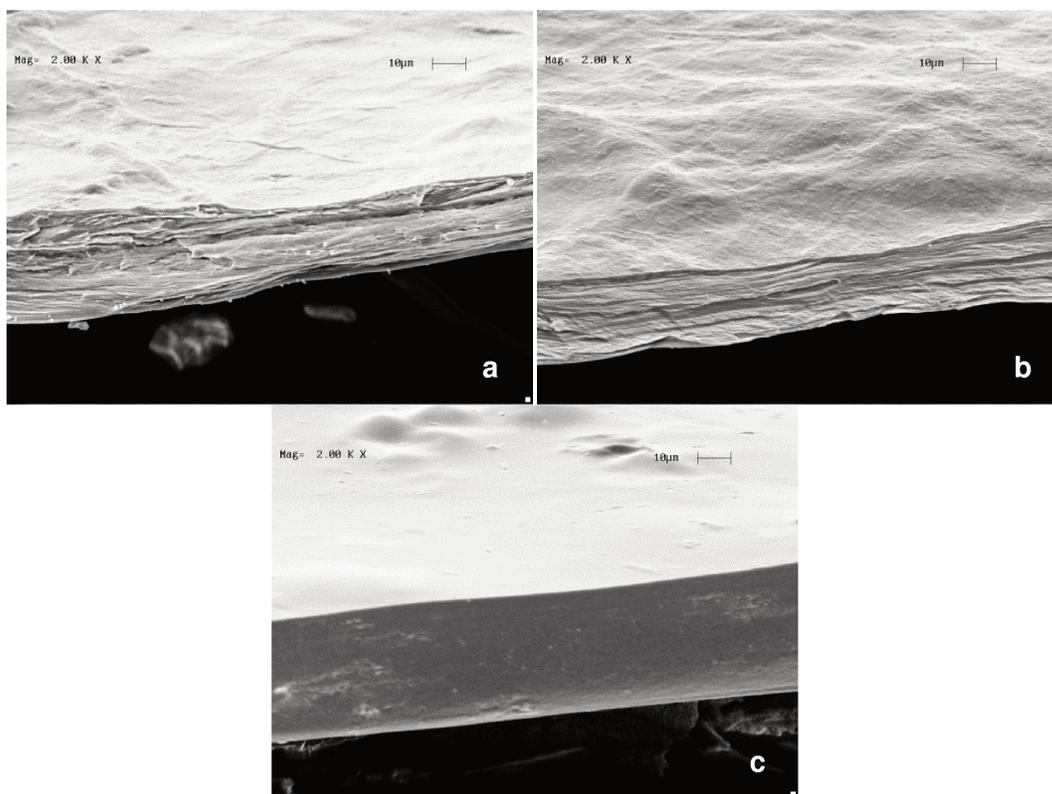


Figura 4.15: Secção transversal das membranas de (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar após a exposição a CO₂ supercrítico.

4.2. Incorporação de fármacos nas membranas

4.2.1. Incorporação de diclofenaco de sódio nas membranas

Ensaio preliminares apontaram que o diclofenaco de sódio é solúvel em água na concentração máxima de 10 g/L, o que possibilita sua incorporação pelos métodos de adição à mistura polimérica e absorção em solução utilizando este solvente. Os dados referentes à curva analítica deste fármaco encontram-se no Anexo 3.

4.2.1.1. Adição do fármaco à mistura polimérica

A incorporação do fármaco ocorreu pela adição de 10 mL de solução aquosa de diclofenaco de sódio com concentrações pré-estabelecidas a fim de obter concentrações finais de 11 a 55 mg de fármaco por grama de membrana QP e 22 a 111 mg por grama das membranas QX e QG. Como a membrana de quitosana e pectina possui duas vezes mais massa polimérica que as outras formulações, a razão mássica fármaco/membrana é menor neste caso. Nas Figuras 4.16 a 4.18 estão apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura das membranas preparadas na presença de diclofenaco de sódio e na Tabela 4.8 estão apresentados os resultados obtidos de eficiência de incorporação do processo.

Analisando-se a Figura 4.16, é possível perceber o aumento da concentração de fármaco presente na membrana QX. Nesta análise foi possível observar que o fármaco encontra-se distribuído homogeneamente na estrutura da membrana, independentemente da concentração utilizada. Na membrana QP (Figura 4.17) é possível observar a presença de pequenos grânulos na superfície das amostras, sugerindo que o diclofenaco de sódio encontra-se na superfície e no interior das membranas. O mesmo não foi observado na membrana QG (Figura 4.18), porém é possível notar que há pequenos orifícios na superfície da membrana, indicando que algum composto depositado foi possivelmente retirado durante a etapa de neutralização a qual é realizada somente neste tipo de formulação.

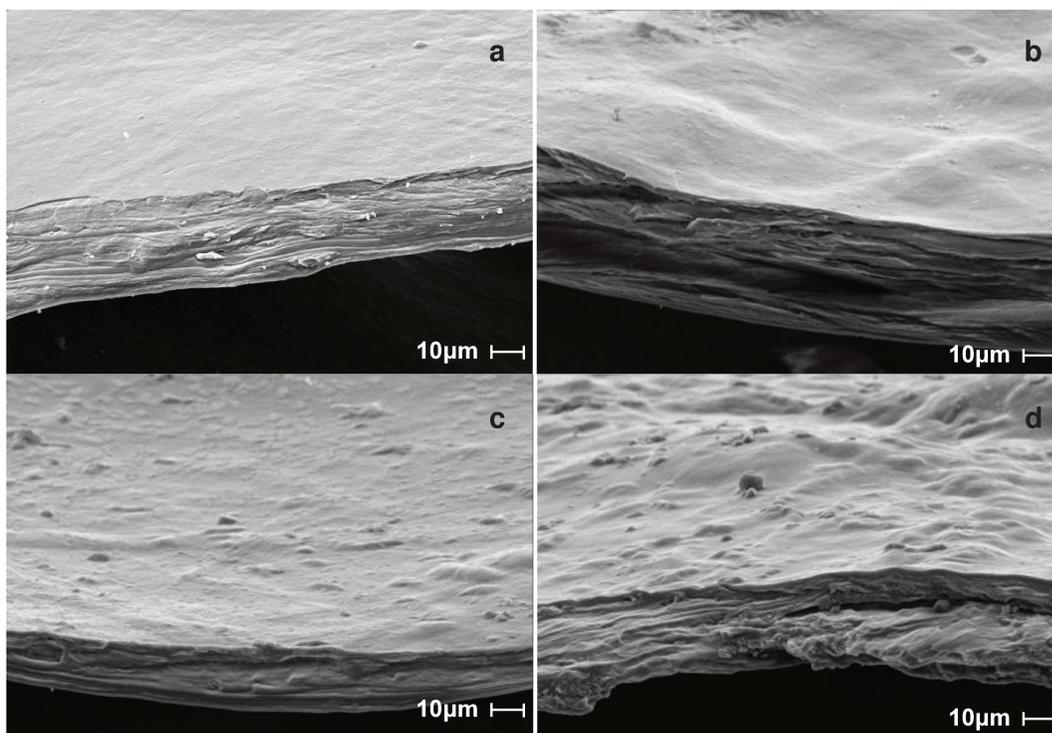


Figura 4.16: Secção transversal das membranas de quitosana-xantana preparadas na presença de (a) 0 mg/g, (b) 22 mg/g, (c) 55 mg/g e (d) 111 mg/g de diclofenaco de sódio.

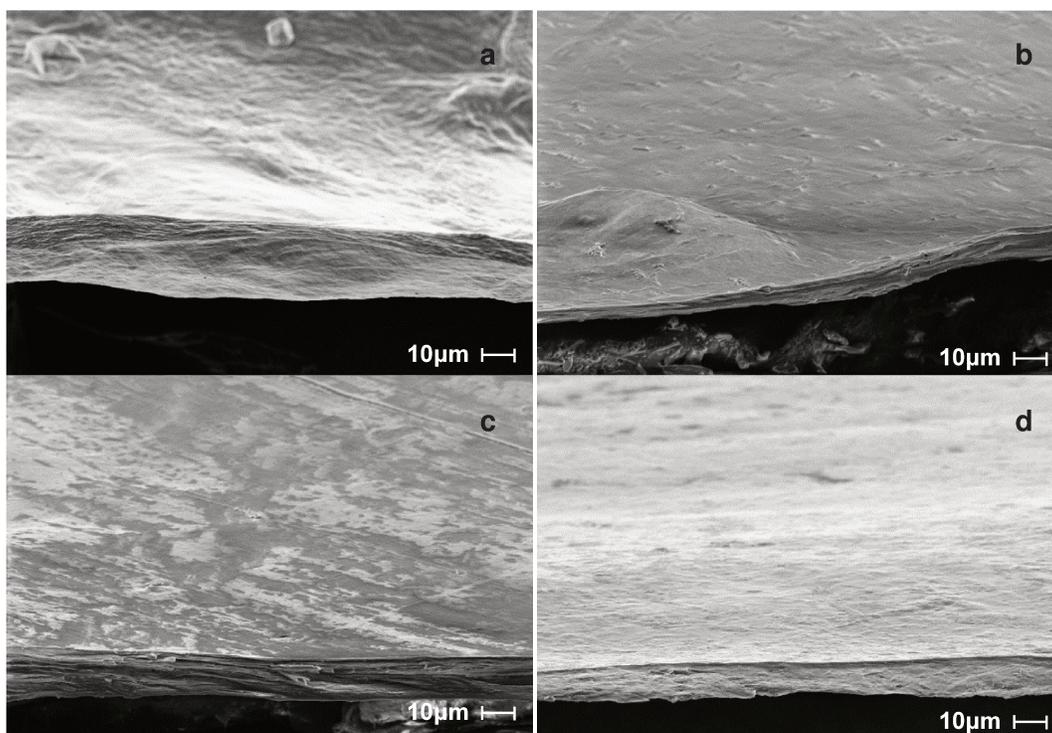


Figura 4.17: Secção transversal das membranas de quitosana-pectina preparadas na presença de (a) 0 mg/g, (b) 11 mg/g, (c) 27 mg/g e (d) 55 mg/g de diclofenaco de sódio.

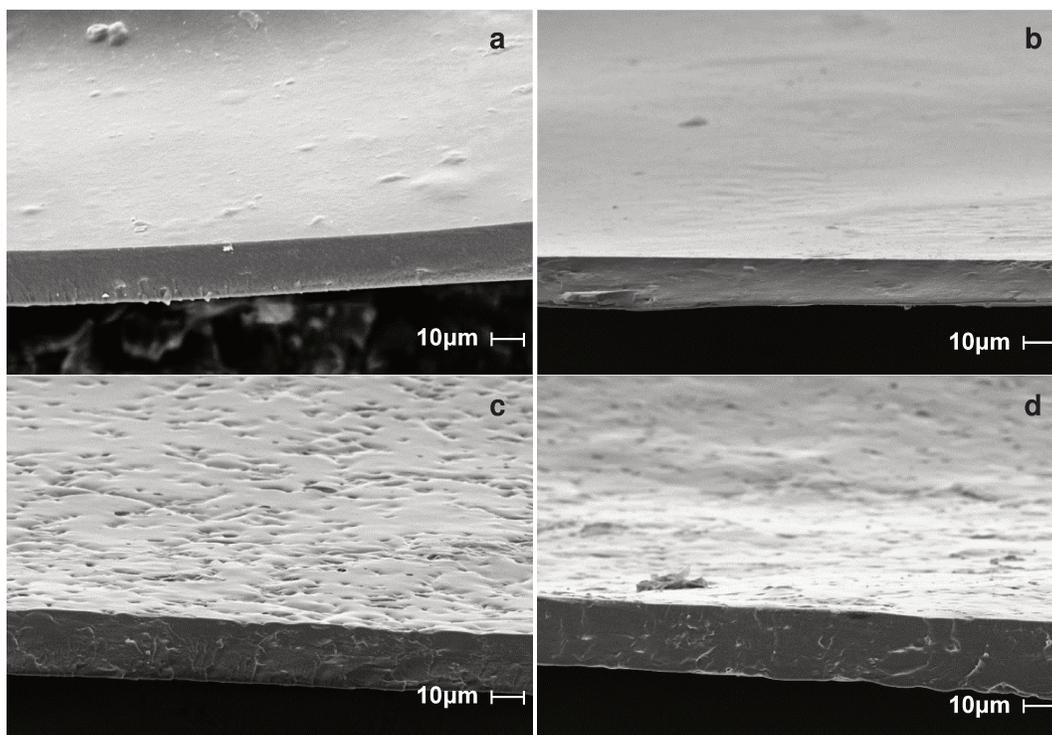


Figura 4.18: Secção transversal das membranas de quitosana-guar preparadas na presença de (a) 0 mg/g, (b) 22 mg/g, (c) 55 mg/g e (d) 111 mg/g de diclofenaco de sódio.

Esta hipótese é reforçada pela análise dos dados da Tabela 4.6, na qual estão apresentados os resultados obtidos de eficiência de incorporação do processo. Ressalta-se que as amostras apresentam perda de massa durante a liberação do fármaco em PBS (3,65, 3,70 e 0,51% para QX, QP e QG, respectivamente, após 24 h), porém esta perda não é considerada relevante para a análise da eficiência de incorporação. Observa-se que houve uma elevada perda de diclofenaco de sódio durante a lavagem das amostras contendo goma guar, além da quantidade não computada que pode ter sido liberada durante a neutralização da amostra (imersão por 1 min em NaOH 1M em água:etanol 1:1 v/v). A lavagem ocorreu em 100 mL de água deionizada por 1h e posteriormente determinou-se espectrofotometricamente a quantidade de fármaco nesta solução. De acordo com Maitani *et al.* (1995), o uso de soluções aquosas com etanol como cossolvente é capaz de aumentar a permeação de fármacos em sistemas dérmicos e em membranas de silicone, inclusive no caso do diclofenaco de sódio. O mesmo comportamento pode ter ocorrido na membrana de QG, em que o etanol forma pontes de

hidrogênio com as hidroxilas presentes nas cadeias poliméricas, aumentando a permeação do fármaco no seu interior, liberando este mais facilmente durante a lavagem. Com isto, a eficiência de incorporação verificada para a membrana de quitosana e guar foi baixa. Como esta etapa é crucial para a preparação da membrana, não podendo ser eliminada, considerou-se que a membrana de quitosana e guar não foi adequada para a incorporação por adição na mistura polimérica. Já as membranas QX e QP apresentaram alta eficiência de incorporação, como resultados da baixa perda por solubilização do fármaco durante a lavagem.

Tabela 4.8: Dados obtidos para a incorporação de diclofenaco por adição na mistura polimérica das membranas.

Membrana	Fármaco adicionado (mg/g)	Perda durante a lavagem (%)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	22,22	12,70 ± 0,47	18,19 ± 0,81	81,86
	55,56	3,00 ± 0,72	52,57 ± 0,29	94,63
	111,11	0,83 ± 0,71	105,86 ± 0,20	95,27
Quitosana	11,11	1,31 ± 0,06	10,29 ± 0,76	92,62
	27,78	0,54 ± 0,02	25,36 ± 1,38	91,29
	55,56	0,49 ± 0,02	53,25 ± 1,43	95,84
Quitosana	22,22	64,63 ± 0,13	0,87 ± 0,05	3,92
	55,56	69,44 ± 0,33	2,14 ± 0,03	3,85
	111,11	64,39 ± 0,35	5,72 ± 0,40	5,15

*A membrana de quitosana e pectina possui o duas vezes mais massa polimérica que as outras membranas, diminuindo a razão fármaco/membrana adicionada.

4.2.1.2. Incorporação por absorção do fármaco em solução

Esta estratégia de incorporação foi realizada após a preparação das membranas, usando-se diclofenaco de sódio solubilizado em água, visto que este é um solvente atóxico e absorvido em grandes quantidades por algumas das amostras. Nas Figuras 4.22 a 4.24 estão apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura das membranas

expostas às soluções de diclofenaco de sódio e na Tabela 4.9 estão sumarizados os dados de eficiência de incorporação do composto nas membranas.

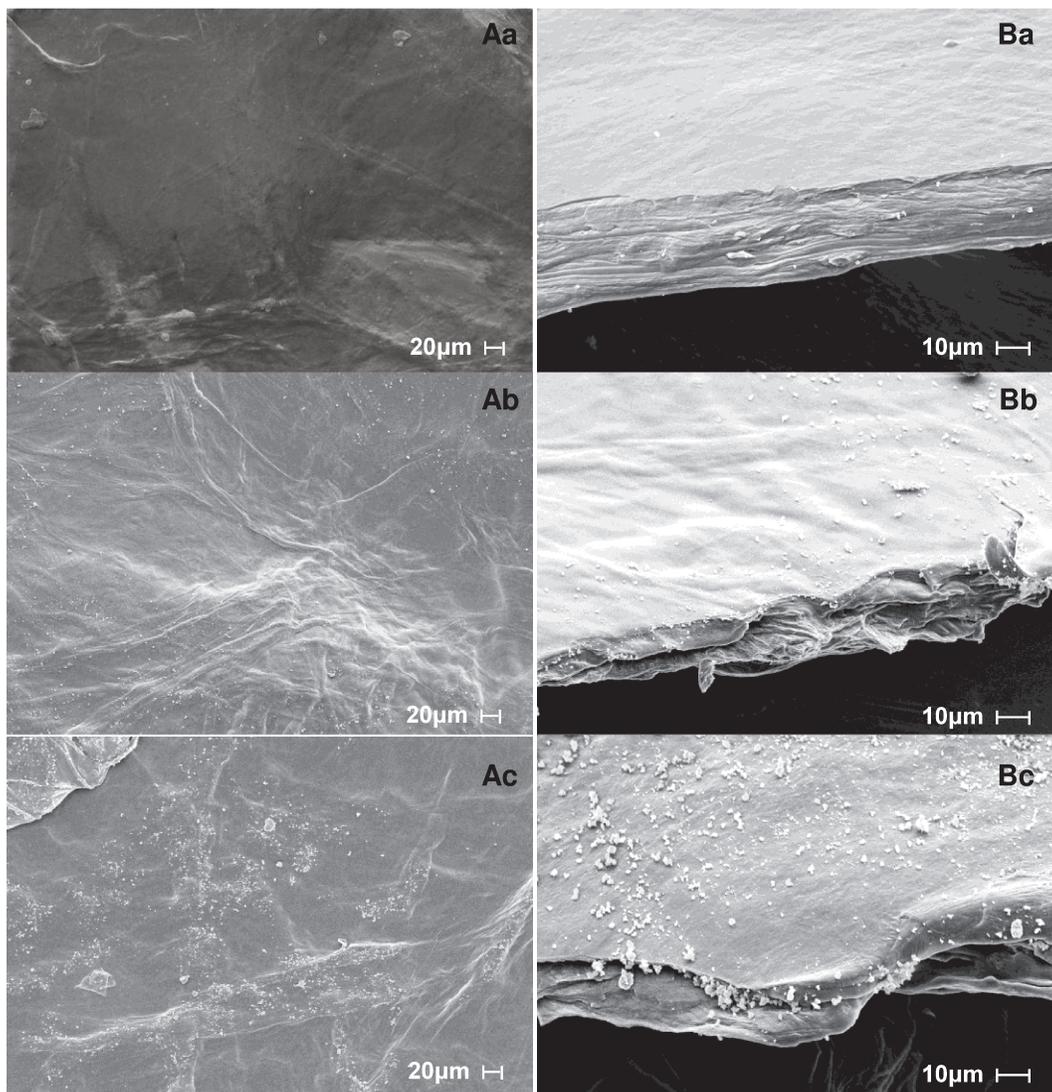


Figura 4.19: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-xantana expostas a soluções aquosas de diclofenaco de sódio nas concentrações de (a) 0 mg/mL, (b) 2 mg/mL e (c) 5 mg/mL.

Nas Figuras 4.19 e 4.20 é possível observar a presença do fármaco cristalizado na superfície das membranas QX e QP. Maior quantidade de material precipitado é observada nas amostras em que a concentração de fármaco presente na solução de

incorporação era maior. Nota-se que não há presença visível de fármaco no interior da matriz polimérica, sugerindo que a incorporação ocorreu apenas na superfície da membrana, na forma de deposição do composto. No caso da membrana contendo guar (Figura 4.21), não é possível observar a presença dos cristais na superfície como nas demais membranas, notando-se também eficiência de incorporação muito menor do fármaco nesta formulação (Tabela 4.9).

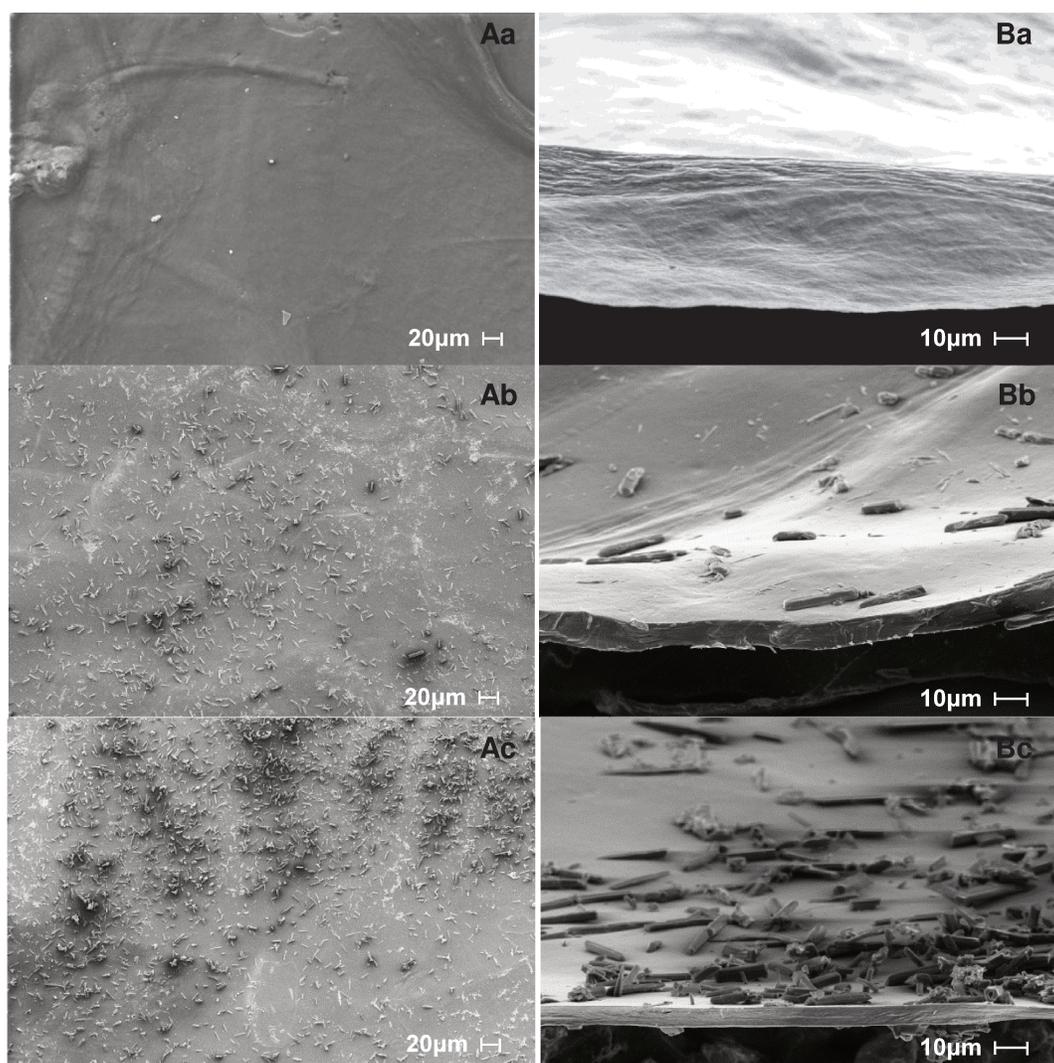


Figura 4.20: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-pectina expostas a soluções aquosas de diclofenaco de sódio nas concentrações de (a) 0 mg/mL, (b) 2 mg/mL e (c) 5 mg/mL.

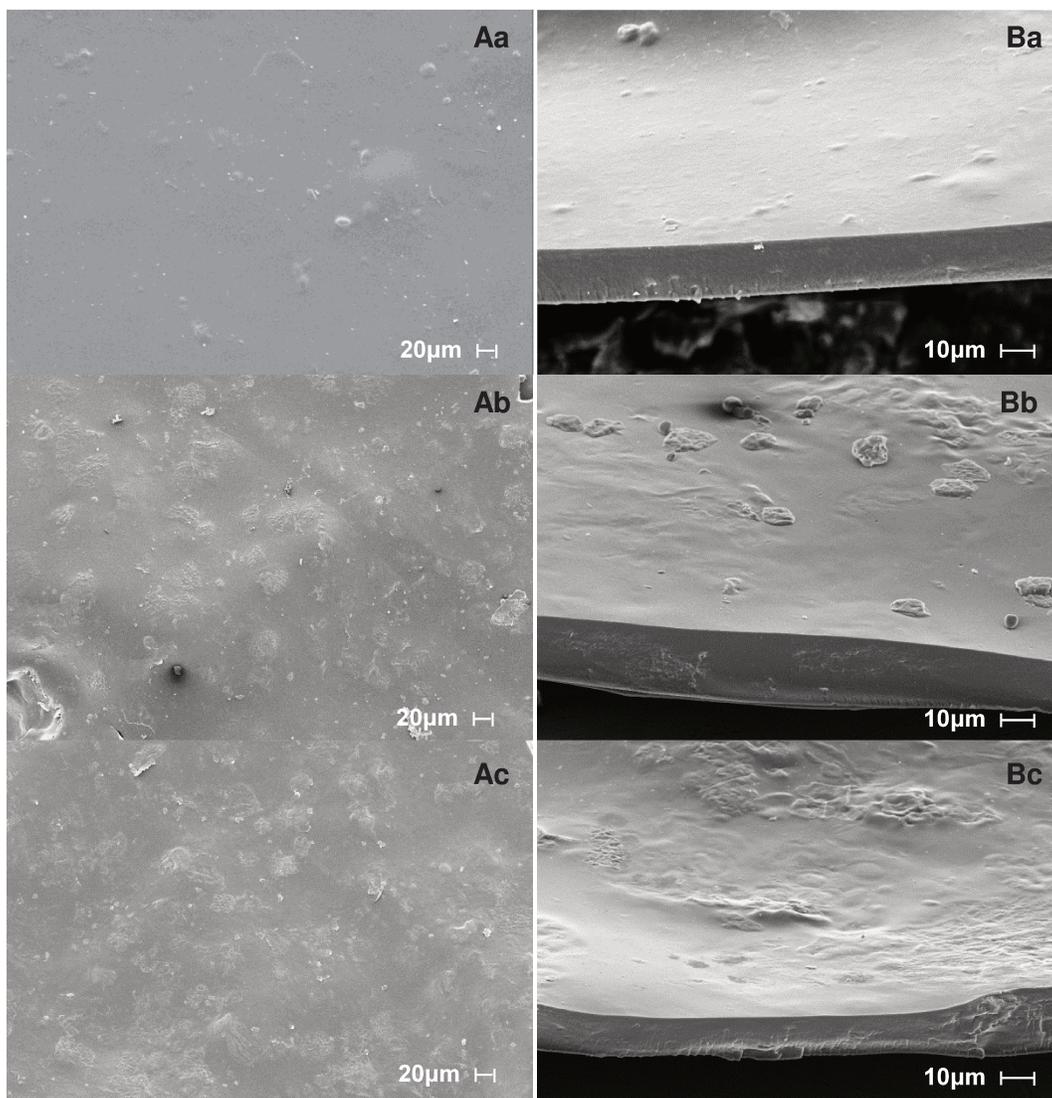


Figura 4.21: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-guar expostas a soluções aquosas de diclofenaco de sódio nas concentrações de (a) 0 mg/mL, (b) 2 mg/mL e (c) 5 mg/mL.

Nota-se pela Tabela 4.9 que este método de incorporação resultou em menores eficiências, porém possibilitou atingir altas concentrações de diclofenaco retido na membrana em comparação com o método anterior. Como o fármaco que não é incorporado permanece em solução, é possível reaproveitar este para processos posteriores. Neste caso, para um processo de incorporação com várias amostras, a eficiência global pode ser elevada e tornar este um processo viável. Neste método

também é possível verificar a menor incorporação nas membranas QG, provavelmente devido à estrutura densa que esta membrana apresenta e à baixa capacidade absorção de soluções, conforme comentado anteriormente no item 4.1.5.4. Fahmy e Fouda (2008) também observaram que quanto maior a capacidade de absorção de tampão fosfato (0,1M pH 7,4) pelas matrizes de quitosana e alginato, maior a incorporação de diclofenaco de sódio.

Tabela 4.9: Dados obtidos para a incorporação de diclofenaco de sódio por absorção de solução aquosa contendo o fármaco pelas membranas.

Membrana	Concentração inicial de fármaco no solvente (mg/mL)	Fármaco adicionado (mg/g)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	2,2	521,63	210,23 ± 20,34	40,30
Xantana	5,4	1299,04	243,90 ± 24,60	18,78
	10,9	2546,95	302,13 ± 7,84	11,86
Quitosana	2,1	313,0	58,63 ± 5,64	18,73
Pectina	5,3	789,9	101,39 ± 18,43	12,84
Quitosana	2,1	496,50	16,67 ± 3,47	3,36
Guar	5,3	1253,02	29,42 ± 1,38	2,35

4.2.1.3. Impregnação com CO₂ supercrítico

Para testar se a incorporação de diclofenaco empregando CO₂ supercrítico é viável, uma vez que este fármaco apresenta baixa solubilidade neste fluido, realizaram-se três ensaios iguais em condições intermediárias (225 bar, 45°C e 9h de contato) para averiguação inicial em membrana QX. Neste mesmo tipo de membrana foram realizados testes para verificar a melhor taxa de despressurização do sistema (de 2 até 10 bar/min) visando minimizar a perda de fármaco incorporado e possíveis alterações na matriz (Anexo 4). Os resultados das liberações do fármaco supostamente incorporado em tampão fosfato salino encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Dados obtidos para a incorporação de diclofenaco de sódio por tecnologia supercrítica.

Membrana	Cossolvente	Fármaco adicionado na célula (mg/g)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	-	66,48	1,80 ± 0,35	2,71
Xantana	Etanol	57,89	0,31 ± 0,16	0,54
	Água (99% UR)	71,21	0,87 ± 0,11	1,22
Quitosana	-	43,30	0,34 ± 0,07	0,79
Pectina				
Quitosana	-	45,30	0,28 ± 0,06	0,62
Guar				

A incorporação de diclofenaco de sódio nas membranas de quitosana-xantana apresentou um desvio padrão elevado, sendo este calculado com base em diferentes amostras do mesmo experimento. Isto se deve, em parte, às absorvâncias muito reduzidas, próximas do limite inferior de detecção do equipamento, o que acarreta em erros nas medidas. Outro motivo é a provável não incorporação do fármaco no interior da estrutura da membrana, sugerindo que este foi apenas precipitado na superfície da membrana e de forma irregular. Um comportamento similar foi observado para as membranas quitosana-pectina e quitosana-guar.

Alguns trabalhos encontrados na literatura sugerem o uso de cossolventes para aumentar a incorporação de fármacos, sendo água e etanol os mais utilizados (Bush *et al.*, 2007; Natu *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010a; Costa *et al.*, 2010b). Frente a isto, realizaram-se ensaios com amostras QX mantidas em ambiente com umidade controlada de 99% utilizando solução saturada de sulfato de lítio ou utilizando etanol a 5% molar em relação ao CO₂ (0,66 mL) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.10.

A utilização de ambos os cossolventes não resultou em aumento da impregnação do diclofenaco de sódio em nenhuma das membranas. O cossolvente tem como função aumentar a solubilidade do fármaco no meio, bem como melhorar a interação do CO₂ com a matriz polimérica. Em alguns casos o cossolvente aumenta a afinidade do fármaco com o CO₂ supercrítico de tal forma que este acaba por retirar durante a descompressão o

fármaco que estaria no interior da matriz, o que pode ter ocorrido neste trabalho. Para que este método fosse passível de aplicação, a incorporação teria que ser superior a 10 mg de fármaco por grama de membrana, valor esse relacionado à dose terapêutica utilizada em cremes comerciais.

4.2.1.4. Análise da cinética de liberação de diclofenaco de sódio

Conforme observado nos itens anteriores, a incorporação de diclofenaco de sódio em membranas QG não foi adequada para as metodologias de adição à mistura polimérica ou por tecnologia supercrítica, resultando em baixa quantidade retida na membrana e baixa eficiência. Entretanto, a incorporação por absorção de solução aquosa contendo o fármaco nesta e nas demais membranas apresentaram bons resultados de retenção de fármaco, mesmo com eficiência reduzida. A impregnação supercrítica não foi um método adequado de incorporação deste fármaco, provavelmente pela baixa solubilidade deste em CO₂ supercrítico.

Após as incorporações, foram realizadas as liberações dos fármacos em PBS a pH 7,4 com agitação controlada de 100 rpm, a 37 °C por até 24 h. Para a comparação entre as cinéticas de liberação do fármaco para cada metodologia de incorporação utilizou-se os dados obtidos para a formulação QP com maior retenção de diclofenaco de sódio em cada caso (Figura 4.24). É possível observar que o diclofenaco é liberado quase que em sua totalidade na primeira hora de contato. O mesmo comportamento de liberação de diclofenaco de sódio foi observado por Fahmy e Fouda (2008) em matrizes de quitosana e alginato e por Piyakulawat *et al.* (2007) em matrizes de quitosana e carragena, provavelmente pela alta solubilidade do fármaco no meio de liberação (5,15 g/L de acordo com Kincl *et al.*, 2004) e também pelo rápido intumescimento da matriz. Fu *et al.* (2011) também observaram uma rápida liberação de diclofenaco de potássio em matrizes de celulose microcristalina e povidone K30 (excipiente da indústria farmacêutica), atingindo o platô em 15 min. Porém, observou-se que durante a imersão em água que a liberação foi baixa (menos de 10% do fármaco foi liberado) mesmo o diclofenaco de sódio apresentado uma maior solubilidade em água (14,18 g/L) que em PBS (Kincl *et al.*, 2004).

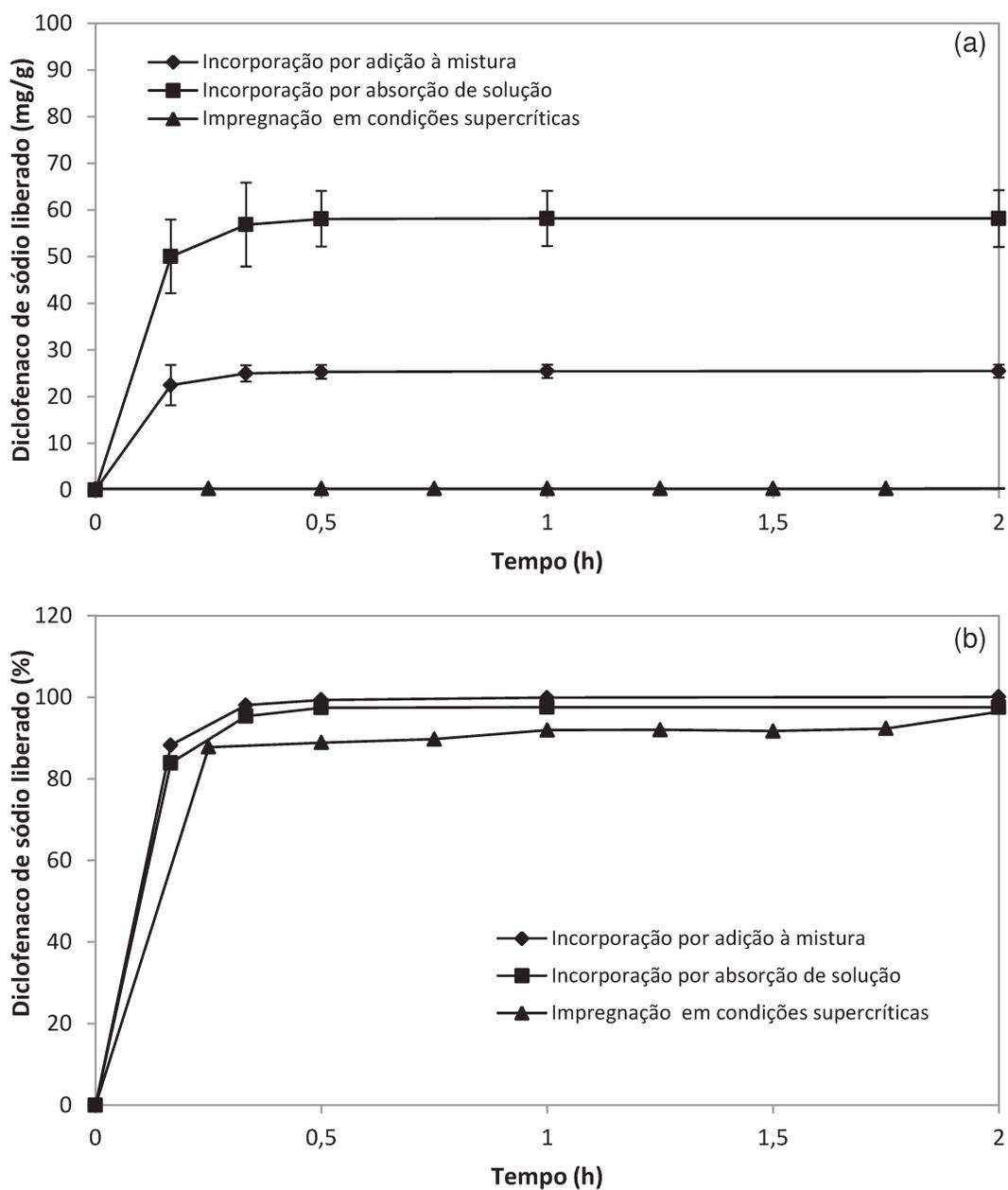


Figura 4.22: Liberação de diclofenaco de sódio incorporado pelas três metodologias nas membranas de quitosana-pectina em termos de (a) mg de fármaco/g de membrana e de (b) porcentagem: (♦) Incorporação por adição de 55,56 mg à mistura, (■) Incorporação por absorção de solução de 2,1 mg/mL e (▲) Impregnação em condições supercríticas.

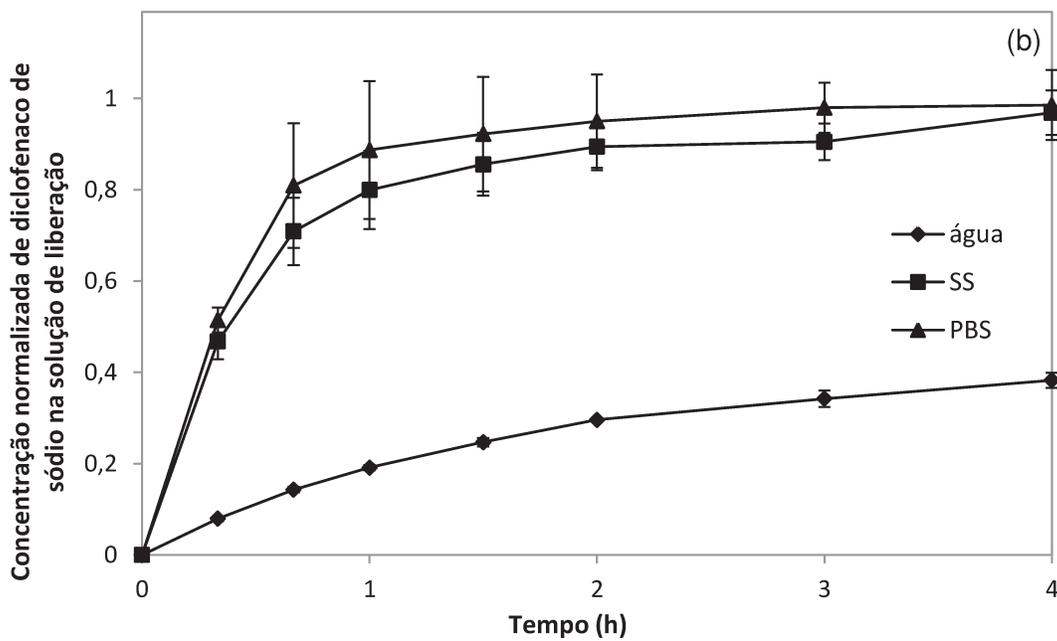
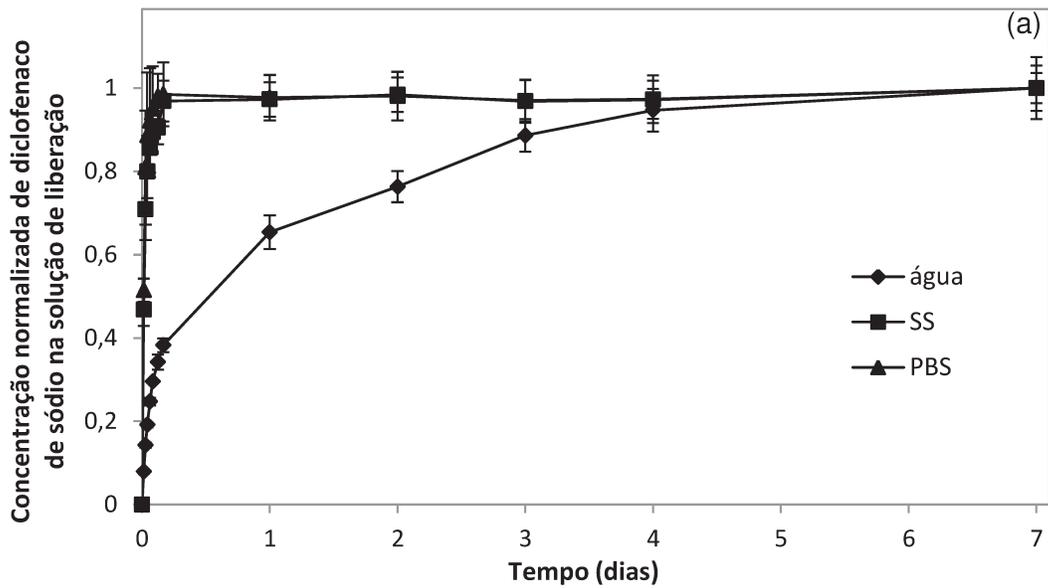


Figura 4.23: Comportamento observado para o perfil de liberação das membranas de quitosana-xantana preparadas na presença de 55 mg de diclofenaco de sódio por grama de membrana em diferentes soluções de liberação (a) em sete dias e (b) nas primeiras quatro horas: (■) água, (◆) solução salina 0,9% e (▲) tampão fosfato salino.

Frente a isto, testaram-se diferentes meios de liberação para verificar a influência de cada um na liberação (Figura 4.23). Os meios que continham íons em solução (solução salina 0,9% e tampão fosfato salino) apresentaram liberação total do fármaco já na primeira hora, enquanto que em água deionizada teve-se uma liberação lenta e parcial. Isto é atribuído à interação iônica do fármaco, que está em sua forma salina, com as cargas contidas na membrana. Na presença dos íons contidos nas soluções, há uma competição pelas cargas da estrutura da membrana que resulta na rápida liberação do diclofenaco de sódio. Wang *et al.* (2009) estudaram o efeito do pH do meio na liberação de diclofenaco empregando esferas de quitosana, PAA e alginato e verificaram que em tampão fosfato pH 7,4 a taxa de liberação é maior do que em pH 6,8 e pH 2,1. Os autores associam esta diferença à presença de PO_4^{3-} em pH 7,4, íon este capaz de reagir com o Na^+ do diclofenaco de sódio, acelerando a liberação. Não foram observadas diferenças significativas nos formatos das cinéticas de liberação em PBS de amostras obtidas por diferentes metodologias de incorporação.

4.2.2. Incorporação de piroxicam nas membranas

Ensaio preliminares apontaram que o piroxicam é insolúvel em água e solúvel em etanol na concentração máxima de 1,2 g/L, o que possibilita sua incorporação por absorção em solução utilizando este solvente. Para adicioná-lo à mistura polimérica optou-se por utiliza-lo em pó devido à baixa solubilidade. Os dados referentes à curva analítica deste fármaco encontram-se no Anexo 3.

4.2.2.1. Adição do fármaco à mistura polimérica

A incorporação por adição do piroxicam na mistura polimérica deu-se em pó, não sendo necessária sua solubilização em etanol, visto que este fármaco não causa danos às vias respiratórias como o diclofenaco. Utilizou-se 20 ou 50 mg de piroxicam para cada membrana, com a intenção de se atingir 5 mg/g de membrana, concentração esta utilizada nos géis de aplicação tópica deste fármaco. Após a etapa de incorporação

estimou-se a quantidade de fármaco remanescente na matriz após a secagem e lavagem da membrana por extração do mesmo com PBS. Na Tabela 4.11 estão apresentados os dados obtidos e que possibilitam o cálculo da eficiência do processo e nas Figuras 4.24 a 4.26, o aspecto das membranas avaliadas por MEV. Pode-se observar que a membrana de quitosana e xantana e a de quitosana e pectina apresentaram alta eficiência de incorporação, acima de 80%, e pelas imagens que o fármaco está em sua forma cúbica, não havendo modificação no arranjo estrutural do piroxicam em relação ao estado anterior à incorporação. É possível observar nas Figuras 4.24 e 4.25 a presença do piroxicam na superfície e mesmo no interior das membranas, chegando a formar concavidades na superfície das mesmas. O mesmo não ocorreu para a membrana contendo guar, que teve eficiência de incorporação menor que 4%, provavelmente devido à alta perda de fármaco durante a neutralização e lavagem, conforme observado na Tabela 4.11. Joseph *et al.* (2002) relatam que a solubilidade do piroxicam aumenta significativamente em valores de pH maiores que o pK_a do fármaco (6,3), condições esta atingida na etapa de neutralização da membrana QG. O mesmo foi observado para a incorporação de diclofenaco de sódio, indicando que este é provavelmente um fator atribuível ao processamento da membrana e não ao tipo de fármaco utilizado.

Tabela 4.11: Dados obtidos para a incorporação de piroxicam por adição na mistura polimérica das membranas quitosana-pectina e quitosana-guar.

Membrana	Fármaco adicionado (mg/g)	Perda durante a lavagem (%)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	22,22	4,71 ± 0,30	19,27 ± 1,26	86,72
Xantana	55,56	2,15 ± 0,03	47,42 ± 4,86	85,36
Quitosana	11,11*	5,80 ± 0,15	9,48 ± 1,04	88,37
Pectina	27,78*	1,65 ± 0,22	22,58 ± 1,19	81,29
Quitosana	22,22	50,18 ± 0,05	0,69 ± 0,20	3,12
Guar	55,56	46,50 ± 2,23	1,42 ± 0,13	2,53

*A membrana de quitosana e pectina possui o duas vezes mais massa polimérica que as outras membranas, diminuindo a razão fármaco/membrana adicionada.

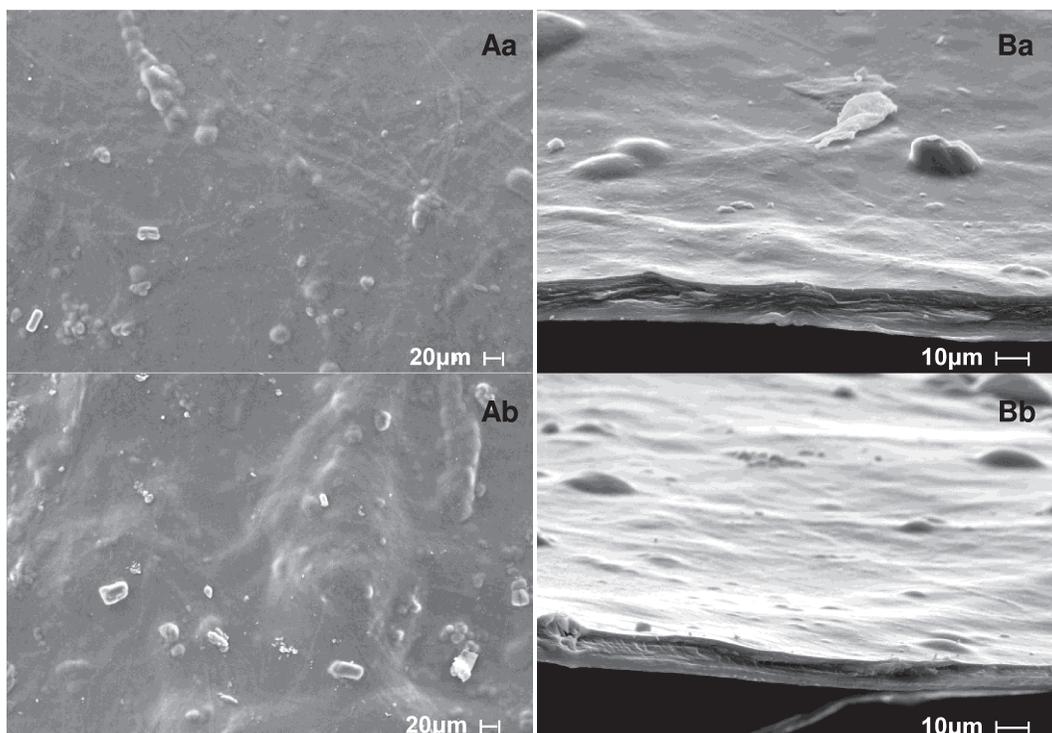


Figura 4.24: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-xantana preparadas na presença de (a) 22 mg/g e (b) 55 mg/g de piroxicam.

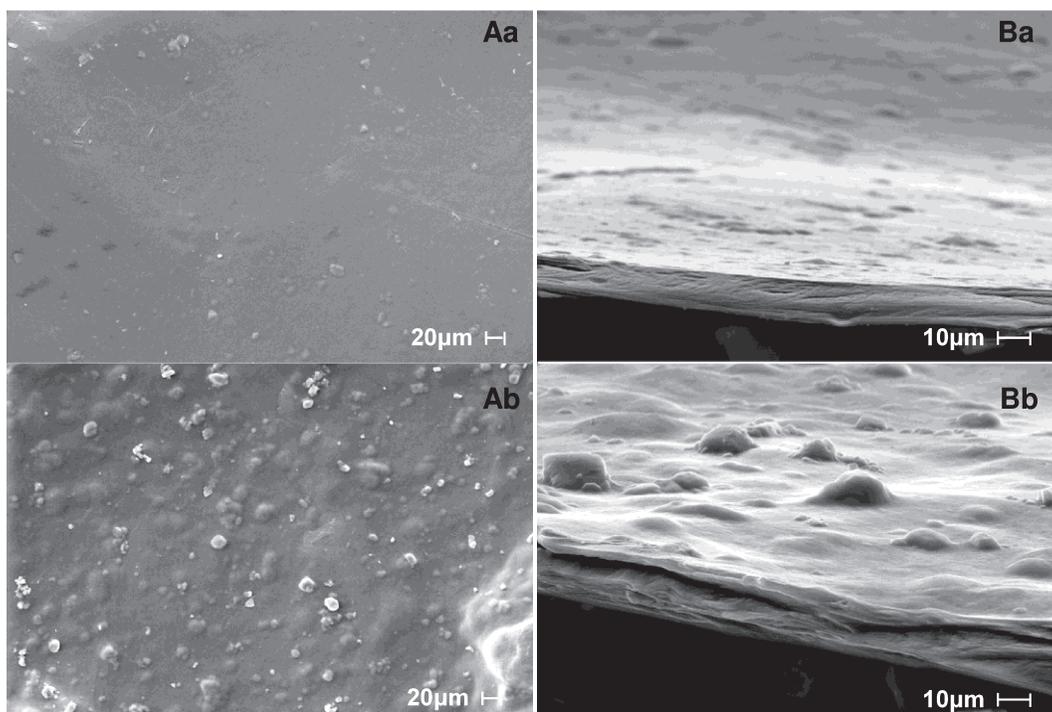


Figura 4.25: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-pectina preparadas na presença de (a) 11 mg/g e (b) 27 mg/g de piroxicam.

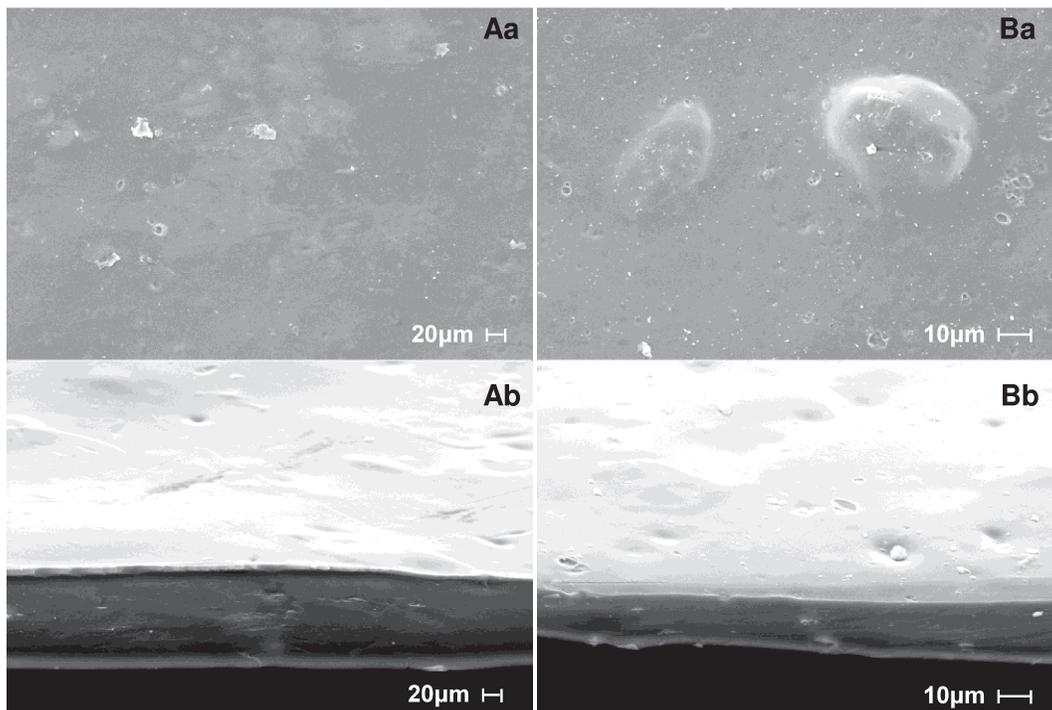


Figura 4.26: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-guar preparadas na presença de (a) 22 mg/g e (b) 55 mg/g de piroxicam.

4.2.2.2. *Incorporação por absorção do fármaco em solução*

A incorporação por absorção ocorreu pelo contato da membrana com uma solução de piroxicam em etanol. Na Tabela 4.12 estão apresentados os dados resultantes da análise de eficiência do processo de incorporação através da extração do piroxicam em PBS e na Figura 4.27 estão apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura das membranas expostas à solução de piroxicam.

Observa-se na Tabela 4.12 que todas as membranas testadas apresentaram baixa retenção de fármaco, não ultrapassando 2,3 mg/g, e baixa eficiência de incorporação, menor que 1%. Isto se deve, provavelmente, do uso de etanol como solvente para o fármaco. Sabe-se que, em água, a capacidade de absorção de fluido

pelas cadeias poliméricas é maior, resultando em uma absorção maior também de fármaco, como observado para o diclofenaco. Porém, ao se utilizar etanol, solvente pelo qual a membrana não tem afinidade, a absorção deste e conseqüentemente do piroxicam é menor, resultando em baixa incorporação. De acordo com Yan *et al.* (2000) na presença de um solvente orgânico de baixa polaridade polímeros como a quitosana assumem uma conformação menos estendida, o que pode prejudicar a incorporação de piroxicam. Resultado oposto do encontrado com a água, em que as cadeias se tornam mais estendidas e flexíveis, possibilitando a penetração do fármaco no seu interior e sua posterior retenção durante a secagem.

Tabela 4.12: Dados obtidos para a incorporação de piroxicam por absorção de solução etanólica pelas membranas.

Membrana	Concentração inicial de fármaco no solvente (mg/mL)	Fármaco adicionado (mg/g)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana xantana	1,2	292,68	1,89 ± 0,21	0,65
Quitosana Pectina	1,2	185,71	2,25 ± 0,10	1,21
Quitosana Guar	1,2	297,77	0,98 ± 0,16	0,33

Observa-se na Figura 4.27 que as membranas apresentam agregados em sua superfície, sugerindo a presença de piroxicam depositado, porém em quantidade muito reduzida em comparação com o diclofenaco de sódio. No entanto, não é possível observar claramente esses depósitos na secção transversal, não podendo-se afirmar que houve incorporação do mesmo no interior através da análise das microscopias.

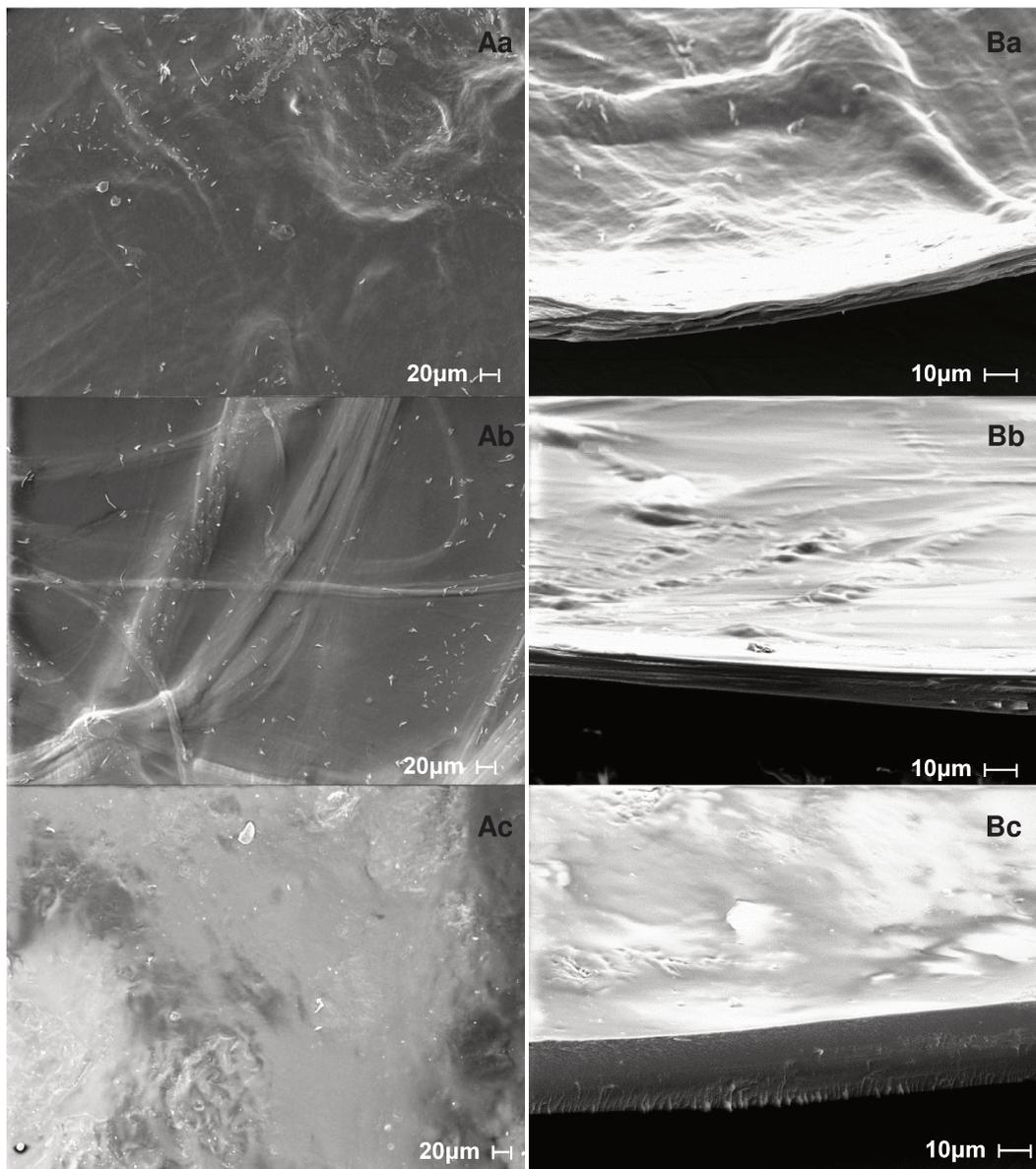


Figura 4.27: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas expostas à solução de piroxicam a 1,2 mg/mL: (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar.

4.2.2.3. Impregnação com CO₂ supercrítico

Para o estabelecimento da melhor condição de impregnação de piroxicam em membranas de quitosana-xantana por tecnologia supercrítica foi utilizado um planejamento experimental linear com três variáveis ($2^3 + 3$ pontos centrais, totalizando 11 ensaios), sendo elas o tempo de contato do fluido supercrítico, a temperatura e a pressão de operação. Este planejamento visou auxiliar na compreensão do efeito de cada variável no sistema de impregnação. Na Tabela 4.13 estão apresentados o planejamento e os resultados da incorporação nos diferentes níveis testados.

Utilizando estas condições de temperatura e pressão, foi possível obter diferentes valores de densidade do dióxido de carbono supercrítico, variando de 0,70 a 0,91 g/cm³ (150 bar a 50 °C e 300 bar a 40 °C, respectivamente). Desta forma, a densidade variável do meio afeta a solubilidade do piroxicam, que nestas condições pode ter atingido de 5,41 até 29,2 mg/mol de CO₂ (Macnaughton *et al.*, 1996).

Tabela 4.13: Condições e resultados do planejamento experimental de incorporação de piroxicam em membranas de quitosana-xantana.

Experimento	Tempo (h)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Incorporação (mg/g)
1	4	150	40	0,24
2	4	150	50	0,77
3	4	300	40	0,34
4	4	300	50	0,90
5	14	150	40	0,54
6	14	150	50	0,61
7	14	300	40	1,06
8	14	300	50	0,43
9	9	225	45	0,30
10	9	225	45	0,25
11	9	225	45	0,33

Com os resultados obtidos nos experimentos foi possível fazer uma análise estatística através do programa Statistica 7.0 e determinar matematicamente a influência das variáveis estudadas pelo diagrama de Pareto, com nível de confiança de 95% (Figura 4.28). Analisando-se esta Figura, observa-se que as variáveis pressão e temperatura tiveram um efeito positivo na incorporação do fármaco, resultante da maior densidade do meio e consequente maior solubilidade do piroxicam. Porém o efeito cruzado entre as variáveis temperatura x tempo e temperatura x pressão também foram significativos e maiores que os efeitos puros. Este comportamento é bastante incomum e aponta que o efeito da temperatura pode diferir com a passagem do tempo, o que está diretamente ligado com a taxa de intumescimento e de transferência de massa no material. Também depende da temperatura a densidade do fluido supercrítico, que está relacionada também com a pressão, justificando o segundo efeito cruzado significativo.

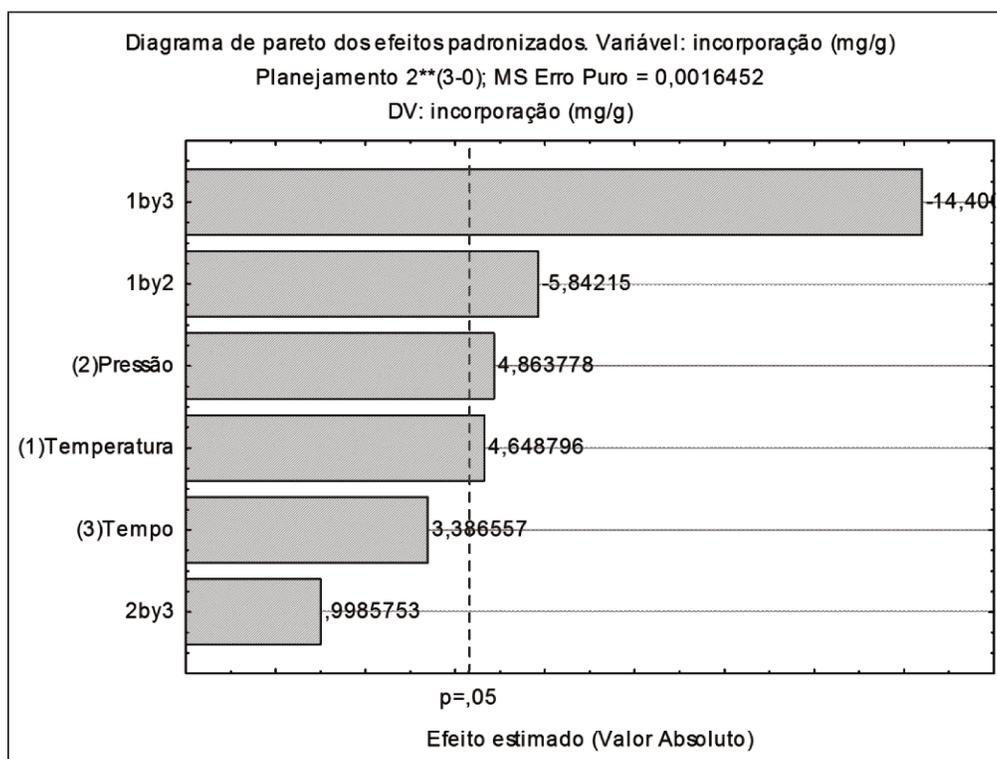


Figura 4.28: Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de piroxicam em membranas de quitosana e xantana.

O melhor resultado deste conjunto de dados foi o obtido no ensaio 7, realizado a 300 bar e 40 °C por 14 h, atingindo 1,05 mg de piroxicam incorporado para cada grama de membrana. Este resultado ainda está abaixo do desejável para este fármaco, visto que os medicamentos formulados a partir deste para uso tópico apresentam 5 mg/g de gel. Com isto, resolveu-se testar o etanol como cossolvente, já que o piroxicam também é solúvel neste solvente.

Nos experimentos cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.14 foram adicionados 5% de etanol (fração molar) em relação ao CO₂ presente na célula de pressão considerando as condições de cada ensaio. O uso do etanol, adicionado na célula anteriormente ao CO₂, tem como função aumentar a solubilidade do piroxicam no meio supercrítico, mas pode contrair as cadeias poliméricas, dificultando a entrada das moléculas de fármaco.

Tabela 4.14: Condições e resultados do planejamento experimental de incorporação de piroxicam em membranas de quitosana-xantana utilizando etanol como cossolvente.

Experimento	Tempo (h)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Incorporação (mg/g)
1	4	150	40	0,18
2	4	150	50	0,67
3	4	300	40	4,84
4	4	300	50	2,87
5	14	150	40	0,19
6	14	150	50	0,50
7	14	300	40	5,81
8	14	300	50	4,68
9	9	225	45	0,59
10	9	225	45	0,68
11	9	225	45	1,11

Comparando os resultados obtidos com os dos ensaios sem a presença de etanol (Figura 4.29), observa-se que houve um aumento de mais de cinco vezes na incorporação quando utilizada a pressão de 300 bar. Este aumento está relacionado com a maior capacidade de solubilização do fármaco no fluido em alta pressão causado pelo

aumento na polaridade da fase móvel, possibilitando um aumento da quantidade de fármaco transportado até o interior da membrana. Além disso, o fluido supercrítico é capaz de aumentar o volume livre e a mobilidade das cadeias poliméricas, facilitando o processo de difusão do fármaco nos filmes de policaprolactona (Natu *et al.*, 2008), e possivelmente tal efeito suplantou a contração das cadeias pela adição do etanol. Na Figura 4.30 estão apresentadas as micrografias do experimento 7 na ausência ou presença de etanol. Observa-se a formação de agulhas de piroxicam, umas das conformações deste fármaco, que anteriormente à impregnação se encontra na forma cúbica. O mesmo comportamento foi observado por Bancheiro *et al.* (2009), também utilizando pressão de 300 bar, porém somente em temperaturas acima de 80°C.

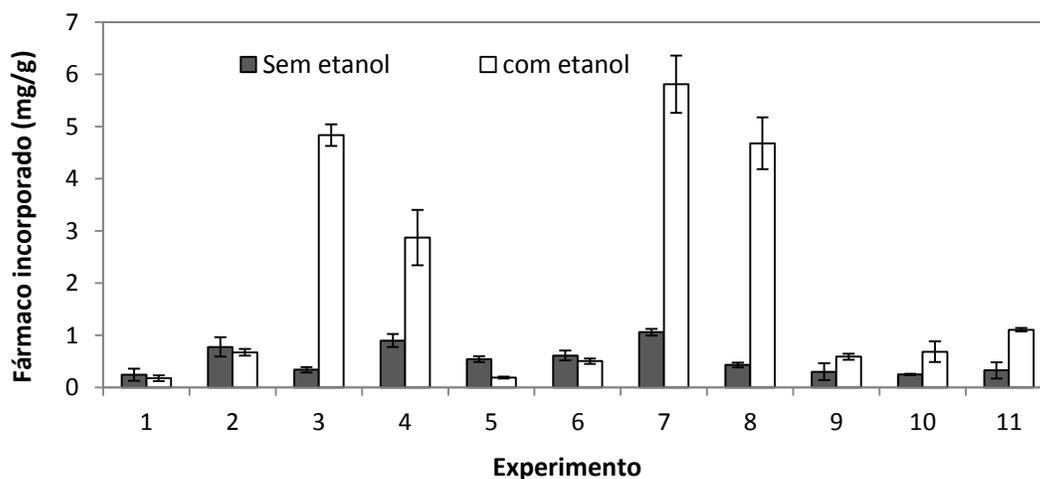


Figura 4.29: Comparação da incorporação de piroxicam por tecnologia supercrítica nos experimentos com membranas de quitosana e xantana utilizando ou não etanol como cossolvente.

O mesmo não ocorreu nas condições de menor pressão (150 bar), nestes casos, a presença do cossolvente ocasionou uma ligeira diminuição na incorporação. Isto sugere que nestas condições o efeito da contração das cadeias poliméricas seja predominante em relação ao aumento da solubilidade do fármaco ou mesmo que não haja aumento da solubilidade nesta pressão.

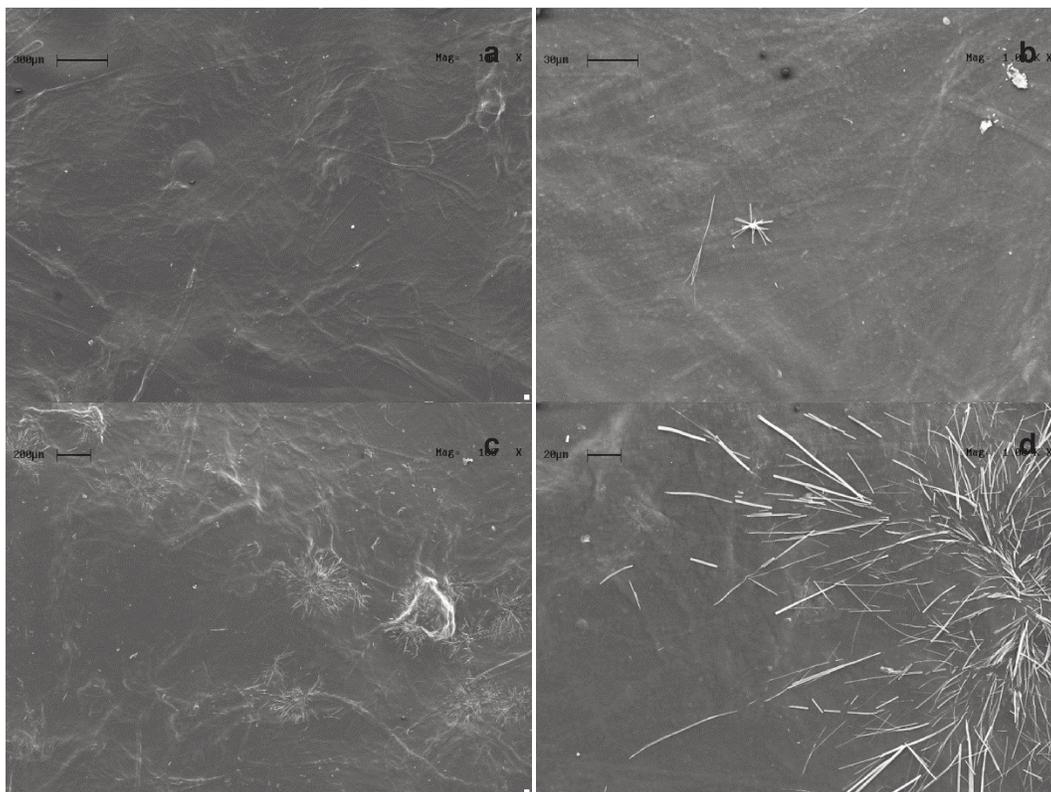


Figura 4.30: Superfície das membranas de quitosana-xantana expostas à impregnação de piroxicam com CO₂ supercrítico: (a, b) sem a adição de cossolvente e (c, d) com etanol como cossolvente.

Analisando o diagrama de Pareto para este conjunto de dados, apresentado na Figura 4.31, verificou-se que a pressão foi a única variável que teve efeito significativo no sistema, sendo este positivo. Isto ocorre, pois há um aumento considerável na solubilidade do fármaco com a pressão, facilitando a impregnação. A interação entre a temperatura e a pressão também foi significativa, porém com um efeito negativo devido à contribuição inversa da temperatura na incorporação do fármaco. Este comportamento ocorre porque o piroxicam não atingiu sua pressão de cruzamento, ou seja, a pressão em que há intersecção das isothermas de solubilidade, como pode ser observado na Figura 4.32 (Foster *et al.* 1991). Abaixo da pressão de cruzamento a solubilidade diminui com o aumento da temperatura e acima deste valor ocorre o inverso (Macnaughton *et al.*, 1996). Observa-se que neste caso não houve o aparecimento significativo do efeito cruzado temperatura x tempo, sugerindo que a adição do cossolvente contribuiu para a

solubilização do fármaco e, conseqüentemente, para o efeito da pressão ser significativo, se sobressaindo dentre as demais variáveis.

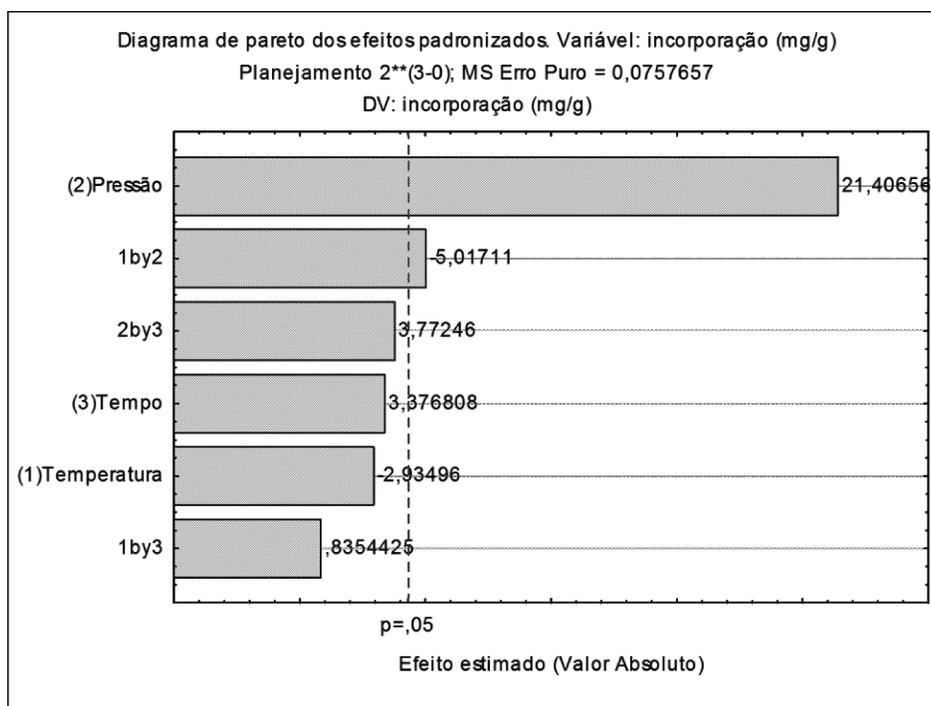


Figura 4.31: Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de piroxicam em membranas de quitosana e xantana utilizando etanol como cossolvente.

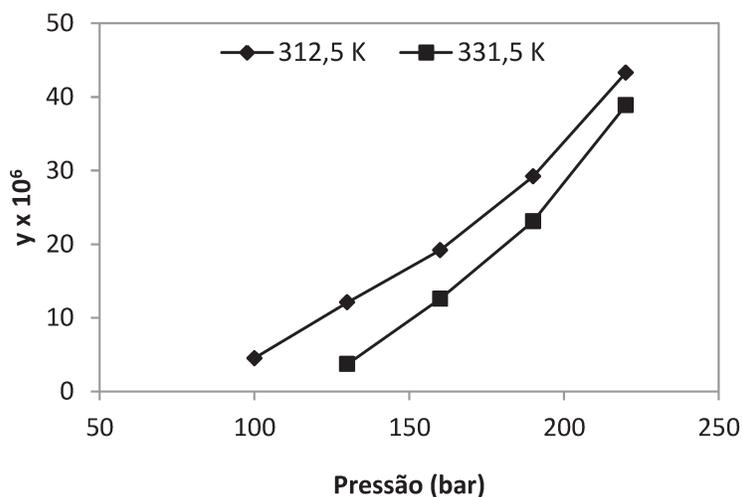


Figura 4.32: Solubilidade em fração molar de piroxicam em função da pressão de dióxido de carbono supercrítico (adaptado de Macnaughton *et al.*, 1996).

O mesmo planejamento foi aplicado às membranas QP e QG, mantendo-se a adição de etanol como cossolvente, visto que resultou em melhoria na impregnação de piroxicam para as formulações de quitosana-xantana. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.15 e os efeitos das variáveis obtidos com o tratamento estatístico estão apresentados nas Figuras 4.33 e 4.34.

Tabela 4.15: Condições e resultados do planejamento experimental de incorporação de piroxicam em membranas quitosana-pectina e quitosana-guar utilizando etanol como cossolvente.

Experimento	Tempo (h)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Incorporação em membrana QP (mg/g)	Incorporação em membrana QG (mg/g)
1	4	150	40	0,07	0,08
2	4	150	50	0,27	0,22
3	4	300	40	4,37	1,22
4	4	300	50	1,10	0,50
5	14	150	40	0,32	0,05
6	14	150	50	0,24	0,12
7	14	300	40	4,35	1,26
8	14	300	50	2,03	1,13
9	9	225	45	1,39	0,85
10	9	225	45	0,71	0,63
11	9	225	45	1,34	0,42

Observou-se que para a membrana QP a maior impregnação ocorreu no experimento 3, porém no experimento 7 alcançou-se resultado muito similar. A diferença entre estes dois experimentos foi o tempo de contato das membranas com a mistura ternária CO₂-etanol-piroxicam, maior no experimento 7. O mesmo comportamento em relação à temperatura no planejamento utilizando membrana de quitosana-xantana também foi observado nestes experimentos, mas neste caso o efeito foi significativo, como pode ser verificado na Figura 4.33. O tempo de contato é uma variável importante,

visto que se pretende atingir o equilíbrio do sistema, tanto na solubilização do solvente quanto no intumescimento da matriz polimérica. Neste planejamento e nos anteriores o tempo não foi significativo na incorporação do piroxicam, possivelmente devido ao rápido equilíbrio alcançado pelo sistema, em até 4 h, possibilitando a migração do fármaco da membrana para o fluido supercrítico (CO₂-etanol) devido à maior afinidade. Neste sistema também se verificou que a pressão teve efeito significativo no sistema, além da interação entre esta e a temperatura.

Analisando os efeitos de cada variável para a incorporação de piroxicam nas membranas de quitosana-guar (Figura 4.34), verificou-se que a pressão também apresentou efeito significativo neste sistema. O experimento 7 também foi o que apresentou o melhor resultado, porém menor em comparação com as demais formulações de membranas. Uma hipótese é o intumescimento no fluido supercrítico ser menor nestas membranas (mesmo comportamento observado com soluções aquosas). Também há a possibilidade de interação do fármaco com os grupos carboxila dos demais poliânions, enquanto que a goma guar apresenta apenas hidroxilas.

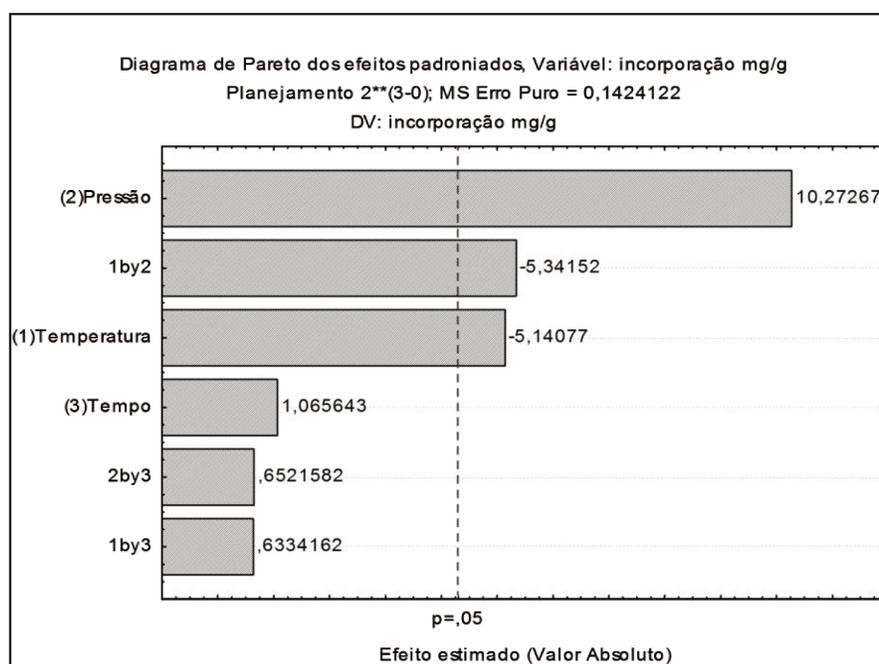


Figura 4.33: Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de piroxicam em membranas de quitosana e pectina utilizando etanol como co-solvente.

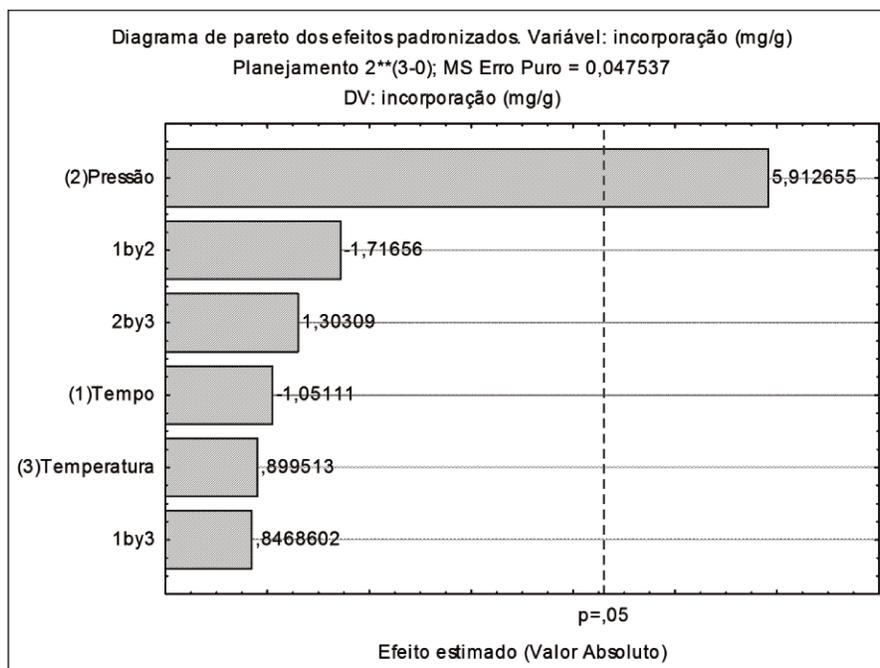


Figura 4.34: Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de piroxicam em membranas de quitosana e goma guar utilizando etanol como cossolvente.

Mesmo na condição em que as maiores razões mássicas fármaco/membrana foram atingidas (experimento 7 para todas as formulações) os experimentos utilizando tecnologia supercrítica apresentaram baixa eficiência de incorporação (Tabela 4.16), resultado do tipo de procedimento utilizado. Nesta metodologia é necessário que o ambiente interno da célula, composto de CO₂ e etanol, esteja saturado com o fármaco, a fim de facilitar a entrada deste na matriz polimérica. Em vista disso, um excesso de fármaco é utilizado no processo, porém o piroxicam remanescente no sistema, que não foi impregnado no polímero, pode ser recuperado e utilizado novamente sem a necessidade de evaporação do solvente (o etanol é arrastado durante a despressurização). Para uma melhor eficiência de incorporação, pode-se utilizar um número maior de amostras, ocupando de forma mais eficaz o espaço livre no reator, mas de forma a não comprometer a agitação do fluido supercrítico.

Tabela 4.16: Dados obtidos para a incorporação de piroxicam por tecnologia supercrítica referentes ao experimento 7 (40°C, 300 bar e 14 h de contato, amostras de 1 x 1 cm²).

Membrana	Fármaco adicionado na célula (mg/g)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana Xantana	442,86	5,8131	1,31
Quitosana Pectina	346,81	4,3533	1,26
Quitosana Guar	293,37	1,2612	0,43

4.2.2.4. Análise da cinética de liberação de piroxicam

A cinética de liberação do fármaco das membranas (Figura 4.35) foi similar à cinética encontrada para o diclofenaco de sódio, em que o fármaco é liberado quase que em sua totalidade na primeira hora de contato. Bazzo *et al.* (2009) também observaram a rápida liberação de piroxicam incorporado em micropartículas de quitosana e poli(3-hidroxi-butirato) e associaram este comportamento à rápida difusão do fármaco pela matriz polimérica e à distribuição preferencial deste na superfície. Foram observadas modificações discretas no formato das curvas de liberação de membranas, principalmente na incorporação por adição na mistura. Neste caso, a liberação ocorreu um pouco mais lentamente e de forma mais contínua do que nas outras metodologias, provavelmente devido à forma de dispersão de fármaco no interior da matriz. Observa-se também que a micronização do fármaco em sua forma agulha na impregnação supercrítica favorece a liberação mais lenta do que no caso da metodologia de absorção, em que o piroxicam encontra-se na superfície na forma cúbica.

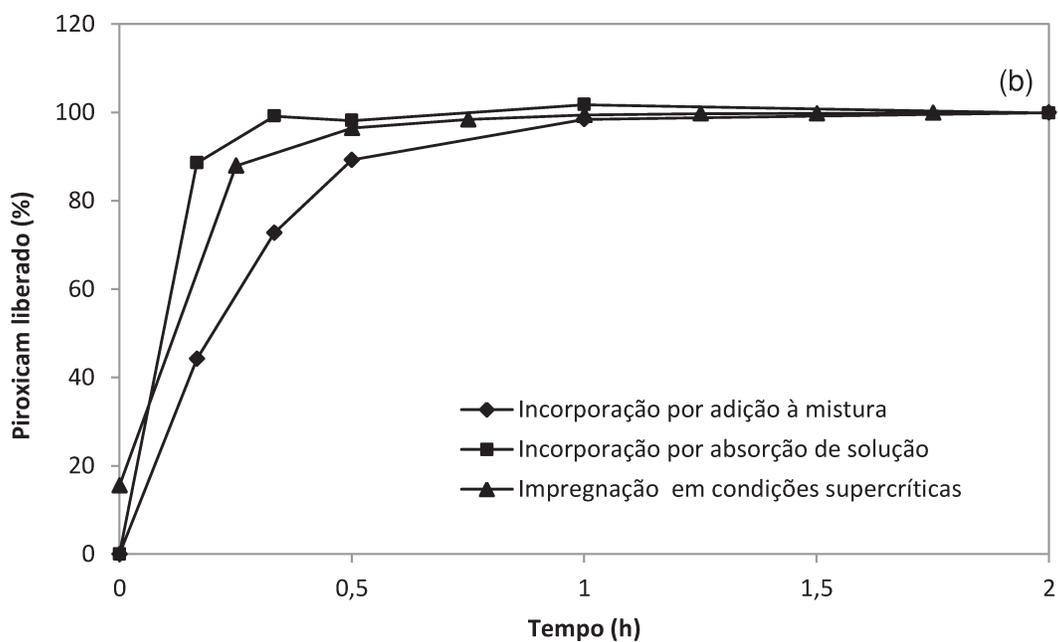
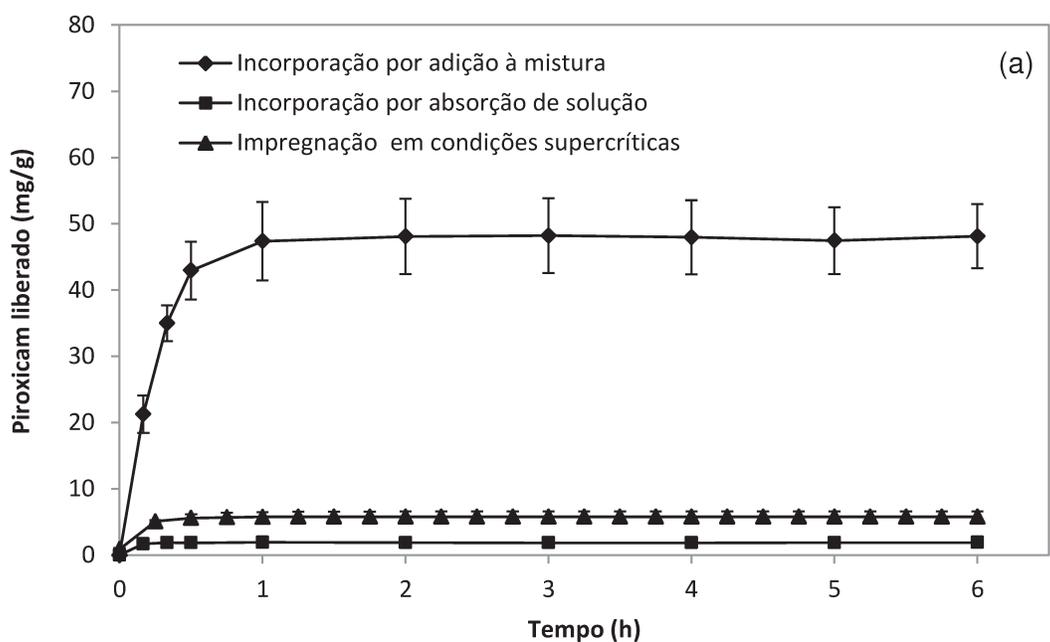


Figura 4.35: Liberação de piroxicam incorporado pelas três metodologias nas membranas quitosana-xantana em termos de (a) mg de fármaco/g de membrana e de (b) percentagem: (◆) Incorporação por adição de 55 mg à mistura, (■) Incorporação por absorção de solução de 1,2 mg/mL e (▲) Impregnação em condições supercríticas (experimento 7 com etanol como cossolvente).

4.2.3. Incorporação de cetoprofeno nas membranas

O cetoprofeno, assim como o piroxicam, é insolúvel em água e tanto os estudos de incorporação por adição na mistura polimérica como por absorção em solução foram realizadas com o fármaco solubilizado em etanol. Os dados referentes à curva analítica deste fármaco encontram-se no Anexo 3.

4.2.3.1. Adição do fármaco à mistura polimérica

A incorporação por adição do cetoprofeno foi feita através do uso de uma solução de etanol (10 mL) contendo uma concentração de fármaco já estabelecida a fim de se obter concentrações finais de 11 e 27 mg de fármaco por grama de membrana QP e 22 e 55 mg por grama das membranas QX e QG. Na Tabela 4.17 estão apresentados os resultados obtidos para a eficiência de incorporação do cetoprofeno.

Tabela 4.17: Dados obtidos para a incorporação de cetoprofeno por adição na mistura polimérica das membranas.

Membrana	Fármaco adicionado (mg/g)	Perda durante a lavagem (%)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	22,22	41,63 ± 0,85	10,19 ± 0,60	45,89
Xantana	55,56	52,15 ± 2,52	26,62 ± 1,23	47,90
Quitosana	11,11*	28,51 ± 2,14	7,68 ± 0,49	69,16
Pectina	27,78*	26,39 ± 0,97	20,33 ± 1,87	73,18
Quitosana	22,22	23,13 ± 1,86	0,27 ± 0,03	1,24
Guar	55,56	23,47 ± 1,78	0,69 ± 0,22	1,24

*A membrana de quitosana e pectina possui duas vezes mais massa polimérica que as outras membranas, diminuindo a razão fármaco/membrana adicionada.

Observa-se através dos dados apresentados na Tabela 4.17 que este fármaco apresentou alta liberação durante a lavagem das membranas, não seguindo o comportamento dos fármacos anteriores. Era esperado que cetoprofeno fosse capaz de

interagir com as cadeias de quitosana presentes na membrana devido ao grupo carboxílico de sua estrutura. Entretanto este apresenta pKa igual a 4,5 e, nas condições em que é adicionado à membrana (pH médio da mistura polimérica é igual a 3,8), não apresenta este grupamento ionizado, impedindo qualquer interação com os grupos amina da quitosana. Outro fator que pode ter contribuído para a alta liberação em água é a solubilidade do cetoprofeno neste meio, 0,13 g/L (Khaleel *et al.*, 2011), muito superior à do piroxicam, de 0,02 g/L (Karatas *et al.*, 2005), facilitando assim a solubilização do fármaco. Esta perda de fármaco durante as imersões em água foi mais intensa nas membranas QX do que nas que continham pectina, provavelmente devido à maior relação fármaco/polímero apresentada por estas. Nas membranas QG a eficiência foi muito baixa, neste caso também supostamente relacionada à etapa de neutralização, visto que o cetoprofeno é solúvel neste meio. Nas Figuras 4.36 a 4.38 estão apresentadas as microscopias das membranas preparadas na presença de cetoprofeno. É possível observar o fármaco nestas membranas em concentrações muito menores do que os anteriores provavelmente devido à alta liberação durante a lavagem, em que o fármaco contido nas camadas externas da membrana foi solubilizado, dificultando a visualização.

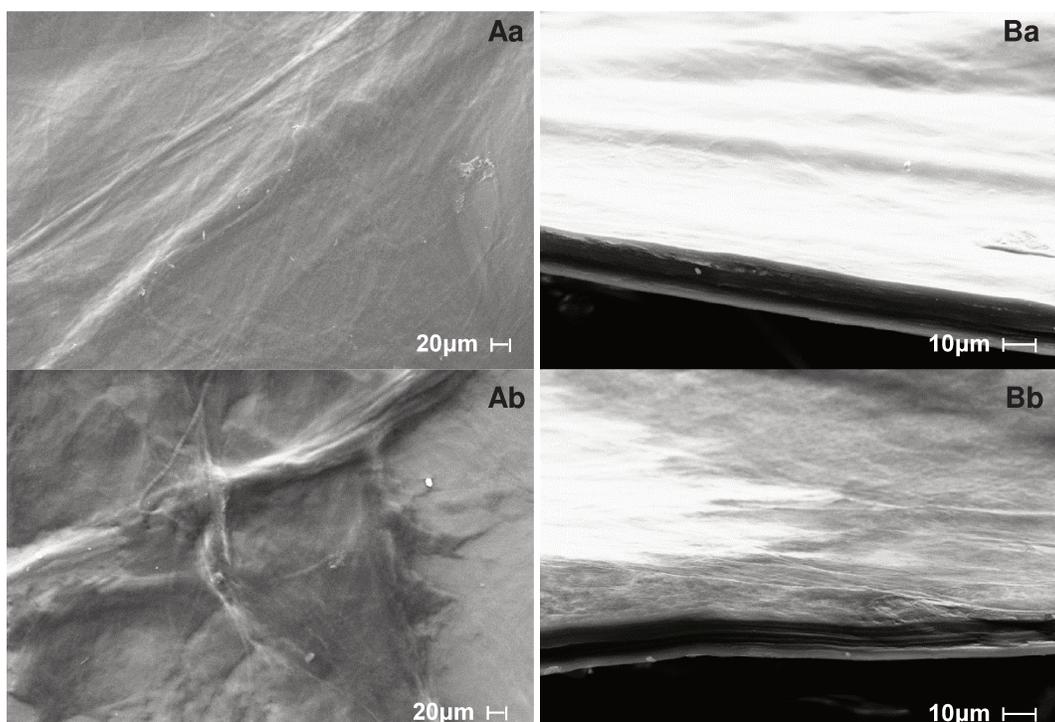


Figura 4.36: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-xantana preparadas na presença de (a) 22 mg/g e (b) 55 mg/g de cetoprofeno.

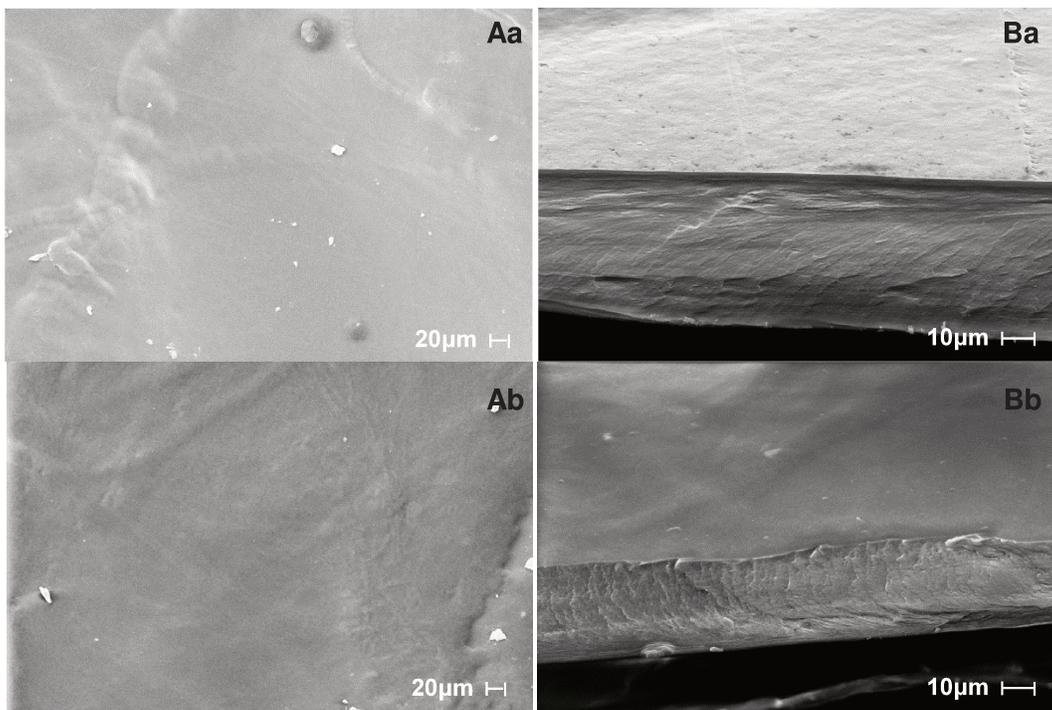


Figura 4.37: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-pectina preparadas na presença de (a) 11 mg/g e (b) 27,7 mg/g de cetoprofeno.

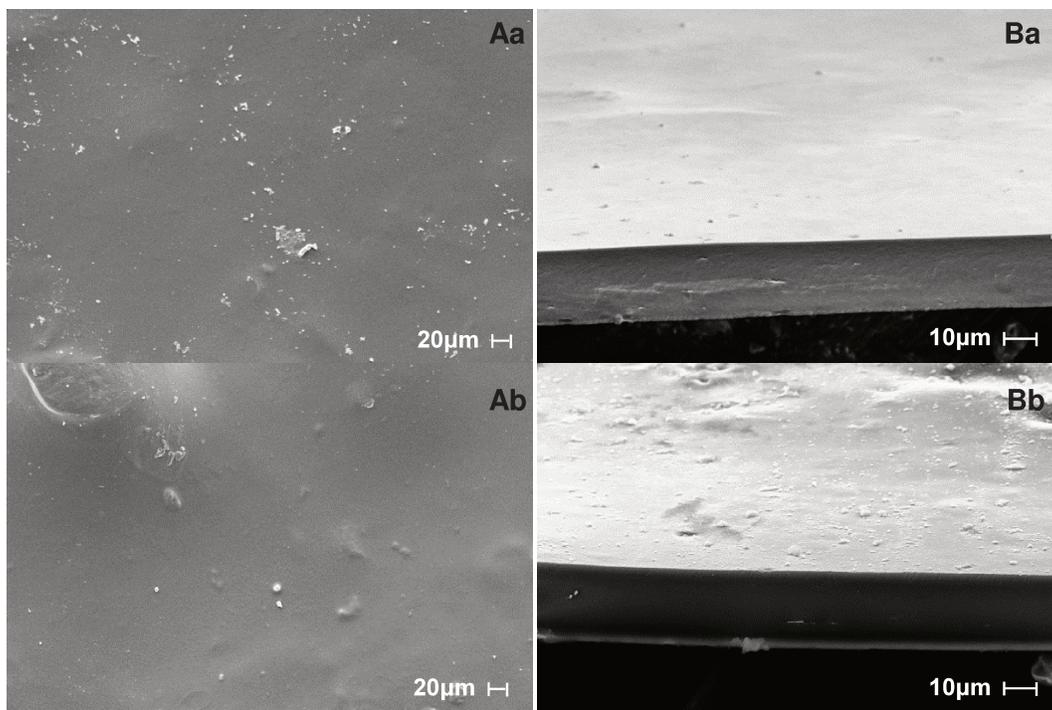


Figura 4.38: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas de quitosana-guar preparadas na presença de (a) 22 mg/g e (b) 55 mg/g de cetoprofeno.

4.2.3.2. Incorporação por absorção do fármaco em solução

A incorporação por absorção ocorreu após a preparação das membranas pelo contato destas com uma solução de cetoprofeno em etanol. Estão sumarizados na Tabela 4.18 os dados resultantes da análise de eficiência do processo de incorporação através da extração de cetoprofeno em PBS e nas Figuras 4.39 a 4.41 estão apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura das membranas expostas à solução de cetoprofeno.

Os dados apresentados na Tabela 4.18 mostram a baixa eficiência de incorporação deste fármaco, mesmo comportamento observado para o piroxicam e relacionado com o uso de etanol como solvente. Nas Figuras 4.39Ab e 4.39Bb é possível observar precipitados na membrana, sugerindo a presença do fármaco na superfície, entretanto nas demais membranas isto não é observado, provavelmente por apresentarem menor concentração de cetoprofeno.

Tabela 4.18: Dados obtidos para a incorporação de cetoprofeno por absorção de solução etanólica pelas membranas.

Membrana	Concentração inicial de fármaco no solvente (mg/mL)	Fármaco adicionado (mg/g)	Fármaco retido na membrana (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
Quitossana	2,0	532,39	2,23 ± 0,27	0,47
xantana	5,0	1232,54	7,70 ± 0,60	0,62
Quitossana	2,0	344,63	2,14 ± 0,79	0,62
Pectina	5,0	638,84	4,85 ± 1,04	0,76
Quitossana	2,0	269,66	1,28 ± 0,26	0,48
Guar	5,0	780,03	3,71 ± 0,64	0,48

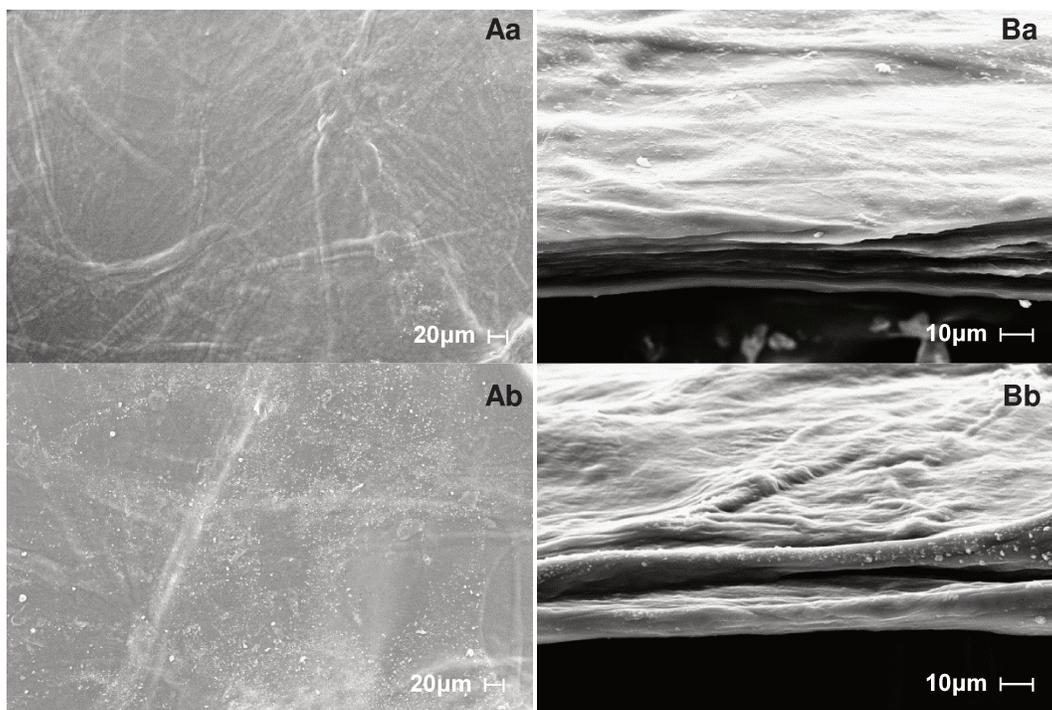


Figura 4.39: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas quitosana-xantana expostas à solução de cetoprofeno: (a) 2 mg/mL e (b) 5mg/mL.

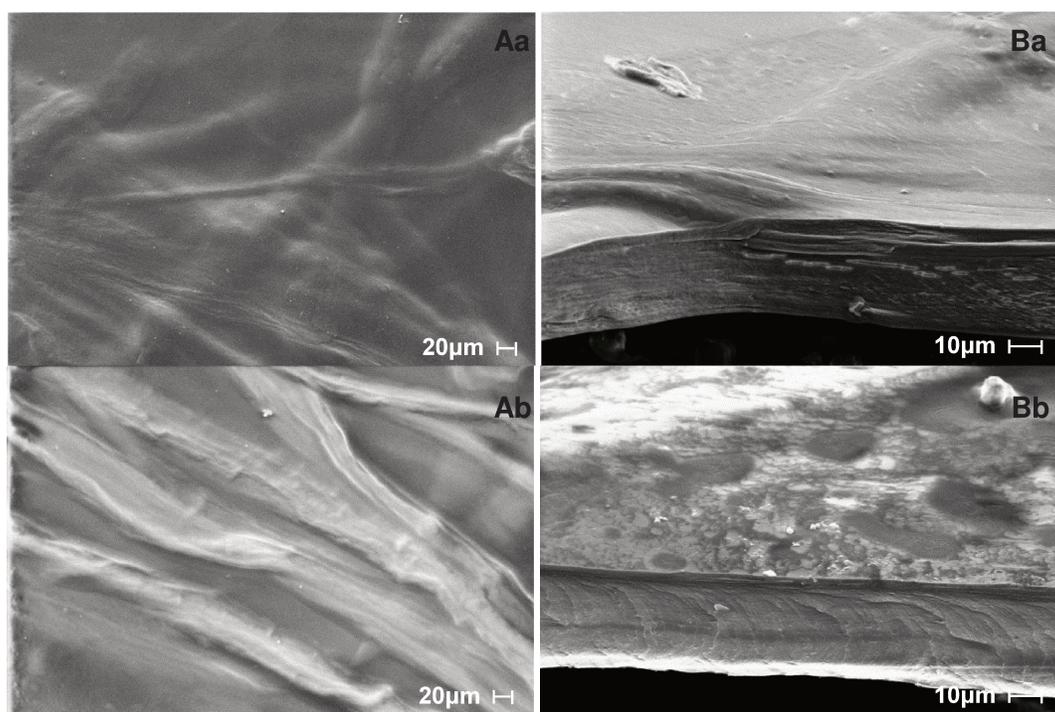


Figura 4.40: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas quitosana-pectina expostas à solução de cetoprofeno: (a) 2 mg/mL e (b) 5mg/mL.

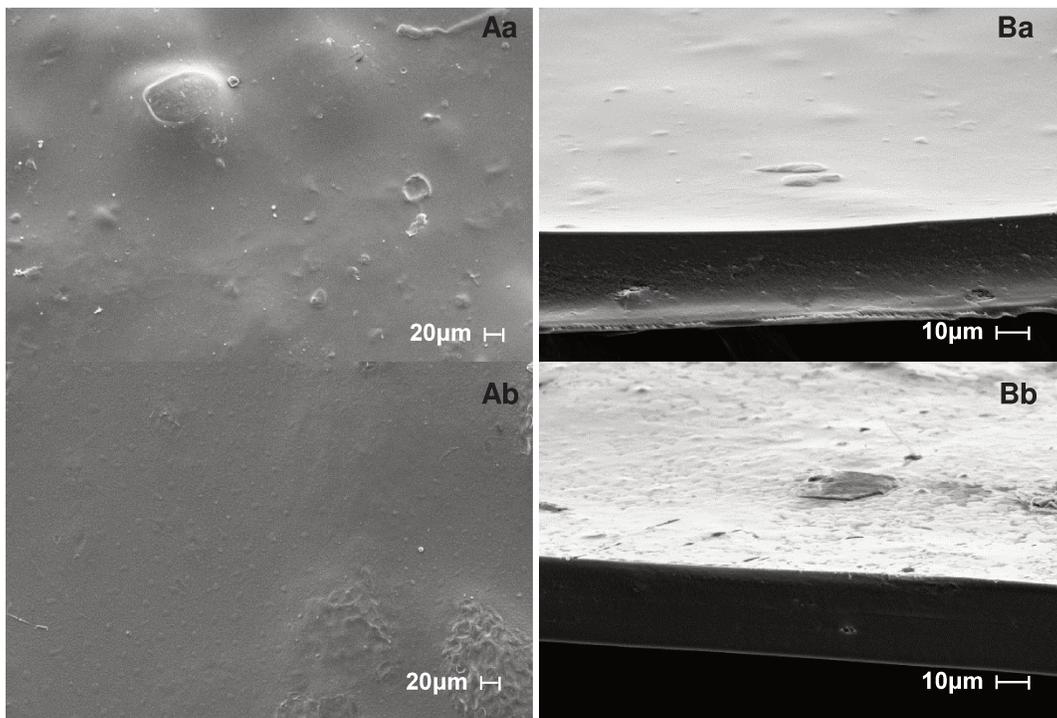


Figura 4.41: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas quitosana-guar expostas à solução de cetoprofeno: (a) 2 mg/mL e (b) 5mg/mL.

4.2.3.3. Impregnação com CO_2 supercrítico

Nos testes iniciais de impregnação com cetoprofeno utilizaram-se as membranas quitosana-xantana testando-se a adição do cossolvente etanol a 5% base molar em relação ao CO_2 conforme utilizado para o fármaco piroxicam. No caso do cetoprofeno não foi verificada uma impregnação satisfatória (0,15 mg de cetoprofeno por grama de membrana nas condições de 40°C e 300 bar), indicando que o cossolvente pode ter arrastado o fármaco durante a descompressão. Para os testes seguintes fez-se um planejamento experimental linear com duas variáveis (2^2), sendo elas a temperatura e a pressão de operação sem cossolvente e com 0,5% molar de etanol. A estratégia de redução da quantidade de cossolvente foi concebida em função da análise de dados preliminares, que mostraram ser possível incorporar uma quantidade maior de fármaco

apenas com o etanol residual nas linhas do equipamento. Os resultados estão apresentados na Figura 4.42.

É possível observar que em todas as condições do planejamento a adição de 0,5% de etanol foi favorável à incorporação do cetoprofeno, quando em comparação com os experimentos realizados na ausência do cossolvente. Provavelmente o etanol contribuiu para a solubilização do cetoprofeno sem causar contração nas cadeias dos polímeros e arraste do fármaco durante a descompressão.

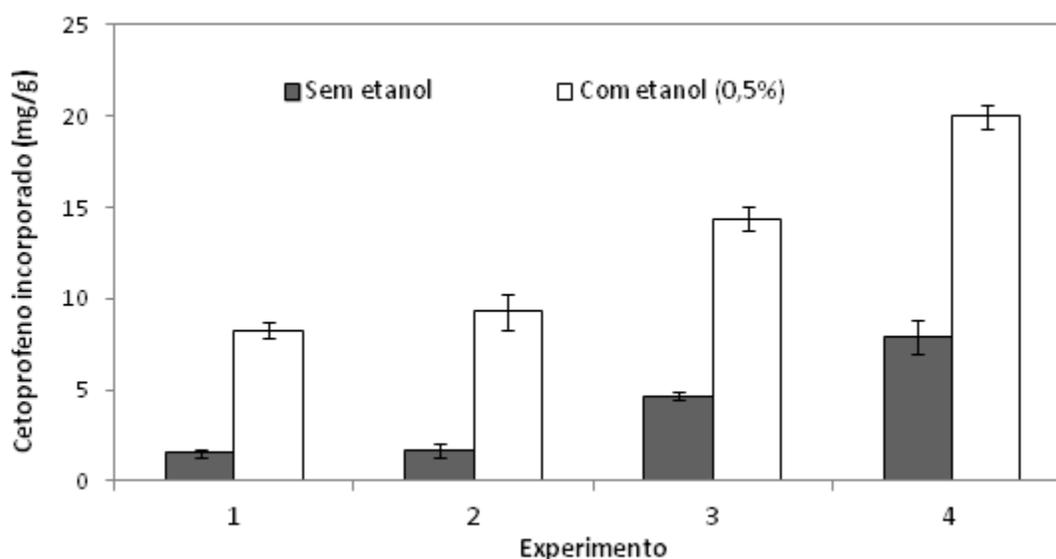


Figura 4.42: Comparação da incorporação de cetoprofeno por impregnação supercrítica nos experimentos com membranas de quitosana-xantana utilizando ou não etanol como cossolvente Experimento: 1 (150 bar e 40°C), 2 (150 bar e 50°C), 3 (300 bar e 40°C) e 4 (300 bar e 50°C).

Na Figura 4.43 estão apresentadas as micrografias do experimento 4 na ausência ou presença de etanol. Observa-se na Figura 4.43Aa um fragmento cristalizado de cetoprofeno precipitado na superfície da membrana, enquanto que na Figura 4.43Ab o mesmo não é visível. Entretanto nota-se a formação de pequenos glóbulos (com diâmetro entre 1 e 10 μm) na superfície das amostras que foram processadas na presença do cossolvente etanol. Tal formação pode estar relacionada com a maior incorporação de

fármaco neste caso (20 mg/g) em comparação com o experimento sem cossolvente (8 mg/g). Os polímeros tendem a intumescer na presença de CO₂ supercrítico e retornar a sua forma original após a lenta despressurização. Porém, com a presença de uma quantidade maior de cetoprofeno no interior da matriz, o retorno dos polímeros a sua forma inicial pode ter sido comprometido.

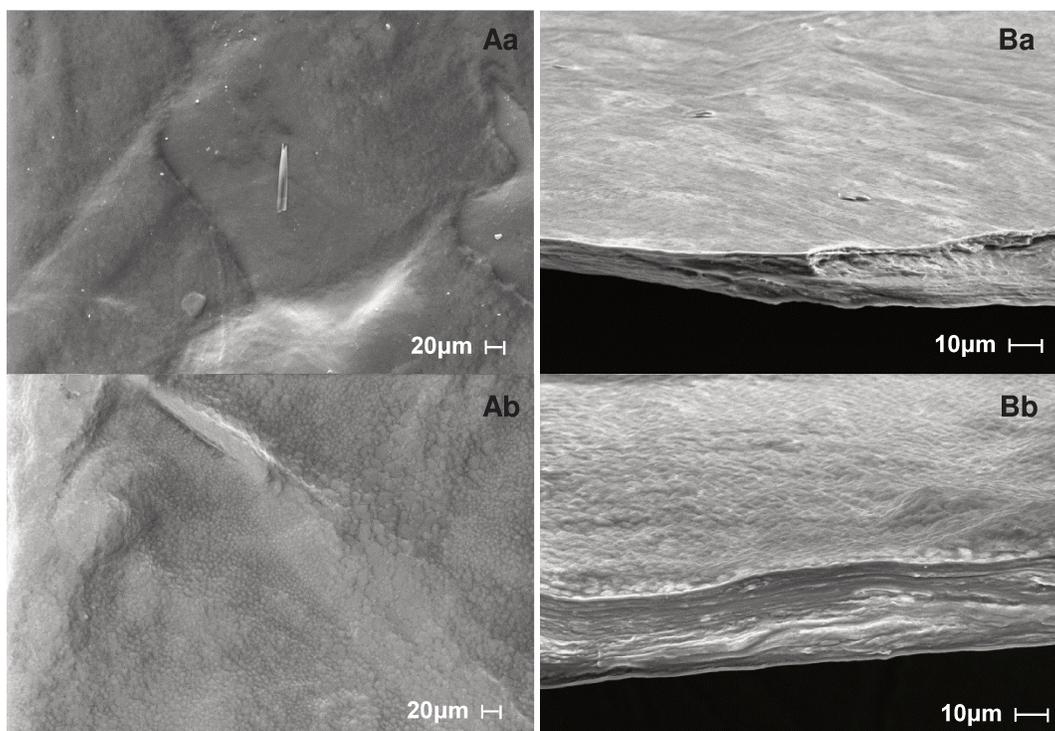


Figura 4.43: Superfície (A) e secção transversal (B) das membranas quitosana-xantana expostas à impregnação de piroxicam com CO₂ supercrítico: (a) sem a adição de cossolvente e (b) com etanol como cossolvente.

Para uma melhor compreensão dos efeitos da pressão e da temperatura na incorporação de cetoprofeno na presença do cossolvente etanol, foram adicionados ao planejamento três pontos centrais, nas condições de 225 bar e 45°C. Na Tabela 4.19 estão apresentados os resultados da incorporação de cetoprofeno e sua eficiência nos diferentes níveis testados para as membranas de quitosana e xantana.

Fez-se uma análise estatística dos resultados obtidos para determinar matematicamente a influência das variáveis estudadas e obter o diagrama de pareto dos

efeitos das condições de operação na incorporação de cetoprofeno (Figura 4.44). Analisando-se esta Figura, observa-se que as variáveis tiveram efeito positivo na incorporação do fármaco. Entretanto apenas a pressão apresentou um efeito significativo no sistema de acordo com o diagrama de Pareto, sendo este três vezes maior que o efeito da temperatura. De acordo com Sabegh *et al.* (2012), ambas as variáveis tem efeito direto e positivo na solubilidade do cetoprofeno em dióxido de carbono supercrítico. Este comportamento está associado à maior densidade do dióxido de carbono quando em maiores pressões, aumentando a capacidade de solvatação no meio e consequentemente, a solubilidade do fármaco. O aumento da temperatura nas faixas estudadas ocasiona diminuição da densidade do fluido supercrítico, entretanto eleva a pressão de vapor havendo assim competição destes dois fatores no efeito da temperatura na modificação da solubilidade do cetoprofeno. Neste caso e nas condições testadas pelos autores, o efeito da temperatura na pressão de vapor é dominante em relação à diminuição da densidade, elevando a solubilidade do cetoprofeno (Sabegh *et al.*, 2012). A eficiência de incorporação não apresentou variação expressiva entre os experimentos (4-5,5%). Cortesi *et al.* (2000) observaram eficiência de incorporação de cetoprofeno em torno de 8% para matrizes de PMMA, aumento este devido a maior capacidade de intumescimento desta matriz frente ao dióxido de carbono supercrítico em comparação com as membranas deste trabalho.

Tabela 4.19: Condições e resultados do planejamento experimental de incorporação de cetoprofeno nas membranas utilizando etanol como co-solvente.

Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Incorporação em membrana QX (mg/g)	Eficiência de incorporação (%)
1	150	40	8,28	5,14
2	150	50	9,27	5,26
3	300	40	14,36	3,98
4	300	50	20,00	5,04
5	225	45	10,60	4,27
6	225	45	10,19	4,08
7	225	45	11,96	4,07

Uma vantagem na utilização desta metodologia é a capacidade de redução da contagem microbiana do material ou mesmo a inativação de vírus patogênicos em decorrência do contato do material com o fluido supercrítico (Perrut, 2012).

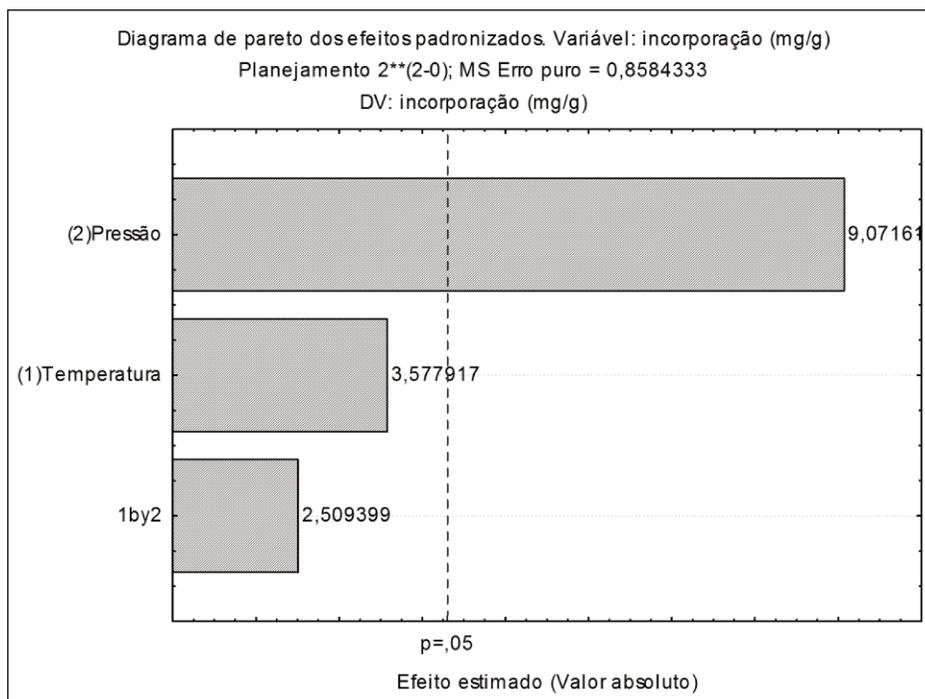


Figura 4.44: Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de cetoprofeno em membranas de quitosana e xantana por impregnação supercrítica.

4.2.3.4. Análise da cinética de liberação de cetoprofeno

A cinética de liberação do fármaco nas membranas (Figura 4.45) foi similar à cinética encontrada para o diclofenaco de sódio e para o piroxicam, em que o fármaco é liberado quase que em sua totalidade na primeira hora de contato. Bazzo *et al.* (2009) também observaram este comportamento em micropartículas de quitosana e poli(3-hidroxi-butirato) e relacionaram com a rápida difusão do fármaco pela matriz polimérica e com a distribuição preferencial deste na superfície. Wang *et al.* (2011) associam a rápida liberação inicial de cetoprofeno em filmes microfibrosos de quitosana à capacidade de

intumescimento do filme no meio de liberação e à pouca interação entre o fármaco hidrofóbico e o polímero hidrofílico. Não foram observadas modificações na cinética de liberação do cetoprofeno quando este foi incorporado por diferentes metodologias.

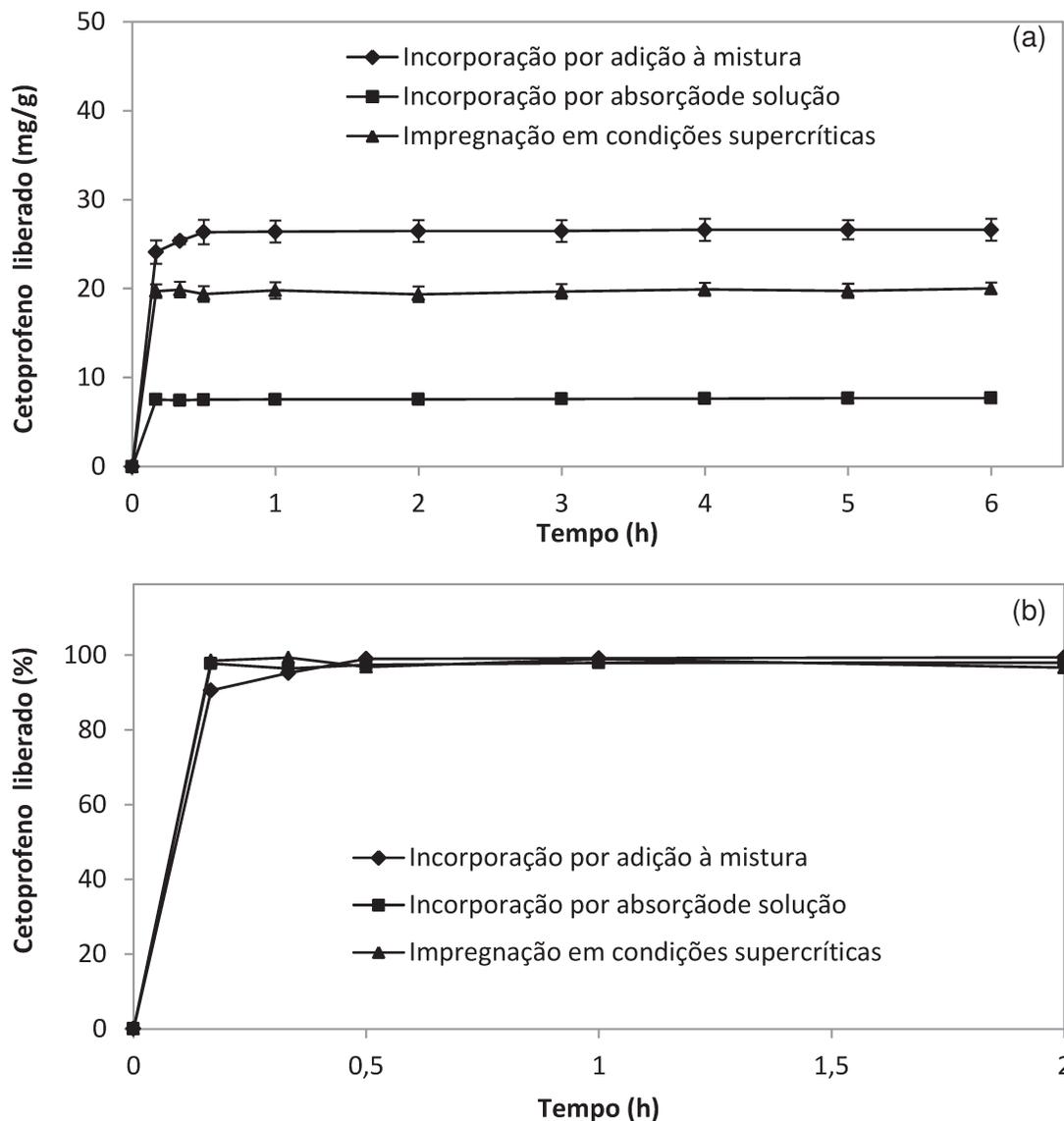


Figura 4.45: Liberação de cetoprofeno incorporado pelas três metodologias nas membranas quitosana-xantana em termos de (a) mg de fármaco/g de membrana e de (b) percentagem: (◆) Incorporação por adição de 55 mg à mistura, (■) Incorporação por absorção de solução de 5 mg/mL e (▲) Impregnação em condições supercríticas (experimento 4 com etanol como co-solvente).

5. CONCLUSÕES

A associação de quitosana com outros polissacarídeos visando a produção de membranas foi alcançada com sucesso, sendo possível a produção de membranas estáveis com xantana, pectina e goma guar. A associação de quitosana com goma arábica não resultou em membranas estáveis, rompendo-se com facilidade quando em contato com água.

Os resultados obtidos para as membranas de quitosana-xantana indicaram que podem ser obtidas membranas com capacidade de absorção de água de até 64 g/g de membrana, com perda de massa máxima (em água) de até 22%, permeabilidade ao vapor em torno de $1,5 \text{ Kg m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, resistência à tração de 6 MPa e alongamento na ruptura em torno de 2,5%. Através dos espectros de FTIR é possível supor que houve interação entre os polímeros e formação de um complexo polieletrólito.

As membranas de pectina apresentaram capacidade de absorção de soluções de até 125 g/g de membrana, com perda de massa máxima (em água) de até 34%, permeabilidade ao vapor em torno de $1,7 \text{ kg m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, resistência à tração de 10 MPa e alongamento na ruptura em torno de 3%. Através da análise dos termogramas verificou-se a complexação da quitosana com a pectina.

Os resultados obtidos para as membranas de quitosana-guar indicaram que membranas com baixa capacidade de absorção de soluções (até 2 g de H_2O por grama de membrana), com perda de massa máxima de até 8% (em fluido corpóreo simulado), permeabilidade ao vapor em torno de $1,2 \text{ kg m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, resistência à tração de 24 MPa e alongamento na ruptura em torno de 3,3% podem ser obtidas.

Todas as formulações de membranas se mostraram biocompatíveis em relação à citotoxicidade e hemocompatibilidade. Estas apresentaram boa capacidade de coagulação de sangue, característica importante para um curativo. As membranas QX e QP foram eficazes como barreira para bactérias e não promoveram seu crescimento.

A incorporação de anti-inflamatórios nas membranas produzidas resultou em comportamentos distintos para cada fármaco frente às diferentes metodologias. O diclofenaco de sódio teve boa eficiência de incorporação por adição em membranas QX e

QP (mais de 90%). Em contrapartida, o diclofenaco de sódio, por se tratar de um fármaco hidrofílico, não apresentou as características necessárias para a incorporação por tecnologia supercrítica. De forma geral, as menores eficiências foram alcançadas com as membranas QG devido a sua densa estrutura polimérica.

A incorporação de piroxicam foi conseguida com sucesso utilizando o processo com fluido supercrítico e os resultados foram promissores, demonstrando que a técnica pode ser utilizada nas membranas biopoliméricas. Todavia, a incorporação por absorção não apresentou resultados satisfatórios (eficiências menores que 1%), possivelmente devido ao caráter hidrofóbico deste fármaco. A incorporação por adição durante a preparação da membrana foi a metodologia com melhores resultados, tanto em relação à eficiência, quanto à quantidade final de fármaco presente nas membranas. Também neste caso não se obteve resultados satisfatórios para a membrana QG em comparação às demais formulações.

O cetoprofeno apresentou resultados para a incorporação semelhantes entre as técnicas de adição à mistura polimérica e impregnação supercrítica (máximos de 27 e 20 mg/g, respectivamente) e desempenho abaixo do esperado quanto incorporado pela metodologia de absorção de solução (máximo de 7 mg/g).

Nas condições testadas, todos os fármacos apresentaram liberação na primeira hora de contato, demonstrando que as membranas produzidas não apresentam capacidade de controle da liberação do agente ativo.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- Avaliar a adição de um agente reticulante na formação de membranas de quitosana e goma arábica para melhorar a estabilidade da mesma em água;
- Misturar mais de dois polissacarídeos entre si a fim de obter propriedades intermediárias, como no caso quitosana-guar-pectina;

- Estudar o uso de um polímero sintético como um dos constituintes da membrana para melhorar suas características mecânicas;
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade das membranas contendo os fármacos testados;
- Estudar o uso de uma técnica de encapsulação dos fármacos em partículas antes de adicioná-los na mistura polimérica com o intuito de retardar sua liberação;
- Estudar diferentes proporções de etanol/CO₂ na impregnação supercrítica a fim de aumentar a quantidade de fármaco impregnado e melhorar a eficiência do processo;
- Estudar o escalonamento do processo de impregnação supercrítica a fim de melhorar o rendimento do processo;
- Realizar ensaios *in vivo* para avaliar o efeito da adição dos anti-inflamatórios nas membranas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 7241-7250, 2005.
2. Ahuja, M.; Dhake, A. S.; Sharma, S. K.; Majumdar, D. K. Topical Ocular Delivery of NSAIDs. *The AAPS Journal*, v. 10(2), p. 229-241, 2008.
3. Alemdaroğlu, C.; Değim, Z.; Celebi, N.; Zor, F.; Öztürk, S.; Erdoğan, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, v. 32, p. 319-327, 2006.
4. American Society for Testing and Materials – ASTM E96-90D: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 2010.
5. American Society for Testing and Materials ASTM D882-02: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2002.
6. American Society for Testing and Materials ASTM F 756-00: Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials, 2000.
7. Andreopoulos, A.G.; Tarantili, P. A. Xanthan gum as a Carrier for controlled release of drugs. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 16, p. 34-46, 2001.
8. Aquino, R.P.; Auriemma, G.; d'Amore, M.; D'Ursi, A.M.; Mencherini, T.; Del Gaudio, P. Piroxicam loaded alginate beads obtained by prilling/microwave tandem technique: Morphology and drug release. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 740–748, 2012.
9. 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.

10. Azad A.K., Sermsintham; N., Chandkrachang, S.; Stevens, W.F. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 69B, p. 216-222, 2004.
11. Banchemo, M.; Manna, L.; Ronchetti, S.; Campanelli, P.; Ferri, A. Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights *Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, p. 271-278, 2009.
12. Bazzo, G. C. Piroxicam e cetoprofeno utilizados como fármacos modelo em micropartículas de PHB e PHB/quitosana: preparação, caracterização e avaliação do perfil de liberação. 2008. 82f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
13. Bazzo G. C., Lemos-Senna E., Pires A. T. N. Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan /ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 839–844, 2009.
14. Bellini, M. Z.; Pires, A. L. R.; Vasconcelos, M. O.; Moraes, Â. 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.
15. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34, 2004(a).
16. 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(b).

17. Bernabé, P.; Peniche, C.; Argüelles-Monal, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linkng. *Polymer Bulletin*, v. 55, p. 367-375, 2005.
18. Bigucci, F.; Luppi, B.; Cerchiara, T.; Sorrenti, M.; Bettinetti, G. Rodriguez, L.; Zecchi, V. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 35, p. 435–441, 2008.
19. 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.
20. Braga, M. E. M.; Pato, M. T. V.; Silva, H. S. R. C.; Ferreira, E. I.; Gil, M. H.; Duarte, C. M. M.; Sousa, H.C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 44, p. 245-257, 2008.
21. Brunner, G. *Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes*, Springer, 1994.
22. Bueno, C. Z.; Moraes, Â. 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.
23. Bush, J.R.; Akgerman, A.; Hall, K.R. Synthesis of controlled release device with supercritical CO₂ and co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, p. 311-316, 2007.
24. Canella, K.M.N.C; Garcia, R. B. Caracterização de Quitosana por Cromatografia de permeação em Gel - Influência do Método de Preparação e do Solvente. *Química Nova*, v. 24(1), p. 13-17, 2001.
25. Chang, K. L. B.; Lin, J. Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p. 163-169, 2000.

26. Chatelet, C., Damour, O.; Domard, A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v. 22, p. 261-268, 2001.
27. Chellat, F.; Tabrizian, M.; Dumitriu, S.; Chornet, E.; Magny, P.; Rivard, C. H.; Yahia, L. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan poluionic complex. *Journal Biomedical Material Research*, v. 51, p. 107-116, 2000.
28. Chu, C. H.; Kumagai, H.; Nakamura K. Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 60, p. 1041-1047, 1996.
29. Cirri, M.; Bragagni, M.; Mennini, N.; Mura P. Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, p. 46–53, 2012.
30. Clasen, C.; Wilhelms, T.; Kulicke, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3210-3222, 2006.
31. Coimbra, P.; Fernandes, D.; Gil, M. H.; Sousa, H. C. Solubility of Diflunisal in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 53, p. 1990-1995, 2008.
32. Coimbra, P.; Ferreira, P.; Sousa, H.C.; Batista, P.; Rodrigues, M.A.; Gil, M.H. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 112–118, 2011.
33. Comyn, J. *Polymer Permeability*, 1st Ed, Elsevier Applied Science, London, 1985.
34. Cortesi, A.; Alessi, P.; Kikic, I.; Kirchmayer, S.; Vecchione, F. Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 61-68, 2000.

35. Costa, V.P.; Braga, M.E.M.; Guerra, J.P.; Duarte, A.R.C.; Duarte, C.M.M.; Leite, E.O.B.; Gil, M.H.; Sousa, H.C. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, p. 306-316, 2010a.
36. Costa, V.P.; Braga, M.E.M.; Duarte, C.M.M.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Gil, M.H.; Sousa, H.C. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 53, p. 165-173, 2010b.
37. Dallan, P. R. M. Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele. 2005. 212f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, outubro de 2005.
38. Dallan, P. R. M.; Moreira, P. L.; Petinari, L.; Malmonge, S. M.; Beppu, M. M.; Genari, S. C.; Moraes, A. M. Effects of Chitosan Solution Concentration and Incorporation of Chitin and Glycerol on Dense Chitosan Membrane Properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80 (2), p. 394-405, 2007.
39. Das, S.; Chaudhury, A.; Ng, K. Y. Preparation and evaluation of zinc–pectin–chitosan composite particles for drug delivery to the colon: Role of chitosan in modifying *in vitro* and *in vivo* drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 406, p. 11–20, 2011.
40. 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.
41. 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.
42. Dhawan, S.; Kaur, J. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.27(4), p.197-216, 2007.

43. 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
44. 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.
45. Duarte, A.R.C.; Simplício, A.L.; Veja-González, A.; Subra-Paternault, P.; Coimbra, P.; Gil, M.H.; Sousa, H.C.; Duarte, C.M.M. Impregnation of an intraocular lens for ophthalmic drug delivery. *Current Drug Delivery*, v. 5, p. 102-107, 2008.
46. Duarte, A.R.C.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal*, v. 45, p. 141-148, 2009.
47. Dumitriu, S. *Polymeric Biomaterials*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
48. Dumitriu, S. *Polysaccharides in medical applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
49. Dumitriu, S.; Chornet, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complex. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 223-246, 1998.
50. Espinosa-Andrews, H.; Báez-González, J. G.; Cruz-Sosa, F.; Vernon-Carter, E. J. Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 1313-1318, 2007.
51. Espinosa-Andrews, H.; Sandoval-Castilla, O.; Vázquez-Torres, H.; Vernon-Carter, E. J.; Lobato-Calleros, C. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 541–546, 2010.

52. Fahmy, H.M.; Fouda, M. M.G. Crosslinking of alginic acid/chitosan matrices using polycarboxylic acids and their utilization for sodium diclofenac release. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 606–611, 2008.
53. Fellah, A.; Anjukandi, P.; Waterland, M. R.; Williams, M. A. K. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 847-853, 2009.
54. Ferreira, P.; Coelho, J.F.J.; Gil, M. H. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 172–181, 2008.
55. Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, Inc. v. 10, 1981.
56. Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, Inc. v. 15, 1986.
57. Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, Inc. v. 19, 1990.
58. Foster, N. R.; Gurdial, G. S.; Yun, J. S. L.; Liang, K. K. L.; Tilly, K. D.; Ting, S. S. T.; Singh, H.; Lee, J. H. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 30, p. 1955-1964, 1991.
59. Fu, J.; Wang, X.; Xu, L.; Meng, J.; Weng, Y.; Li, G.; He, H.; Tang, X. Preparation and in vitro–in vivo evaluation of double layer coated and matrix sustained release pellet formulations of diclofenac potassium. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 406 (1-2), p. 84-90, 2011.
60. 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.

61. Ghaffari, A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K.; Rafiee-Tehrani, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 175–186, 2007.
62. Gong, K.; Darr, J.A.; Rehman, I.U. Supercritical fluid assisted impregnation of indomethacin into chitosan thermosets for controlled release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 315, p. 93-98, 2006.
63. Guo, X.; Han, D.; Xi, H.; Rao, L.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 441-448, 2012.
64. Guney, O.; Akgerman, A. Synthesis of controlled-release products in supercritical medium. *AIChE Journal*, v. 48, p. 856, 2002.
65. Hagesaether, E.; Hiorth, M.; Sande, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 325-331, 2009.
66. Haupt, S.; Zioni, T.; Gati, I.; Kleinstern, J.; Rubinstein, A. Luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 28, p. 204-211, 2006.
67. Hayashi, T., Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science*, v. 19, p.663-702, 1994.
68. Hench, L.L., Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, p. 1419-1423, 1998.
69. Hiorth, M.; Kjøniksen, A. L.; Knudsen, K. D.; Sande, S. A.; Nyström, B. Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1718–1728, 2005.
70. Horn, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica)

- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
71. Howling, G. I.; Dettmar, P. W.; Goddard, P. A.; Hampson, F. C.; Dornish, M.; Wood, E. J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, v. 22, p. 2959-2966, 2001.
 72. Huang, Y.; Lu, J.; Xiao, C. Thermal and mechanical properties of cationic guar gum/poly(acrylic acid) hydrogel membranes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 92, p. 1072-1081, 2007.
 73. Imai, Y.; Nose, Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 6, p. 165–172, 1972.
 74. International Standardization Organization - ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood, 1999.
 75. International Standardization Organization - ISO 10993-5E: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 1992.
 76. Jian, H.; Zhu L.; Zhang, W.; Sun, D.; Jiang, J. Galactomannan (from *Gleditsia sinensis* Lam.) and xanthan gum matrix tablets for controlled delivery of theophylline: In vitro drug release and swelling behavior. *Carbohydrate Polymers*, v. 87(3), p. 2176–2182, 2012.
 77. Joseph, N. J.; Lakshmi, S.; Jayakrishnan A. A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *Journal of Controlled Release*, v. 79, p. 71–79, 2002.
 78. Karataş, A.; Yüksel, N.; Baykara, T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. *Il Farmaco*, v. 60 (9), p. 777-782, 2005.
 79. Katzung, B. G. *Medical Book Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., 2007.

80. Kenawy, E. R.; Abdel-Hay, F. I.; El-Newehy, M. H.; Wnek, G. E. Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Materials Science and Engineering A*, v. 459, p. 390–396, 2007.
81. Khaleel, N.Y.; Abdulrasool, A. A.; Ghareeb, M. M.; Hussain, S. A. Solubility and dissolution improvement of ketoprofen by solid dispersion in polymer and surfactant using solvent evaporation method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3 (4), p. 431-435, 2011.
82. Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3(3), p. 303-311, 2000.
83. Khor, E.; Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, p. 2339-2349, 2003.
84. Khouryieh, H. A.; Herald, T. J.; Aramouni, F.; Bean, S.; Alavi, S. Influence of deacetylation on the rheological properties of xanthan-guar interactions in dilute aqueous solutions. *Journal of Food Science*, v. 72 (3), p. C173-C181, 2007.
85. Khurma, J. R.; Rohindra, D. R.; Nand, A. V. Synthesis and properties of hydrogels based on chitosan and poly(vinyl alcohol) crosslinked by genipin. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 43, p. 749-758, 2006.
86. Kikic, I.; Vecchione, F. Supercritical impregnation of polymers. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 7, p. 399-405, 2003.
87. Kikic, I. Polymer-supercritical fluid interactions. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 458-465, 2009.
88. Kim, C.; Yoo, B. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 120–128, 2006.

89. Kincl, M.; Meleh, M.; Veber, M.; Vrečer F. Study of physicochemical parameters affecting the release of diclofenac sodium from lipophilic matrix tablets. *Acta Chimica Slovenica*, v. 51, p. 409-425, 2004.
90. 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.
91. Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1–27, 2000.
92. Kummer, C. L.; Coelho, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52 (4), p. 498-512, 2002.
93. 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.
94. 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.
95. Leeuwenburgh, S. C.G.; Malda, J.; Rouwkema, j.; Kirkpatrick, C. J.; Williams, D. F. Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. *Biomaterials*, v. 28, p. 3047-3052, 2008.
96. Li, X.; Fang, Y.; Zhang, H.; Nishinari, K.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O. Rheological properties of gum arabic solution: From Newtonianism to thixotropy. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 293-298, 2011.
97. Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Ed. Edgard Blucher, V. 3, 2001.

98. Lin, C.C.; Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1379-1408, 2006.
99. López-Periago, A.; Argemí, A.; Andanson, J. M.; Fernández, V.; García-González, C. A.; Kazarianc, S. G.; Saurinab, J.; Domingo C. Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug–matrix interactions *Journal of Supercritical Fluids*, v. 48, p. 56-63, 2009.
100. Lozano, H. R.; Martínez, F. Thermodynamics of partitioning and solvation of ketoprofen in some organic solvent/buffer and liposome systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42(4), p.601-613, 2006.
101. Macleod, G. S.; Collett, J. H.; Fell, J. T. The potencial use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303-310, 1999.
102. Macnaughton, S. J.; Kikic, I.; Foster, N. R.; Alessi, P.; Cortesi, P.; Colombo, I. Solubility of Anti-Inflammatory Drugs in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 41, p. 1083-1086, 1996.
103. Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133-1142, 1999.
104. Magnin, D.; Dumitriu, S.; Chornet, E. Immobilization of enzymes into a polyionic hydrogel: chitoxan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 18, p. 355-373, 2003.
105. Maitani, Y.; Sato, H.; Nagai, T. Effect of ethanol on the true diffusion coefficient of diclofenac and its sodium salt in silicone membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 165–174, 1995.
106. Manna, L.; Banchemo, M.; Sola, D.; Ferri, A.; Ronchetti, S.; Sicardi, S. Impregnation of PVP microparticles with ketoprofen in the presence of supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 42, p. 378-384, 2007.

107. Mao, J. S.; Feng liu, H.; Yin, Y. J.; De Yao, K. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, v.24, p. 1621-1629, 2003.
108. Marreco, P. R.; Moreira, P. L.; Genari, S. C.; Moraes, A. M. Effects of Different Sterilization Methods on the Morphology, Mechanical Properties and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71 (2), p. 268-277, 2004.
109. Martínez-Ruvalcaba, A.; Chornet, E.; Rodriguez, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 586-595, 2007.
110. Masmoudi, Y.; Ben Azzouk, L.; Forzano, O.; Andre, J. M.; Badens E. Supercritical impregnation of intraocular lenses. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 60, p. 98-105, 2011.
111. Metcalfe, A. D.; Ferguson, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 4, p. 413-437, 2007.
112. Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Wu, Y. B.; Lee, S. T.; Shyong, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p. 165-173, 2001.
113. Mi, F. L.; Wu, Y. B.; Shyu, S. S.; Chao, A. C.; Lai, J. Y.; Su, C. C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*, v. 212, p. 237-254, 2003.
114. Mudgil, D.; Barak, S.; Khatkar, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications - A Review. *Journal of Food Science and Technology*, 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0522-x.
115. Muzzarelli, R. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydrate Polymers*, v. 20, p. 7-16, 1993.

116. Muzzarelli, R. Chitin and the human body. In: First International Conference of the European Chitin Society. *Advances in Chitin Science. Brest*, p. 448-461, 1995.
117. Muzzarelli, R.; Baldassarre, V.; Ferrara, P.; Biagini, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, v. 9, p. 247-252, 1988.
118. Muzzarelli, R.; Mattioli-Belmonte, M.; Tietz, C.; Biagini, R.; Ferioli, G.; Brunelli, M.A.; Fini, M.; Giardino, R.; Ilari, P.; Biagini, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, v. 15, p. 1075-1081, 1994.
119. Natu, M.V.; Gil, M.H.; Sousa, H.C. Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/ poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/ poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 93-102, 2008.
120. Niekraszewicz, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13(6), p. 16-18, 2005.
121. Nikitin, L. N.; Gallyamov, M. O.; Vinokur, R. A.; Nikolaev, A. Y.; Said-Galiyev, E. E.; Khokhlov, A. R.; Jespersen, H. T.; Schaumburg, K. Swelling and impregnation of polystyrene using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 26 p. 263-273, 2003.
122. Nishi, K. K.; Jayakrishnan, A. Preparation and In Vitro Evaluation of Primaquine-Conjugated Gum Arabic Microspheres. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18 (2), p. 191-197, 2005.
123. Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R.; Formariz, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27 (1), p.131-138, 2004.
124. Pandey, P. K.; Banerjee, J.; Taunk, K.; Behari, K. Graft copolymerization of acrylic acid onto xanthum gum using a potassium monopersulfate/Fe₂ redox pair. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, p. 1341–1346, 2003.

125. Parisotto, G.; Souza, J. S.; Ferrão, M. F.; Furtado, J. C.; Molz, R. F. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 41(4), p.499-505, 2005.
126. Pasquali, I.; Bettini, R.; Giordano, F. Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 399-410, 2008.
127. Paul, W.; Sharma, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 18-23, 2004.
128. Paulo, N. M.; Conceição, M.; Bueno, I. A. Silva, M. S. B.; Menezes, L. B.; Moraes, A. B.; Rodrigues, A. P. Filme de quitosana para o tratamento de ferida cutânea em uma gata. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35 (3), p. 381-383, 2007.
129. Paulo, N. M.; Silva, M. S. B.; Moraes, A. B.; Rodrigues, A. P.; Menezes, L. B.; Miguel, M. P.; Lima, F. G.; Faria, A. M.; Lima, L. M. L. Use of chitosan membrane associated with polypropylene mesh to prevent peritoneal adhesion in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B – Applied Biomaterials*, v. 91B (1), p. 221-227, 2009.
130. Pawlak, A.; Mucha, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, v. 396, p. 153–166, 2003.
131. Perrut, M. Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). *Journal of Supercritical Fluids*, v. 66, p. 359-371, 2012.
132. Pillai, C.K.S.; Paul, W.; Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 641-678, 2009.
133. Piyakulawat, P.; Praphairaksit, N.; Chantarasiri, N.; Muangsin, N. Preparation and evaluation of chitosan/carrageenan beads for controlled release of sodium diclofenac. *AAPS PharmSciTech*, v. 8(4), Article 97, 2007.

134. Popa, N.; Novac, O.; Profire, O.; Lupusoru, C. E.; Popa, M.I. Hydrogels based on chitosan–xanthan for controlled release of theophylline *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p.1241–1248, 2010.
135. Rabea, E.I.; Badawy, M.E.-T.; Stevens, C.V.; Smagghe, G.; Steubaut, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1457-1465, 2003.
136. Rao, M.S.; Kanatt, S.R.; Chawla, S.P.; Sharma, A. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 1243–1247, 2010.
137. Ribeiro, A. Q.; Sevalho, G.; César, C. C. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the occurrence of gastric lesions among patients undergoing upper endoscopy in a university hospital in Brazil. *Clinics*, v. 61 (5), p. 409-416, 2006.
138. Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, p.397-430, 2008.
139. Rodrigues, A. P.; Sanchez, E. M. S.; 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. 2703-2710, 2008.
140. Rodrigues, A.P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana ealginato para aplicação na terapia de lesões. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, julho de 2008.
141. Rosalam, S.; England, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and microbial Technology*, v. 39, p. 197-207, 2006.
142. Sabegh, M.A.; Rajaei, H.; Esmaeilzadeh, F.; Lashkarbolooki M. Solubility of ketoprofen in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 72, p. 191– 197, 2012.

143. Salgado, C. L.; Sanchez, E. M. S.; Mano, J. F.; Moraes, Â. M. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Materials Science*, v. 47, p. 659-667, 2012.
144. Sander, I.; Raulf-Heimsoth, M.; Wiemer, K.; Kespohl, S.; Brüning, T.; Merget, R. Sensitization due to gum arabic (*Acacia senegal*): the cause of occupational allergic asthma or crossreaction to carbohydrates. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 141, p. 51-56, 2006.
145. Santos, K.S.C.R., Coelho, J.F.J., Ferreira, P., Pinto, I., Lorenzetti, S.G., Ferreira, E.I., Higa, O.Z., Gil, M.H. Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p. 37-45, 2006.
146. Shalviri, A.; Liu, Q., Abdekhodaie, M.J.; Wu, X.Y. Novel modified starch–xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 898–907, 2010.
147. Souza, J. S.; Ferrão, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42(3), p.437-445, 2006.
148. Sriamornsak, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutica Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*, v. 3 (1-2), p. 206-228, 2003.
149. Stephen, A. M.; Phillips, G. O.; Williams, P. A. *Food polysaccharides and their applications*. 2° ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, Flórida, 2006.
150. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., Shakesheff, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 3181-3198, 1999.
151. Veiga, I. G.; Moraes, Â. M. Study of the Swelling and Stability Properties of Chitosan–Xanthan Membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, p. E154- E160, 2012.

152. Vendruscolo, C. W.; Andrezza, I. F.; Ganter, J. L. M. S.; Ferrero, C.; Bresolin, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 296, p. 1-11, 2005.
153. Wang, L.; Khor, E.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
154. Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002.
155. Wang, Q.; Dong, Z.; Du, Y.; Kennedy, J. F. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 69 (2), p. 336-343, 2007.
156. Wang, Q.; Zhang, J.; Wang, A. Preparation and characterization of a novel pH-sensitive chitosan-g-poly (acrylic acid)/attapulgit/sodium alginate composite hydrogel bead for controlled release of diclofenac sodium. *Carbohydrate Polymers*, v. 78 (4), p. 731-737, 2009.
157. Wang, W.; Wang, A. Preparation, characterization and properties of superabsorbent nanocomposites based on natural guar gum and modified rectorite. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 891–897, 2009.
158. Wang, Z.; Wu, H.; Liao, C.; Zhou, N.; Cheng, W.; Wan, Y. Sustained release of ketoprofen from fibrous chitosan-poly(ϵ -caprolactone) membranes. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 624–630, 2011.
159. Williams, D.F. *Definitions in biomaterial. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*. Chester: Elsevier, 1987.
160. Yadav, M. P.; Igartuburu, J. M.; Yan, Y.; Nothnagel, E. A. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 297-308, 2007.

161. Yamaura, M. A química das quitosanas. Disponível em: http://www.crq4.org.br/qv_quitosanas. Acesso em: junho de 2008.
162. Yan, X.; Khor, E.; Lim, L. Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48(7), p. 941-946, 2000.
163. Yang, Y.; Anvari, M.; Pan, C. H.; Chung, D. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, v. 135, p. 555–561, 2012.
164. Yen, M. T.; Yang, J. H.; Mau, J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 15–21, 2009.
165. Yosof, N.L.B.M., Lim, L.Y.; Khor, E., Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 4, p. 59-68, 2001.
166. Zawadzki, J.; Kaczmarek, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 394–400, 2010.
167. Zhao, Q.; An, Q. F.; Ji, Y.; Qian, J.; Gao, C. Polyelectrolyte complex membranes for pervaporation, nanofiltration and fuel cell applications. *Journal of Membrane Science* v. 379 (1–2),p. 19–45, 2011.

ANEXO I

Tabela Al.1: Perda de massa durante o processo de preparação das membranas.

Membrana	Massa inicial de quitosana (g)	Massa inicial de X, P ou G (g)	Total de polímero inicial (g)	Perda de massa durante o processo (%)	Perda de massa no corte (%)	Perda na lavagem (%)	Massa final da membrana (g)
Quitosana-xantana	0,45	0,45	0,9	9,63 ± 1,58	17,18 ± 0,36	1,14 ± 0,08	0,65 ± 0,02
Quitosana-pectina	0,9	0,9	1,8	7,25 ± 0,67	15,03 ± 1,12	4,95 ± 1,18	1,31 ± 0,12
Quitosana-guar	0,45	0,45	0,9	9,00 ± 0,16	6,09 ± 0,04	5,42 ± 1,63	0,72 ± 0,02

Perda de massa durante o processo: material que fica aderido à superfície do reator, impelidor e kitassato; Perda de massa no corte: corte realizado na membrana para retirada das bordas que formam durante a secagem na placa.

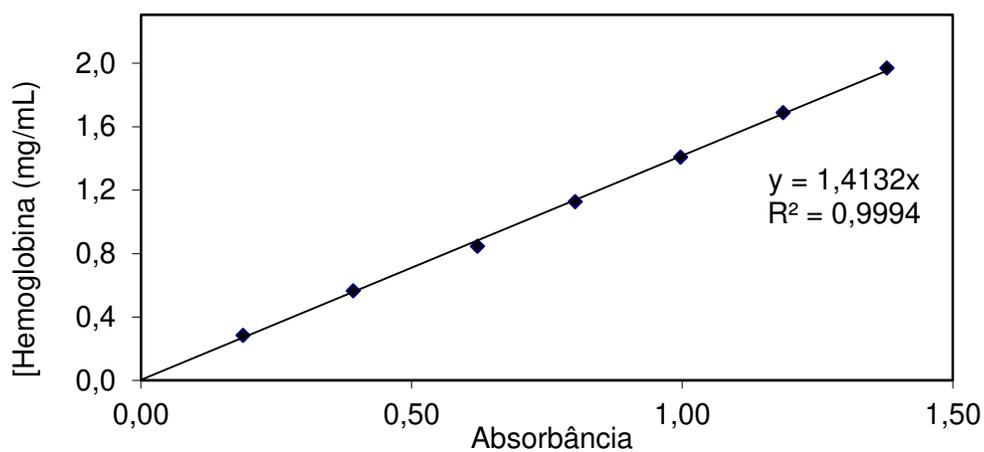


Figura Al.1: Curva de calibração da concentração de hemoglobina utilizada nos ensaios de potencial hemolítico.

ANEXO II

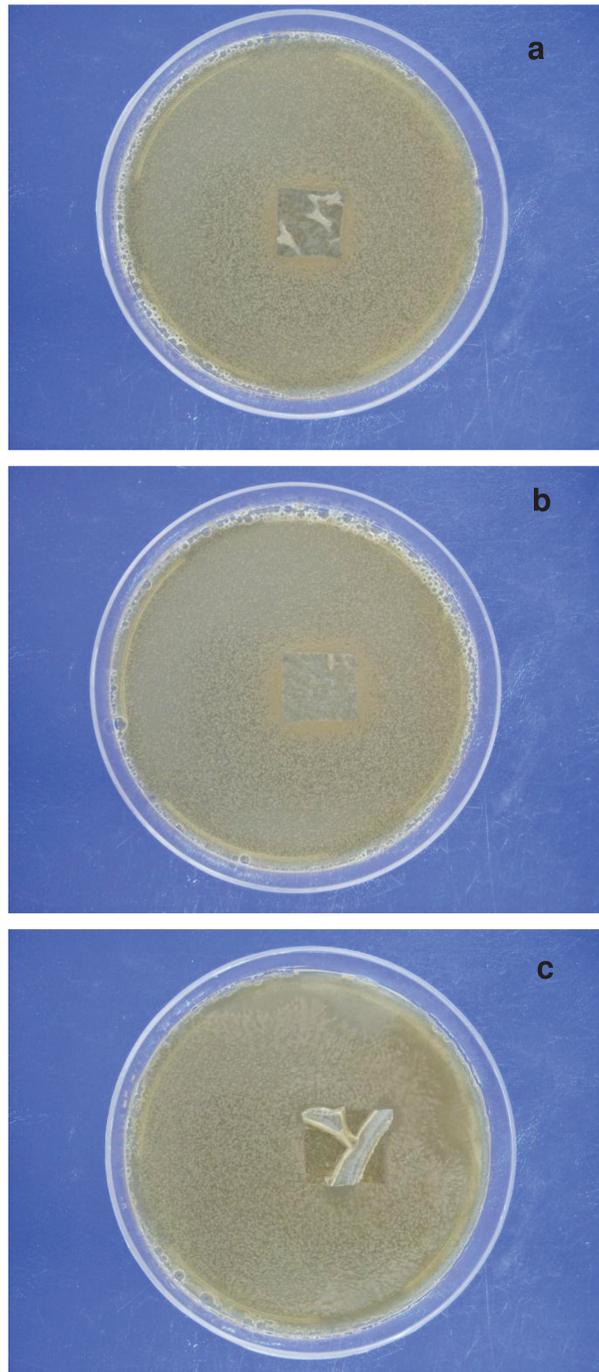


Figura All.1: Ensaio de formação de halo de inibição pelas membranas de: (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar utilizando bactérias *Pseudomonas aeruginosas*.

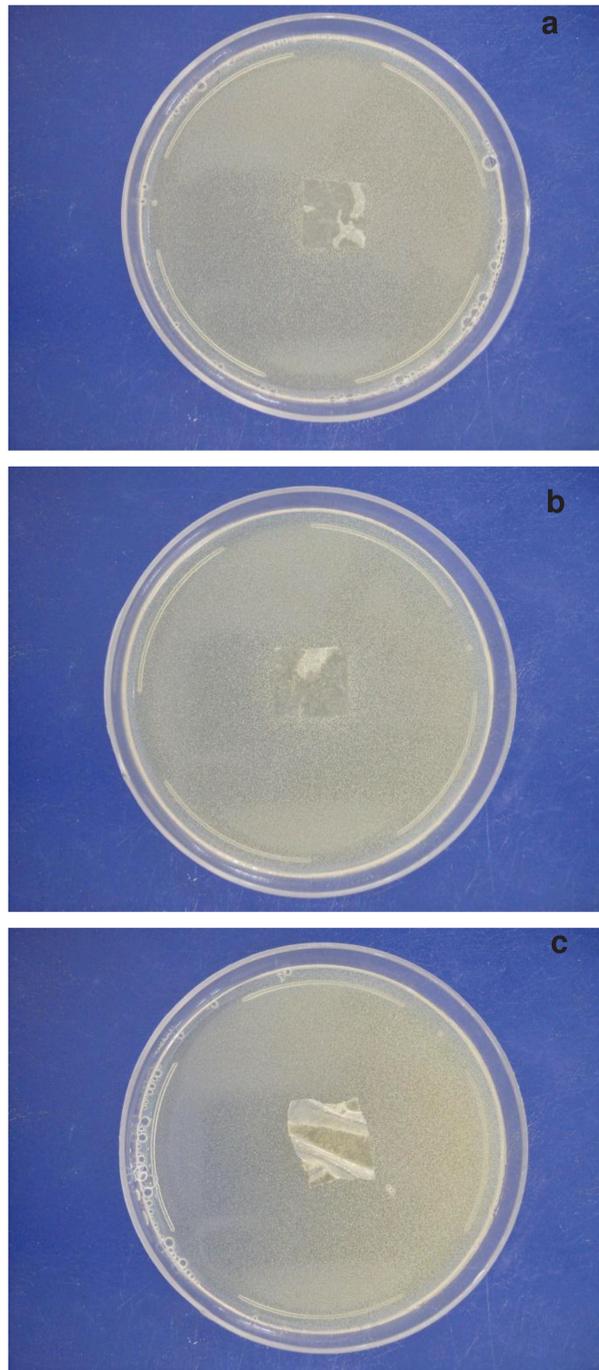


Figura All.2: Ensaio de formação de halo de inibição pelas membranas de: (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar utilizando bactérias *Staphylococcus aureus*.

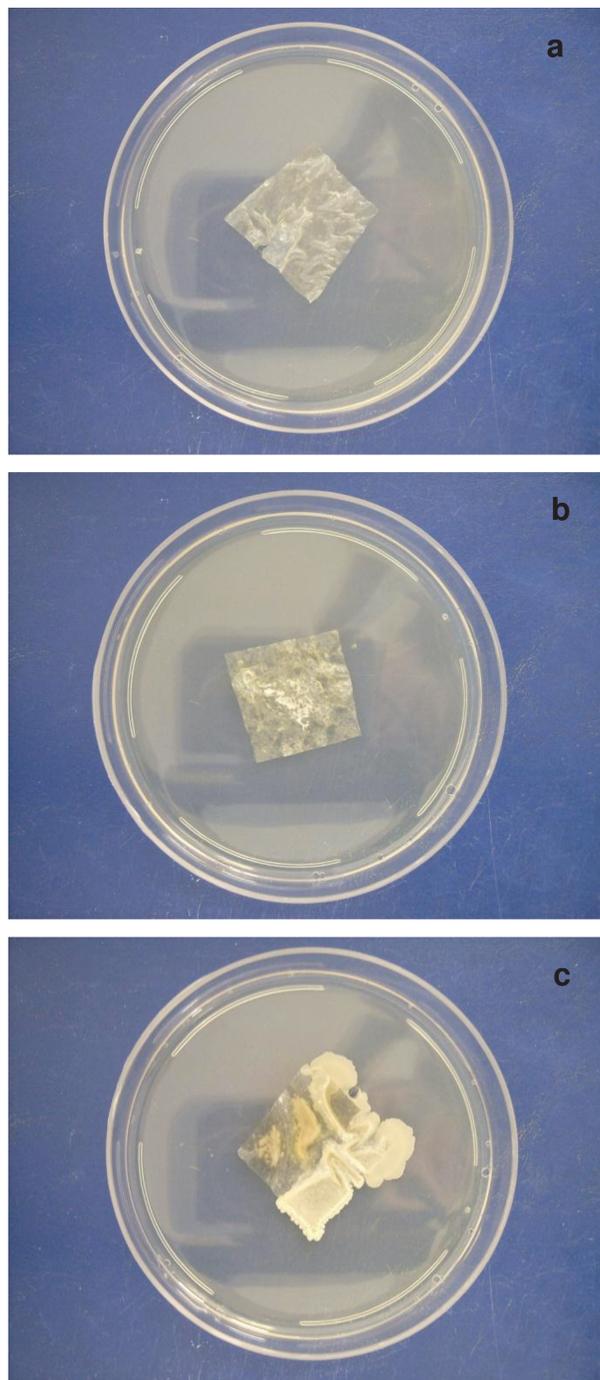


Figura All.3: Ensaio de permeação de bactérias *Pseudomonas aeruginosas* através das membranas de: (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar.

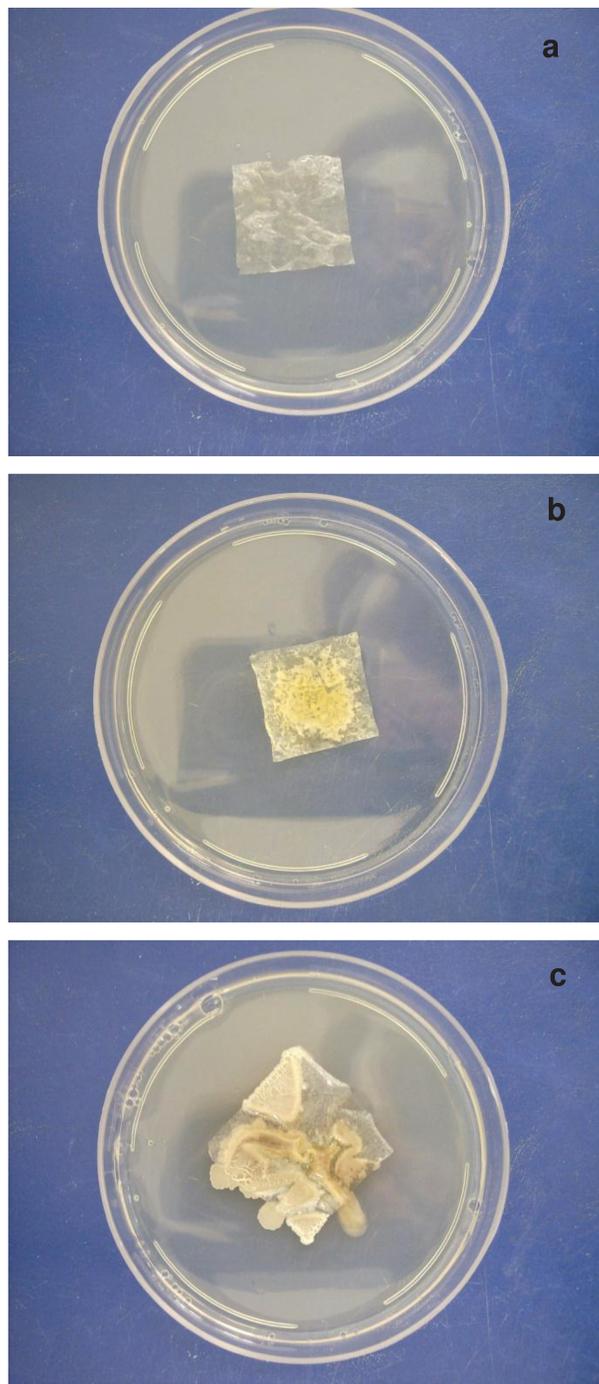


Figura All.4: Ensaio de permeação de bactérias *Staphylococcus aureus* através das membranas de: (a) quitosana-xantana, (b) quitosana-pectina e (c) quitosana-guar.

ANEXO III

Tabela AIII.1: Comprimentos de onda utilizados para a quantificação dos fármacos solubilizados nos diferentes solventes utilizados.

Fármaco / solvente	Comprimento de onda (nm)		
	Água	Etanol	PBS
Diclofenaco de sódio	274	-	275
Piroxicam	-	309	335
Cetoprofeno	-	254	260

Tabela AIII.2: Relações obtidas entre as concentrações de fármacos solubilizados em diferentes solventes e as absorvâncias das soluções utilizadas para a quantificação dos fármacos.

Fármaco / solvente	Equação da curva padrão e R ²	
	Água ou Etanol	PBS
Diclofenaco de sódio	C = 31,088 A	C = 29,483 A
	R ² = 0,9999	R ² = 0,9999
Piroxicam	C = 20,378 A	C = 22,122 A
	R ² = 0,9956	R ² = 0,9994
Cetoprofeno	C = 18,078 A	C = 13,313 A
	R ² = 0,9982	R ² = 0,9999

C – concentração (µg/ml); A – absorvância

ANEXO IV

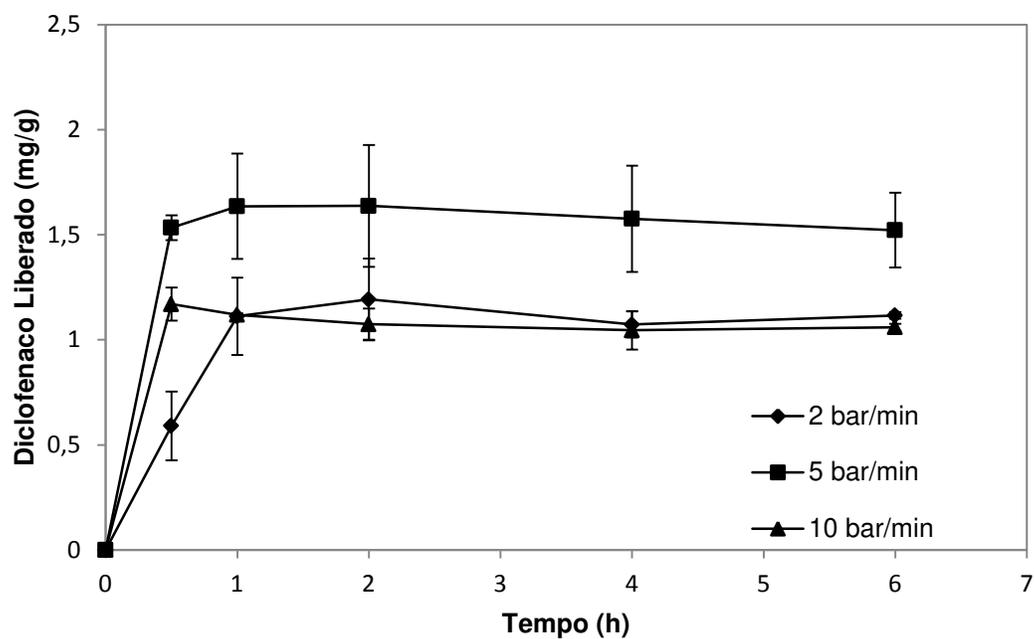


Figura AIV.1: Liberação em PBS de diclofenaco de sódio incorporado por tecnologia supercrítica nas membranas quitosana-xantana utilizando taxa de despressurização de (♦) 2 bar/min, (■) 5 bar/min e (▲) 10 bar/min.