



ANA LUIZA RESENDE PIRES

**“DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS FLEXÍVEIS E
NEUTRALIZADOS DE QUITOSANA E ALGINATO CONTENDO
ALPHASAN[®] RC2000”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

ANA LUIZA RESENDE PIRES

**“DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS FLEXÍVEIS E
NEUTRALIZADOS DE QUITOSANA E ALGINATO CONTENDO
ALPHASAN[®] RC2000”**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ângela Maria Moraes

Dissertação de Mestrado apresentada á Faculdade de Engenharia Química da Unicamp para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, na área de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Luiza Resende Pires, e orientada pela Profa. Ângela Maria Moraes.

Profa. Ângela Maria Moraes

Campinas

2013

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

P665d Pires, Ana Luiza Resende
Desenvolvimento de curativos flexíveis e
neutralizados de quitosana e alginato contendo
AlphaSan® RC2000 / Ana Luiza Resende Pires. --
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Flexibilidade. I.
Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Development of flexible and neutralized chitosan and alginate
dressing containig AlphaSan® RC2000

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginates, Flexibility

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

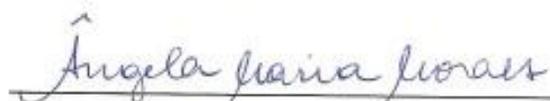
Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Ângela Maria Moraes, Claudio Alberto Torres Suazo, Theo
Guenter Kieckbush

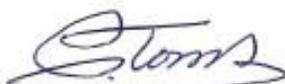
Data da defesa: 07-02-13

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

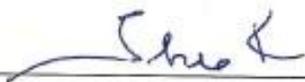
Dissertação de Mestrado defendida por Ana Luiza Resende Pires e aprovada em 07 de
Fevereiro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a Dra. Ângela Maria Moraes



Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as portas que abre em meu caminho.

À professora Dr^a Ângela Maria Moraes pela orientação, atenção, oportunidade, confiança e amizade.

Ao meu pai, Chico, por toda sua fé, o qual me incentiva e apoia em todos os momentos. Meu grande e verdadeiro herói. À minha mamãe, Luiza (*in memoriam*), que tenho certeza ser meu maior anjo da guarda.

Aos meus irmãos, Guto e Rafinha, por serem meus protetores e companheiros, pela união e amor incondicional.

À minha dindinha, Paulina, por me cuidar e amar como filha, por sempre me fazer refletir e pensar sobre o melhor caminho, por estar sempre ao meu lado.

A toda minha família pela torcida e constante incentivo.

Ao Rodolfo pelo companheirismo, carinho, amor e por toda a paciência nos momentos difíceis.

À Sarinha pelo carinho e por ser sempre tão atenciosa. Sua alegria de viver é uma inspiração.

Às amigas mineirinhas, pela amizade de sempre, principalmente à Marina que está me presenteando com um afilhadinho e às amigas paulistinhas, principalmente a Bruninha, Gabi, Mari, Alliny, Ju e Nat pelas risadas, companheirismo e compreensão, tê-las por perto faz toda a diferença.

Aos colegas de laboratório pela boa convivência e risadas durante os cafezinhos, principalmente à Cecília pela disponibilidade de sempre ajudar. A todos os amigos que fiz na Pós-Graduação, principalmente Renata, Rafael, Fernanda e Juliana.

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

À empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda pela parceria e apoio e à empresa Acecil de Esterilização Comércio e Indústria Ltda pela esterilização das membranas.

A CAPES que, pelo apoio financeiro, viabilizou os frutos deste trabalho.

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

**“Perguntaram-me o que eu queria ser
quando crescesse...eu anotei: Feliz.”**

John Lennon

RESUMO

Polímeros biodegradáveis estão sendo amplamente aplicados na constituição de curativos para o tratamento de lesões de pele de diferentes origens, estando a quitosana e o alginato dentre os mais estudados. A associação de alginato e quitosana em curativos pode atuar de maneira positiva na absorção de fluidos das lesões, além de propiciar a incorporação de fármacos. Entretanto, a flexibilidade do dispositivo é baixa e o processo de obtenção é lento em função de etapas como a correção do pH para a neutralidade, secagem e reticulação. Neste trabalho teve-se por objetivo melhorar as propriedades mecânicas de membranas de quitosana e alginato pela incorporação de um gel de silicone comercial (Silpuran[®] 2130 A/B), avaliar os efeitos da correção do pH em etapa única, da temperatura de secagem e também da eliminação das etapas de reticulação nas características de membranas de quitosana e alginato na presença e ausência de AlphaSan[®] RC2000, um agente microbicida à base de prata. As membranas foram caracterizadas quanto à espessura, à absorção de fluidos, à perda de massa quando expostas a diferentes fluidos fisiológicos e à resistência mecânica. Análises complementares de FTIR e EDS também foram realizadas. Os resultados obtidos mostraram que as membranas secas a 60 °C apresentaram superfície mais lisa que as secas a 37 °C. A espessura diminuiu com a correção do pH para 7,0 e aumentou na presença de AlphaSan[®] RC2000. Para as formulações livres do antimicrobiano, a elevação do pH aumentou a absorção de soro fetal bovino e solução salina e aumentou também a perda de massa nesta última solução. Já as amostras obtidas na presença de AlphaSan[®] RC2000 apresentaram aumento na absorção de água. A elevação da temperatura reduziu somente a perda de massa após o contato com a água. A reticulação, após a secagem, com CaCl₂ a 2% mostrou-se indispensável para a estabilização das membranas, resultando em materiais com aspecto mais rugoso e maior espessura. A absorção de fluidos, a estabilidade em diferentes fluidos e a resistência mecânica diminuíram tanto na presença quanto na ausência de prata. Análises por EDS e FTIR mostraram que tanto o AlphaSan[®] RC2000 quanto o Silpuran[®] 2130 A/B, não são removidos após a etapa de lavagem das membranas. As formulações contendo o composto siliconado, apresentaram-se mais homogêneas, flexíveis e com maior caráter adesivo, assim como menor espessura. A absorção de soluções por estas formulações foi menor e a estabilidade em solução foi maior. A resistência mecânica aumentou significativamente com a incorporação de silicone, atingindo-se uma tensão de ruptura máxima de 63 MPa. Dessa forma, é viável a diminuição do tempo de processamento das membranas pelo ajuste do pH em etapa única, pelo uso de temperaturas mais elevadas de secagem e pela eliminação da etapa de reticulação primária. A incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B mostrou-se uma boa alternativa para a melhora das propriedades mecânicas dos curativos de quitosana e alginato.

Palavras-chave: *quitosana, alginato, curativos, gel de silicone, lesões de pele, prata.*

ABSTRACT

Biodegradable polymers are widely applied in the constitution of dressings for treating various types of skin lesions, being chitosan and alginate two of the most studied raw materials. The association between alginate and chitosan in wound dressings can act positively in the absorption of fluids from lesions, allowing also the incorporation of drugs. However, the device flexibility is frequently low and its production is time-consuming due to steps such as adjusting the pH to neutrality, sample drying and crosslinking. This study aimed to improve the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings by incorporating a commercial silicone gel (Silpuran® 2130 A/B) and to evaluate the effects of pH correction in one step, of the drying temperature and also of the elimination of the crosslinking steps in the characteristics of chitosan-alginate membranes obtained in the presence and absence of AlphaSan® RC2000, an antimicrobial agent containing silver in its composition. The membranes were characterized regarding thickness, absorption of fluids, mass loss in different fluids and mechanical resistance. Complementary analyzes of FTIR and EDS were also performed. The results showed that membranes dried at 60 °C presented smoother surfaces than when dried at 37 °C. Membrane thickness decreased with the correction of the pH to 7,0 and increased in the presence of AlphaSan® RC2000. For formulations free of the antimicrobial agent, the pH adjustment increased bovine fetal serum and saline solution absorption, increasing also sample mass loss in the latter solution. Devices containing AlphaSan® RC2000, on the other hand, had increased water absorption. The increase of drying temperature, however, reduced mass loss due to prolonged contact with water. The crosslinking with CaCl₂ 2% after a drying step was shown to be essential for membrane stabilization, conducting to materials with less smooth surfaces and with greater thickness. The absorption of fluids decreased for samples prepared both in the presence and absence of silver, as did membrane stability and mechanical properties. EDS and FTIR analyzes showed that both AlphaSan® RC2000 and Silpuran® 2130 A/B were not removed from the membranes after the washing step. The formulations incorporating the silicone compound showed more homogeneous surfaces, greater flexibility and adhesivity, as well as lower thickness. The solution absorption was lower and membrane stability was higher for those devices. The mechanical strength increased with the incorporation of silicone, reaching a maximum of 63 MPa. Thus, it is viable to decrease the processing time of the membranes by pH adjustment in a single step, through the use of higher temperatures during drying and by the eliminating of the primary crosslinking step. The incorporation of Silpuran® 2130 A/B proved to be a good alternative for the improvement of the mechanical properties of chitosan and alginate dressings.

Keywords: *chitosan, alginate, wound dressings, silicone gel, skin lesions, silver.*

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Lesões de pele	4
2.2. Biomateriais	6
2.2.1. Curativos	7
2.3. Biopolímeros.....	10
2.3.1. Quitosana.....	11
2.3.2. Alginato	16
2.3.3.Complexo de polieletrólitos de quitosana e alginato.....	18
2.4. Uso de agentes antimicrobianos em lesões dérmicas.....	22
2.4.1 AlphaSan [®] RC2000	26
2.5. Alternativas para reforço nas propriedades mecânicas de curativos polissacarídeos.....	29
2.5.1 Elastômeros de silicone.....	31
2.6. Aspectos relevantes na ampliação de escala da produção de curativos de quitosana e alginato.....	33
2.7. Análise conclusiva da literatura consultada.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Materiais	35
3.2. Metodologia	35

3.2.1. Preparação de membranas de quitosana-alginato	35
3.2.1.1. Avaliação da neutralização em etapa única e aumento da temperatura de secagem.....	35
3.2.1.2. Avaliação da eliminação das etapas de reticulação.....	39
3.2.1.3. Avaliação de estratégias de aumento na resistência mecânica e flexibilidade.....	39
3.2.1.3.1. Utilização de liner revestido com Silpuran® 2130 A/B como suporte da membrana de quitosana e alginato contendo AlphaSan® RC2000.....	39
3.2.1.3.2. Incorporação de Silpuran® 2130 A/B durante o processamento das membranas de quitosana e alginato	41
3.2.2. Caracterização das membranas	42
3.2.2.1. Aspecto das membranas	43
3.2.2.2. Morfologia da superfície e da secção transversal	43
3.2.2.3. Avaliação da espessura das membranas	43
3.2.2.4. Capacidade de absorção de água e soluções fisiológicas.....	44
3.2.2.5. Perda de massa em soluções aquosas	45
3.2.2.6. Avaliação das propriedades mecânicas.....	45
3.2.2.7. Análise por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS).....	46
3.2.2.8. Análise por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	47
3.2.2.9. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

4.1. Avaliação da neutralização em etapa única e aumento da temperatura de secagem.....	48
4.1.1. Aspecto das membranas.....	48
4.1.2. Morfologia da superfície e da secção transversal.....	50
4.1.3. Avaliação da espessura das membranas.....	53
4.1.4. Capacidade de absorção de água e soluções fisiológicas.....	55
4.1.5. Perda de massa em soluções aquosas.....	57
4.1.6. Análise das propriedades mecânicas.....	59
4.2. Avaliação da eliminação das etapas de reticulação.....	61
4.2.1. Aspecto das membranas reticuladas por distintas formas.....	62
4.2.2. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas submetidas somente à reticulação secundária.....	63
4.2.3. Análise do efeito da reticulação secundária na espessura das membranas	66
4.2.4. Influência do método de reticulação na capacidade de absorção das membranas expostas a diferentes soluções aquosas.....	67
4.2.5. Perda de massa das membranas preparadas por diferentes métodos de reticulação após exposição a diferentes soluções aquosas.....	69
4.2.6. Análise das propriedades mecânicas das membranas reticuladas por diferentes métodos.....	70
4.3. Avaliação de estratégias de aumento da resistência mecânica e flexibilidade.....	72
4.3.1. Utilização de “liner” revestido com Silpuran [®] 2130 A/B para suporte da membrana de quitosana e alginato contendo AlphaSan [®] RC2000.....	72

4.3.2. Incorporação de Silpuran [®] 2130 A/B no processamento das membranas de quitosana e alginato.....	73
4.3.3. Aspecto das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B.....	73
4.3.4. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B.....	76
4.3.5. Análise elementar das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B por EDS.....	79
4.3.6. Análise do efeito da adição de Silpuran [®] 2130 A/B por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR).....	81
4.3.7. Avaliação da espessura das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B.....	86
4.3.8. Capacidade de absorção das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B quando expostas a soluções fisiológicas.....	88
4.3.9. Estabilidade das membranas contendo Silpuran [®] 2130 A/B quando expostas a diferentes soluções fisiológicas.....	90
4.3.10. Análise das propriedades mecânicas das membranas contendo 10% de Silpuran [®] 2130 A/B.....	92
5. CONCLUSÕES.....	96
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

NOMENCLATURA

A = Capacidade de absorção de fluidos

Al = Alongamento da amostra na ruptura

A_s = Área da secção transversal inicial da amostra

ASTM = *American National Standards Institute*

d_i = Afastamento inicial das garras do equipamento TA.TXT2 (Stable Microsystems SMD)

d_r = Afastamento das garras no momento da ruptura

EDS = Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, do termo em inglês *energy dispersive spectroscopy*

FCS = Fluido corpóreo simulado

F_m = Força máxima de rompimento

FTIR = Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do termo em inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*

M_i = Massa inicial do corpo de prova da membrana de quitosana-alginato

M_f = Massa seca final do corpo de prova da membrana de quitosana-alginato

M_u = Massa úmida final do corpo de prova da membrana de quitosana-alginato

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

NICNAS = *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme*

OE = Óxido de etileno

PBS = Tampão fosfato salino, do termo em inglês *phosphate buffered saline*

PDMS = polidimetilsiloxano

PEC = Complexo polieletrólito, do termo em inglês *polyelectrolyte complex*

PHMB = Polihexametileno biguanida

RT = Resistência à tração

SFB = Soro fetal bovino

SS = Solução salina

1. INTRODUÇÃO

A procura por maior conforto do paciente vitimado por traumas ou patologias tem originado a necessidade de alternativas para uma rápida e eficiente cicatrização de lesões. Com grande destaque neste contexto está o uso dos biomateriais, definidos como materiais que por si só ou como parte de um sistema complexo são usados para dirigir, por controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico (Williams, 2009).

Os biomateriais podem ser de origem sintética ou natural. O uso de materiais sintéticos pode originar resíduos que dificultam a recuperação da lesão. Essa limitação pode ser diminuída pelo uso de dispositivos produzidos a partir de variados tipos de compostos poliméricos naturais, uma vez que estes geralmente são biocompatíveis e biodegradáveis (Dallan, 2005; Bueno e Moraes, 2011; Sionkowska, 2011). A escolha por biopolímeros vem sendo também apontada na área de curativos por serem estes capazes de manter um microambiente controlado no local da lesão. Dentre os biopolímeros, quitosana e alginato são amplamente utilizados para este fim (Costache *et al.*, 2010; Dantas *et al.*, 2011; Arockianathan *et al.*, 2012).

A quitosana consiste de um copolímero catiônico derivado da quitina, um componente do exoesqueleto de crustáceos, com unidades de N-acetil glicosamina e D-glicosamina. É conhecida no campo do tratamento de feridas por suas propriedades hemostáticas, por estimular a proliferação celular e por ter propriedades bactericidas e fungicidas (Chen *et al.*, 2012; Paul e Sharma, 2004). O alginato é um biopolímero aniônico obtido de algas marrons, composto por blocos de (1,4) β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G). Seu uso na constituição de curativos é importante devido ao ambiente úmido que proporciona ao ferimento, facilitando a re-epitelização. Os íons sódio no fluido da ferida convertem, lentamente, o alginato reticulado do curativo em uma solução viscosa de alginato de sódio e aliviando a dor (Lee e Mooney, 2012; Goh *et al.*, 2012).

Quando misturados em fase aquosa, a quitosana e o alginato combinam-se espontaneamente por forte atração eletrostática, formando um complexo polieletrólito (PEC) (Verma *et al.*, 2011). Nesta complexação, as carboxilas do alginato interagem ionicamente com

as aminas protonadas da quitosana, aumentando a tendência de intumescimento e melhorando a resistência estrutural e a estabilidade mecânica do material (Li *et al.*, 2009). Rodrigues (2008) preparou membranas de quitosana e alginato e constatou maior estabilidade a alterações de pH, absorção de fluidos mais intensa, além de boa eficácia para a liberação controlada de fármacos. Porém, apesar de existirem boas características na utilização de PECs à base de quitosana e alginato, algumas limitações como a baixa resistência mecânica e a reduzida flexibilidade podem consistir em problemas durante o manuseio e a estocagem do material, por exemplo.

O uso de agentes antimicrobianos desempenha um papel fundamental no controle e terapia de infecções de pele, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos no local da lesão, resultando em um microambiente mais adequado para a cura (Luo *et al.*, 2008). O AlphaSan[®] RC2000 é um agente antimicrobiano disponível comercialmente que consiste de fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. A prata é o componente ativo e é eficaz contra um largo espectro de microrganismos, e sua utilização reduz o risco de infecção (Schrijver, *et al.*, 2007), sendo possível sua incorporação em membranas de quitosana e alginato (Girata, 2011).

São observadas várias oportunidades de melhoria do produto que combina membranas de quitosana e alginato com AlphaSan[®] RC2000, produto este já registrado na ANVISA pela empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda (São José dos Campos, SP, Brasil) após desenvolvimento em parceria com o Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (LEBC/Unicamp). Devido ao fato de a quitosana se dissolver em soluções acidificadas, membranas consistindo de complexos secos de quitosana e alginato devem ter seu pH neutralizado antes do uso para não causar irritação na lesão. Esta etapa alonga o tempo de processamento do material, e o mesmo se aplica à etapa de secagem do dispositivo, costumeiramente efetuada a 37 °C por cerca de 20 horas (Rodrigues, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Girata, 2011). Outra etapa que poderia ser suprimida do processamento é a reticulação primária e secundária das membranas com íons cálcio, o que pode ser feito com sucesso se o agente antimicrobiano adicionado à membrana desempenhar também a função de agente reticulante. Além do mais, há a necessidade de melhorar a resistência mecânica das membranas de quitosana e alginato que é baixa, o que compromete a flexibilidade e a porcentagem de alongamento na ruptura da mesma. Tendo em vista tais possibilidades de melhoria do produto, neste trabalho buscou-se alcançar as metas estabelecidas a seguir, destacando-se que para a

realização deste trabalho contou-se com o apoio técnico da empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda. (situada em São José dos Campos, SP), especializada na produção de curativos e outros produtos de uso clínico.

1.1. **Objetivos**

Este projeto teve por objetivo geral contribuir para os trabalhos realizados na área de desenvolvimento de membranas para o tratamento de lesões dérmicas, tendo como objetivos específicos:

- a) Avaliar os efeitos da correção do pH para a neutralidade após a etapa de complexação e do aumento da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®]RC2000, a fim de minimizar o tempo de obtenção destes dispositivos;
- b) Averiguar se é possível eliminar do processamento de membranas contendo AlphaSan[®] RC2000 uma ou mais etapas de reticulação com íons cálcio.
- c) Aumentar a resistência mecânica das membranas de quitosana e alginato a fim de torná-las mais flexíveis e, preferencialmente, elásticas com a incorporação de gel de silicone comercial, Silpuran[®] 2130 A/B.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lesões de pele

A pele, órgão mais externo do corpo, é um tecido vivo que possui seu próprio metabolismo, contribuindo para o bom funcionamento geral do corpo. Atua como um envelope de retenção de água no interior do organismo e como uma barreira contra a penetração de agentes externos. A transferência de tais agentes está associada a variadas questões, tais como: contaminação por microrganismos e produtos químicos, distribuição de medicamentos na superfície da pele (tratamentos dermatológicos) e através da pele (adesivos transdérmicos) e cuidados e proteção da pele (cosméticos) (Bolzinger *et al.*, 2012).

Descrito como um material compósito laminado, a pele é constituída por três camadas distintas, conforme indicado na Figura 2.1. A epiderme, camada superior, contém queratinócitos e é a interface final entre o ambiente externo e o corpo humano, atuando como a primeira barreira de proteção contra danos mecânicos e contra a entrada de microrganismos, por exemplo. As diferentes forças mecânicas que podem ser aplicadas à epiderme são transmitidas para a derme, que é constituída por fibroblastos e colágeno, este último responsável pela rigidez e resistência da pele. A camada mais profunda, hipoderme, é composta principalmente por gordura, atua como uma reserva de energia, contribui para o isolamento térmico e também tem papel na plasticidade da pele (Rolin *et al.*, 2012; Metcalfe e Ferguson, 2007).

As lesões de pele, particularmente as feridas, podem ser causadas por cirurgias, por traumas (agentes mecânicos, químicos ou físicos) ou por úlceras e possuem grande importância clínica em função da morbidade, da alta frequência em que ocorrem, dos efeitos da proliferação de possíveis contaminantes bacterianos e também do alto custo dos tratamentos, principalmente se ocorrer demora na cicatrização (Wouk *et al.*, 1998).

Um ferimento pode atingir completamente a derme ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. A abrangência do ferimento vai defini-lo como uma ferida de espessura parcial ou total. Quando não atinge toda a derme, a ferida de espessura parcial resulta em uma cicatriz praticamente imperceptível. Já uma ferida de espessura total atinge a

derme completa ou se estende à hipoderme; nesse caso, a cicatriz é normalmente perceptível, uma vez que há a necessidade de formação de um novo tecido (Mandelbaum *et al.*, 2003).

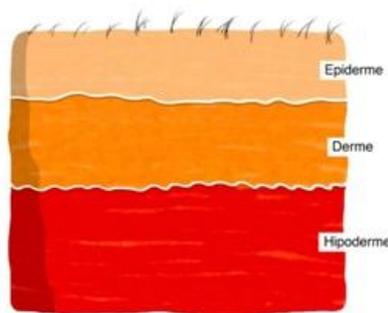


Figura 2.1 – Disposição das três camadas da pele.

Embora a restauração da continuidade do tecido lesado seja um fenômeno natural, a infecção, a qualidade da cura, a velocidade de cicatrização, a perda de fluidos e outras complicações aumentam o tempo de cicatrização, representando um grande desafio clínico (Paul e Sharma, 2004).

Segundo Gantwerker e Hom (2012), existem quatro fases na cicatrização de feridas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. A hemostasia é a fase inicial e ocorre de segundos a minutos após a lesão inicial; as plaquetas são essenciais nesta fase em que ocorre a formação de coágulo sanguíneo. A fase inflamatória é estabelecida pelo influxo de macrófagos e linfócitos para o local lesado que, por sua vez, removem os detritos e bactérias da ferida. A fase proliferativa começa na forma de reepitelização pelo influxo de queratinócitos, envolvendo assim a produção da matriz extracelular e brotamento capilar para preencher os defeitos deixados pela ferida. Já na remodelação, a resistência à tração da ferida aumenta drasticamente e os vasos sanguíneos retraem, devido à presença do colágeno. Embora estas fases sejam separadas, na prática, se sobrepõem, uma vez que diferentes áreas da ferida podem estar em diferentes fases de

cicatrização. Nesse caso, qualquer interrupção na cascata natural de cicatrização pode perturbar as fases subsequentes e resultar em cicatrização anormal.

O tratamento de feridas tem caráter dinâmico e depende, a cada momento, da fase de cicatrização. Existem vários biomateriais, dentre eles, curativos, que estão disponíveis no mercado para o tratamento dos mais diversos tipos de lesões de pele, mas sua escolha depende de fatores intrínsecos e extrínsecos à lesão. Entretanto, um só tipo de curativo normalmente não preenche os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas. Os avanços tecnológicos certamente possibilitam a utilização de produtos que aceleram a cicatrização e facilitam a vida do paciente (Franco e Gonçalves, 2008), mas lastimavelmente, em razão do custo, nem todos têm acesso a algumas das modalidades de curativos disponíveis. Os biomateriais da categoria dos curativos serão mais detalhadamente discutidos a seguir.

2.2. Biomateriais

Há duas questões a se considerar quanto ao significado de um biomaterial. A primeira diz respeito ao prefixo “bio” e a segunda diz respeito ao conceito do que é um material. Este assunto foi debatido por diversas vezes em conferências, havendo uma definição preferencial de que o âmbito de biomateriais seria apenas referente ao domínio dos cuidados da saúde (ao invés de energia, alimentos, produtos químicos em geral, etc.). Nesse sentido, um biomaterial deve se dirigir ao curso do tratamento médico, tanto no diagnóstico ou na terapia e deve ainda controlar as interações com os componentes biológicos do paciente a ser tratado (Williams, 2009).

A utilização segura dos biomateriais só entrou em prática no final do século 19, quando houve o avanço de técnicas cirúrgicas assépticas. Independentemente da sua composição ou aplicação, os materiais utilizados para o reparo do corpo devem atender requisitos quanto à biofuncionalidade e à biocompatibilidade. A biofuncionalidade diz respeito à capacidade do material de executar o propósito para o qual foi designado, está relacionada com as propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que permitem o desempenho de sua função. Já a biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material de proporcionar uma resposta adequada ao hospedeiro em uma aplicação específica, ou seja, o material não pode ser afetado

pelo meio fisiológico e o organismo não pode sofrer danos pela presença desse material (Barrère *et al.*, 2008).

Os biomateriais podem ser de origem sintética ou natural, sendo a primeira classe constituída por metais, cerâmicas, polímeros ou seus compósitos. Na segunda classe destacam-se os biomateriais produzidos a partir de colágeno purificado, fibras protéicas, polissacarídeos e tecidos tratados (Dallan, 2005).

Limitações como resposta inflamatória associada ao uso de biomateriais sintéticos podem ser diminuídas pelo uso dos de origem natural, como polissacarídeos, por geralmente estes apresentarem propriedades específicas de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Um grande número de polissacarídeos com diferentes estruturas químicas e propriedades vem sendo utilizado no campo biomédico, como por exemplo, na área de engenharia de tecidos e veículos para a liberação controlada de drogas (Bueno e Moraes, 2011; Rinaudo, 2008).

Uma importante aplicação dos polissacarídeos ocorre na área de curativos para o tratamento de lesões de pele de diferentes origens. Pesquisas nesse campo vêm sendo desenvolvidas visando qualidade e conforto ao paciente, além de custos competitivos. Os tipos mais relevantes de curativos e suas principais características serão abordados a seguir.

2.2.1. Curativos

O estudo e tratamento de feridas vêm sendo realizados desde o antigo Egito. Naquele tempo, as bordas da ferida limpa eram unidas com fita adesiva ou pontos e um pedaço de carne era colocado sobre a lesão. Pomadas à base de camomila e mel eram também utilizadas e suas propriedades antibacterianas e anti-sépticas foram mais tarde elucidadas. Assim, curativos e unguentos ou pomadas vêm sendo utilizados com sucesso ao longo da história e o advento da teoria dos germes, que revolucionou a medicina, trouxe impactos significativos na cirurgia e no tratamento de feridas (Gantwerker e Hom, 2012). Portanto, o tratamento de lesões pode ser efetivado de várias formas, mas varia de caso para caso, conforme as necessidades do paciente, as possibilidades técnicas e a experiência da equipe médica responsável (Dallan, 2005).

Jayakumar *et al.* (2011) definem três categorias de curativos: curativos biológicos, curativos sintéticos e curativos sintético-biológicos. A pele de porco é um tipo de curativo biológico utilizado clinicamente, porém possui desvantagens, como suprimento limitado, elevada antigenicidade, pouca adesividade e risco de contaminação cruzada (transferência de microrganismos do curativo biológico para a pele do paciente). Os curativos sintéticos possuem uma vida útil longa, porém como já mencionado neste trabalho, podem originar resíduos que dificultam a recuperação da lesão, uma vez que quando implantados no organismo, podem ocasionar a liberação de subprodutos ácidos e consequentes reações inflamatórias quando há baixa vascularização e atividade metabólica na região tecidual adjacente (Bellini, 2012). Já os curativos sintético-biológicos consistem simultaneamente de polímeros e materiais biológicos, combinando vantagens e limitações de ambos. Na Tabela 2.1 são mostrados alguns tipos de curativos e suas indicações de uso.

Apesar de possuírem características similares, os hidrocolóides e hidrogéis possuem definições distintas. Os hidrocolóides são encontrados na forma sólida e podem ser compostos por diversas substâncias (como água, pectina e gelatina) e, somente em contato com o exsudato ou com meio líquido, darão origem a um gel. Os hidrogéis, em termos de composição, contêm água e polímeros como, por exemplo, carbopol e propilenoglicol, e se diferenciam dos hidrocolóides por terem apresentação na forma de gel propriamente dito.

Abdelrahman e Newton (2011) apontam que além das abordagens baseadas no uso de curativos mostradas na Tabela 2.1, existem também duas terapias utilizadas no tratamento de feridas, a terapia larval e a de pressão tópica negativa. A terapia larval vem sendo utilizada na cura de feridas há centenas de anos. As larvas eliminam as bactérias da lesão através de sua ingestão e degradação, porém, causam desconforto ao paciente. As larvas mais utilizadas são as necrobiontófagas, que se alimentam exclusivamente de tecido necrosado. A terapia de pressão tópica negativa auxilia no fechamento da ferida através de aplicação localizada, inserindo-se, por exemplo, uma esponja hidrofóbica de poliuretano no ferimento conectada a bomba de vácuo por um tubo plástico e cobrindo-se hermeticamente a lesão com um filme transparente. A aplicação do vácuo promove a drenagem do excesso de fluidos e a contração da lesão, reduzindo a população bacteriana e o edema, com melhoria do fluxo sanguíneo local e de formação do tecido

de granulação. Dependendo da lesão é necessária uma pressão negativa entre 80 e 150 mmHg. Porém, é uma terapia que pode causar sangramento e dor ao paciente.

Tabela 2.1: Tipos de curativos e suas indicações clínicas (adaptado de Abdelrahman e Newton, 2011).

<i>Tipo de produto</i>	<i>Indicações de uso</i>
Filmes semipermeáveis	Feridas secas e superficiais. Podem ser usados como curativos secundários. Não podem ser utilizados em feridas exsudativas.
Contato, não-aderente	Feridas com risco de aderência. Podem ser usados como uma camada de transporte de géis ou pomadas.
Hidrocolóides	Feridas com baixo a moderado teor de exsudato. Promovem desbridamento de fibrina. Reduzem a dor pela hidratação das terminações nervosas.
Alginato	Feridas com moderado a alto teor de exsudatos. Feridas com muito sangue.
Espuma de hidrofibra	Feridas com moderado a alto teor de exsudato. Usada como curativo primário ou secundário.
Hidrogel	Feridas secas, espessas e necróticas.
Com agente antimicrobiano	Feridas colonizadas e infectadas em nível crítico. Usado em feridas úmidas e secas.
Com agente antiodor	Utilizados para reduzir o odor. A maioria possui carvão ativo em sua composição.
Matriz de protease moduladora	Feridas crônicas. Indicado para reequilibrar o ambiente da ferida.

Um curativo ideal deve proteger a ferida, prevenir a infecção, promover a cicatrização, deve manter um ambiente úmido na interface da lesão, com o ambiente, permitir a troca gasosa, agir como uma barreira para os microrganismos, remover o excesso de exsudato, além de ser não

tóxico, não alergênico e não aderente, propiciando um microambiente ótimo para a cura (Jayakumar *et al.*, 2011; Singh e Chacharkar, 2011). Os curativos devem também apresentar boa resistência mecânica, facilidade de aplicação e remoção, além de manter boa flexibilidade durante o processo de cicatrização (Singh e Pal, 2012; Murakami *et al.*, 2010).

Atualmente, esforços estão voltados para a utilização de materiais de origem biológica que, geralmente, são capazes de acelerar o processo de cura em níveis moleculares e celulares (Jayakumar *et al.*, 2011). Os polímeros naturais vêm sendo avaliados por promover a cicatrização e regeneração de tecidos, uma vez que são capazes de manter um microambiente controlado no local da lesão. O emprego de biopolímeros com diferentes propriedades mecânicas, físicas e biológicas possui grandes vantagens, tais como: biocompatibilidade e biodegradabilidade (Costache *et al.*, 2010; Dantas *et al.*, 2011; Bueno e Moraes, 2011).

2.3. Biopolímeros

Os polímeros possuem um papel importante na sociedade moderna, estando presentes na medicina, no vestiário, na agricultura e em embalagens, entre outros. O petróleo foi considerado uma das fontes principais de matéria-prima para a produção de polímeros, porém com o aumento do seu preço e com a crescente preocupação da sociedade com a poluição, fez-se necessária a investigação de novos tipos de polímeros, os polímeros naturais. Os biopolímeros são definidos como qualquer polímero (proteína, ácido nucléico, polissacarídeos) produzido por um organismo vivo (Borshiver *et al.*, 2008).

Diversos polissacarídeos com diferentes estruturas químicas e propriedades físicas constituem-se em fontes para aplicações na engenharia de tecidos, medicina regenerativa e em dispositivos médicos. Todos esses campos tomam partido das propriedades específicas desses polímeros naturais, tais como: renovabilidade, biodegradabilidade e atividade biológica, o que os tornam elementos-chave em processos biológicos. Além do mais, os polissacarídeos são muito importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e propriedades de hidratação, dentre outras (Rinaudo, 2008). Os polissacarídeos

são geralmente obtidos a partir de fontes microbianas, animais ou vegetais (Malafaya *et al.*, 2007). A Tabela 2.2 lista alguns polissacarídeos e suas fontes usuais.

Tabela 2.2: Fontes usuais de alguns polissacarídeos (adaptada de Bueno, 2010).

<i>Polissacarídeo</i>	<i>Fonte</i>
Alginato	Algas marrons
Carragena	Algas vermelhas
Goma Guar	Semente de <i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
Ácido Hialurônico	Humor vítreo de bovinos e intestinos de porcos
Quitosana	Carapaças de crustáceos
Xantana	Bactérias da espécie <i>Xanthomonas SSP</i>

Os biopolímeros representam uma alternativa de materiais para aplicação em avançadas terapias no combate de feridas de pele, tanto agudas como crônicas. A quitosana e o alginato são polissacarídeos que vêm ganhando bastante atenção por seu uso já estabelecido em várias aplicações, inclusive como curativo (Metcalf e Ferguson, 2007; Girata, 2011); ambos são mais detalhadamente descritos a seguir.

2.3.1 *Quitosana*

A quitosana é o principal derivado da quitina, que é um polímero normalmente encontrado na natureza. A quitosana é um co-polímero constituído de unidades de N-acetil-glicosamina e N-glicosamina distribuídas aleatoriamente ao longo da cadeia, sendo o número de unidades de N-acetil-glicosamina inferior a 50%. Inversamente, quando o número de unidades de N-glicosamina é mais elevado, então o biopolímero é denominado quitosana. A quitosana vem sendo a forma molecular mais pesquisada devido a sua solubilidade em ácidos, o que torna este

biopolímero mais acessível para utilização e modificações via reações químicas (Khor e Lim, 2003). As estruturas químicas da quitina e da quitosana estão indicadas na Figura 2.2.

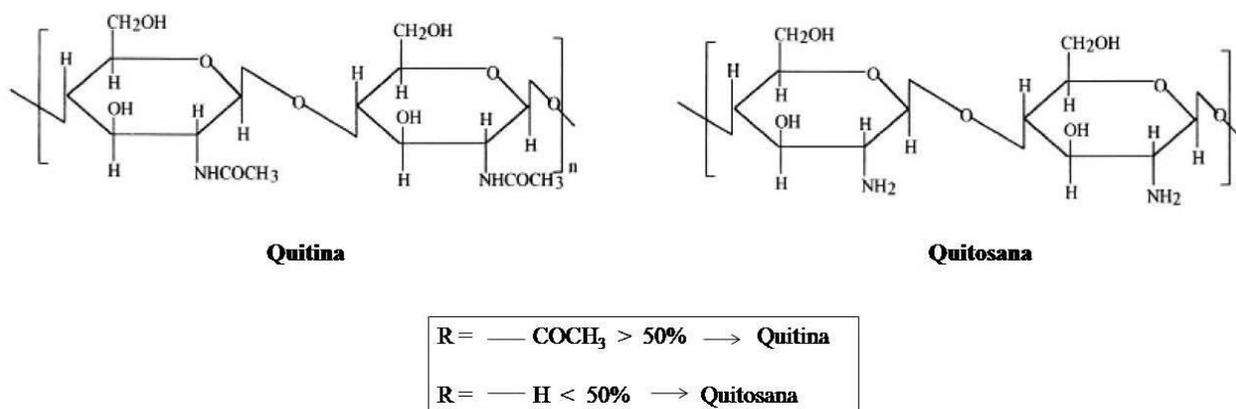


Figura 2.2 – Estruturas químicas da quitina e da quitosana (Azevedo *et al.*, 2007; Khor e Lim, 2003).

Para a obtenção da quitosana, a quitina, principal biopolímero constituinte de carapaças de crustáceos, é separada dos outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização, desproteinização e descoloração. A quitina obtida contém grupos acetil, os quais são removidos com solução concentrada de NaOH, resultando na quitosana (Rodrigues, 2008).

A quitosana é um dos poucos polímeros catiônicos de origem natural e tem recebido bastante atenção devido a suas atraentes propriedades intrínsecas, tais como biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, bioadesividade, capacidade de formação de filmes e atividade contra fungos, bactérias e vírus (Ávila *et al.*, 2012).

Dada a presença dos grupos amino na estrutura da quitosana, o pH do meio pode alterar o estado de ionização e outras características da quitosana. A transição solúvel-insolúvel da quitosana ocorre em torno de pH 6,0 e 6,5. Assim, a quitosana é solúvel em condições ácidas, pela protonação do grupo amino, e insolúvel em valores de pH acima de seu pKa (6,3), pela

desprotonação da amina, como ilustra a Figura 2.3. Seu pKa é altamente dependente do grau de desacetilação, que por sua vez influencia as propriedades estruturais físico-químicas (massa molar, alongamento na ruptura e resistência à tração) e biológicas (principalmente as propriedades cicatrizantes da quitosana) (Dash *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010; Chatelet *et al.*, 2001).

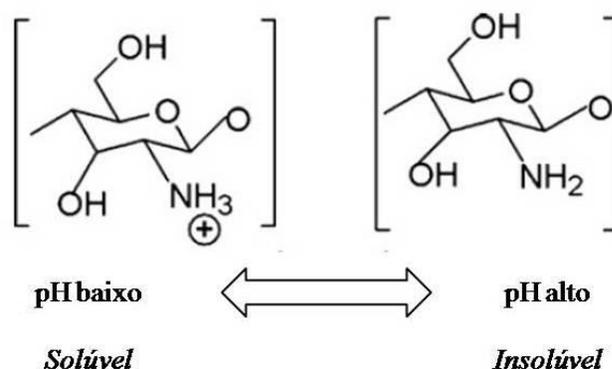


Figura 2.3 – Em condições de baixo pH (menor que 6,0) ocorre a protonação dos grupamento amino, conferindo à molécula comportamento de policação. Em pH alto (acima de 6,5) o grupo amino é desprotonado, ocasionando a insolubilidade da quitosana (Dash *et al.*, 2011).

O grau de desacetilação é definido em termos do percentual de grupos amino primários existentes na cadeia de quitosana. O grau de desacetilação da quitosana comercialmente disponível varia entre 70 e 95% e sua massa molar, entre 10 a 1000 kDa (Malafaya *et al.*, 2007).

Segundo Regiel *et al.* (2013) a atividade anti-microbiana da quitosana é proporcional ao seu grau de desacetilação. Um alto grau de desacetilação indica que há um maior número de grupos protonados, os quais interagem com as paredes negativamente carregadas dos microorganismos. Assim, a atividade anti-microbiana da quitosana é fortemente afetada pelo pH, sendo mais elevada em condições de baixo pH.

Uma vez que, em meio ácido, a quitosana, se comporta como um polieletrólito, por apresentar uma alta densidade de cargas positivas (uma por unidade de glicosamina), pode

interagir com biomoléculas que apresentam cargas negativas, tais como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos (Dallan, 2005).

Economicamente, as fontes mais viáveis de quitina e quitosana são os descartes industriais do processamento de crustáceos, destacando-se os caranguejos, camarões e lagostas. No exoesqueleto desses invertebrados a porcentagem de quitina pode variar de 10 a 80%. Nos últimos anos, devido ao aumento na demanda da quitina e quitosana para diferentes utilizações, outras fontes desses biopolímeros estão sendo avaliadas, como por exemplo, a extração de quitina do fungo *Aspergillus niger* utilizado na produção do ácido cítrico. Porém, para produzir quitosana, essa metodologia é mais cara que sua obtenção a partir de crustáceos, tornando-se inviável economicamente. Apesar disso, a quitosana pode ser isolada, sem a necessidade de um tratamento muito danoso ao biopolímero com soluções alcalinas e isso pode apresentar grande importância futuramente (Almeida, 2009). É provável que futuras fontes de quitina e quitosana surjam de inovações biotecnológicas, especialmente considerando-se suas crescentes aplicações médicas (Khor e Lim, 2003).

Diferentes campos utilizam a quitosana, tanto da área industrial (cosméticos, agrícola, alimentícia e tratamento de água), quanto nutricional e da saúde (biofarmacêutica e biomédica). A Tabela 2.3 resume as principais aplicações da quitosana nessas áreas.

Dentre todas as áreas que empregam a quitosana, é na biomédica sua maior aplicação (Azevedo *et al.*, 2007). Nesse campo vem sendo amplamente estudadas as interações específicas da quitosana com componentes da matriz extra celular, o que tem levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia de tecidos, como no reparo da pele, ossos e cartilagens. Testes clínicos mostram que biomateriais baseados em quitosana não resultam em reações alérgicas no corpo humano após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (Khor e Lim, 2003).

A quitosana é um importante constituinte de biomateriais úteis para o tratamento de feridas, uma vez que é capaz de acelerar a cicatrização de lesões e a síntese de colágeno pelos fibroblastos na fase inicial de cicatrização, caracterizando-se como um polímero bioativo (Chen *et al.*, 2012).

Apesar de a quitosana possibilitar a obtenção de membranas e filmes adequados, sua resistência mecânica é baixa, assim como sua capacidade de absorver fluidos corpóreos. Uma alternativa que vem chamando a atenção para auxiliar nessa limitação é a combinação de quitosana com outros materiais (Ávila *et al.*, 2012), tais como: heparina (He *et al.*, 2007), xantana (Veiga e Moraes, 2011; Bellini *et al.*, 2012) e alginato (Rodrigues, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Meng *et al.*, 2010), dentre outros.

Tabela 2.3: Os ramos de aplicação e utilização da quitosana (adaptada de Azevedo *et al.*, 2007; Dallan, 2005 e Ong *et al.*, 2008).

<i>Ramo de aplicação</i>	<i>Uso</i>
Industrial	Tratamento de água, meio de troca iônica
Agricultura	Adubo para plantas, proteção de sementes contra bactérias
Indústria de alimentos	Conservante para molhos, estabilizante de aromas, de gorduras em alimentos e de frutas e verduras perecíveis.
Indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal	Esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental
Saúde humana	Agente absorvedor de gorduras, redutor de colesterol, inibidor de placa dentária, bactericida/antiviral, lentes de contato, sutura cirúrgica, reconstituição óssea, regeneração da pele, curativos hemostáticos, liberação controlada de fármacos, curativos.

2.3.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural linear que, na presença de cátions multivalentes, tem a capacidade de formar gel. É composto por duas diferentes unidades de repetição, (1,4)- α -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- β -D-manuronato (unidade M), em variadas proporções e arranjos seqüenciais (Rodrigues, 2008), como ilustrado na Figura 2.4.

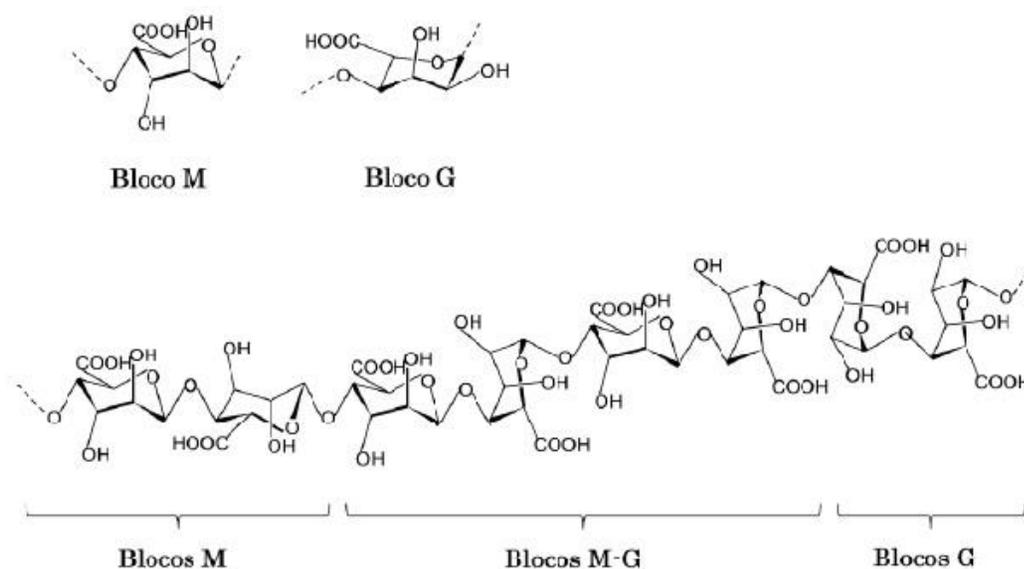


Figura 2.4 – Fórmula estrutural do alginato (adaptado Rodrigues, 2008).

A razão entre as unidades M e G e a quantidade relativa dos segmentos poliméricos varia com a fonte de obtenção. Uma diferença importante é observada na característica dos géis, uma vez que alginatos com maior porcentagem de blocos G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinérese (perda de água para o meio externo). Já os géis com maior porcentagem de blocos M são mais elásticos e dificilmente sofrem senérese (Segato, 2007). O alginato é quimicamente estável a valores de pH entre 5 e 10 e os valores de pKa dos resíduos M e G são de 3,38 e 4,4, respectivamente (Meng *et al.*, 2010).

Os alginatos comerciais podem ser extraídos de diversos tipos de algas, principalmente de três espécies de algas marrons, *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% do seu peso seco. As algas da espécie *Macrocystis pyrifera* são tidas como as principais produtoras desse polímero natural (Rodrigues, 2008). Além disso, o alginato pode ser produzido como um polímero exocelular por bactérias como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas* (Maurstad *et al.*, 2008).

O processo básico de obtenção do alginato e seus sais começa com sua extração alcalina (com carbonato de sódio) da massa de algas, obtendo-se um extrato composto de alginato de sódio solúvel e resíduos insolúveis de algas, que são separados por filtração. À solução de alginato de sódio pode ser adicionado cloreto de cálcio ou ácido clorídrico, precipitando o polímero na forma de alginato de cálcio ou ácido algínico, respectivamente (Segato, 2007).

A estrutura química e as propriedades físicas do alginato proporcionam muitas aplicações comerciais, como na indústria de alimentos e bebidas, indústrias farmacêuticas entre outras. A Tabela 2.4 resume o papel funcional do alginato em algumas aplicações comuns.

Curativos baseados em alginato são bem conhecidos tanto na literatura quanto do ponto de vista comercial (Goh *et al.*, 2012), por possuírem muitas características vantajosas. Os curativos de alginato atuam tipicamente por troca iônica entre os íons cálcio da solução de alginato e os íons de sódio do exsudato, formando um gel. O gel formado mantém um microambiente úmido na lesão, o que facilita a cicatrização e minimiza a infecção bacteriana no local. Estas funções podem promover a formação de tecido de granulação, epitelização rápida e a cura (Lee e Mooney, 2012). Além do mais, o meio úmido contribui para a manutenção da temperatura corpórea em níveis adequados, promove a diminuição da dor do paciente, evitando traumas na troca do curativo.

De acordo com Paul e Sharma (2004), a capacidade de gelificação dos alginatos auxilia na remoção das coberturas preparadas a partir deste composto, uma vez que estas não aderem ao leito da lesão, o que diminui a dor e o trauma associados às trocas de curativo. Em pacientes queimados, o uso de curativos contendo alginato pode promover redução da dor pelo bloqueio dos terminais nervosos e acelerar o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxertos.

Tabela 2.4 – Função do alginato em algumas aplicações comuns (adaptado de Goh *et al.*, 2012).

<i>Aplicação</i>	<i>Função</i>
Bebidas	Estabilizantes e espessantes
Sorvetes	Estabilizantes e espessantes
Geléia	Estabilizantes e espessantes
Produção de etanol	Material de encapsulação de células de levedura
Cultura de células e transplantes	Material de encapsulação
Material odontológico	Molde
Comprimidos	Agente adesivo, liberação sustentada
Curativos	Agente hemostático e absorvente
Papel	Agente adesivo e de preenchimento
Tintas	Estabilizador e agente de suspensão
Creme dental	Estabilizador e espessantes

Quando em solução e em determinadas condições de pH (geralmente acima de 3,7), o alginato possui resíduos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) livres, ou seja, carga líquida negativa, sendo capaz de interagir ionicamente com outros polímeros com carga líquida positiva, como por exemplo a quitosana, e formar complexos polieletrólitos (PEC) com propriedades adequadas visando a produção de curativos e de outros dispositivos biocompatíveis e biodegradáveis (Girata, 2011), os quais serão brevemente discutidos a seguir.

2.3.3 Complexo de polieletrólitos de quitosana e alginato

Os complexos polieletrólitos são obtidos por mistura de soluções aquosas de dois polímeros que apresentam cargas opostas. A formação destes complexos é conduzida, principalmente, por um mecanismo eletrostático mediado por um contra-íon multivalente que

induz atração entre os segmentos separados e os polieletrólitos. Um grande número desses compostos têm sido estudados e caracterizados devido sua ampla variedade de aplicações em medicina, tecnologia, entre outras (Marón *et al.*, 2004; Sankalia *et al.*, 2007).

A formação dos complexos polieletrólitos depende diretamente do pH, da força iônica das soluções, da densidade de cargas dos polímeros, das concentrações e do meio reacional (Il'ina e Varlamov, 2005). Segundo Chellat *et al.* (2000), a interação iônica proveniente da complexação polimérica possibilita variar as características relativas à sensibilidade ao pH, permitindo a imobilização de células, agentes terapêuticos e enzimas.

A formação deste tipo de complexo reduz a tendência de intumescimento em soluções aquosas, além de melhorar a resistência estrutural e a estabilidade mecânica. Diante destas características, tem crescido um interesse considerável nos PECs de quitosana e alginato, que são utilizados sob diversas formas, tais como em suportes tridimensionais para o cultivo celular (*scaffolds*) (Li *et al.*, 2009), membranas (Bueno e Moraes, 2011), fibras (Jayakumar *et al.*, 2011) e microcápsulas (Goh *et al.*, 2012).

Os PECs baseados em quitosana e alginato são de grande valor prático e amplamente utilizados na investigação científica. A principal interação desse complexo é a atração eletrostática. Os grupos carboxílicos desprotonados do alginato podem interagir com os grupos amino protonados da quitosana, formando o PEC. Podem também estar envolvidas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Krayukhina *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011).

Em condições de elevado pH, a interação entre o alginato e a quitosana é comprometida, assim como em baixo pH, como mostra a Figura 2.5. Isso ocorre porque há preponderância de ionização do alginato e da quitosana isolados, respectivamente, nestas condições (Girata, 2011). Nesse sentido, para promover a formação de um PEC estável, a quitosana e o alginato devem estar parcialmente protonados e isso ocorre em valores intermediários aos valores de pKa da quitosana (pKa em torno de 6,5) e do alginato (pKa entre 3,4 e 4,4) (Yan *et al.*, 2000).

Os complexos polieletrólitos podem ser reforçados, em relação à resistência mecânica, através da adição de íons multivalentes que interagem com grupos não complexados, induzindo a

formação de sistemas ligados ionicamente, como por exemplo, pelo íon Ca^{++} , que pode ser adicionado em complexos de quitosana misturada a alginato e pectina (Berger *et al.*, 2004).

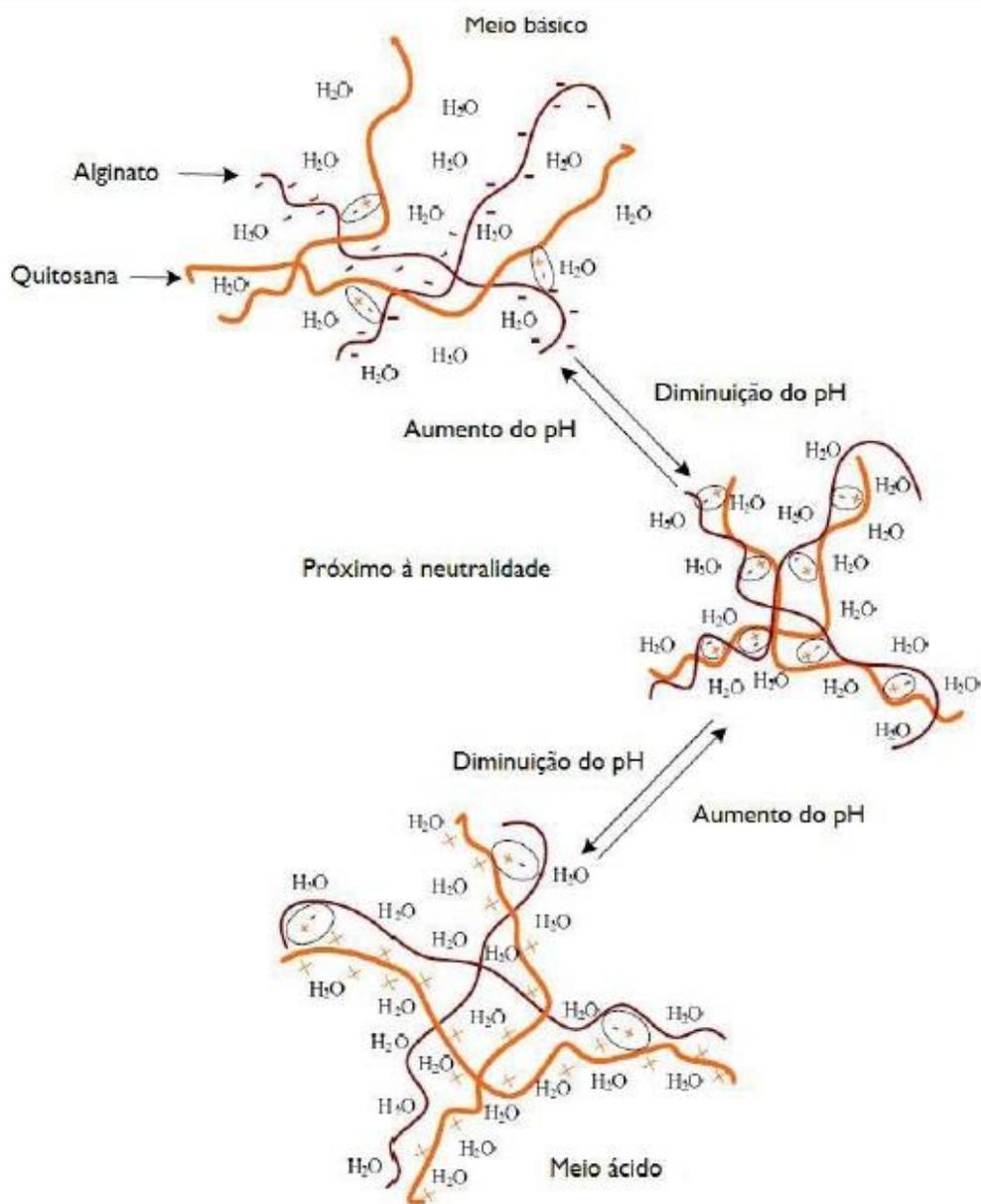


Figura 2.5 – Efeito do pH na distribuição de cargas de polieletrólitos de quitosana e alginato. As elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato e as cargas positivas da quitosana (adaptado de Rodrigues, 2008).

Nesse sentido, Bueno (2010) analisou a influência de diferentes tipos de agentes iônicos reticulantes (íons cálcio e sulfato isolados e em conjunto) nas características de membranas de quitosana e alginato. A reticulação iônica demonstrou ser uma estratégia eficiente, requerendo baixas concentrações de íons cálcio e sulfato isolados, uma vez que o aumento das mesmas levou a membranas com menor resistência à tração e alongamento na ruptura. A autora testou também a reticulação covalente de grupos amino livres com glutaraldeído, mas neste caso, as membranas se mostraram muito quebradiças, confirmando a adição de íons como a melhor estratégia de reforço às membranas de quitosana e alginato dentre as testadas.

Os PECs formados por quitosana e alginato são geralmente redes biocompatíveis que exibem características de intumescimento particulares. A rede polimérica pode ser caracterizada como um micro ambiente hidrofílico com alta quantidade de água e alta densidade de cargas elétricas (Rodrigues, 2008). De acordo com Yan *et al.* (2000), esse complexo quitosana-alginato é insolúvel em água e apresenta maior efetividade em controlar a liberação de materiais incorporados a ele, quando comparado aos incorporados nos mesmos polímeros isolados.

Segundo Bueno (2010), o PEC de quitosana-alginato é biocompatível, estável e apresenta degradação relativamente lenta no organismo. Este complexo pode ser processado de diversas formas, como na confecção de membranas com uma ou mais camadas (Jayakumar *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2013) ou na forma de esponjas (Murakami *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2009) para aplicação no tratamento de lesões de pele de difícil cicatrização e também na produção de partículas (Sankalia *et al.*, 2007; Goycoolea *et al.*, 2009).

No tratamento de lesões de pele, o complexo de quitosana e alginato pode ser empregado para a produção de membranas flexíveis, finas, transparentes e mais eficientes do que os curativos convencionais (Paul e Sharma, 2004). Assim, a incorporação de compostos com atividade antimicrobiana, como a prata, em membranas de quitosana e alginato consiste em uma estratégia relevante para aplicações como curativos em feridas infectadas (Girata, 2011).

2.4 Uso de agentes antimicrobianos em lesões dérmicas

O tratamento de feridas e queimaduras é importante, especialmente nos casos em que a lesão é dolorosa e pode desfigurar ou mesmo ameaçar a vida do paciente. A infecção é uma das principais complicações de feridas cutâneas, uma vez que qualquer lesão de pele tem grande potencial de invasão por microrganismos. Nesse sentido, há a necessidade de um tratamento adequado da ferida para prevenir ou controlar contaminações. Para tratar uma infecção, agentes antimicrobianos e antibióticos vêm sendo incorporados em curativos. Na prática clínica o antibiótico é normalmente administrado por via oral ou parenteral, no entanto, esses fármacos podem resultar em toxicidade sistêmica e resistência ao fármaco (Liu *et al.*, 2012).

Devido ao aumento da resistência a antibióticos, a utilização de antimicrobianos em feridas vem sendo avaliada, uma vez que estes possuem ação menos específica, minimizando o desenvolvimento de resistência (Green, 2012). A Tabela 2.5 lista os antimicrobianos tópicos mais comuns utilizados no tratamento de feridas e suas formas de apresentação típicas.

Quando em contato direto com a lesão, alguns antimicrobianos são rapidamente inativados na presença de exsudato. Assim, é preferível sua incorporação em curativos que permitam sua liberação lenta e contínua. Neste ponto de vista, o uso de polímeros para incorporação e dispersão destes compósitos é uma boa alternativa devido à sua natureza química, morfologia e estrutura específica com cadeias poliméricas longas (Green, 2012; Dallas *et al.*, 2011), que possibilitam não só a proteção do agente antimicrobiano, mas eventualmente o controle de sua liberação.

Com frequência, produtos bioativos são incorporados em matrizes poliméricas. Numerosos sistemas de liberação de drogas estão já descritos na literatura, nos quais o princípio ativo a ser incorporado pode estar ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (Wang *et al.*, 2000). A incorporação em matrizes poliméricas pode ser feita em diversas etapas do processo de produção, tais como: impregnação a úmido (técnica de absorção do solvente contendo o agente ativo), mediada por fluidos supercríticos e adição durante a complexação dos polímeros (Grassi e Grassi, 2005; Duarte *et al.*, 2009; Girata, 2011).

Tabela 2.5: Exemplos de agentes antimicrobianos tópicos comumente utilizados no tratamento de lesões, suas principais características e formas de apresentação (adaptado de Green, 2012).

<i>Antimicrobiano tópico</i>	<i>Formulação</i>	<i>Características</i>
Ácido acético	Solução	Efeito contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Clorexidina	Solução, pó e curativos impregnados	Pode ser usado como alternativa no tratamento de pacientes alérgicos a iodo.
Peróxido de hidrogênio	Solução e creme	Deve haver precaução quando utilizado na forma de solução, casos de embolia gasosa têm sido descritos.
Iodo	Solução, creme, spray, pó, curativos impregnados	Produtos modernos liberam lentamente níveis baixos de iodo, reduzindo a probabilidade de toxicidade e coloração do tecido.
Polihexametileno biguanida (PHMB)	Solução e curativos impregnados	Utilizado principalmente para queimaduras.
Íons prata	Creme e curativos impregnados	Curativos funcionam como depósitos de prata e a liberam quando em contato com a ferida.

O uso da prata tem conquistado importância como um eficaz agente antimicrobiano por não resultar em resistência das bactérias, uma vez que é um dos elementos mais tóxicos para os micro-organismos. Devido à atividade antimicrobiana, existem diferentes produtos incorporados com prata no mercado e estes podem ser genericamente classificados em dois grupos: íons prata e prata metálica. Enquanto a prata metálica é relativamente inativa, os íons prata são eficazes contra uma grande variedade de bactérias. Quando em baixas concentrações, os íons prata se acumulam no interior das células e podem se ligar a componentes negativamente carregados das proteínas e ácidos nucleicos, efetuando assim alterações estruturais nas paredes celulares,

membranas e ácidos nucleicos de bactérias, que afetam seriamente a atividade microbiana (Qin *et al.*, 2006; Regiel *et al.*, 2013).

Por apresentar atividade microbicida em baixas concentrações, a prata é descrita como oligodinâmica. A ação inibitória da prata pode ser atribuída a sua forte interação com grupos tiol, presentes nas enzimas respiratórias das bactérias. Sua interação com grupos sulfidril livres pode, também, levar à inativação da enzima fosfomanose isomerase (Kirsner *et al.*, 2001; Atiyeh *et al.*, 2007).

Para que seja biologicamente ativa, a prata deve estar na sua forma solúvel como Ag^+ ou aglomerados de Ag^0 . Para uma melhor eficácia das propriedades da prata, esta deve estar bem dispersa sobre a superfície do polímero em que foi incorporada, sem que forme grandes agregados, pois isto pode reduzir drasticamente o efeito antimicrobiano da prata (Dunn e Edwards-Jones, 2004; Dallas *et al.*, 2011).

Na medicina, a prata é amplamente empregada por seus efeitos profiláticos, antibacterianos e antiinflamatórios, por ajudar na regeneração tecidual e por controlar granulomas e sangramento nasal. Na Figura 2.6 são apontados alguns empregos da prata na área médica.

A liberação da prata nos curativos quando em contato com os exsudatos das lesões pode ocorrer por meio de três mecanismos: pela troca dos íons prata com os íons sódio e cálcio encontrados no exsudato, pela quelação dos íons prata com moléculas de proteínas presentes no exsudato, e pela migração das partículas de prata, que podem se destacar da matriz do curativo e serem transportados para o exsudato (Qin, 2005).

Visto que dispositivos formados por quitosana e alginato podem ser eficientemente utilizados na liberação controlada de variados agentes bioativos, Meng *et al.* (2010) investigaram as características e propriedades de membranas com diferentes concentrações de quitosana e alginato incorporando sulfadiazina de prata durante o processo de mistura dos polímeros. Os autores perceberam que a taxa de liberação de sulfadiazina de prata foi maior quando a proporção de alginato foi de 50% em relação à quitosana, no entanto, na proporção de 1:1 foi observada maior viscosidade da solução de complexação de quitosana e alginato. As propriedades físicas requeridas, a cinética de liberação, a absorção de água, a facilidade de formulação e a

biodegradabilidade mostraram que o uso do polieletrólito quitosana-alginato é possível para aplicação como curativos para o tratamento de lesões e na liberação controlada de fármacos.

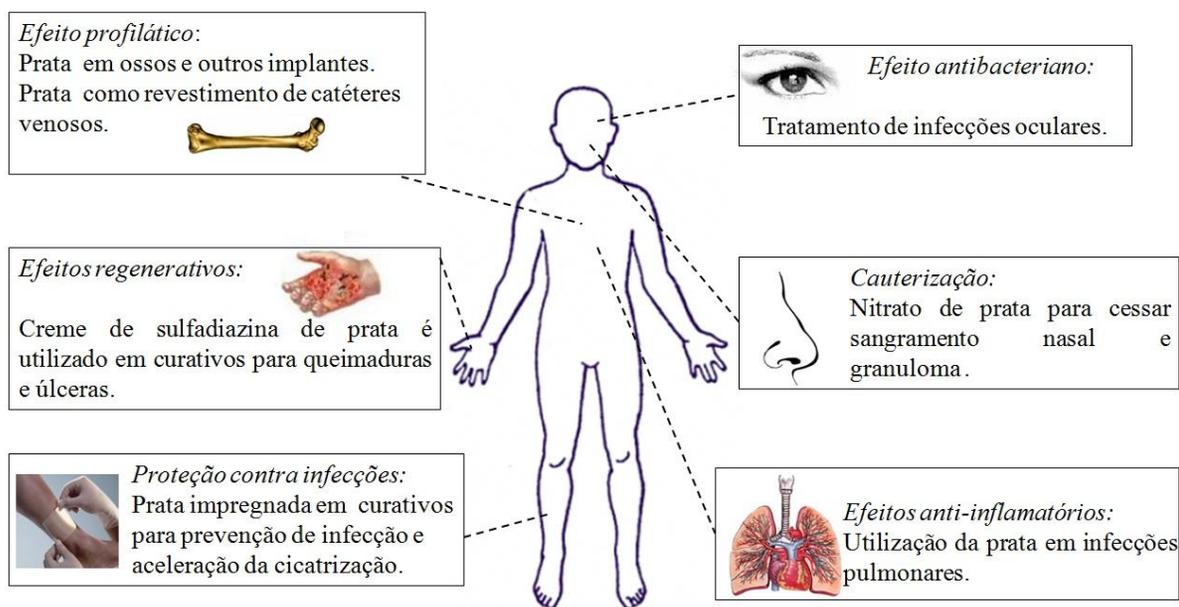


Figura 2.6 – Exemplos do uso da prata na medicina (adaptado de Cioffi e Rai, 2012).

A sulfadiazina de prata é um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, sendo recomendada em lesões de segundo e terceiro grau. É facilmente aplicada e removida e não provoca dor. Porém, o uso desse antimicrobiano pode causar efeitos colaterais, tais como episódios de discreta leucopenia (diminuição de glóbulos brancos no sangue) depois de poucos dias de uso e alergia em menos de 5% dos pacientes. Além disso, pode ser tóxica para queratinócitos e fibroblastos (Ferreira *et al.*, 2003).

Alternativamente ao emprego da sulfadiazina de prata, Girata (2011) desenvolveu membranas de quitosana e alginato contendo diferentes concentrações de prata estabilizada na forma do antimicrobiano comercialmente conhecido como AlphaSan[®] RC2000. A eficiência de incorporação foi de até 99%. As membranas apresentaram eficácia contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, citotoxicidade *in vitro* moderada a fibroblastos e foram

classificadas como não irritantes e não sensibilizantes. Além do mais, as membranas foram capazes de liberar até 100% de prata presente em sua estrutura em sete dias, dependendo da concentração inicial de agente antimicrobiano incorporado. A autora aponta que o produto é seguro e apresenta elevado potencial para o uso em curativos e por estas razões tais dispositivos foram selecionados para este trabalho, visando-se melhorar algumas de suas deficiências. Algumas características relevantes do AlphaSan[®] RC2000 serão apresentadas a seguir.

2.4.1 AlphaSan[®] RC2000

O AlphaSan[®] é um aditivo antimicrobiano baseado em fosfato hidrogenado de zircônio de sódio, $\text{NaZr}_2(\text{PO}_4)_3$, contendo prata. A prata é o componente ativo e é eficaz contra um largo espectro de microorganismos que provocam problemas na cicatrização (Schrijver *et al.*, 2007). Comercialmente, é encontrado como AlphaSan[®] RC5000, AlphaSan[®] RC7000 e AlphaSan[®] RC2000, dependendo da quantidade de prata. A Tabela 2.6 indica a composição de cada um dos tipos de AlphaSan mencionados.

Tabela 2.6: Formas de AlphaSan[®] comercialmente encontrados e suas composições (adaptado de Milliken Chemical, 2002; Girata, 2011).

<i>AlphaSan[®]</i>	<i>Composição</i>
AlphaSan [®] RC5000	3,8% de prata. Fórmula molecular: $\text{Ag}_{0,18}\text{Na}_{0,57}\text{H}_{0,25}\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3$
AlphaSan [®] RC7000	Blenda de 31% de AlphaSan [®] RC2000 e 69% de óxido de zinco.
AlphaSan [®] RC2000	10% de prata. Fórmula molecular: $\text{Ag}_{0,46}\text{Na}_{0,29}\text{H}_{0,25}\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3$

Por apresentar alta concentração de prata, o AlphaSan[®] RC2000 é um dos candidatos de maior interesse para a incorporação em curativos. Este antimicrobiano pode permanecer em suspensão em misturas viscosas, não sendo observada incompatibilidade deste com outros materiais. Foi registrado para ser usado em materiais poliméricos em contato com alimentos, água e em outros tipos de dispositivos poliméricos, no entanto sua faixa de concentração deve estar entre 0,1 e 2,0% em peso (Milliken Chemical, 2002).

A prata é liberada desse composto por meio de troca iônica com os íons sódio. Em contato com o sódio presente no exsudato de feridas, o AlphaSan[®] libera de forma contínua íons prata, provendo proteção contra um amplo espectro de bactérias e fungos.

O AlphaSan[®] RC2000 é um composto em pó, de coloração esbranquiçada, inodoro, estável à temperatura ambiente, praticamente insolúvel em água ($2,6 \times 10^{-4}$ g/L à 20 °C) e com 99% de pureza. Assemelha-se a cristais em forma de cubo, com tamanho médio de partícula de cerca de um micrômetro. Nas Figuras 2.7 e 2.8 estão indicadas a micrografia do composto em pó e a estrutura tridimensional do AlphaSan[®] RC2000, respectivamente.

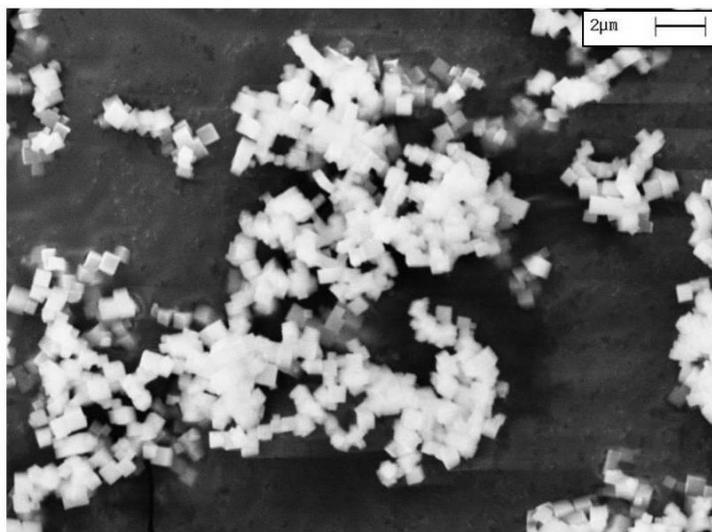


Figura 2.7 – Micrografia do composto AlphaSan[®] RC2000 em pó.

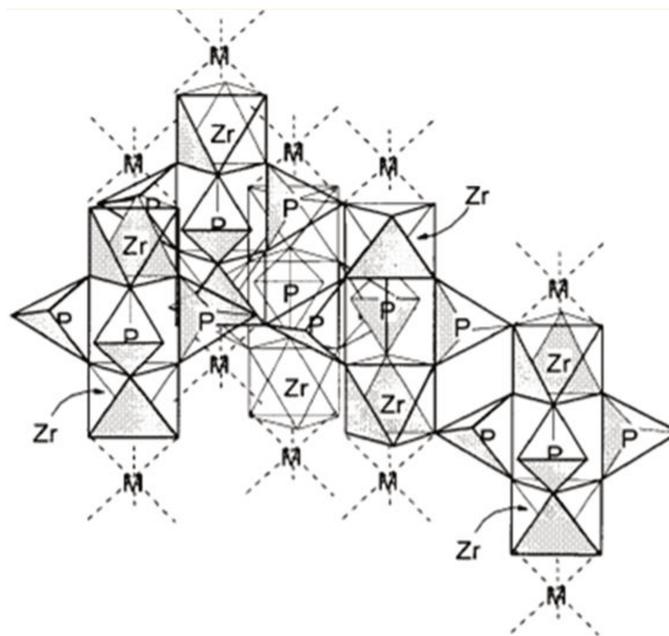


Figura 2.8 – Estrutura tridimensional do AlphaSan[®] RC2000, onde M representa os íons metálicos sódio, prata e hidrogênio (NICNAS, 2004).

Diversos curativos possuem AlphaSan[®] em sua composição, como por exemplo, os curativos MaxSorb[®] Extra Ag (Medline Industries, Inc), Select Silver (Milliken & Medical), a espuma de poliuretano Comfeel (Coloplast Co.) e as fibras de alginato com prata Invacare (Invacare Co.). Estes materiais, no entanto, são formulados na forma de fibras, muitas vezes requerendo o uso de curativos secundários (como é o caso das fibras compactadas dos absorventes MaxSorb[®] Extra Ag e Invacare) para possibilitar sua fixação na região lesada.

O AlphaSan[®] RC5000 pode atuar como um reservatório de prata quando se visa a liberação sustentada de íons de prata, permitindo sua aplicação por períodos prolongados. Quando em contato com a solução salina normal ou soro humano, o composto libera íons prata por meio de troca iônica com os íons sódio presentes no exsudato da lesão, provendo proteção contra um amplo espectro de bactérias e fungos (Qin *et al.*, 2006; Qin, 2005).

Girata (2011) incorporou o AlphaSan[®] RC2000 em membranas de quitosana e alginato e observou que as membranas constituídas na ausência do antimicrobiano não apresentaram atividade antimicrobiana. Em contrapartida, a membrana preparada na presença de 1,1% de prata

apresentou eficácia antimicrobiana satisfatória contra as cepas testadas, com adequação potencial de uso na aplicação em feridas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Porém, a autora observou que houve uma distribuição heterogênea do composto ao longo da espessura das membranas, com aglomeração de partículas na estrutura, o que, entre outros problemas, prejudica o comportamento do dispositivo com relação às propriedades mecânicas, tornando-o mais susceptível à ruptura quando de sua exposição a tensões cisalhantes.

2.5 Alternativas para reforço nas propriedades mecânicas de curativos polissacarídicos

Muitas alternativas vêm sendo analisadas para melhorar a resistência mecânica e a flexibilidade de membranas polissacarídicas, uma vez que o baixo desempenho neste quesito gera limitações, que podem consistir em problemas, por exemplo, durante o manuseio e a estocagem do material.

Dentre essas alternativas tem-se a adição de plastificantes. Plastificantes agem através da redução das forças intermoleculares, reduzindo a rigidez da estrutura do filme e aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, melhorando assim as propriedades mecânicas. Os agentes plastificantes mais utilizados são glicerol, sorbitol, eritrol, ácido lático e polietilenoglicol (Veiga, 2009).

Rodrigues (2008) incorporou glicerol durante o preparo de coacervados de quitosana-alginato, como mostra o fluxograma do processamento na Figura 2.9. Porém o uso deste agente plastificante não se mostrou eficiente para melhorar tal propriedade, uma vez que houve remoção do glicerol nas etapas de lavagem das membranas. Tem-se como estratégia mais promissora o emprego do glicerol no meio de estocagem dos curativos, minimizando assim problemas com ruptura precoce e indesejada e reduzindo seu encolhimento (Rodrigues, 2008; Dallan, 2005).

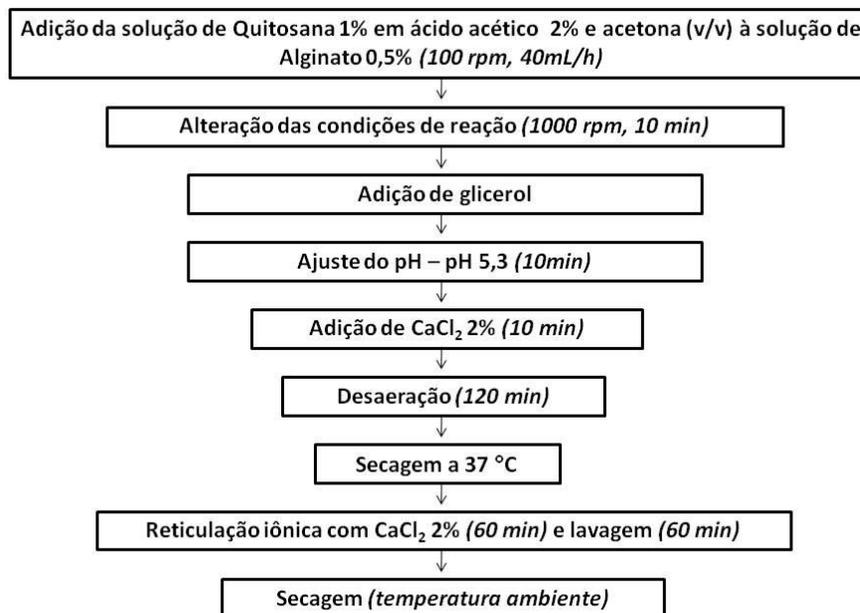


Figura 2.9 – Fluxograma da produção das membranas de quitosana e alginato contendo glicerol (adaptado de Rodrigues, 2008).

Nessa mesma perspectiva, Bueno (2010) testou a adição de agentes reticulantes iônicos e covalentes com o intuito de promover interações em maior número ou mais intensas entre as cadeias poliméricas da membrana de quitosana e alginato. Baixas concentrações de reticulantes iônicos mostraram ser estratégias mais efetivas e promissoras, uma vez que o aumento da concentração levou a membranas com menor resistência à tração e alongamento na ruptura. Uma segunda alternativa utilizada pela autora foi o uso de surfatantes, tais como Tween 80 e Pluronic F68, para obtenção de melhor dispersão dos agregados poliméricos. As membranas se mostraram satisfatórias do ponto de vista do seu aspecto e maleabilidade, porém sua resistência mecânica e alongamento na ruptura também foram baixos.

Uma alternativa proposta neste trabalho é a utilização de um agente siliconado na confecção de curativos de quitosana e alginato. As propriedades e características de polímeros desta categoria serão discutidas a seguir.

2.5.1 Elastômeros de silicone

Silicones representam uma categoria de polímeros sintéticos cuja cadeia principal é caracterizada por repetidas ligações de silício-oxigênio (Si-O). O átomo de silício pode ainda se ligar a grupos orgânicos, como por exemplo, metil, fenil, vinil e trifluoropropil. Quando se liga ao grupamento metila, é denominado polidimetilsiloxano (PDMS), que é um elastômero de silicone muito utilizado em diversas aplicações (Hassler *et al.*, 2011), a Figura 2.10 mostra a estrutura do PDMS.

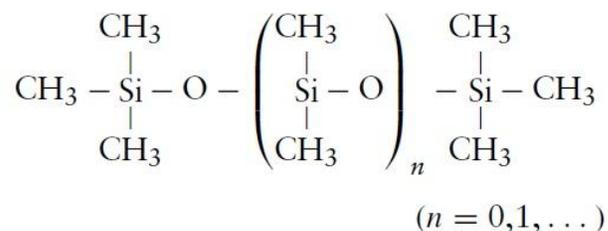


Figura 2.10 – Fórmula estrutural do polidimetilsiloxano (Ratner *et al.*, 2004).

O PDMS é conhecido como um dos polímeros mais flexíveis devido às características estruturais das ligações Si-O, uma vez que há um comprimento de ligação maior e, conseqüentemente, um maior ângulo de contato (Mani, 2011). Além disso, é caracterizado por possuir ligações químicas fortes e somente ácidos fortes e bases fortes são capazes de despolimerizar a cadeia siloxano. Assim, devido à baixa rigidez, este polímero permite que os grupamentos metila fiquem expostos na região externa da cadeia, e, como resultado, os polidimetilsiloxanos são caracterizados por baixas interações intermoleculares (Colas e Corning, 2001).

Segundo Ratner *et al.* (2004), polímeros de silicone podem ser facilmente transformados em uma rede tridimensional por meio de uma reação de reticulação, o que permite a formação de ligações químicas entre cadeias adjacentes. A maior parte dos elastômeros de silicone podem ser reticulados das seguintes formas: reticulação com radicais (efetiva somente com a presença de

grupos vinil na cadeia polimérica), reticulação por condensação (mistura de dois componentes, como por exemplo, hidroxí terminal e um tetra-n-propoxissilano) e reticulação por adição (combinação de dois componentes, com reticulação através dos carbonos terminais dos polímeros catalisada pela platina ou outros complexos metálicos presentes na mistura).

O Silpuran[®] 2130 A/B, por exemplo, é um polidimetilsiloxano que possui grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva nos dois componentes da mistura (A e B), e é no Silpuran[®] 2130 A que são encontrados os catalisadores de platina. Este é um produto siliconado que se caracteriza por baixa viscosidade, alta adesividade, biocompatibilidade e transparência, sendo comercializado pela Wacker Chemie S.A. para aplicações em lesões.

Os elastômeros de silicone vêm sendo utilizados há anos em aplicações biomédicas, como na fabricação de próteses, órgãos artificiais, materiais dentários, dispositivos cirúrgicos e em matrizes para transporte de drogas. Estas aplicações são devidas às suas propriedades, tais como: bioestabilidade, biocompatibilidade, alta adesividade, não-irritabilidade, não-toxicidade, permeabilidade a gás e hidrofobicidade (Borde *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

Para confecção de curativos para lesões de pele, os compostos siliconados vêm sendo bastante utilizados devido à propriedade adesiva, característica esta requerida de curativos para uso por tempo prolongado. No entanto, o curativo não deve causar danos à pele durante sua utilização e remoção. Assim a adesividade, juntamente com a hidrofobicidade dos agentes siliconados, permitem que o curativo à base deste composto adira à pele, mas não à ferida, gerando maior alívio ao paciente (Fawcett *et al.*, 2010; Borde *et al.*, 2012).

Segundo Colas e Corning (2001), quando há incorporação de fármacos em matrizes compostas por PDMS, o agente ativo pode ser homogeneamente distribuído em toda matriz e lentamente liberado por difusão a partir da superfície externa do dispositivo, ou seja, a superfície que estará em contato com a lesão. Além do mais, os curativos a base de silicone são muito confortáveis para o paciente e não resultam em maceração da pele.

Não foram localizados relatos na literatura da adição de agentes siliconados em membranas polissacarídicas visando à melhora da resistência mecânica e flexibilidade, o que confere um caráter de ineditismo ao presente trabalho.

Visto que além da limitação quanto às propriedades mecânicas dos curativos de quitosana-alginato, o longo tempo de processamento verificado em escala de bancada consistiria em um entrave à produção das membranas em escala industrial, alguns aspectos estratégicos quanto à ampliação de escala serão abordados a seguir.

2.6 Aspectos relevantes na ampliação de escala da produção de curativos de quitosana e alginato

O número de etapas de processamento de curativos de quitosana e alginato é grande, assim como o tempo de obtenção das membranas é longo, o que não estimula propriamente sua produção industrial. Para tanto, o desenvolvimento de metodologias reprodutíveis e mais facilmente escalonáveis na produção das mesmas é de grande importância.

Nos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (LEBC) (Rodrigues, 2008; Bueno, 2010; Girata, 2011) foram produzidas membranas de quitosana e alginato em um tempo de processo relativamente alto, a começar pelo ajuste do pH necessário para a aplicação dos curativos, feito em duas etapas independentes (durante a complexação dos polímeros e após a secagem das membranas). A etapa de secagem também é longa, uma vez que à temperatura de 37°C, o tempo usual para a secagem total das membranas é cerca de 20 horas.

Nos protocolos de preparo das membranas dos trabalhos do grupo de pesquisa mencionados acima foi utilizada a acetona como solvente da quitosana no intuito de fazer com que este polímero assumisse uma conformação menos estendida, restringindo a taxa de reação entre os dois polieletrólitos, obtendo-se assim coacervados mais homogêneos (Yan, *et al.*, 2000). Bueno (2012), no desenvolvimento de sua tese de doutorado na FEQ/UNICAMP em tema correlato ao deste trabalho, propôs, com base nos trabalhos de Veiga e Moraes (2011) e Bellini *et al.* (2012), a eliminação da adição da acetona. As membranas obtidas na ausência desse solvente apresentaram aspecto melhorado em relação às obtidas na sua presença em termos de homogeneidade. Além disso, com a retirada da acetona do processo conseguiu-se reduzir a quantidade de material empregado na produção das membranas, contribuindo conseqüentemente para a redução do custo de produção, assim como do tempo de secagem pela diminuição da

quantidade de solvente empregado. Por esta razão, tal procedimento foi adotado na condução do presente trabalho.

Outro aspecto importante a ressaltar são as etapas de reticulação iônica que, nos mesmos protocolos de preparo dos curativos de quitosana e alginato citados acima, são feitas em duas etapas independentes (durante a complexação dos polímeros e após a secagem das membranas). Além de alongar o tempo de processamento, o processo de reticulação dificulta a liberação de fármaco e aumenta drasticamente a massa molar do complexo polimérico, o que reduz ainda mais a sua solubilidade em água e retarda o processo de hidratação (Aiedeh *et al.*, 2007). Assim, estudos enfocando tais aspectos são de apreciável relevância.

2.7 Análise conclusiva da literatura consultada

Tendo em vista os tópicos abordados nesta revisão bibliográfica, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novos curativos com boas propriedades cicatrizantes e cujas matérias-primas sejam de fácil acesso e baixo custo. Membranas de quitosana e alginato incorporando o agente antimicrobiano AlphaSan[®] RC2000 representam uma boa alternativa para aplicação no tratamento de lesões de pele com alta produção de exsudato. Porém, há a necessidade de estudos para melhorar suas propriedades mecânicas e facilitar o processo de produção, de forma a diminuir o tempo de processamento do produto e obtê-lo em larga escala.

Várias alternativas vêm sendo estudadas para melhorar as propriedades mecânicas dos curativos de modo que estes possam ser empregados em regiões do corpo humano que requeiram esforço mecânico considerável. Segundo a literatura consultada, o uso de alguns tipos de plastificantes e agentes reticulantes podem não consistir em estratégias muito promissoras para contornar esta limitação. No entanto, nenhum estudo incorporando compostos siliconados em matrizes polissacarídicas foi localizado, constituindo assim um trabalho inédito e que apresenta grande potencial para a obtenção de membranas com melhor aspecto e propriedades mecânicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a obtenção das membranas flexíveis e neutralizadas de quitosana-alginato na presença e ausência do agente antimicrobiano, foram utilizados os seguintes reagentes: quitosana (Sigma-Aldrich, lote número 109K0043V, com grau de desacetilação de 96%), alginato de sódio de baixa viscosidade obtido de algas marrons do tipo *Macrocystis pyrifera* (Sigma-Aldrich Co., lote número 090M0092V), AlphaSan[®] RC2000 (Milliken & Company), Silpuran[®] 2130 A/B (Wacker Chemie AG), ácido acético glacial, cloreto de cálcio dihidratado e hidróxido de sódio (Merck KGaA). A água utilizada em todo o trabalho foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore. O *liner* (suporte de tecido não-tecido ou não tramado, TNT), o AlphaSan[®] RC2000 e o Silpuran[®] 2130 A/B foram gentilmente doados pela empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda. de São José dos Campos –SP.

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação das membranas de quitosana-alginato

A preparação das membranas de quitosana-alginato foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2010) e adaptados por Girata (2011), com modificações visando a neutralização dos dispositivos em etapa única e o aumento da temperatura de secagem, a eliminação das etapas de reticulação e a melhoria das propriedades mecânicas, divididas em três etapas, respectivamente, conforme descrito a seguir.

3.2.1.1. Avaliação da neutralização em etapa única e aumento da temperatura de secagem

Nestes estudos, as membranas de quitosana-alginato foram preparadas na presença e ausência de AlphaSan[®] RC2000 em diferentes condições de pH imediatamente após a

complexação dos polissacarídeos e temperatura, totalizando 6 formulações, conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Formulações e condições de preparação das membranas de quitosana-alginato visando à avaliação dos efeitos da neutralização em etapa única e do aumento da temperatura de secagem.

<i>Formulação</i>	<i>AlphaSan[®]</i>	<i>pH</i>	<i>Secagem</i>	
			<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (h)</i>
A	0%	5,3	37	20
B	0%	7,0	37	20
C	0%	7,0	60	6
D	1,1%	5,3	37	20
E	1,1%	7,0	37	20
F	1,1%	7,0	60	6

Para a obtenção das membranas, foram adicionados 90 mL de solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético a 2% (v/v), com auxílio de uma bomba peristáltica (modelo Minipuls 3, Gilson), a 180 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v) em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm, a uma vazão de 200 mL/h. Durante a adição, o sistema foi mantido a 25 °C utilizando-se um banho ultratermostático (214 M2, Quimis) e sob agitação constante de 500 rpm empregando-se um agitador mecânico (251 D, Quimis) provido de uma hélice do tipo pás inclinadas de raio 2,1 cm. Ao término da adição da solução de quitosana, aumentou-se a taxa de agitação para 1000 rpm, agitando-se a mistura por mais 10 minutos. Em seguida o pH foi corrigido para 5,3 ou 7,0 adicionando-se 16,8 mL de NaOH a 1M ou 13,0 mL de NaOH a 2M, respectivamente. A agitação e a temperatura foram mantidas constantes por mais 10 minutos. Após a etapa de correção do pH, foram adicionados ao sistema 3,6 mL de solução aquosa de CaCl₂ 2% (m/v) para a reticulação primária do alginato não complexado com a quitosana, permanecendo-se nas mesmas condições de agitação e temperatura por 10 minutos mais. O sistema utilizado para a produção do complexo polimérico encontra-se ilustrado na Figura 3.1.



Figura 3.1 – Sistema de produção do complexo polimérico.

Para as formulações contendo AlphaSan[®] RC2000 (formulações D, E e F), sua incorporação foi feita pela adição de 0,2 g do composto em pó à mistura após a etapa de reticulação primária (proporção de 11% de AlphaSan[®] RC2000 na mistura final), resultando em uma concentração de 1,1% de prata em relação à massa total de polímeros na mistura (Girata, 2011). O sistema foi, então, mantido sob agitação constante de 500 rpm à 20 °C durante 5 minutos. Destaca-se que nas formulações preparadas por Girata (2011) houve adição de acetona à solução de partida de quitosana em ácido acético a 2%, procedimento este que foi eliminado no presente trabalho.

As misturas poliméricas obtidas de todas as formulações foram desaeradas em bomba de vácuo (Q-355B2, Quimis) por 120 minutos. Em seguida, o material resultante de cada formulação foi dividido igualmente em termos mássicos em duas placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro e levado à estufa de circulação de ar (modelo 410D, Nova Ética) para secagem por 6 a 20 horas, a 60 ou 37 °C, respectivamente. Para maior homogeneidade da secagem, as formulações foram mantidas em uma plataforma giratória com diâmetro de 25 cm (Autoart) a 3 rpm.

Após a secagem, todas as amostras foram imersas em 150 mL de solução aquosa de CaCl₂ a 2% (m/v) por uma hora e, para a remoção dos íons livres, foram feitas mais duas imersões de

uma hora em 200 mL de água deionizada. A secagem final de todas as formulações foi feita à temperatura ambiente por 24 h. Destaca-se que todas as membranas formuladas na presença de prata foram preparadas sob luz indireta para evitar o escurecimento das mesmas.

Todas as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno (OE) por exposição à Oxyfume-30 (30% de OE e 70% de dióxido de carbono) na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP) sob as seguintes condições: vácuo inicial de 0,4 a 0,6 kgf/cm², temperatura de 50 °C, umidade relativa de 30 a 80%, pressão de 0,5 kgf/cm², 3,5 horas de exposição ao gás. Após a exposição, o vácuo foi restabelecido (0,4 a 0,6 kgf/cm²) e as amostras foram expostas a ar filtrado por 10 minutos. O OE residual foi removido mantendo as amostras sob aeração por 48h. Na Figura 3.2 mostra-se o fluxograma do processamento utilizado.

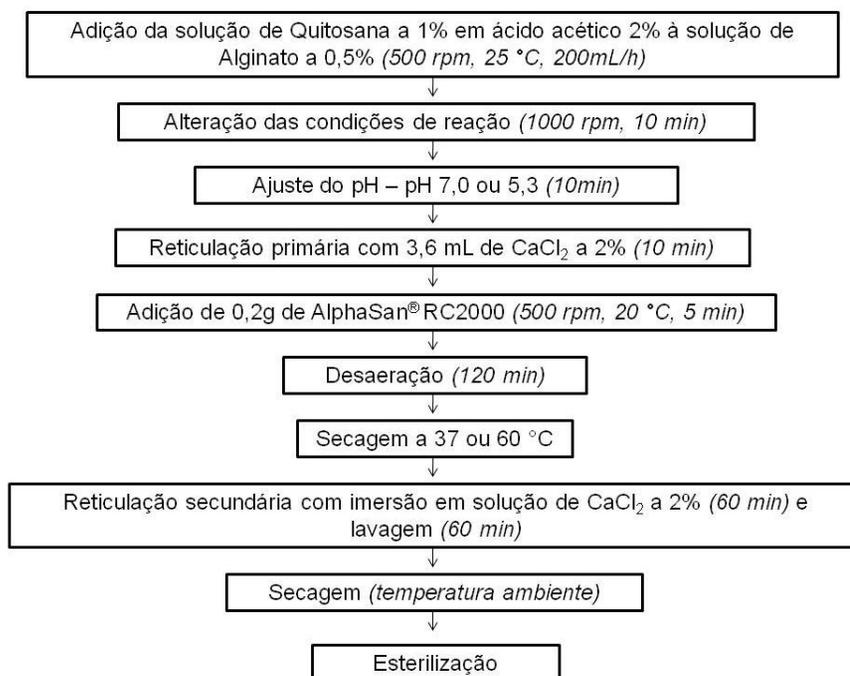


Figura 3.2 – Fluxograma da produção das membranas de quitosana e alginato visando avaliar a viabilidade de neutralização em etapa única e o aumento da temperatura de secagem.

3.2.1.2. Avaliação da eliminação das etapas de reticulação

Nos estudos visando a eliminação das etapas de reticulação com CaCl_2 a 2% (m/v), as membranas de quitosana-alginato foram preparadas segundo descrito no tópico anterior, na presença e ausência de AlphaSan[®] RC2000, com pH corrigido para 7,0 em única etapa, e secas na primeira etapa à temperatura de 60 °C por 6 horas. Após a secagem, foram feitas duas imersões de uma hora em 200 mL de água deionizada, sendo expostas a diferentes procedimentos de reticulação, totalizando 6 formulações, conforme apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Membranas de quitosana-alginato preparadas em distintas formas de reticulação.

<i>Formulação</i>	<i>AlphaSan[®]</i>	<i>Reticulação primária</i>	<i>Reticulação secundária</i>
G	0%	não realizada	não realizada
H	0%	realizada	não realizada
I	0%	não realizada	realizada
J	11%	não realizada	não realizada
L	11%	realizada	não realizada
M	11%	não realizada	realizada

3.2.1.3. Avaliação de estratégias de aumento da resistência mecânica e flexibilidade

Nesta etapa do trabalho foram empregadas duas distintas formas de abordagens para a preparação de curativos à base de quitosana e alginato em combinação com Silpuran[®] 2130 A/B, visando o aumento na resistência mecânica e na flexibilidade. As metodologias utilizadas são descritas a seguir.

3.2.1.3.1. Utilização de *liner* revestido com Silpuran[®] 2130 A/B como suporte da membrana de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®] RC2000

As membranas de quitosana e alginato contendo prata foram preparadas como descrito no item 3.2.1.1, em pH 7,0. Estas foram colocadas de duas formas distintas sobre a superfície de um

liner poroso revestido homogeneamente em sua superfície com 5 mL de Silpuran[®] 2130 A e 5 mL de de Silpuran[®] 2130 B previamente misturados (gel sem cura). Na primeira forma, depositou-se o complexo quitosana-alginato desaerado preparado com reticulação primária e contendo 1,1% de prata sobre o *liner* revestido e, em seguida, o conjunto foi levado à estufa a 60 °C por 6 horas para a secagem do PEC com prata e a cura do gel de silicone. Já na segunda forma de procedimento, a membrana já seca de quitosana e alginato contendo 1,1% de prata submetida às duas etapas de reticulação e foi colocada sobre a superfície do *liner* revestido pelo composto siliconado (gel sem cura) e o dispositivo foi levado à estufa a 60 °C por 3 horas. A Figura 3.3 ilustra a disposição das camadas do dispositivo.

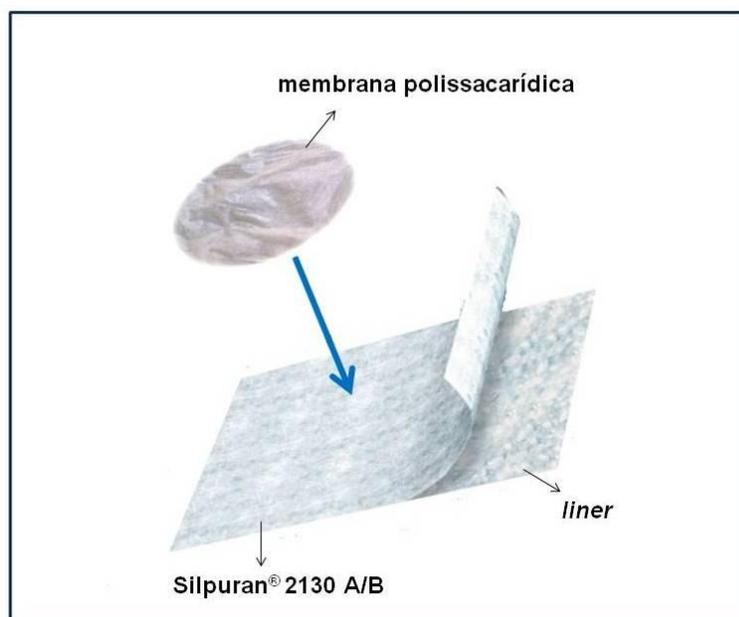


Figura 3.3 – Ilustração da disposição da membrana sobre a superfície do *liner* revestido na face inferior com silicone.

Visto que a reticulação do gel de silicone se dá pela exposição do material à alta temperatura, em ambos os procedimentos se esperava que tal composto atuasse também como um elemento de adesão entre as várias partes do dispositivo em desenvolvimento.

3.2.1.3.2. Incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B durante o processamento das membranas de quitosana e alginato

As membranas foram preparadas segundo descrito no tópico 3.2.1.1, com pH corrigido para 7,0 em única etapa. Com base em ensaios preliminares, a incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B foi feita pela adição de 90 µL de Silpuran[®] 2130 A e 90 µL de Silpuran[®] 2130 B à mistura de polissacarídeos após a etapa de correção do pH, resultando em uma concentração de 10% em relação à massa total de polissacarídeos na mistura, com um intervalo de 5 minutos entre a adição do silicone A e B a 1000 rpm. Após esta etapa, os procedimentos seguintes, como a incorporação ou não de AlphaSan[®] RC2000, a secagem a 60 °C e a lavagem foram feitas como descrito anteriormente.

Visou-se também nesta parte do estudo verificar se o composto siliconado possuía propriedades reticulantes suficientes para que se dispensasse as reticulações com íons Ca⁺⁺. Assim, foram preparadas membranas na ausência das etapas de reticulação, assim como na presença de reticulação primária e secundária e, somente, de reticulação secundária. As formulações preparadas segundo as distintas formas de reticulação estão apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Formulação das membranas de quitosana e alginato preparadas na presença ou ausência de Silpuran[®] 2130 A/B e da etapa de reticulação primária.

<i>Formulação</i>	<i>AlphaSan^{®*}</i>	<i>Silpuran^{®*}</i>	<i>Reticulação primária</i>	<i>Reticulação secundária</i>
N	0%	10%	realizada	realizada
O	0%	10%	não realizada	realizada
P	11%	10%	realizada	realizada
Q	11%	10%	não realizada	realizada

*porcentagens expressas em base seca

A Figura 3.4 mostra o fluxograma das formulações preparadas com Silpuran[®] 2130 A/B, na presença ou ausência de prata e na presença e/ou ausência da etapa de reticulação primária.

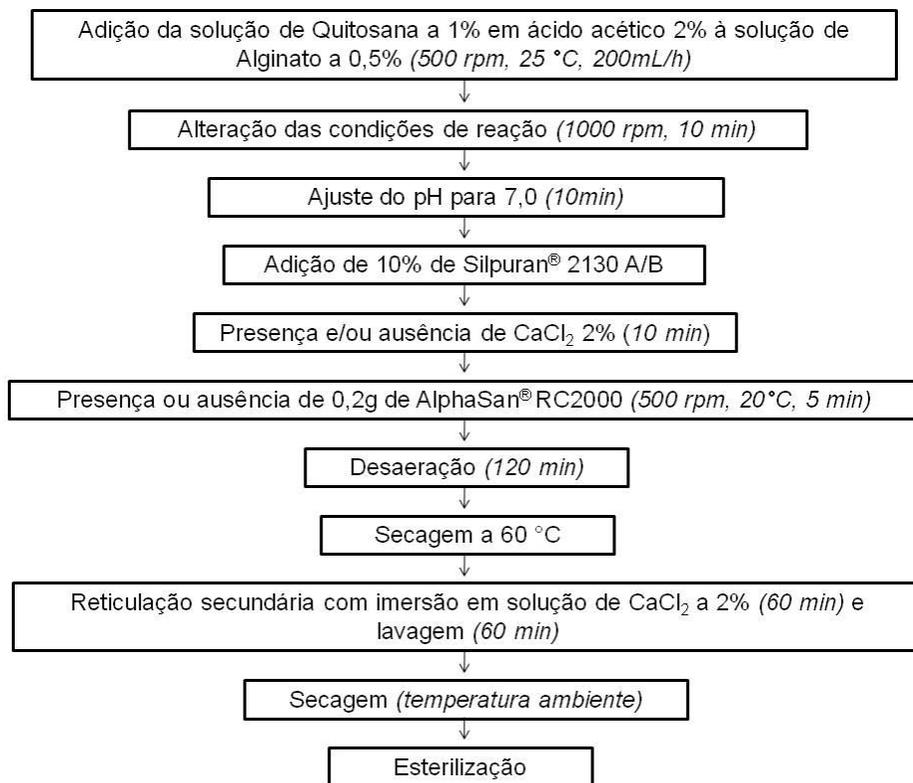


Figura 3.4 – Fluxograma da produção das membranas de quitosana e alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B.

3.2.2. Caracterização das membranas

A caracterização das membranas de quitosana-alginato foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2010) e Girata (2011), conforme descrito a seguir, após armazenamento prévio por pelo menos 24 horas em dessecador contendo sílica-gel ativada.

3.2.2.1. Aspecto das membranas

As membranas foram examinadas quanto ao aspecto a olho nu e fotografadas com câmera digital Canon, modelo Power Shot A410.

3.2.2.2. Morfologia da superfície e da secção transversal

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440, Leica disponível no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC da FEQ/Unicamp).

Amostras de 2 cm x 1 cm foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (Sputter coater Polaron modelo SC 7620, Microtech) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies. Para a avaliação da secção transversal, as amostras foram criofaturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

3.2.2.3. Avaliação da espessura das membranas

As espessuras das membranas secas foram medidas com micrômetro Digimess através de nove medições em diferentes posições ao longo da extensão de cada membrana.

Para medir a espessura das membranas úmidas, estas foram previamente hidratadas por 24 horas em água deionizada a 37 °C e levemente secas com papel filtro antes da realização das medidas.

3.2.2.4. Capacidade de absorção de soluções fisiológicas

A capacidade de absorção das membranas foi determinada por meio do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água (pH 4,9), fluido corpóreo simulado (pH 7,4), soro fetal bovino (pH 7,2) e solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/v) (pH 5,5). A utilização da água foi realizada a fim de se analisar o efeito deste solvente no comportamento das membranas, o fluido corpóreo simulado (FCS) foi empregado visando expor às membranas a uma solução com composição e concentração de sais mais próximas à do corpo humano, enquanto o soro fetal bovino (SFB) tem sua importância por simular um ambiente mais complexo e mais próximo ao sangue animal, e a solução de NaCl por ser usualmente utilizada para a limpeza e hidratação das lesões. O FCS foi preparado de acordo com Kokubo *et al.* (1990), tendo a composição descrita na Tabela 3.4, na qual se apresenta também a composição média do plasma humano para fins comparativos.

Tabela 3.4: Composição iônica do FCS e do plasma humano (Kokubo *et al.*, 1990).

Íon	Concentração (mM)	
	FCS	Plasma Humano
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	148,8	103,5
HCO ³⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

Foram cortados corpos de prova, em triplicata, de 6 cm x 1 cm com massa inicial (M_i) determinada em balança analítica modelo TE214S (Quimis). As amostras foram então imersas em 10 mL das referidas soluções por 24 horas a 37 °C. Após este período, o excesso de solvente foi levemente removido com papel de filtro e as amostras foram novamente pesadas em balança

analítica para a determinação das massas úmidas finais (M_u). A capacidade de absorção (A) de cada solução foi calculada através da Equação 1:

$$A = \frac{(M_u - M_i)}{M_i} \quad \text{(Equação 1)}$$

3.2.2.5. *Perda de massa em soluções aquosas*

Neste ensaio visou-se analisar a estabilidade estrutural das membranas após exposição prolongada a água, solução salina (SS), FCS e soro fetal bovino (SFB).

Corpos de prova de 6 cm x 1 cm, em triplicata, foram pesados em balança analítica para a determinação de sua massa inicial (M_i), sendo então imersos em 10 mL das referidas soluções por sete dias a 37 °C. Após este período, cada amostra foi imersa em 20 mL de água deionizada por 5 minutos por 5 vezes para a remoção de sais, proteínas e outras moléculas adsorvidas diferentes da água. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 37 °C até atingirem massa seca constante (M_f), sendo em seguida armazenadas em dessecador com sílica-gel por pelo menos 24 horas.. Ao final desse período, a perda de massa (P) foi determinada por meio da Equação 2, ressaltando-se que mesmo após prolongado armazenamento no dessecador, pode ainda haver água residual firmemente ligada às amostras.

$$P = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

3.2.2.6. *Avaliação das propriedades mecânicas*

A resistência à tensão e o alongamento na ruptura das membranas foram avaliados segundo o método ASTM D882-95a, utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD) disponível no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos. Dez corpos de prova de 8 cm x 1 cm de cada formulação foram fixados por garras pneumáticas com mordentes de borracha do equipamento, distantes 5,0 cm entre si, uma das

quais foi afastada a uma velocidade de 0,1 cm/s empregando-se uma célula de carga de 5,098 kgf. A resistência à tração (RT) e o alongamento (Al) na ruptura foram calculados através das Equações 3 e 4, respectivamente:

$$RT = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Equação 3})$$

$$Al = \frac{d_r - d_i}{d_i} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde: F_m é a força máxima de rompimento, A_s é a área da seção transversal inicial da amostra, d_i é o afastamento inicial das garras do equipamento (5 cm) e d_r é o afastamento das garras no momento da ruptura.

3.2.2.7. *Análise por espectrometria de energia dispersiva de Raios-X (EDS)*

A espectrometria de energia dispersiva de Raios-X baseia-se na identificação dos Raios-X emitidos pela amostra quando da interação da mesma com o feixe eletrônico. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que permite detectar a presença de elementos presentes na amostra. Outra característica importante desta microanálise é a possibilidade de se obter o mapa de composição química na região observada.

Análises de EDS foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) para detectar a presença de íons cálcio, prata e silício nas amostras. As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de 2 cm x 1 cm e armazenadas por 24 horas em dessecador. Após este período, as amostras foram fixadas em um suporte adequado e suas composições foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 440, Leica.

3.2.2.8. *Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)*

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier no modo ATR foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) para as amostras preparadas somente com reticulação secundária, na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 e Silpuran[®] 2130 A/B. As amostras foram previamente cortadas em dimensões de 2cm x 1cm e mantidas em dessecador por 24 horas. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Nicolet 6700 da marca ThermoScientific. A varredura de absorção foi realizada de 4000 a 675 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 varreduras acumuladas.

3.2.2.9. *Análise estatística*

O software *Statistica 7*[®] foi utilizado para analisar os resultados numéricos referentes às propriedades das membranas, empregando-se o teste de comparação de médias de Tukey com nível de significância de 5%.

Todos os resultados são expressos como a média das medidas experimentais, calculadas com, no mínimo, três amostras independentes. Cada valor médio é acompanhado de seu respectivo erro padrão, indicado para viabilizar comparações entre médias de diferentes populações (Paes, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho referentes à diminuição do tempo de processamento de membranas de quitosana-alginato na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000, visando avaliar a neutralização em etapa única e os efeitos do aumento da temperatura de secagem, e avaliar também a eliminação das etapas de reticulação do processamento. Além disso, serão também mostrados os resultados referentes às formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B, obtidas através de distintas estratégias, visando à melhora nas propriedades mecânicas e na flexibilidade das mesmas.

4.1. Avaliação da neutralização em etapa única e aumento da temperatura de secagem

Neste tópico são discutidos os resultados pertinentes aos estudos sobre neutralização em etapa única durante o processamento das membranas e com relação ao aumento da temperatura de secagem para 60 °C, visando a diminuição do tempo de processamento. As características dos dispositivos formulados para este objetivo são descritas a seguir.

4.1.1. Aspecto das membranas

As membranas produzidas apresentaram os aspectos típicos mostrados na Figura 4.1. Verificou-se que a superfície das formulações C e F obtidas a pH 7,0 e secas a 60 °C por 6 horas (Figuras 4.1c e 4.1f, respectivamente) é aparentemente mais lisa que a das outras formulações. Todas as formulações desenvolvidas na ausência de prata apresentaram diâmetro médio de 12 cm, já as formulações na presença do antimicrobiano alcançaram diâmetro menor, em média 10 cm. Essa diminuição é conseqüência da incorporação do AlphaSan[®] RC2000, que pode ter atuado como um agente reticulante, aproximando as cadeias de polissacarídeos, o que explicaria a redução do diâmetro das membranas.

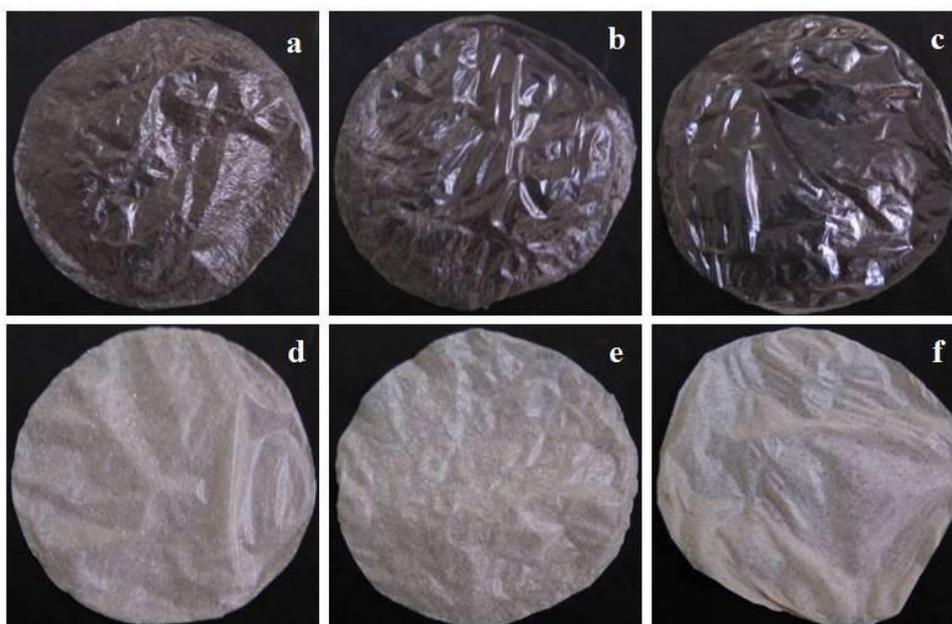


Figura 4.1 – Aspecto visual das formulações preparadas em diferentes condições de pH e temperatura de secagem, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) pH 5,3 e 37 °C; (b) pH 7,0 e 37 °C; (c) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (d) pH 5,3 e 37 °C; (e) pH 7,0 e 37 °C; (f) pH 7,0 e 60 °C.

Neste trabalho não foram feitos testes para elucidar se ocorre a reticulação do antimicrobiano AlphaSan[®] RC2000 com a matriz polimérica. Supõe-se que possa haver ligação de coordenação com a quitosana, uma vez que este polissacarídeo possui a capacidade de atuar como quelante de íons metálicos (Mathur e Narang, 1990). Verma *et al.* (2008), avaliaram através de FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) o efeito da interação da quitosana na estrutura da hidroxiapatita e constataram que o grupo amino da quitosana forma um complexo com o grupo fosfato (PO₄)₃ da hidroxiapatita. Isto também pode ter ocorrido nas formulações contendo o agente antimicrobiano, uma vez que o AlphaSan[®] RC2000 é composto por fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, NaZr₂(PO₄)₃. Assim, esta complexação entre o grupamento amino da quitosana e o grupamento fosfato do AlphaSan[®] RC2000 pode ter contribuído para a contração da estrutura do PEC e, conseqüentemente para a redução do diâmetro dos dispositivos contendo o antimicrobiano.

As membranas de quitosana-alginato desenvolvidas anteriormente por Girata (2011) na presença de diferentes proporções de AlphaSan[®] RC2000, apresentaram aspecto esbranquiçado e homogêneo a olho nu e, ao aumentar a concentração de prata, as membranas tornaram-se mais opacas e sensíveis à luz. De acordo com a autora, a sensibilidade e conseqüentemente o escurecimento das membranas quando em contato com a luz ocorre pela formação de cloreto de prata, produto da reação da prata presente na estrutura do AlphaSan[®] RC2000 com a solução de cloreto de cálcio utilizada na etapa de reticulação iônica. O mesmo foi observado no presente trabalho para as formulações que incluíram esse composto em sua preparação.

4.1.2. Morfologia da superfície e da secção transversal

Na Figura 4.2 estão apresentadas as morfologias de superfície típicas das membranas de quitosana e alginato preparadas na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000, com pH a 5,3 e corrigido para 7,0 e temperatura de secagem de 37 ou 60°C

Foi observado que as membranas secas a 37°C (Figuras 4.2a, 4.2b, 4.2d e 4.2e) apresentaram superfície ondulada, com elevações e fibras distribuídas ao longo de sua extensão, o que não foi observado nas membranas secas a 60°C (Figura 4.2c e 4.2f), que se mostraram praticamente sem rugosidades. Não foi observada a presença de poros em aumentos de até 5000 vezes em nenhuma das formulações. Essas características também foram observadas a olho nu, tendo as formulações C e F (Figura 4.1c e 4.1f, respectivamente) superfícies mais lisas. O aspecto rugoso de membranas secas a 37°C também foi notado por Rodrigues (2008), que observou maior rugosidade quando as membranas são preparadas em uma condição de agitação menos intensa, situação em que há menor compactação das fibras poliméricas. O ajuste do pH para 7,0 não alterou a superfície das membranas, que permaneceu com aspecto rugoso.

O antimicrobiano incorporado nas formulações D, E e F (Figuras 4.2d, 4.2e, 4.2f, respectivamente) mostrou-se distribuído uniformemente pela superfície das membranas. Segundo Regiel *et al.* (2013), uma boa dispersão de íons prata na superfície de filmes usados como curativos é necessária para alcançar adequado efeito antimicrobiano, promovendo o contato

direto entre os íons prata dispersos na superfície do dispositivo e os micro-organismos situados na lesão.

Destaca-se que tais observações são fruto da análise de áreas de amostragem significativamente maiores do que as mostradas nas micrografias aqui apresentadas, e que podem não estar claramente visíveis nas imagens mencionadas em função destas representarem frações limitadas das amostras. O mesmo se aplica à micrografias que se seguem.

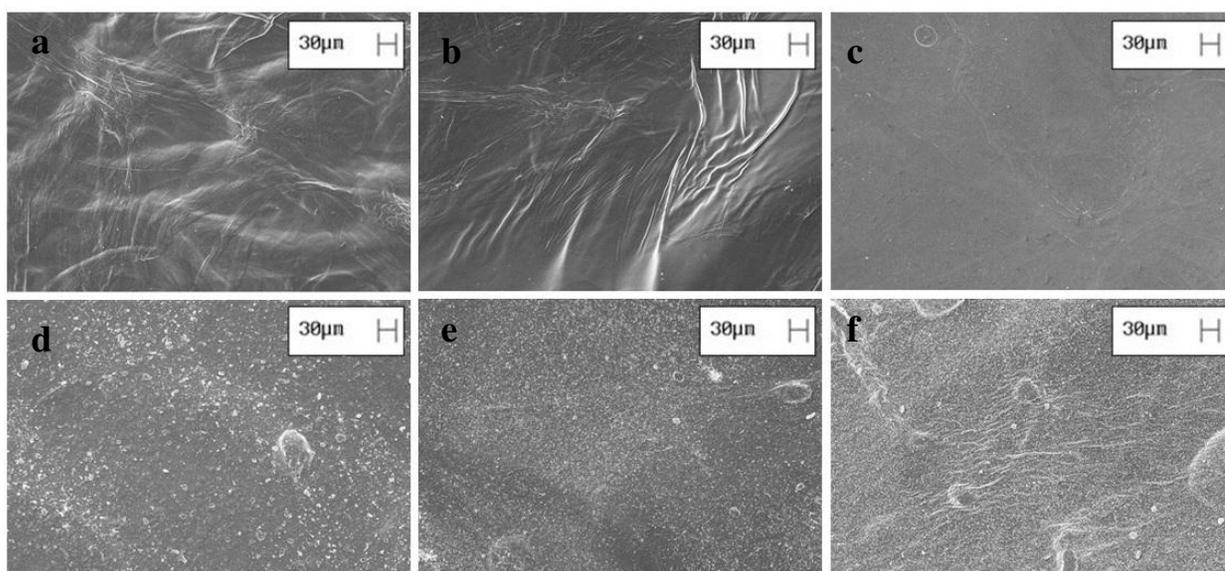


Figura 4.2 – Morfologia da superfície das formulações preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan® RC2000: (a) pH 5,3 e 37 °C; (b) pH 7,0 e 37 °C; (c) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (d) pH 5,3 e 37 °C; (e) pH 7,0 e 37 °C; (f) pH 7,0 e 60°C.

Para verificar a ocorrência de possíveis alterações no empacotamento das fibras de polissacarídeos decorrentes da variação do pH e da temperatura, as amostras também foram avaliadas quanto ao aspecto dos cortes transversais. Os resultados são apresentados na Figura 4.3, notando-se que a correção do pH para a neutralidade logo após a complexação da quitosana com o alginato não resultou em alterações na secção transversal quando comparada à situação de

ajuste do pH para 5,3. Amostras processadas na temperatura de secagem de 60°C apresentam lamelas aparentemente mais compactas quando livres do AlphaSan[®] RC2000. Bueno (2012), no desenvolvimento de sua tese de doutorado na FEQ/UNICAMP em tema correlato ao deste trabalho, supôs que o aumento da temperatura contribui para a diminuição da solubilidade dos gases no interior da mistura polimérica, diminuindo conseqüentemente a quantidade de bolhas de ar e a espessura das membranas formadas após a secagem da mistura, discutida em maiores detalhes no próximo item.

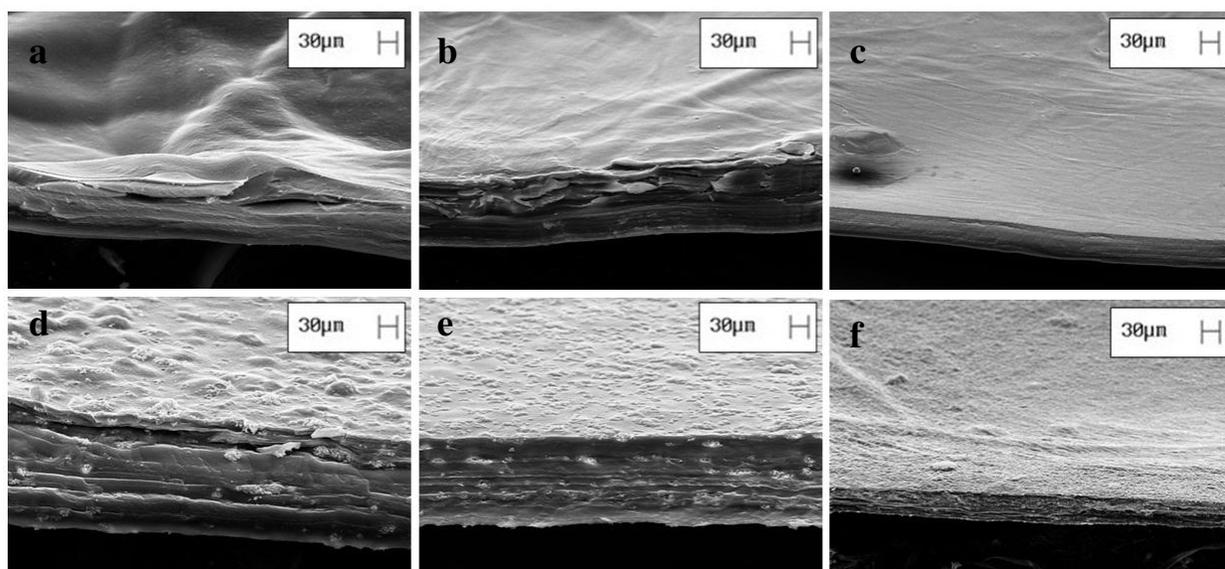


Figura 4.3 – Corte transversal das formulações preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) pH 5,3 e 37 °C; (b) pH 7,0 e 37 °C; (c) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (d) pH 5,3 e 37 °C; (e) pH 7,0 e 37 °C; (f) pH 7,0 e 60 °C.

As amostras contendo AlphaSan[®] RC2000 mostraram lamelas mais espaçadas, uma vez que o agente antimicrobiano se localiza disperso na forma de sólido na estrutura, inclusive na formulação seca a 60 °C. Assim como observado por Girata (2011), constatou-se pontos de aglomeração das partículas de AlphaSan[®] RC2000, indicando que o antimicrobiano não foi homogêneamente distribuído na matriz quitosana-alginato. Segundo a autora, tal aglomeração pode ser decorrente da segregação de fases durante o processo de secagem das membranas, que é

bastante lento, e também da baixa solubilidade deste composto na mistura (a título de comparação, a máxima solubilidade do AlphaSan[®] RC2000 em água a 20 °C é de $2,6 \times 10^{-4}$ g/L segundo NICNAS, 2004). Porém, com o aumento da temperatura de secagem e, conseqüentemente, com a diminuição do tempo de secagem, o material permaneceu aglomerado possivelmente porque o processo de secagem, apesar de ser mais rápido, ainda pode ser considerado como lento (6 horas).

Segundo Lankoff *et al.* (2012), nanopartículas, inclusive as de prata, têm um forte potencial para aglomerar tanto no ar ambiente quanto em soluções líquidas e em fluidos corpóreos. O estado de aglomeração pode influenciar seu potencial de absorção através da pele, podendo contribuir para o aumento da citotoxicidade, contudo, a taxa de dissolução da prata depende do tamanho da partícula, do meio utilizado, da temperatura e da cristalinidade das partículas. Mesmo não se tratando de nanopartículas de prata no presente trabalho, o tamanho das partículas de AlphaSan[®] RC2000 é bastante pequeno, de forma que certa similaridade de comportamento seria esperada. No presente trabalho utilizou-se uma concentração de 1,1% de prata e, de acordo com Girata (2011), as membranas de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®] RC2000 na proporção empregada apresentam moderada citotoxicidade a fibroblastos, supondo-se que os benefícios da utilização de curativos com a quantidade adicionada de agente bioativo superem a desvantagem de seu efeito citotóxico, mesmo que o composto se apresente parcialmente aglomerado.

4.1.3. Avaliação da espessura das membranas

A Tabela 4.1 mostra os resultados obtidos na medida da espessura das amostras em seu estado seco e em seu estado úmido. Para as membranas preparadas na ausência do agente antimicrobiano, a espessura variou de 51 a 78 μm no estado seco e de 157 a 277 μm no estado úmido, quando expostas por 24 horas a água deionizada a 37 °C. Observa-se que houve uma diferença nesta característica da membrana quando se alterou o pH de processamento, verificando-se diminuição da espessura ao se corrigir o pH para 7,0, tanto para amostras no estado seco quanto no estado úmido. Nota-se que alterações na etapa de secagem não resultaram

em mudanças significativas na espessura das amostras neutralizadas após a complexação do alginato com a quitosana, exceto para as formulações E e F no estado úmido. Rodrigues *et al.* (2008) obtiveram variação de espessura de 65 a 80 μm no estado seco, enquanto Yan *et al.* (2000) verificaram variação de 17,6 a 48,2 μm para membranas preparadas em condições similares.

Tabela 4.1: Espessura das membranas de quitosana-alginato preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (A) pH 5,3 e 37 °C; (B) pH 7,0 e 37 °C; (C) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (D) pH 5,3 e 37 °C; (E) pH 7,0 e 37 °C; (F) pH 7,0 e 60 °C.

<i>Formulações</i>	<i>Espessura (μm)</i>	
	<i>Amostras secas</i>	<i>Amostras úmidas</i>
A	77,78 \pm 5,47 ^a	276,67 \pm 40,96 ^a
B	51,11 \pm 3,09 ^b	160,00 \pm 2,36 ^b
C	56,67 \pm 4,08 ^b	156,67 \pm 5,00 ^b
D	128,00 \pm 8,60 ^A	158,00 \pm 9,13 ^A
E	127,78 \pm 11,52 ^A	163,33 \pm 10,80 ^A
F	94,40 \pm 3,90 ^B	128,20 \pm 3,63 ^B

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

As amostras contendo AlphaSan[®] RC2000 alcançaram espessura de 94 a 128 μm no estado seco e, da mesma forma, a espessura diminuiu com a correção do pH para a neutralidade logo em seguida à complexação do alginato e da quitosana. Quando úmidas, houve uma variação de 128 a 163 μm , sendo a amostra F a que apresentou a menor espessura. Esses valores são menores do que os reportados por Girata (2011), que encontrou uma média de 420 μm no estado seco para membranas com 1,1% de prata e 1710 μm no estado úmido, provavelmente decorrente da utilização da acetona durante a complexação dos polissacarídeos por parte de Girata (2011).

Este solvente faz com que a quitosana assuma uma conformação menos estendida, restringindo a taxa de reação com o alginato (Yan *et al.*, 2000) e, possivelmente, levando à formação de coacervados mais volumosos.

Porém, pode-se notar que, em geral, as amostras que possuem prata incorporada são as que têm maior espessura tanto no estado seco quanto no estado úmido (exceto para a formulação A). Uma vez que a solubilidade do AlphaSan[®] RC2000 em soluções aquosas é muito reduzida, ao ser incorporado nas membranas tal composto se localiza disperso na forma de sólido na estrutura, o que contribui significativamente para o aumento da espessura do material obtido.

Segundo Ma *et al.* (2001), substitutos artificiais da pele são geralmente mais finos do que a derme humana, cuja espessura varia de 0,5 mm a 2 mm, dependendo da idade, sexo e área do corpo. Nesse sentido, todas as membranas preparadas nesta etapa do estudo possuem potencial para uso como curativos de pele.

Os altos desvios padrão observados em alguns ensaios devem-se à heterogeneidade das membranas, uma vez que durante a etapa de secagem, a distribuição dos complexos polieletrólitos não é totalmente homogênea, ocorrendo acúmulo de cadeias poliméricas em algumas regiões da matriz.

4.1.4. Capacidade de absorção de água e soluções fisiológicas

Os valores listados na Tabela 4.2 correspondem à capacidade de absorção das seis formulações quando expostas a água, NaCl 0,9%, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino.

Comparando-se os valores obtidos, nota-se que, de forma geral, o fluido melhor absorvido pelas membranas em 24 horas foi a solução salina (SS), com uma variação de 8 a 12 g/g, seguido do SFB, FCS e água. Estes resultados contrastam com os de outros autores (Rodrigues *et al.*, 2008; Girata, 2011; Bueno e Moraes, 2011), que observaram maior absorção de água.

Ao avaliar a capacidade de absorção de diferentes fluidos, Girata (2011) obteve valores para amostras de quitosana-alginato livres do agente antimicrobiano de 13,9 g/g, 13,0 g/g, 9,2 g/g

e 8,4 g/g em água, SS, FCS e SFB, respectivamente. Para as amostras na presença de 1,1% de prata a autora obteve 39,5 g/g, 23 g/g, 15 g/g e 14 g/g respectivamente para soluções mencionadas. Todas as amostras foram processadas em pH de 5,3 e secas a 37°C. A diferença dos valores em relação aos obtidos no presente trabalho pode ser atribuída ao fato de que a autora incorporou acetona à solução de quitosana. Como já mencionado, por ser um solvente de baixa polaridade a acetona faz com que os polissacarídeos assumam uma conformação menos estendida (Yan *et al.*, 2000), o que pode promover a formação de complexos com diferentes geometrias e empacotamentos. Além disso, a adição da acetona pode resultar em menor número de pontos de ligação iônica entre o alginato e a quitosana, o que poderia contribuir para o aumento da absorção de soluções aquosas.

Tabela 4.2: Valores para a capacidade de absorção de soluções pelas membranas de quitosana-alginato preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (A) pH 5,3 e 37 °C; (B) pH 7,0 e 37 °C; (C) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (D) pH 5,3 e 37 °C; (E) pH 7,0 e 37 °C; (F) pH 7,0 e 60 °C.

<i>Formulações</i>	<i>Capacidade de Absorção (g/g)</i>			
	<i>A_{Água}</i>	<i>A_{SS}</i>	<i>A_{FCS}</i>	<i>A_{SFB}</i>
A	9,08±3,20 ^a	8,11±0,25 ^a	5,83±0,37 ^a	8,63±0,64 ^a
B	6,60±2,65 ^a	10,79±0,71 ^b	9,07±0,28 ^b	9,58±2,09 ^a
C	4,19±0,24 ^a	11,91±0,48 ^b	9,85±0,42 ^b	9,66±0,33 ^a
D	1,74±0,07 ^A	8,23±0,97 ^A	9,29±0,83 ^A	7,82±0,85 ^A
E	5,65±0,13 ^B	9,94±1,19 ^A	6,81±0,31 ^B	7,61±0,07 ^A
F	6,48±1,07 ^B	8,33±0,86 ^A	5,73±0,20 ^B	7,77±0,44 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Para amostras com e sem AlphaSan[®] RC2000, o teste de Tukey revelou que não houve diferenças significativas na capacidade de absorção de soluções com relação à variação de

temperatura de secagem entre 37°C e 60°C. Já para a correção do pH, houve uma pequena diferença quanto à absorção de SS e FCS pelas amostras livres de AlphaSan® RC2000, uma vez que essas soluções são melhor absorvidas pelas amostras preparadas em pH 7,0 (formulação B) do que em pH 5,3 (formulação A).

No entanto, houve um aumento na absorção de água e uma diminuição no intumescimento quando na presença de FCS para amostras contendo o agente antimicrobiano e com pH corrigido para 7,0 (formulações E e F). Não se verificou diferença significativa na absorção de SS ou SFB pelo material com pH ajustado em 7,0. Segundo Veiga (2009), na presença de solventes apresentando alta força iônica, como o fluido corpóreo simulado, pode ocorrer competição dos íons do solvente com as hidroxilas presentes nas cadeias poliméricas pela água, diminuindo sua disponibilidade para hidratação da membrana.

4.1.5. Perda de massa em soluções aquosas

A avaliação da estabilidade das membranas é importante para o conhecimento da cinética de degradação do biomaterial quando em contato com a lesão. A degradação de polieletrólitos de quitosana e alginato é dependente da extensão da interação dos polímeros, ou seja, a estabilidade é uma função do número de pontos de ligação entre as moléculas de quitosana e alginato (Yan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009).

A estabilidade das membranas foi avaliada nos quatro fluidos já testados quanto à capacidade de absorção: água, solução salina, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino. Os valores obtidos estão apontados na Tabela 4.3.

Nota-se que a máxima perda de massa encontrada foi de 27% em soro fetal bovino. O pH somente afetou de forma estatisticamente significativa o comportamento das amostras livres de AlphaSan® RC2000 em contato com solução salina, observando-se um aumento na perda de massa quando o pH foi corrigido para 7,0. Como observado anteriormente, o fluido melhor absorvido pelas membranas livres do agente antimicrobiano foi a SS. Isto faz com que ocorra maior afastamento entre as cadeias poliméricas, o que diminui a intensidade de interação entre as

mesmas, promovendo menor estabilidade das mesmas (Bueno, 2009). O aumento da temperatura de secagem afetou somente a estabilidade da formulação sem AlphaSan® RC2000 em água, tendo o material seco a 60 °C menor perda de massa. Este resultado corrobora com os obtidos na capacidade de absorção, uma vez que em água obteve-se menor intumescimento das membranas.

Tabela 4.3: Valores para a perda de massa das membranas de quitosana-alginato preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan® RC2000: (A) pH 5,3 e 37°C; (B) pH 7,0 e 37 °C; (C) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (D) pH 5,3 e 37 °C; (E) pH 7,0 e 37 °C; (F) pH 7,0 e 60 °C.

Formulações	Perda de massa (%)			
	$P_{Água}$	P_{SS}	P_{FCS}	P_{SFB}
A	16,82±1,58 ^a	10,70±1,45 ^a	16,61±1,72 ^a	21,55±7,23 ^a
B	16,55±0,27 ^a	15,44±0,50 ^b	15,59±0,79 ^a	26,79±5,18 ^a
C	10,57±0,19 ^b	15,34±1,03 ^b	13,28±0,95 ^a	13,99±11,7 ^a
D	9,06±0,14 ^A	10,48±0,76 ^A	10,32±0,86 ^A	9,77±5,32 ^A
E	10,59±0,31 ^A	11,27±0,67 ^A	10,40±0,64 ^A	15,96±4,54 ^A
F	15,34±5,92 ^A	11,53±0,95 ^A	12,40±0,72 ^A	6,37±3,58 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan® RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan® RC2000.

Segundo Krayukhina *et al.* (2008), quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, melhor é a estabilidade do complexo quitosana e alginato. Já com a diminuição do grau de desacetilação, a formação dos complexos é dificultada, diminuindo sua estabilidade. Neste trabalho foi empregada quitosana com grau de desacetilação de 96%. Neste sentido, supõe-se que o complexo quitosana-alginato apresenta boa estabilidade, o que é confirmado pelas baixas perdas de massa verificadas.

Yan *et al.* (2000) sugerem que a perda de massa é relativamente independente da natureza dos meios aquosos e essa perda pode ser atribuída à remoção de moléculas que não reagiram

durante o processamento, apontando que o PEC, quando estável, não se solubiliza nestes meios. Entretanto, visto que o PEC de quitosana e alginato é estabilizado primordialmente por interações eletrostáticas e tendo por base os resultados obtidos pela exposição das membranas às diferentes soluções aquosas, supõe-se que as espécies em solução possam, sim, exercer algum efeito na estrutura das membranas.

4.1.6. Análise das propriedades mecânicas

Um curativo deve possuir características mecânicas adequadas para sua aplicação, além de possibilitar seu fácil manuseio e armazenamento. Nesse sentido, foram avaliadas a tensão de ruptura e a porcentagem de deformação após o alongamento das membranas de quitosana-alginato. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato preparadas em diferentes condições de pH e temperatura, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (A) pH 5,3 e 37 °C; (B) pH 7,0 e 37 °C; (C) pH 7,0 e 60 °C; ou com adição do mesmo: (D) pH 5,3 e 37 °C; (E) pH 7,0 e 37 °C; (F) pH 7,0 e 60 °C.

<i>Formulações</i>	<i>Resistência Mecânica</i>	
	<i>Tensão na ruptura (MPa)</i>	<i>Alongamento na ruptura (%)</i>
A	2,33±0,58 ^a	2,15±0,32 ^a
B	12,19±2,13 ^b	3,04±0,39 ^a
C	20,45±1,38 ^c	2,78±0,31 ^a
D	4,71±0,93 ^A	3,28±0,41 ^A
E	3,58±0,79 ^A	3,06±0,52 ^A
F	4,94±0,83 ^A	3,66±0,28 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

No caso de amostras livres de prata, o teste estatístico revelou que as formulações A, B e C diferiram significativamente na tensão de ruptura. As amostras com pH corrigido para 7,0 e secas à temperatura de 60 °C alcançaram maiores tensões de ruptura. Não foram verificadas diferenças para estas membranas quanto ao alongamento na ruptura. Como já discutido no item 4.2, o aumento da temperatura de secagem contribui para a diminuição da solubilidade dos gases no interior da mistura polimérica, diminuindo a quantidade de bolhas de ar (Bueno, 2009) e, isto pode ter contribuído para melhores resultados quanto à tensão na ruptura, uma vez que a presença de bolhas desfavorece as pontes iônicas entre os polissacarídeos e, conseqüentemente, diminui a tensão na ruptura das membranas.

Para as amostras contendo prata, notou-se que as diferenças nas condições de secagem e pH de processamento não conduziram a variações na tensão de ruptura ou no alongamento da amostra. Considerando-se estes resultados e também os obtidos para os dispositivos livres de AlphaSan[®] RC2000, nota-se que o uso de maiores temperaturas de secagem e da correção do pH para 7,0 pode ser realizado sem prejuízos para o desempenho mecânico dos curativos.

Foram verificados neste trabalho valores de resistência à tração entre 2 e 20 MPa e de alongamento na ruptura entre 2 e 3%. Girata (2011) examinou membranas de quitosana e alginato preparadas com diferentes proporções de AlphaSan[®] RC2000, encontrando valores de resistência à tração menores que os verificados neste trabalho, entre 2 e 10 MPa e alongamento na ruptura na mesma faixa, entre 2 e 4%. Os melhores desempenhos encontrados para resistência à tração e alongamento na ruptura foram verificados nas amostras livres de AlphaSan[®] RC2000 e com 0,2% de prata, respectivamente. A autora constatou que a concentração, composição polimérica, o tempo de reação entre os complexos e o estado físico do agente antimicrobiano são fatores que influenciam a resistência à tração e a flexibilidade das membranas, e que, de fato, membranas contendo alta concentração de AlphaSan[®] RC2000 apresentam baixa resistência mecânica de forma geral. A diferença entre os resultados de Girata (2011) e os relatados no presente trabalho podem ser fruto da não utilização da acetona na etapa de solubilização a quitosana, que, por esta razão, apresentaria conformação mais compactada, reagindo menos intensamente com o alginato. Isto implicaria em coacervados potencialmente menos estabilizados pelas ligações iônicas e, portanto, capazes de suportar menores tensões no momento de sua ruptura.

No entanto, como a resistência à tração da pele normal varia de 2,5 a 16 MPa (Wang *et al.*, 2002), considerando-se este aspecto específico, todas as membranas obtidas nesta etapa do estudo podem ser consideradas como adequadas para aplicação como curativos poliméricos.

Tendo em vista os resultados obtidos das caracterizações de membranas de quitosana-alginato na presença ou ausência de prata, pode-se constatar que são viáveis o ajuste de pH para 7,0 em etapa única e o aumento da temperatura de secagem para 60 °C. Assim, nos próximos itens são descritas formulações preparadas nessas novas condições de obtenção.

Apesar da diminuição do tempo de processamento, o mesmo continua longo, assim, na etapa seguinte objetivou averiguar se seria possível suspender do processamento as etapas de reticulação com íons cálcio, o que poderia diminuir ainda mais o tempo de produção dos curativos de quitosana e alginato na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000.

4.2. Avaliação da eliminação das etapas de reticulação

Nos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa (Rodrigues, 2008; Bueno, 2010; Girata, 2011) foram produzidas membranas de quitosana e alginato com duas etapas independentes de reticulação com íons cálcio: durante a complexação dos polissacarídeos (reticulação primária) e após a secagem das membranas (reticulação secundária). Uma vez que estas etapas prolongam o tempo de processamento, neste trabalho procurou-se verificar se as membranas seriam estáveis na ausência das mesmas. Foram preparadas membranas de quitosana-alginato na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 sujeitas a distintas formas de reticulação: ausência das duas etapas independentes de reticulação, somente com reticulação primária e somente com reticulação secundária. Os dispositivos produzidos foram caracterizados e os resultados obtidos são mostrados e discutidos a seguir.

4.2.1. Aspecto das membranas reticuladas por distintas formas

As formulações preparadas na ausência das duas etapas de reticulação e na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 (formulações G e J respectivamente) não se mantiveram estáveis após a secagem. Apesar de se notar um encolhimento das formulações reticuladas com Ca⁺⁺ pela adição do AlphaSan[®] RC2000, discutido no item 4.1.1., o aparente efeito de aproximação das cadeias por este composto não se mostra suficiente para a estabilização da estrutura sem a adição concomitante dos íons cálcio. Ao se adicionar íons Ca⁺⁺ à mistura polimérica ocorre uma interação destes íons com grupos carboxila do alginato não complexados com a quitosana, promovendo um reforço à matriz polimérica (Berger *et al.*, 2004). Como tais ligações de reforço não ocorreram em decorrência da ausência dos íons cálcio e por estas terem se mostrado fundamentais para a estabilização final da estrutura, não se deu mais sequência à análise de formulações não reticuladas com cálcio no presente estudo, focando-se as avaliações subsequentes nas amostras mais promissoras.

A Figura 4.4 mostra o aspecto típico, avaliado a olho nu, das membranas preparadas na presença ou ausência do agente antimicrobiano e após passarem pela reticulação primária ou secundária.

Percebe-se que as membranas contendo ou não AlphaSan[®] RC2000 com reticulação somente na primeira etapa (Figura 4.4a e 4.4c respectivamente) não se mantiveram estáveis durante a etapa de lavagem com água deionizada, mostrando apreciável perda de massa em sua estrutura. No entanto, as amostras com reticulação somente na segunda etapa (Figura 4.4b e 4.4d) mostraram-se homogêneas e permaneceram íntegras.

Verificou-se, portanto, que a reticulação secundária com íons Ca⁺⁺ é imprescindível para a estabilização do PEC de quitosana e alginato. Por ser uma etapa de reticulação com imersão das membranas secas em solução contendo os íons multivalentes, supõe-se que os íons difundem-se homogêaneamente por toda matriz, aumentando a estabilidade das mesmas. Isso, provavelmente, não ocorre com a reticulação primária que pode estar exercendo um efeito mais localizado. Assim, nos próximos itens somente as formulações preparadas com reticulação secundária serão discutidas, sendo então suas características comparadas com as de amostras submetidas à dupla

reticulação nas condições determinadas anteriormente como as mais adequadas com relação a pH e temperatura de secagem, na ausência ou presença de prata, formulações C e F respectivamente.

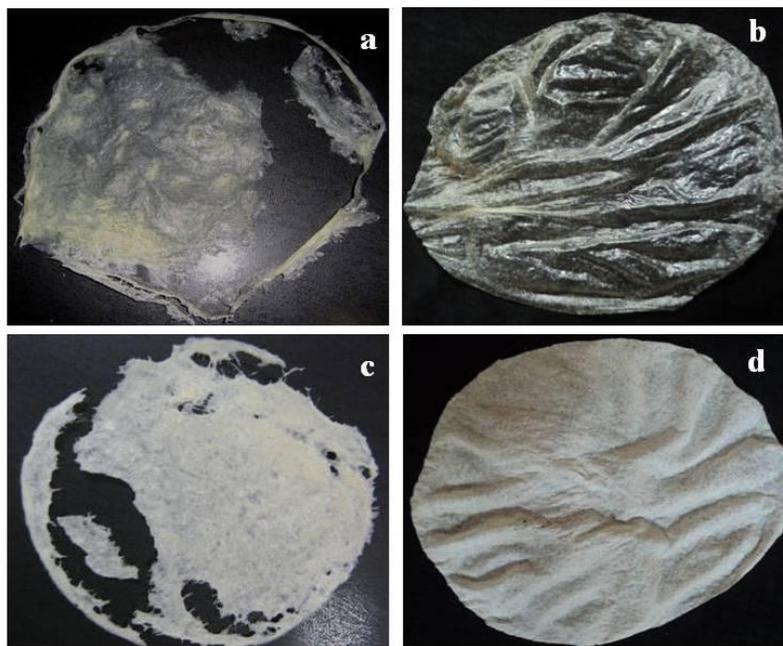


Figura 4.4 – Aspecto visual das formulações preparadas com diferentes etapas de reticulação, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) somente reticulação primária; (b) somente reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (c) somente reticulação primária; (d) somente reticulação secundária.

4.2.2. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas submetidas somente à reticulação secundária

Na Figura 4.5 mostra-se as morfologias de superfície das membranas de quitosana e alginato contendo ou não AlphaSan[®] RC2000 e preparadas somente com reticulação secundária.

Através da comparação com as formulações submetidas a ambas as etapas de reticulação, contendo ou não AlphaSan[®] RC2000 (Figuras 4.2c e 4.2f, respectivamente), nota-se grande diferença entre as rugosidades das superfícies das membranas. As membranas reticuladas

somente com a segunda etapa (Figuras 4.5a e 4.5b) apresentaram superfícies onduladas, com elevações distribuídas uniformemente ao longo de sua extensão, tanto na presença quanto na ausência de prata. De acordo com Rodrigues (2008), a maior rugosidade observada pode ser resultado de menor compactação das fibras poliméricas.

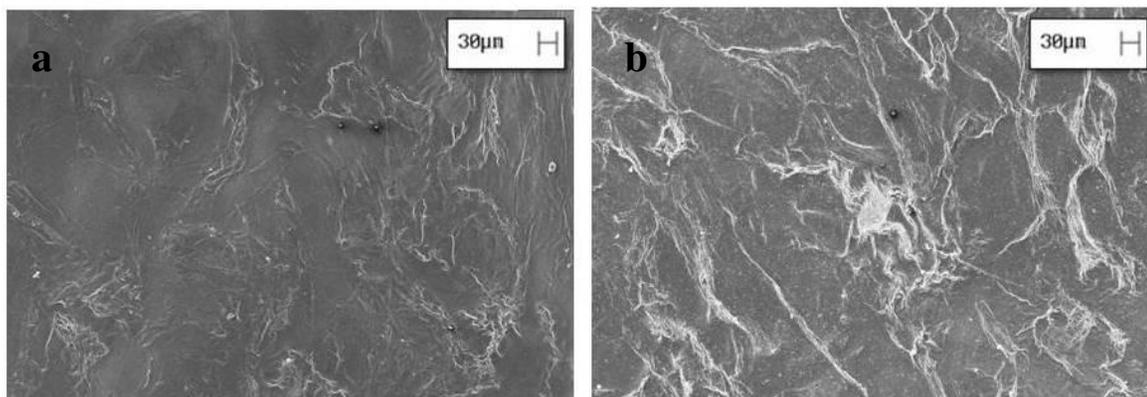


Figura 4.5 – Morfologia da superfície das formulações preparadas somente com reticulação secundária: (a) sem adição de AlphaSan[®] RC2000 ou (b) com adição do mesmo.

Karakeçili *et al.* (2007), produziram membranas de quitosana reticuladas ou não com íons sulfato e relataram que tais íons exerceram forte influência sobre a topografia da superfície, tornando-a mais homogênea e relativamente plana. Os autores explicam que as rugosidades nas membranas não reticuladas poderiam ser terminações de fibras de quitosana desniveladas e que, após a reticulação, teria ocorrido a formação de feixes de fibras, aplanando a superfície. Estes resultados também foram observados no presente trabalho, o que explica o aumento da rugosidade das membranas e a visualização mais clara das fibras poliméricas nas formulações preparadas na ausência de reticulação primária.

Na Figura 4.6 são apresentadas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das secções transversais das membranas. Os cortes transversais mostraram diferenças significativas na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, sendo que as amostras preparadas com reticulação primária e secundária (Figuras 4.3c e 4.3f) apresentaram

lamelas menos espaçadas do que as formulações submetidas somente à reticulação secundária (Figuras 4.6a e 4.6b). O Ca^{++} , quando adicionado ao complexo polimérico, liga-se aos grupos remanescentes do alginato que não interagiram com a quitosana. Este comportamento pode favorecer uma maior compactação da estrutura, uma vez que diminui o número de carboxilas livres e, conseqüentemente, resultaria em menores espessuras. A análise detalhada a respeito das espessuras das membranas com menor quantidade de íons cálcio será apresentada mais adiante.

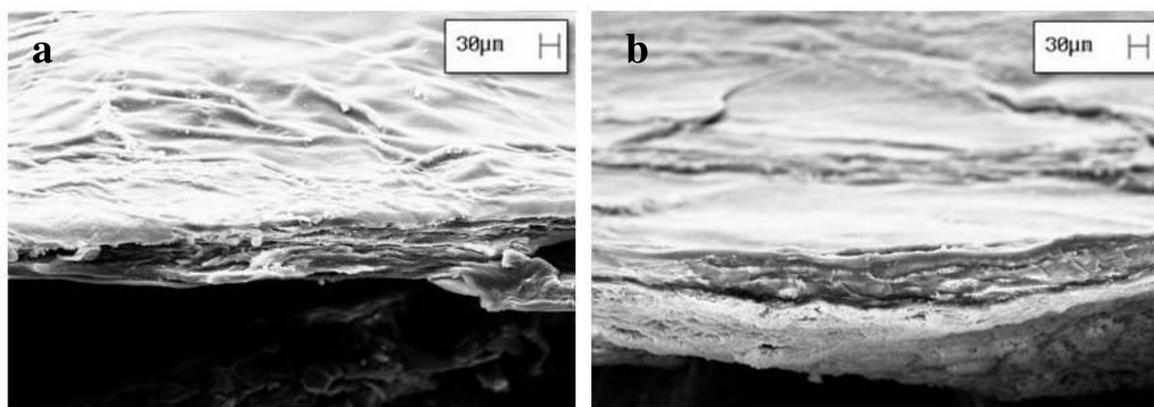


Figura 4.6 – Corte transversal das formulações preparadas somente com reticulação secundária: (a) sem adição de AlphaSan[®] RC2000 ou (b) com adição do mesmo.

Nota-se que na amostra contendo prata uma fração significativa do AlphaSan[®] RC2000 parece estar depositada na parte inferior da membrana. Segundo o National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (2004), a densidade do AlphaSan[®] RC2000 a 20 °C é de 2914 kg/m³, ou seja, cerca de 3 vezes maior que a da água. Assim, supõe-se que durante a etapa de secagem o composto à base de prata tenha migrado devido à gravidade. O depósito formado pode ser avaliado com maior nível de detalhamento na Figura 4.7, que mostra a formulação contendo AlphaSan[®] RC2000 e submetida somente à reticulação secundária com maior aproximação.

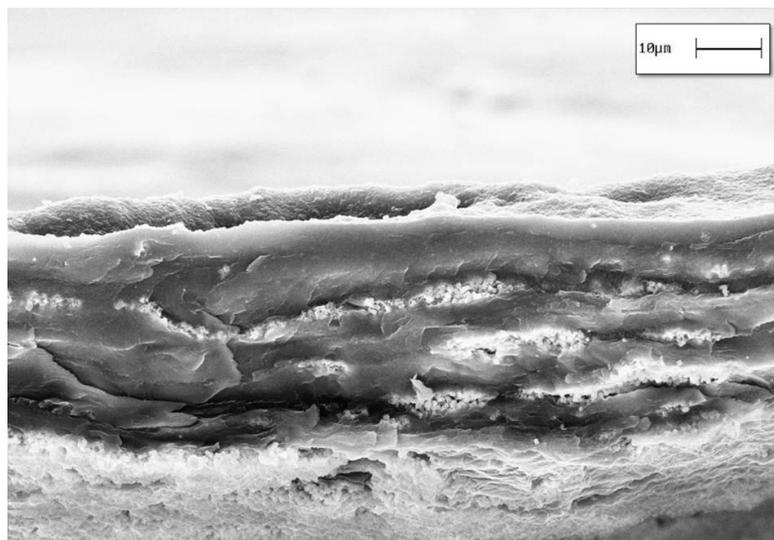


Figura 4.7 – Corte transversal da formulação contendo AlphaSan[®] RC2000 e submetida somente à reticulação secundária.

4.2.3. Análise do efeito da reticulação secundária na espessura das membranas

A Tabela 4.5 aponta a média das espessuras obtidas das membranas de quitosana e alginato preparadas com reticulação primária e secundária ou somente com reticulação secundária, na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000.

Verifica-se que houve um aumento na espessura das formulações preparadas somente pela reticulação secundária em relação às amostras com reticulação dupla, tanto na presença quanto na ausência de AlphaSan[®] RC2000, variando de 1,1 a 1,5 vezes.

Uma possível explicação para este comportamento é que, os íons cálcio, quando adicionados durante a complexação de quitosana-alginato (reticulação primária), reagem fortemente com os grupos carboxila remanescentes do alginato (Bueno, 2010), gerando estruturas com maior empacotamento das cadeias polissacardídicas, portanto, mais finas (formulações C e F), cuja estrutura mais compacta se preserva mesmo após a reticulação secundária e a hidratação.

Tabela 4.5: Espessura das membranas de quitosana-alginato preparadas sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (C) amostras com reticulação dupla; (I) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (F) amostras com reticulação dupla; (M) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Espessura (μm)</i>	
	<i>Amostras secas</i>	<i>Amostras úmidas</i>
C	56,67±4,08 ^a	156,67±5,00 ^a
I	85,00±5,62 ^b	171,66±4,01 ^b
F	94,40±3,90 ^A	128,20±3,63 ^A
M	125,00±6,70 ^B	190,00±6,32 ^B

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Bueno (2010) estudou o comportamento de reticulantes iônicos na complexação das membranas de quitosana-alginato e observou que os íons cálcio, quando adicionados à suspensão de agregados polissacarídicos, reagem fortemente com os grupos carboxila remanescentes, reduzindo a mobilidade das cadeias poliméricas que não se aproximaram durante a secagem das membranas e, conseqüentemente, resultando em maiores espessuras. No entanto, esta teoria corrobora em parte com o presente estudo visto que, quando submetidas somente à reticulação secundária, as formulações testadas apresentaram maiores espessuras. Ainda, segundo a autora, a menor mobilidade das cadeias poliméricas pode resultar em menor intumescimento das mesmas. A diminuição do intumescimento também foi observada nas amostras preparadas somente com reticulação secundária, como apresentado e discutido a seguir.

4.2.4. Influência do método de reticulação na capacidade de absorção das membranas expostas a diferentes soluções aquosas

A Tabela 4.6 mostra os valores correspondentes à capacidade de absorção dos curativos na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 e preparados com reticulação primária e

secundária ou somente com reticulação secundária, quando expostas por 24 horas nas diferentes soluções.

Tabela 4.6: Valores para a capacidade de absorção das membranas de quitosana-alginato preparadas sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (C) amostras com reticulação dupla; (I) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (F) amostras com reticulação dupla; (M) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Capacidade de Absorção (g/g)</i>			
	<i>A_{Água}</i>	<i>A_{SS}</i>	<i>A_{FCS}</i>	<i>A_{SFB}</i>
C	4,19±0,24 ^a	11,91±0,48 ^a	9,85±0,42 ^a	9,66±0,33 ^a
I	4,94±0,29 ^a	7,81±1,46 ^b	5,30±0,07 ^b	7,36±0,97 ^b
F	6,48±1,07 ^A	8,33±0,86 ^A	5,73±0,20 ^A	7,77±0,44 ^A
M	4,20±0,21 ^B	5,82±0,21 ^B	4,98±0,32 ^A	5,92±0,20 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

O fluido melhor absorvido pelos dispositivos preparados somente com reticulação secundária (formulações I e M) foi a solução salina (SS), com 8 g/g para as amostras na presença de AlphaSan[®] RC2000 e 6 g/g para as formulações livres do mesmo, seguido de soro fetal bovino (SFB), fluido corpóreo simulado (FCS) e água.

Ao comparar os dados das formulações na presença da reticulação primária e secundária (formulações C e F), nota-se que para as amostras livres de antimicrobiano não houve diferenças significativas pela exposição à água, porém a formulação C absorveu maiores quantidades de SS, FCS e SFB do que a formulação I. Para as formulações na presença de AlphaSan[®] RC2000, as diferenças significativas foram detectadas com relação à absorção de água e SS.

Segundo Da Silva (2009), a diminuição do grau de intumescimento dos filmes de alginato e quitosana-alginato é consequência do aumento da concentração de cálcio adicionado ao

sistema. Esta teoria contrasta com o presente estudo, uma vez que a absorção de fluidos é menor quando os dispositivos são preparados com menores quantidades de cálcio, ou seja, quando submetidos somente à reticulação secundária. Como já discutido anteriormente, a interação entre os íons Ca^{++} e o alginato parecem ocorrer em maior número na etapa secundária de reticulação, o que gera menor mobilidade das cadeias polissacarídicas e, conseqüentemente, menor intumescimento das mesmas. Nestas condições, a redução da mobilidade resulta em uma menor interação com os solventes.

4.2.5. Perda de massa das membranas preparadas por diferentes métodos de reticulação após exposição a diferentes soluções aquosas

Na Tabela 4.7 são apresentados os valores referentes à estabilidade das amostras preparadas com reticulação primária e secundária ou somente com reticulação secundária quando expostas a diferentes fluidos fisiológicos.

A partir das análises dos dados, nota-se que os dispositivos que foram preparados com as duas etapas de reticulação (C e F) apresentaram maior perda de massa média, tanto na presença quanto na ausência de AlphaSan[®] RC2000, exceto no caso da amostra exposta a SFB. Como já discutido no tópico anterior, as formulações preparadas somente com reticulação secundária absorveram menores quantidades das soluções fisiológicas, e esse comportamento pode ter influenciado a perda de massa. De acordo com Bueno (2010), os maiores valores de absorção implicam em maiores valores de perda de massa. Assim, quanto maior a quantidade de fluidos que a membrana absorve, maior o afastamento entre as cadeias poliméricas, o que diminui a intensidade de interação entre as mesmas, promovendo maior solubilização da membrana.

Com relação à formulação I para a qual se obteve cerca de 53% de perda de massa em soro fetal bovino (SFB), de acordo com Qin (2005) as proteínas do soro fetal podem formar quelatos com a prata do AlphaSan[®], o que reduziria sua perda de massa. Assim, pode-se supor que a ausência do antimicrobiano na formulação I pode ter favorecido o rompimento das interações quitosana e alginato nas amostras submetidas apenas à reticulação secundária, sendo,

esta hipótese confirmada no presente estudo pelas baixas porcentagens de perda de massa encontradas para as formulações contendo prata (F e M).

Tabela 4.7: Valores para a perda de massa das membranas de quitosana-alginato preparadas sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (C) amostras com reticulação dupla; (I) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (F) amostras com reticulação dupla; (M) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Perda de Massa (%)</i>			
	<i>P_{Água}</i>	<i>P_{SS}</i>	<i>P_{FCS}</i>	<i>P_{SFB}</i>
C	10,57±0,19 ^a	15,34±1,03 ^a	13,28±0,95 ^a	13,99±11,7 ^a
I	1,89±0,95 ^b	7,98±1,87 ^b	7,10±0,55 ^b	53,01±2,07 ^b
F	15,34±5,92 ^A	11,53±0,95 ^A	12,40±0,72 ^A	6,37±3,58 ^A
M	1,10±0,21 ^B	9,12±0,27 ^B	8,83±0,31 ^B	1,55±0,66 ^B

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Como o SFB simula um ambiente complexo e mais próximo do sangue animal, a amostra I não seria indicada para utilização por longos períodos em feridas de espessura total, ou seja, daquelas que atinge toda a derme completa e/ou a hipoderme (Mandelbaum *et al.*, 2003), uma vez que essa formulação não permanece estável nestas condições.

4.2.6. Análise das propriedades mecânicas das membranas reticuladas por diferentes métodos

Na Tabela 4.8 são apresentados os valores referentes às propriedades mecânicas das amostras preparadas com reticulação primária e secundária ou somente com reticulação secundária.

Tabela 4.8: Análise das propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato preparadas sem adição de AlphaSan® RC2000: (C) amostras com reticulação dupla; (I) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (F) amostras com reticulação dupla; (M) amostras somente com reticulação secundária.

Formulações	Resistência Mecânica	
	Tensão na ruptura (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
C	20,45±1,38 ^a	2,78±0,31 ^a
I	3,70±0,28 ^b	5,63±0,29 ^b
F	4,94±0,83 ^A	3,66±0,28 ^A
M	2,48±0,39 ^B	3,8±0,38 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan® RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan® RC2000.

As membranas preparadas somente com reticulação secundária (formulações I e M) apresentaram valores de tensão na ruptura significativamente mais baixos do que aquelas que passaram por ambas as etapas de reticulação. O contrário aconteceu com o alongamento na ruptura, que foi mais elevado para as formulações preparadas somente com reticulação secundária. Estes resultados coincidem apenas parcialmente com os relatados por Wang *et al.* (2001, 2002) que verificaram que o aumento da quantidade de CaCl_2 na reticulação de filmes de quitosana-alginato levou a um aumento tanto da resistência à tração quanto do alongamento na ruptura. O uso de menores quantidades de cálcio reduz o número de pontes iônicas ligando carboxilas livres das cadeias de alginato, contribuindo para a diminuição da resistência à tração.

Tendo em vista os resultados obtidos nas caracterizações discutidas neste item, pode-se constatar a viabilidade da preparação de membranas somente com reticulação secundária, tanto na presença quanto na ausência de AlphaSan® RC2000, o que permite assim uma diminuição ainda maior no tempo de processamento das mesmas. Entretanto, notam-se nestes dispositivos duas limitações. Quando na ausência de prata, nota-se baixa estabilidade quando os dispositivos são expostos por longos períodos em SFB. Outra implicação é quanto às propriedades mecânicas das membranas, que diminuíram ainda mais com a supressão da etapa de reticulação primária.

Nesta perspectiva, no próximo item são analisadas estratégias de aumento da resistência mecânica das membranas utilizando Silpuran[®] 2130 A/B, comparando-se amostras também reticuladas com Ca⁺⁺ em uma e duas etapas.

4.3. Avaliação de estratégias de aumento da resistência mecânica e flexibilidade

Adequadas propriedades mecânicas (compatíveis com as do tecido lesado), são requisitos importantes e esperados para materiais destinados à regeneração tecidual. Como já mencionado anteriormente, membranas de quitosana e alginato na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 possuem razoável fragilidade, o que dificulta tanto sua aplicação quanto seu armazenamento.

No intuito de contornar essa limitação, nesta etapa objetivou-se avaliar duas estratégias utilizando o composto siliconado Silpuran[®] 2130 A/B nesses dispositivos.

Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares visando selecionar a proporção mais adequada de Silpuran[®] 2130 A/B em relação ao complexo polimérico (resultados não mostrados), observando-se que a proporção mais promissora dentre as testadas era de 10% em relação à massa total de polissacarídeos na mistura, visto que se desejava manter no material final propriedades mais diretamente associadas aos biopolímeros, como alta capacidade de absorção e potencial para biorreabsorção. Os resultados das estratégias testadas e a discussão das mesmas estão descritos a seguir.

4.3.1. Utilização de “liner” revestido com Silpuran[®] 2130 A/B para suporte da membrana de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®] RC2000

Foram utilizadas duas metodologias utilizando *liner* como suporte da membrana. Na primeira, o complexo constituído da suspensão de quitosana e alginato, neutralizado em única etapa, contendo 1,1% de prata e preparado com reticulação primária, foi depositado na superfície do *liner* à qual foi previamente adicionado o composto siliconado. Após exposição a 60 °C por

6 horas houve a formação da membrana sobre o *liner*. Tal dispositivo mostrou-se bastante flexível. Na segunda metodologia, a membrana seca de quitosana e alginato contendo prata e submetida às duas etapas de reticulação foi pré-formada e fixada no *liner* revestido com silicone e, após exposição a 60 °C por 3 horas, o dispositivo caracterizou-se também por alta flexibilidade.

No entanto, após o intumescimento de ambos os dispositivos em água deionizada e solução de PBS verificou-se solubilização da fase constituída pela membrana, no primeiro caso, e descolamento da membrana do *liner* no segundo caso.

Assim, a utilização de *liner* revestido com 10 mL de Silpuran[®] 2130 A/B, nas metodologias testadas no presente estudo não foi satisfatória para a utilização como curativos para o tratamento de lesões de pele.

4.3.2. Incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B no processamento das membranas de quitosana e alginato

Nesta estratégia, pretendeu-se avaliar as características das membranas de quitosana e alginato contendo 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, na presença ou ausência de 10% de AlphaSan[®] RC2000. Visou-se verificar também se o composto siliconado atuaria como um agente reticulante, possibilitando descartar uma ou ambas as etapas de reticulação com íons Ca⁺⁺. Deste modo, serão apresentados e discutido os resultados relacionados às membranas preparadas com reticulação primária e secundária ou somente submetidas à reticulação secundária.

4.3.3. Aspecto das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B

Na Figura 4.8 mostra-se o aspecto da membrana de quitosana e alginato preparada com incorporação de 10% do composto siliconado, na ausência das etapas de reticulação e livre de AlphaSan[®] RC2000.

A membrana se caracterizou por alta flexibilidade e adesividade, porém sua estrutura não se mostrou contínua. A adição apenas de Silpuran[®] 2130 A/B não foi suficiente para estabilizar a membrana. Como já discutido anteriormente, a reticulação com íons Ca⁺⁺ é necessária para a formação de um filme homogêneo, uma vez que a ausência desses íons impossibilita reforço da matriz polimérica. Portanto, esta amostra não foi adicionalmente caracterizada no presente trabalho.

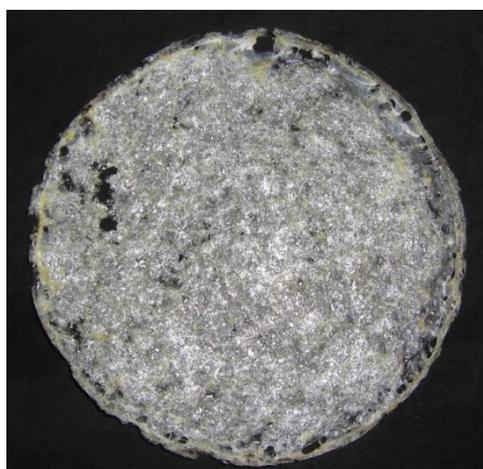


Figura 4.8 – Aspecto visual da formulação preparada com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B e na ausência das etapas independentes de reticulação.

Na Figura 4.9 está ilustrado o aspecto típico das membranas de quitosana e alginato com incorporação do gel de silicone na presença ou ausência do antimicrobiano à base de prata, preparadas com reticulação primária e secundária ou somente com reticulação secundária.

Verificou-se que as membranas submetidas somente à reticulação secundária apresentaram aspecto mais rugoso do que aquelas preparadas na presença das duas etapas independentes de reticulação. Nota-se também em todas as formulações a presença de pequenas bolhas esbranquiçadas, que podem ser fruto da baixa miscibilidade do gel de silicone com a suspensão do PEC. Mas, ao comparar as formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B expostas às duas etapas de reticulação (Figuras 4.9a e 4.9c) com as formulações livres do composto

siliconado (Figuras 4.1c e 4.1f), pode-se notar que os dispositivos contendo o gel de silicone apresentaram aspecto mais homogêneo, além de alta flexibilidade e adesividade, como indicado na Figura 4.10.

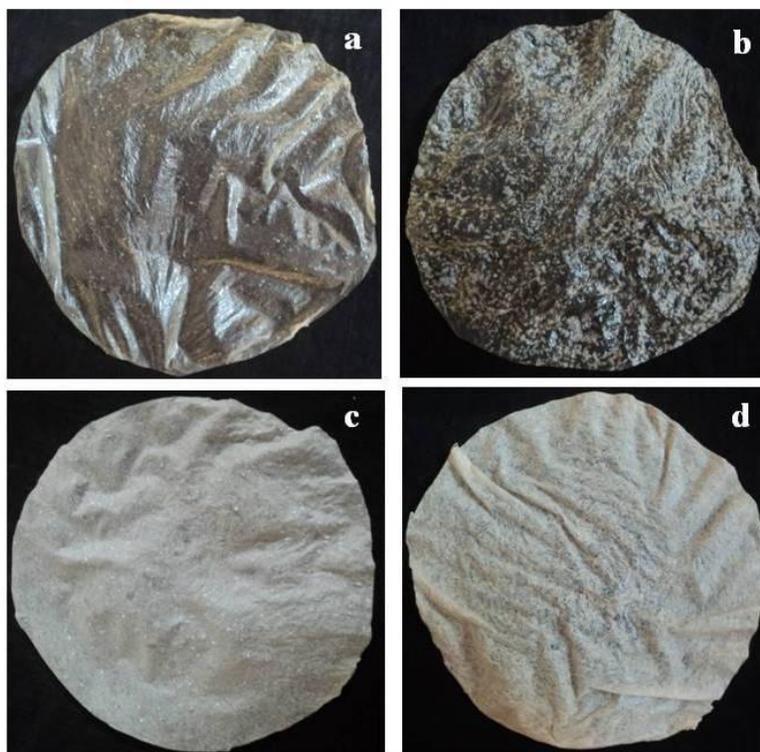


Figura 4.9 – Aspecto visual das formulações preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) com reticulação primária e secundária; (b) somente reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (c) com reticulação primária e secundária; (d) somente reticulação secundária.

Segundo Ratner *et al.* (2004), elastômeros de silicone podem ser facilmente transformados em uma rede tridimensional devido à sua facilidade de reticulação no ambiente ou em temperaturas elevadas. Além do mais, os agentes siliconados permitem a formação de filmes com superfícies bastante homogêneas. No caso do Silpuran[®] 2130 A/B, a reticulação ocorre em temperatura elevada. De acordo com o fabricante (Wacker), a vulcanização do composto siliconado ocorre rapidamente acima de 100 °C. No presente trabalho, foi observada a formação

de uma película de silicone após exposição a 100 °C por 30 minutos, assim como a formação do mesmo tipo de película a 60 °C por 6 horas.



Figura 4.10 – Flexibilidade das formulações preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B com adição de 11% de AlphaSan[®] RC2000.

4.3.4. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B

Na Figura 4.11 estão apresentadas as morfologias de superfície típicas das membranas de quitosana e alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B preparadas na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 e expostas aos processos de reticulação primária e secundária ou somente de reticulação secundária.

Nota-se ainda mais claramente a formação de bolhas na superfície das amostras siliconadas. De acordo com Fawcett *et al.* (2012), superfícies de filmes contendo elastômeros de silicone podem conter bolhas que são geradas durante a desaeração e, adicionalmente, pela produção de hidrogênio a partir de polímeros contendo Si-H na presença de catalisadores à base de platina, como é o caso do Silpuran[®] 2130 A/B. Os autores relataram que as bolhas se formam rapidamente e sua retirada da matriz polimérica não é simples. Uma alternativa citada pelos mesmos autores é a utilização de agentes tensoativos para a possível estabilização das bolhas formadas, estratégia esta que não foi testada no presente trabalho. Conforme também já

mencionado, estas bolhas podem também ser resultado da dispersão ineficiente do gel de silicone na suspensão do PEC de alginato e quitosana.

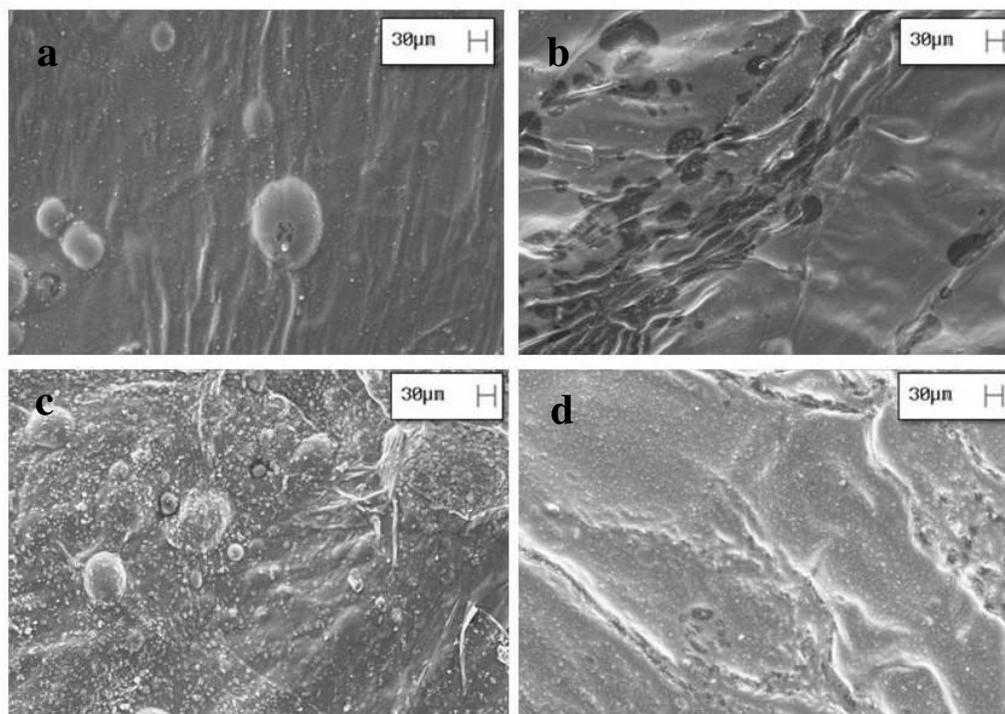


Figura 4.11 – Morfologia da superfície das formulações contendo 10 % Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) amostras com reticulação dupla; (b) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (c) amostras com reticulação dupla; (d) amostras somente com reticulação secundária.

Ainda, segundo Estarlich *et al.* (2011), elastômeros de silicone podem apresentar esta separação devido à viscosidade dos mesmos. No entanto, tendo-se em vista que as soluções de quitosana e alginato também são viscosas, todas as membranas contendo estes polissacarídeos estão sujeitas a problemas quanto à mistura inadequada e possível separação de fases. De acordo com Rodrigues (2008), falhas ao longo da superfície dos dispositivos de quitosana e alginato podem ser decorrentes da solubilização de moléculas de alginato livres na matriz da membrana

sem a ocorrência de formação do PEC (regiões interfásicas), ou podem ainda resultar do enclausuramento de bolhas de ar no meio viscoso antes da conclusão do processo de secagem.

Como já esperado, as amostras preparadas somente com reticulação secundária (Figuras 4.11b e 4.11d) apresentaram menor compactação das fibras poliméricas e, conseqüentemente, maior rugosidade na superfície. O antimicrobiano exibiu dispersão relativamente homogênea na superfície das matrizes poliméricas contendo silicone (Figuras 4.11c e 4.11d).

Para verificar a influência da adição de Silpuran[®] 2130 A/B nas membranas de quitosana e alginato contendo ou não AlphaSan[®] RC2000, as amostras também foram avaliadas quanto ao aspecto dos cortes transversais. Os resultados são mostrados na Figura 4.12, notando-se que as bolhas decorrentes da utilização do gel de silicone se formaram também entre as lamelas das membranas. Aparentemente, as formulações siliconadas apresentaram lamelas mais justapostas do que as amostras na ausência do agente siliconado (Figuras 4.3c, 4.3f, 4.6a e 4.6b), o que possivelmente pode ter contribuído para a redução da espessura das mesmas. Assim, estudos mais detalhados sobre a espessura das membranas contendo o gel de silicone serão apresentados e discutidos mais adiante.

As formulações submetidas às duas etapas de reticulação (Figuras 4.12a e 4.12c) apresentaram lamelas mais compactas do que as amostras preparadas somente com reticulação secundária (Figuras 4.12b e 4.12d), o que também foi observado no item 4.2.2.

O antimicrobiano à base de prata mostrou-se localizado de forma dispersa nas amostras e também entre as lamelas das amostras siliconadas, proporcionando maior compactação lamelar nas formulações preparadas somente com reticulação secundária (Figura 4.12d) do que naquela na ausência de prata (Figura 4.12b). Devido à baixa solubilidade do AlphaSan[®] RC2000, o mesmo supriu os espaços entre as lamelas decorrentes da reticulação secundária.

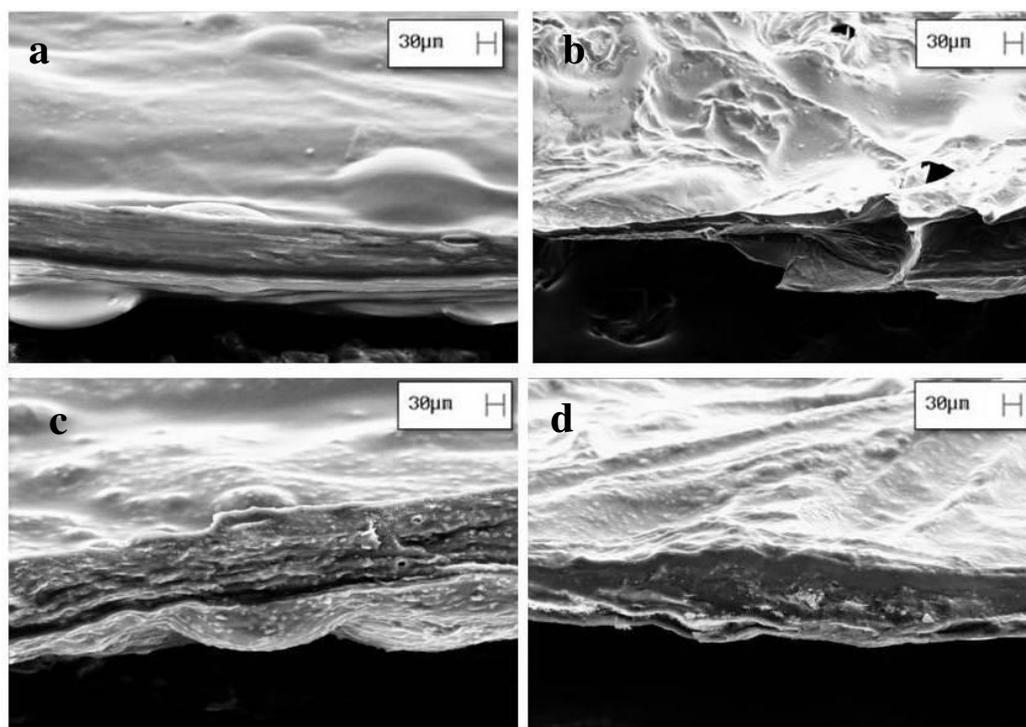


Figura 4.12 – Corte transversal das formulações contendo 10 % Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) amostras com reticulação dupla; (b) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (c) amostras com reticulação dupla; (d) amostras somente com reticulação secundária.

4.3.5. Análise elementar das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B por EDS

Esta análise foi realizada para verificar a presença e a forma de distribuição dos íons cálcio, da prata presente no agente antimicrobiano e do silício proveniente do agente siliconado, com o intuito de verificar se estes compostos não teriam sido removidos após a lavagem das membranas com água. Na Figura 4.13 são mostrados os aspectos típicos dos espectros obtidos para as formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B, enquanto nas Figuras 4.14 e 4.15 indica-se a distribuição do agente siliconado e de AlphaSan[®] RC2000 nas membranas, por meio de mapeamento químico de silício e prata.

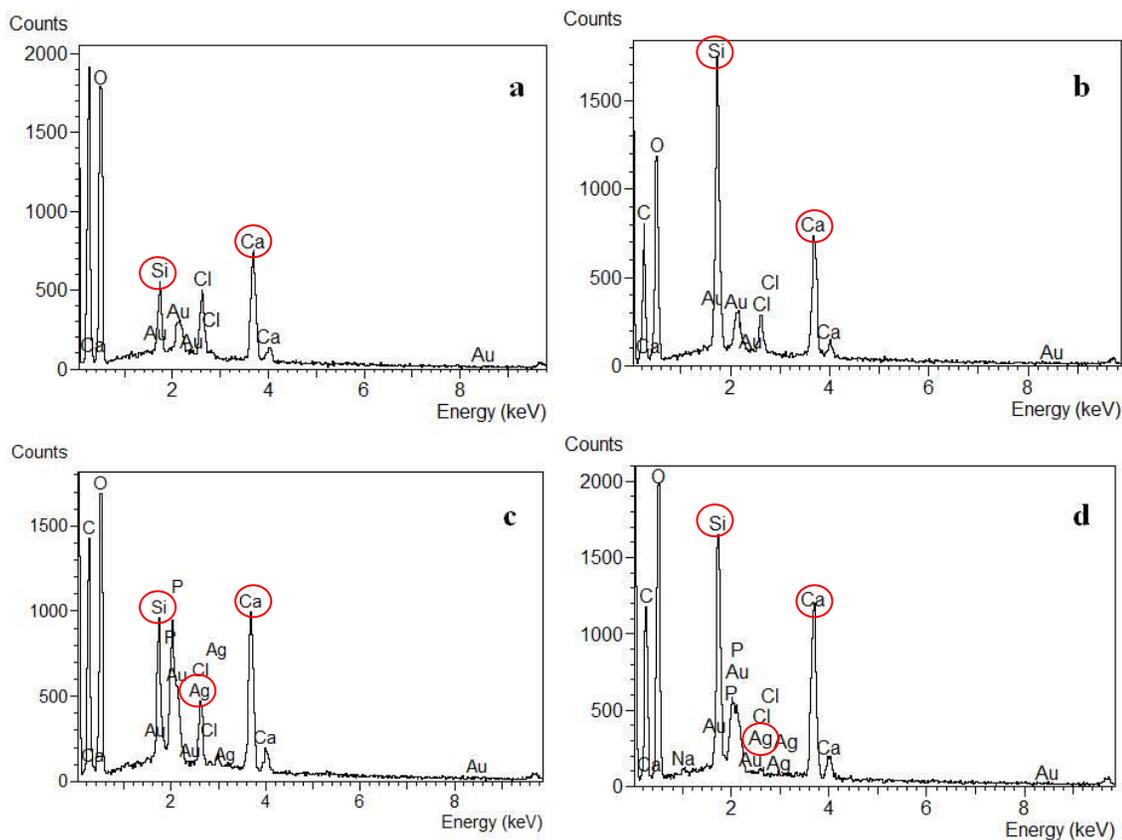


Figura 4.13 – Espectros de EDS típico das formulações contendo 10 % Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (a) amostras com reticulação dupla; (b) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (c) amostras com reticulação dupla; (d) amostras somente com reticulação secundária. Os picos de silício, cálcio e prata de maior intensidade estão evidenciados por meio de círculos nos elementos a eles referentes.

Observa-se nas Figuras 4.13 e 4.14 que os três elementos de interesse foram detectados nas amostras avaliadas. Nota-se que apesar da eliminação da primeira etapa de reticulação (Figuras 4.13b e 4.13d), os íons cálcio permaneceram em porcentagem similar à verificada nas formulações submetidas às duas etapas de reticulação (Figuras 4.13a e 4.13c). Assim, pode-se supor que durante a lavagem das membranas com água, os íons cálcio referentes à reticulação primária podem ser parcialmente removidos, prevalecendo os íons adicionados durante a segunda etapa de reticulação, ou ainda que aproximadamente a mesma quantidade de ligações entre os

grupos carboxila disponíveis do alginato e os íons cálcio são formadas, independentemente do número de vezes a que as amostras são submetidas aos processos de reticulação.

O silício foi detectado em todas as amostras contendo Silpuran[®] 2130 A/B. Nota-se nas Figuras 4.14a a 4.14f regiões onde há aglomeração de Si. Como já discutido anteriormente, estes agregados podem ser resultado das bolhas formadas durante a reticulação do gel de silicone, ou em decorrência de dispersão pouco efetiva no meio, com segregação de fases nas membranas. No entanto, observa-se que, assim como a prata, o silício não foi removido após a etapa de lavagem com água deionizada.

A porcentagem mássica de prata encontrada nas membranas (Figuras 4.13c e 4.13d) foi baixa, porém isto já era esperado, uma vez que são incorporados 1,1% de prata nos dispositivos deste trabalho. Na Figura 4.15 tem-se o mapeamento químico com fundo branco para melhor visualização da prata (em roxo) e silício (em verde). Por esta análise verificou-se que a prata não foi removida após as duas etapas consecutivas de lavagem com água. Como não se verifica a presença exclusiva deste composto nas regiões nas quais se localiza o AlphaSan[®] RC2000 (evidenciadas pelos pequenos cubos na Figura 4.15a a 4.15f), mas nota-se que este elemento se encontra disperso por toda a extensão da amostra, supõe-se que parte da prata possa ter se dissociado do agente antimicrobiano. Destaca-se que as análises de mapeamento químico de prata na superfície das amostras não resultaram em dados tão claros como os verificados para o silício, possivelmente devido à baixa proporção de agente antimicrobiano incorporada na amostra, notando-se uma limitação na técnica quanto à sensibilidade para a identificação destes íons.

4.3.6. Análise do efeito da adição de Silpuran[®] 2130 A/B por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

Através deste método pode-se verificar a interação entre os compostos presentes na amostra. As ligações químicas são identificadas pela comparação dos valores de energia de radiação infravermelha absorvida, uma vez que cada ligação possui um espectro de vibração característico.

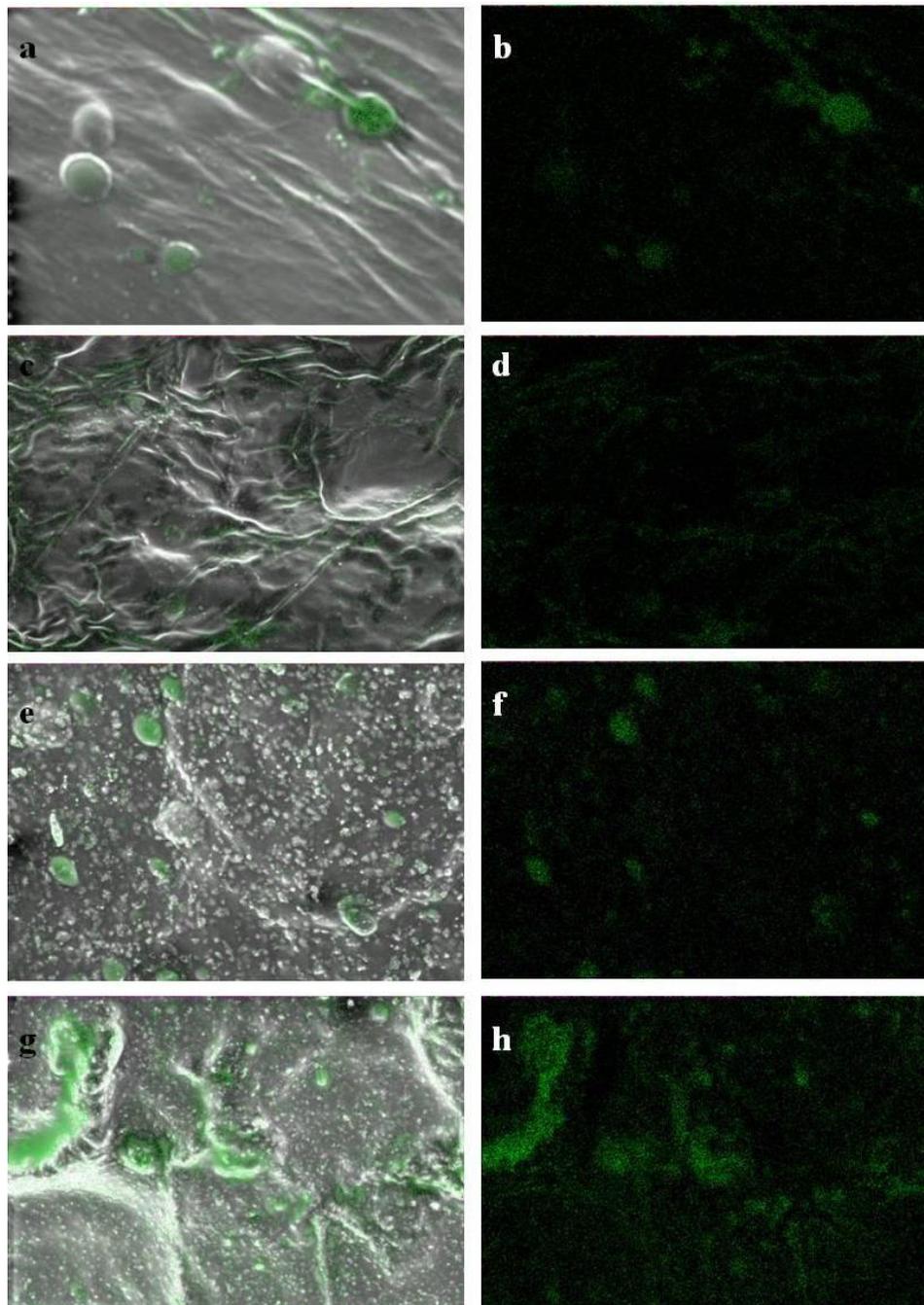


Figura 4.14 – Mapeamento de silício nas formulações contendo 10 % Silpuran® 2130 A/B. As imagens à direita são correspondentes às da esquerda, reduzindo-se à direita o contraste da superfície das membranas (fundo negro) para evidenciar a localização do silício (em verde). Amostras sem adição de AlphaSan® RC2000.: (a) e (b) amostra com reticulação dupla; (c) e (d) amostra somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (e) e (f) amostra com reticulação dupla; (g) e (h) amostra somente com reticulação secundária.

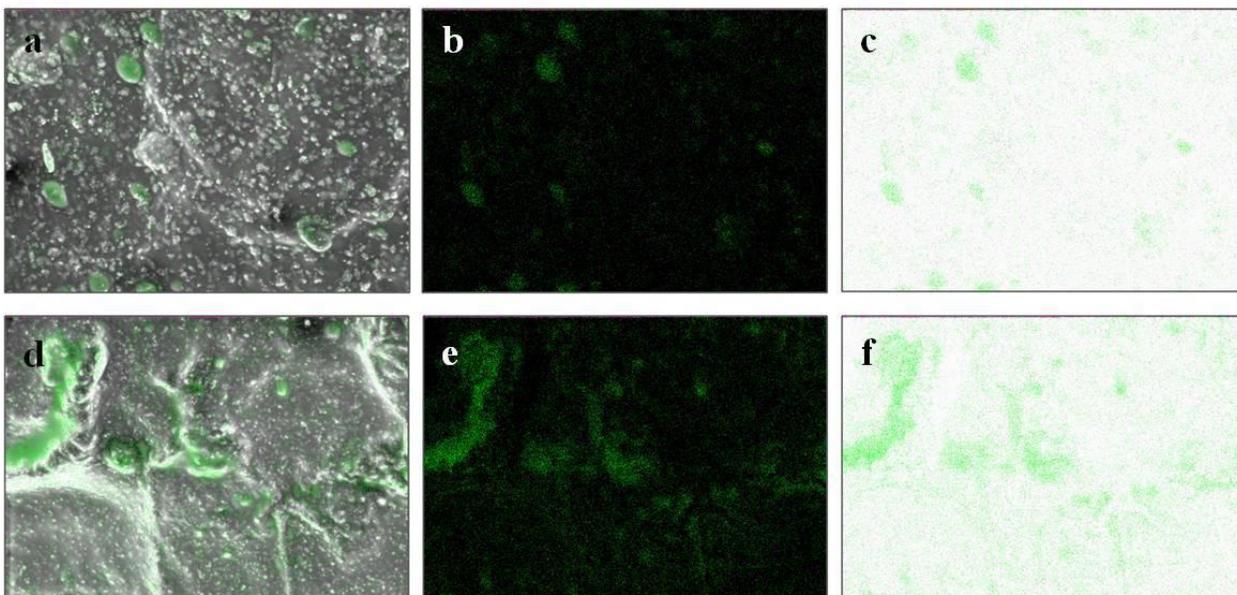


Figura 4.15 – Mapeamento de silício nas formulações contendo 10 % Silpuran[®] 2130 A/B com adição de AlphaSan[®] RC2000: (a), (b) e (c) amostras com reticulação dupla e (d), (e) e (f) amostras somente com reticulação secundária. As imagens (a), (b) e (c) são correspondentes entre si, assim como as imagens (d), (e) e (f), reduzindo-se o contraste da superfície das membranas (fundo negro ou branco) para evidenciar a localização do silício (em verde) e da prata (em roxo).

Segundo Jaeger e Gleria (2007), a espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) é uma das técnicas mais eficientes para detectar a presença de silicones em uma amostra, assim como para obter informações sobre sua estrutura. De acordo com os autores, níveis muito baixos de polidimetilsiloxano (PDMS) podem ser detectados.

Nas Figuras 4.16 e 4.17 são mostrados os espectros de absorção no infravermelho (FTIR-ATR) das membranas de quitosana e alginato preparadas somente com reticulação secundária, na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 e Silpuran[®] 2130 A/B.

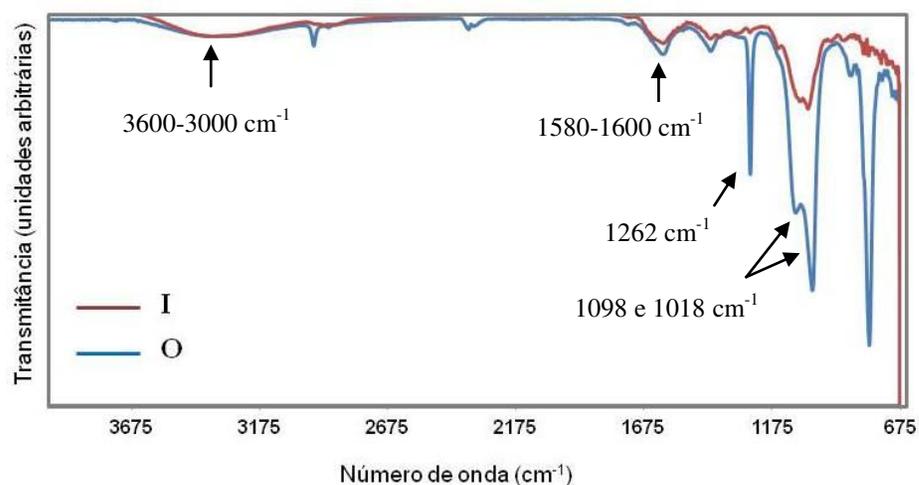


Figura 4.16 - Espectro de absorção (FTIR-ATR) das membranas de quitosana-alginato livres de AlphaSan[®] RC2000, preparadas somente com reticulação secundária e na presença de Silpuran[®] 2130 A/B (formulação O) ou na ausência do mesmo (formulação I).

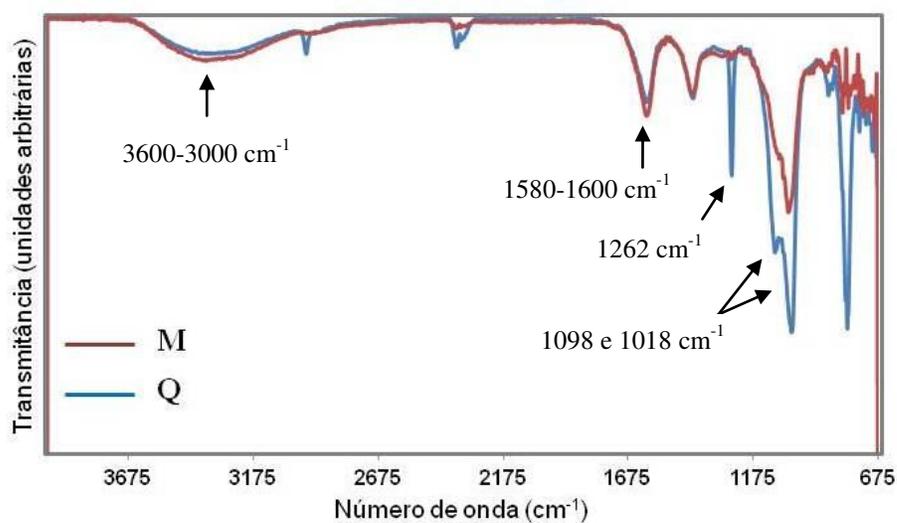


Figura 4.17 - Espectro de absorção (FTIR-ATR) das membranas de quitosana-alginato contendo AlphaSan[®] RC2000, preparadas somente com reticulação secundária e na presença de Silpuran[®] 2130 A/B (formulação Q) ou na ausência do mesmo (formulação M).

Na Tabela 4.9 encontram-se os picos de absorção característicos, que podem ser utilizados para identificar os compostos presentes nas membranas. Como pode ser observado através das Figuras 4.16 e 4.17, ambos os espectros de absorção das membranas de quitosana e alginato mostram uma banda larga na região de 3600-3000 cm^{-1} , aproximadamente. De acordo com Lawrie *et al.* (2007), esta banda pode ser atribuída ao estiramento dos grupos $-\text{OH}$, presentes tanto na quitosana como no alginato. Neste caso, para as formulações livres de AlphaSan[®] RC2000 (Figura 4.16) e na presença do mesmo (Figura 4.17), foram observados picos entre 3374 e 3355.

Tabela 4.9: Picos característicos observados nos espectros de absorção dos compostos analisados e suas respectivas atribuições.

Pico (cm^{-1})	Grupo	Composto
799	$-\text{Si}-\text{CH}_3$	PDMS
1018	$-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$	PDMS
1039	$-\text{P}-\text{O}$	AlphaSan [®]
1262	$-\text{Si}-\text{CH}_3$	PDMS
1405	$-\text{COOH}$	Alginato
1560	$-\text{NH}$	Quitosana
1580	$-\text{NH}_2$	Quitosana
1600	$-\text{COOH}$	Alginato
1650	$-\text{C}=\text{O}$ do grupo amida	Quitosana

Referências: Liu *et al.* (2001), Nicnas (2004), Sankalia *et al.* (2007), Lawrie *et al.* (2007), Kleinuibling, 2009.

Nota-se que os picos referentes aos grupos amino da quitosana e carboxila do alginato (1580 e 1600 cm^{-1} , respectivamente) não são nítidos, havendo sobreposição destes. De acordo com Lawrie *et al.* (2007) e Sankalia *et al.* (2007), os grupos carboxila e amina absorvem a radiação em comprimentos de onda semelhantes, na região de 1560 a 1640 cm^{-1} . Desta forma, é

difícil identificar a presença de um ou outro composto livre, assim como seu estado de protonação ou a ocorrência de interação entre as cadeias.

Observa-se também que as bandas características da quitosana e alginato (1560 a 1640 cm^{-1}) mostraram-se mais pronunciadas quando na presença do agente antimicrobiano (Figura 4.16). De acordo como observado por Kleinubing (2009), a banda de 1612 cm^{-1} refere-se à ligação COO- M, onde M pode ser Na^+ , K^+ , Ca^{++} ou Mg^{++} . Uma vez que o AlphaSan[®] RC2000 possui Na^+ em sua composição e tendo em vista a sobreposição dessa banda com as bandas referentes ao PEC quitosana-alginato, pode-se supor que houve uma interação entre o íons sódio do agente antimicrobiano com a carboxila do alginato. Ainda, os íons Ca^{++} da solução de reticulação (CaCl_2), também podem ter interagido com a carboxila do alginato.

Segundo a National Industrial Chemicals Notification And Assessment Scheme (NICNAS, 2004), o AlphaSan[®] RC2000 possui um pico de absorção em 1039 cm^{-1} referente à ligação P-O. O mesmo pico foi também observado nas amostras contendo o agente antimicrobiano, na Figura 4.17 (formulações M e Q).

Ao analisar a incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B nas amostras O e Q (Figuras 4.16 e 4.17, respectivamente), pode-se notar que houve picos mais pronunciados nas bandas por volta de 1019 , 1260 e 800 cm^{-1} . Liu *et al.* (2001) observou que o PDMS apresenta picos agudos a 1262 cm^{-1} , os quais são característicos para ligações Si-CH₃ e picos duplos e largos em 1098 e 1018 cm^{-1} que são característicos para ligações Si-O-Si.

Observa-se, portanto, que a incorporação de AlphaSan[®] RC2000 e Silpuran[®] 2130 A/B nos curativos de quitosana-alginato pode ser realizada com sucesso, uma vez que os mesmos não são removidos do dispositivo após as etapas de lavagem.

4.3.7. Avaliação da espessura das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B

Na Tabela 4.10 são apresentados os resultados obtidos na medida da espessura referentes às membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B preparadas na presença ou ausência de

AlphaSan[®] RC2000 expostas aos processos de reticulação primária e secundária ou somente de reticulação secundária, para amostras tanto no estado seco quanto úmido.

Tabela 4.10: Espessura das membranas de quitosana-alginato preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (N) amostras com reticulação dupla; (O) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (P) amostras com reticulação dupla; (Q) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Espessura (μm)</i>	
	<i>Amostras secas</i>	<i>Amostras úmidas</i>
N	11,66±0,21 ^a	143,33±2,10 ^a
O	19,83±0,70 ^b	245,00±5,62 ^b
P	16,83±0,40 ^A	343,33±4,94 ^A
Q	16,33±0,80 ^A	210,00±7,30 ^B

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Comparando-se os valores de espessura obtidos nas formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B (formulações N a Q) e livres do mesmo (formulações C, F, I e M), Tabela 4.10 e 4.5, respectivamente, nota-se uma grande diminuição na espessura das amostras contendo o composto siliconado. Essa diminuição, após a adição do silicone em curativos, também foi observada por Losi *et al.* (2012), que compararam gaze com poliéster revestido com silicone, obtendo diminuição de 15 até 12 mm de espessura e observando também uma aparência mais homogênea. Tal redução de espessura pode trazer vantagens, como o aumento do conforto do paciente.

Para as amostras livres do agente antimicrobiano, a membrana preparada somente com reticulação secundária (formulação O) apresentou maior espessura do que a amostra preparada com as duas etapas de reticulação (formulação N), tanto no estado seco quanto no estado úmido, com valores de 20 e 245 μm respectivamente. O mesmo foi observado para as amostras livres de

Silpuran[®] 2130 A/B, no item 4.2.2 e, como já discutido neste trabalho, as formulações preparadas somente com reticulação secundária possuem menor mobilidade das cadeias poliméricas, as quais não se aproximaram suficientemente durante a etapa de secagem, resultando em maior espessura.

Porém, o mesmo não foi observado para os dispositivos obtidos na presença de AlphaSan[®] RC2000 (formulações P e Q), uma vez que não houve diferença significativa quando se comparou a ocorrência ou não da reticulação secundária nas amostras secas. As ligações de coordenação entre o grupamento fosfato do agente antimicrobiano e o grupamento amino da quitosana podem ter substituído numericamente as ligações remanescentes do alginato que não foram reticuladas primariamente com íons Ca⁺⁺, acarretando na similaridade dos valores obtidos. Já para as amostras úmidas, a formulação com reticulação dupla (formulação P) apresentou maior espessura; a maior mobilidade das cadeias pode ter contribuído para esse comportamento, uma vez que estas podem ter absorvido maior quantidade de água, apresentando, por esta razão, maior espaçamento entre as lamelas quando úmidas.

4.3.8. Capacidade de absorção das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B quando expostas a soluções fisiológicas

Os valores listados na Tabela 4.11 correspondem à capacidade de absorção das formulações preparadas na presença ou ausência de AlphaSan[®] RC2000 e na presença de 10% de Silpuran[®] 2130 A/B quando expostas à água, solução salina (SS), fluido corpóreo simulado (FCS) e soro fetal bovino (SFB) após reticulação simples ou dupla.

Nota-se pela comparação dos dados das Tabelas 4.6 e 4.11 que a adição de Silpuran[®] 2130 A/B na amostra submetida à reticulação dupla (formulação N) provocou uma diminuição na absorção de todos os fluidos. Porém, ao se adicionar AlphaSan[®] RC2000 a amostra siliconada (formulação P) absorveu maior quantidade de SS, FCS e SFB. Este comportamento pode ser devido à diferença entre os valores de pH destas soluções. Em meios ácidos como a solução salina (pH 5,5), a protonação seguida do afastamento dos grupos amino residuais do complexo polieletrólito pode causar uma expansão da estrutura polimérica, facilitando a penetração e a absorção de água. Já em condições de pH próximas à neutralidade,

como o fluido corpóreo simulado (pH 7,4) e o soro fetal bovino (pH 7,2), os grupos amino da quitosana, encontram-se, em sua maioria, desprotonados, portanto, não interagem com os grupos carboxila do alginato, negativamente carregados. Desta forma, as ligações iônicas entre os polissacarídeos seriam desfavorecidas, aumentando o espaçamento entre as lamelas e, conseqüentemente, promovendo a absorção das soluções (Girata, 2011; Bueno, 2010).

Tabela 4.11: Valores para a capacidade de absorção das membranas de quitosana-alginato preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (N) amostras com reticulação dupla; (O) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (P) amostras com reticulação dupla; (Q) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Capacidade de Absorção (g/g)</i>			
	<i>A_{Água}</i>	<i>A_{SS}</i>	<i>A_{FCS}</i>	<i>A_{SFB}</i>
N	3,09±0,19 ^a	8,06±0,43 ^a	6,32±0,38 ^a	6,52±0,35 ^a
O	4,92±0,35 ^a	5,90±0,20 ^b	4,92±0,08 ^b	6,87±0,93 ^a
P	5,46±0,90 ^A	13,91±1,64 ^A	8,59±0,41 ^A	8,53±0,47 ^A
Q	2,19±0,09 ^B	5,35±0,39 ^B	4,80±0,21 ^B	5,35±0,31 ^B

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Todas as amostras submetidas somente à reticulação secundária e contendo Silpuran[®] 2130 A/B, tanto na presença quanto na ausência de prata, absorveram menores quantidades de soluções que amostras preparadas sem o gel de silicone. De acordo com Brook (2006), os elastômeros de silicone são, geralmente, preparados por reticulação aditiva e esta reticulação altera drasticamente as propriedades físicas de um polímero, conduzindo a um aumento da viscosidade e à redução na capacidade de absorção de soluções.

Nota-se que o fluido melhor absorvido pelas formulações contendo o composto siliconado foi a SS, com uma variação de 6 a 8 g/g para a amostra livre de antimicrobiano e de 5 a 14 g/g para a formulação contendo o mesmo.

A formulação livre de AlphaSan[®] RC2000 e submetida às duas etapas de reticulação (formulação N) apresentou maior absorção em SS e FCS do que a amostra sem reticulação primária (formulação O). Não houve diferenças significativas quanto à absorção em água e SFB para estas amostras. No entanto, diferenças significativas foram encontradas para as formulações contendo o agente microbicida, uma vez que a amostra preparada somente com reticulação secundária (formulação Q) apresentou menor média de absorção quando em contato com todos os fluidos fisiológicos. Como já mencionado anteriormente, a menor mobilidade das cadeias polissacarídicas das amostras submetidas somente à reticulação secundária pode ter ocasionado uma menor interação com os solventes, diminuindo a absorção dos mesmos.

Nota-se que os valores para a capacidade de absorção das diferentes soluções nas amostras contendo Silpuran[®] 2130 A/B são relativamente baixos. Entretanto, tais valores são ainda apropriados considerando-se a utilização das membranas siliconadas como curativos para lesões de pele com produção moderada de exsudato.

4.3.9. Estabilidade das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B quando expostas a diferentes soluções fisiológicas

Na Tabela 4.12 estão indicados os valores obtidos com relação à perda de massa das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B em diferentes soluções aquosas.

Comparando-se os valores de perda de massa obtidos nas formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B (formulações N a Q) e livres do mesmo (formulações C, F, I e M), nota-se que a membrana siliconada livre de prata e preparada com dupla reticulação (formulação N) apresentou maior estabilidade frente à formulação livre do mesmo (formulação C, Tabela 4.7), com uma máxima perda de 8% da massa em SS. Devido ao maior afastamento das cadeias poliméricas, a membrana livre de silicone (formulação C) absorveu maiores quantidades das soluções aquosas e, conseqüentemente, houve maior solubilização da mesma. Porém, o mesmo comportamento não foi observado na amostra submetida somente à reticulação secundária (formulação O), uma vez que esta apresentou média semelhante à da formulação I (livre de silicone) quando exposta a água e SS. No entanto, a formulação O exibiu maior média de

absorção em FCS. Como já discutido anteriormente, o pH do FCS (pH 7,4) pode ter desfavorecido as pontes iônicas entre a quitosana e o alginato, promovendo assim maior espaçamento entre as lamelas, aumentando a capacidade de absorção da mesma neste fluido. Já para a absorção em SFB, a formulação I apresentou aumento significativo, uma vez que devido à ausência de prata, a quelação com as proteínas do soro fetal não foi promovida e isto contribuiu para o rompimento das interações quitosana-alginato.

Tabela 4.12: Valores para a perda de massa das membranas de quitosana-alginato preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (N) amostras com reticulação dupla; (O) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (P) amostras com reticulação dupla; (Q) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Perda de Massa (%)</i>			
	<i>P_{Água}</i>	<i>P_{SS}</i>	<i>P_{FCS}</i>	<i>P_{SFB}</i>
N	2,34±0,32 ^a	8,20±0,54 ^a	5,98±0,70 ^a	4,48±0,77 ^a
O	2,05±0,30 ^a	8,29±1,10 ^a	9,62±1,17 ^a	5,15±0,03 ^a
P	1,92±0,37 ^A	4,14±0,49 ^A	1,17±0,21 ^A	3,55±0,30 ^A
Q	1,62±0,11 ^A	2,39±0,86 ^A	4,11±0,85 ^B	3,06±0,87 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Já para as amostras contendo o agente antimicrobiano, observa-se que as formulações contendo o gel de silicone (formulações P e Q) apresentaram maior estabilidade frente às soluções aquosas do que as formulações livres do mesmo (formulações F e M). A única exceção encontrada foi quanto à estabilidade em SFB, uma vez que a formulação Q apresentou maior perda de massa neste fluido frente à formulação M. O pH da solução de SFB (pH 7,2) pode ter favorecido a maior porcentagem de perda de massa desta formulação pois, como já discutido anteriormente, nesta faixa de pH parte dos grupamentos amino da quitosana podem sofrer desprotonação, favorecendo o intumescimento e solubilização da membrana.

De forma geral, para as formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B e preparadas nas distintas formas de reticulação, a solução em que as membranas se mantiveram mais estáveis foi à água, obtendo-se valores de perda de massa por volta de 2%. Como já mencionado anteriormente, quanto maior a quantidade de água absorvida pela membrana, maior o afastamento entre as cadeias poliméricas, o que diminui a intensidade de interação entre as mesmas, contribuindo em última instância, para a solubilização da membrana.

Não foram encontradas diferenças significativas quanto à perda de massa nas diferentes soluções aquosas. A única exceção encontrada foi quanto ao comportamento em FCS das amostras contendo prata, uma vez que houve maior perda de massa para a formulação preparada somente com reticulação secundária (Formulação Q).

Nota-se que a estabilidade das membranas contendo o composto siliconado, tanto na ausência quanto na presença de AlphaSan[®] RC2000 é relativamente alta possibilitando sua utilização como curativos em lesões úmidas por alguns dias antes que sua troca seja necessária.

4.3.10. Análise das propriedades mecânicas das membranas contendo 10% de Silpuran[®] 2130 A/B

Na Tabela 4.13 são mostrados os valores obtidos para a tensão e o alongamento na ruptura dos curativos de quitosana e alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B, na presença ou ausência do antimicrobiano e preparadas nas distintas formas de reticulação.

Ao se comparar os dados obtidos com os descritos na Tabela 4.8, nota-se que houve um aumento significativo na resistência à tração das formulações pela adição do composto siliconado, tanto nas amostras preparadas com as duas etapas de reticulação quanto nas preparadas somente com reticulação secundária.

O Silpuran[®] 2130 A/B é um polidimetilsiloxano que possui grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva nos dois componentes da mistura (A e B). O Silpuran[®] 2130 A contém também catalisadores de platina. A reticulação de cadeias adjacentes dos componentes A e B em diferentes pontos da estrutura pode ter exercido efeito de grande relevância na elevação

da tensão de ruptura, apesar de grupamentos aminados, como a quitosana, interferirem negativamente na catálise. Ainda, as cadeias de siloxano dos compostos siliconados podem adotar várias configurações, aumentando a flexibilidade do material. Além disso, possuem maior distância entre as cadeias adjacentes quando comparadas a outros polímeros. E, adicionalmente, segundo Ratner *et al.* (2004), a platina se liga facilmente a compostos que possuem grupamentos amino em sua estrutura, o que poderia ter também contribuído para a formação complexos mais estáveis. Desta forma, o Silpuran[®] 2130 A/B pode ter melhorado as propriedades mecânicas das membranas por variadas razões, mas principalmente por ter provido os filmes com um esqueleto mais flexível e razoavelmente bem distribuído ao longo da estrutura.

Tabela 4.13: Análise das propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato preparadas com 10% de Silpuran[®] 2130 A/B, sem adição de AlphaSan[®] RC2000: (N) amostras com reticulação dupla; (O) amostras somente com reticulação secundária; ou com adição do mesmo: (P) amostras com reticulação dupla; (Q) amostras somente com reticulação secundária.

<i>Formulações</i>	<i>Resistência Mecânica</i>	
	<i>Tensão na ruptura (MPa)</i>	<i>Alongamento na ruptura (%)</i>
N	63,13±5,52 ^a	5,14±0,27 ^a
O	11,83±2,60 ^b	4,93±0,14 ^a
P	43,50±5,56 ^A	3,88±0,58 ^A
Q	20,32±3,07 ^B	2,72±0,59 ^A

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se a formulações livres de AlphaSan[®] RC2000. Letras maiúsculas referem-se a membranas preparadas na presença de AlphaSan[®] RC2000.

Ao analisar as propriedades mecânicas das amostras siliconadas e preparadas nas distintas formas de reticulação (Tabela 4.13), observa-se que o dispositivo livre de AlphaSan[®] RC2000, apresentou uma diminuição da tensão na ruptura quando preparado somente com reticulação secundária (formulação O), obtendo-se o valor de 12 MPa. Já a amostra preparada com reticulação dupla (formulação N) alcançou um valor de 63 MPa. O mesmo comportamento foi

observado para as formulações na presença do antimicrobiano (formulações P e Q). Como já mencionado anteriormente, as membranas contendo prata apresentam menor resistência à tração; este comportamento pode estar atribuído à maior facilidade da estrutura polimérica de se romper nos locais onde o antimicrobiano está acomodado (Rodrigues, 2008).

Os valores encontrados de resistência à tração para membranas com Silpuran[®] 2130 A/B foram superiores aos encontrados na literatura para dispositivos constituídos somente de quitosana e alginato. Bueno (2010) obteve para membranas de quitosana e alginato valores de 10,9 MPa; na mesma perspectiva, Rodrigues (2008) obteve valores de resistência à tração de 27,7 MPa. Por outro lado, Girata (2011) obteve valores entre 2 e 10 MPa na resistência à tração de membranas de quitosana e alginato preparadas com diferentes proporções de AlphaSan[®] RC2000 e Meng *et al.* (2010) obtiveram valores de 36 MPa para membranas de quitosana e alginato incorporando sulfadiazina de prata.

No entanto, apesar dos bons resultados referentes à tensão na ruptura dos dispositivos, nenhuma das membranas obtidas com a adição do agente siliconado apresentou resultados adequados com relação à variável alongamento na ruptura, uma vez que houve baixos índices desta propriedade, entre 3 e 5%. Tendo em vista que a pele normal apresenta elasticidade por volta de 70% (Hansen e Jemec, 2002), a aplicação destes materiais em regiões do corpo com elevado requerimento mecânico, como joelhos e cotovelos, não seria recomendável. De acordo com Rodrigues (2008), em condições de uso *in vivo* as membranas possivelmente estariam em contato com fluidos corpóreos, assim o alongamento das mesmas durante sua utilização pode ser significativamente maior que o determinado nas amostras secas devido à água exercer um efeito plastificante na estrutura dos curativos.

Assim, verificou-se que a adição de Silpuran[®] 2130 A/B no processamento de membranas de quitosana e alginato é uma ótima alternativa, uma vez que tanto na presença quanto na ausência de antimicrobiano, as membranas apresentam aumento na tensão na ruptura e na flexibilidade.

Uma questão frequente sobre o ciclo de vida de novos produtos industrializados refere-se à relação entre o produto e o meio ambiente, considerando-se aspectos associados tanto à extração dos recursos para obtê-los quanto à sua disposição final. Neste sentido, um produto com

baixa biodegradabilidade pode apresentar persistência e acúmulo no ambiente. No presente trabalho foram desenvolvidos curativos à base de quitosana, alginato e silicone. A quitosana e o alginato são polímeros naturais que apresentam a capacidade de dissolução ou lise no interior do organismo e também no ambiente, porém o composto siliconado, Silpuran[®] 2130 A/B, não possui essa propriedade quando utilizado *in vivo*. No entanto, segundo Colas e Corning (2001), o polidimetilsiloxano pode ser degradado no solo através de um mecanismo abiótico, sendo reduzido a moléculas de menor tamanho que, por sua vez, biodegradam-se no próprio solo ou, após volatilização, podem ser oxidados pela luz solar. Assim, em condições normais, os resíduos resultantes da degradação do Silpuran[®] 2130 A/B seriam sílica inorgânica, dióxido de carbono e vapor de água. Logo, todos os compostos utilizados nos curativos desenvolvidos no presente estudo são de fácil decomposição e, conseqüentemente, não prejudicam o meio ambiente quando descartados.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a influência da correção do pH para a neutralidade imediatamente após a complexação dos polissacarídeos, o aumento da temperatura de secagem e a eliminação das etapas de reticulação, visando a diminuição do tempo de processamento de curativos à base de quitosana e alginato na presença e ausência de um agente antimicrobiano, o AlphaSan®RC2000. Foi avaliada também a incorporação do agente siliconado Silpuran® 2130 A/B em distintas metodologias, visando à melhoria das propriedades mecânicas e flexibilidade dos curativos contendo ou não o agente antimicrobiano à base de prata.

Os resultados mostraram que as membranas secas a 60 °C apresentaram superfície mais lisa quando analisadas a olho nu. A espessura diminuiu com a correção do pH para 7,0 e aumentou na presença de prata, alcançando máximo de 190 µm no caso de amostras úmidas. No caso de formulações obtidas na ausência de prata, a correção do pH para 7,0 aumentou a absorção de solução salina e fluido corpóreo simulado e aumentou também a perda de massa em solução salina. Já o aumento da temperatura diminuiu somente a perda de massa em água. Para as formulações contendo AlphaSan® RC2000, a única diferença encontrada foi o aumento da absorção em água para os materiais neutralizados em única etapa. Os valores encontrados para a resistência mecânica estão dentro dos descritos na literatura, tendo as amostras preparadas em pH 7,0 e secas a 60 °C livres do agente antimicrobiano adequada tensão de ruptura, mas baixa porcentagem de alongamento ao se romperem.

A eliminação das duas etapas de reticulação, assim como somente da reticulação secundária, não foram satisfatórias, uma vez que as formulações testadas não se mantiveram estáveis durante as etapas de lavagem e secagem final. No entanto, os curativos preparados somente na presença da reticulação secundária apresentaram aspecto mais rugoso, assim como maior espessura, alcançando um máximo de 190 µm para as amostras úmidas contendo prata. As formulações na presença de AlphaSan® RC2000 apresentaram menores valores de absorção em SS, FCS e SFB e as amostras na ausência deste apresentaram menor absorção em água e SS. Tanto as formulações na presença quanto na ausência do antimicrobiano apresentaram menor estabilidade em soluções aquosas, assim como valores baixos na tensão de ruptura, quando comparadas com as formulações submetidas a dupla reticulação.

Os curativos que incorporaram Silpuran[®] 2130 A/B em sua composição apresentaram superfície mais homogênea, assim como maior flexibilidade e adesividade. Além do mais, apresentaram menores espessuras, alcançando o valor máximo de 343 µm no caso de amostras úmidas contendo prata. As formulações reticuladas e livres de AlphaSan[®] RC2000 absorveram mais SS e FCS, já as amostras reticuladas e contendo o antimicrobiano absorveram mais todos os fluidos. A incorporação do composto siliconado resultou em menor média de absorção, entretanto possibilitou maior estabilidade frente à exposição às diferentes soluções. A tensão na ruptura aumentou significativamente após a incorporação do silicone, obtendo o valor máximo de 63 MPa para as amostras na ausência de prata e 43 MPa na presença da mesma. Contudo, o gel de silicone não alterou os valores de alongamento na ruptura, os quais permaneceram baixos. Através de análises por EDS e FTIR foi constatado que o AlphaSan[®] RC2000 e o Silpuran[®] 2130 A/B não são removidos após a etapa de lavagem das membranas.

Foi, portanto, observado que é viável o aumento da temperatura de secagem para 60 °C e a correção do pH para 7,0 em etapa única, uma vez que as membranas apresentaram características adequadas e melhor aspecto quando comparadas às amostras preparadas com pH 5,3 e secas à 37 °C. O aumento da temperatura de secagem proporcionou economia no processamento de 14 horas em escala laboratorial. É viável também o processamento somente com reticulação secundária, porém, estes dispositivos possuem características um pouco inferiores aos preparados com as etapas de reticulação primária e secundária. A incorporação de Silpuran[®] 2130 A/B mostrou-se uma boa alternativa para a melhora nas propriedades mecânicas e flexibilidade, visando à aplicação dos dispositivos produzidos como curativos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuação deste trabalho, sugere-se:

- A obtenção de membranas utilizando quitosana e alginato de alta e baixa massa molar, além de outros tipos de alginato e quitosana.
- O estudo da variação na concentração de Silpuran[®] 2130 A/B na complexação de quitosana e alginato.
- A realização de ensaios mais detalhados de identificação e quantificação do composto siliconado nas membranas secas através de técnicas como FTIR.
- O estudo da cinética de liberação da prata das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B.
- A utilização de tensoativos, como o Pluronic F68, nas membranas de quitosana-alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B.
- Investigar a biodegradabilidade do Silpuran[®] 2130 A/B.
- A análise da citotoxicidade a fibroblastos, de sensibilização e irritabilidade dérmica *in vivo* das membranas contendo o composto siliconado e preparadas na presença de 1,1% de prata.
- O estudo do aumento de escala do sistema de produção das membranas.
- A análise da viabilidade econômica de produção das membranas em larga escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. “Wound dressings: principles and practice”. *Surgery (Oxford)*, v.29, n.10, 2011.

AIEDEH, K. M.; TAHA, M. O.; AL-HIARI, Y.; BUSTANJI, Y.; ALKHATIB, H. S. “Effect of ionic crosslinking on the drug release properties on chitosan diacetate matrices”. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.96, n.1, 2007.

ALMEIDA, T. L. “Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico”; Dissertação de mestrado; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; Março de 2009.

American Society for Testing and Materials ASTM D882-95a: *Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastics Sheeting*, 1995.

AROCKIANATHAN, P. M.; SEKAR, S.; KUMARAN, B.; SASTRY, T. P. “Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, p.939-946, 2012.

ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S. A. “Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature”; *Burns*, v.33, p.139-148, 2007.

ÁVILA, A.; BIERBRAUER, K.; PUCCI, G.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, M.; STRUMIA, M. “Study of optimization of the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan”. *Journal of Food Engineering*, v.109, p.752-761, 2012.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. “Quitina e quitosana, aplicações como biomateriais”. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p.27-34, 2007.

BARRÈRE, F.; MAHMOOD, T. A.; GROOT, K.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. “Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions”. *Materials Science and Engineering*, v.59, p.38-71, 2008.

BELLINI, M. Z. “Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, fevereiro de 2012.

BELLINI, M. Z.; PIRES, A. L. R.; VASCONCELOS, M. O.; MORAES, A. M. “Comparaison 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.421-431, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. “Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. “Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.17, p.156-165, 2012.

BORDE, A.; LARSSON, M.; ODELBERG, Y.; HAGMAN, J.; LOWENHIELM, P.; LARSSON, A. “Increased water transport in PDMS silicone films by addition of excipients”. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p.579-588, 2012.

BORSHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. “Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.18, p.256-261, 2008.

BROOK, M. A. “Platinum in silicone breast implants”. *Biomaterials*, v.27, p.3274-3286, 2006.

BUENO, C. Z.; MORAES, A. M. “Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.122, p.624-631, 2011.

BUENO, C. Z. “Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de

pele”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, maio de 2010.

BUENO, C. Z. Comunicação pessoal, Campinas, SP, 2012.

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.

CHELLAT, F.; TABRIZIAN, M.; DUMITRIU, S.; CHORNET, E.; MAGNY, P.; RIVARD, C. H.; YAHIA, L. “*In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex”. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.51, p.107-116, 2000.

CHEN, J. P.; KUO, C. Y.; LEE, W. L.”Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics”. *Applied Surface Science*. 2012, DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.02.106.

COLAS, A.; CORNING, D. “Silicones in pharmaceutical applications”. *Dow Corning Healthcare Industries*, p.1-21, 2001.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. “Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration”. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, p.52-60, 2013.

CIOFFI, N.; RAI, M. “Nano-antimicrobials: Progress and Prospect” *Springer Heidelberg Dordrecht London New York*. 2012, DOI: 10.1007/978-3-642-24428-5.

COSTACHE, M. C.; QU, H.; DUCHEYNE, P.; DEVORE, D. I. “Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings”. *Biomaterials*, v.31, p.6336-6343, 2010.

DA SILVA, M. A. “Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimicótico”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, 2009.

DAI, M.; ZHENG, X.; XU, X.; KONG, X.; LI, X.; GUO, G.; LUO, F.; ZHAO, X.; WEI, Y. Q.; QIAN, Z. “Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 1, p.1-8, 2009.

DALLAN, P. R. M. “Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, outubro de 2005.

DALLAS, P.; SHARMA, V. K.; ZBORIL, R. “Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications and perspective”. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.166, p.119-135, 2011.

DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAÚJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. “Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.105, p.51-59, 2011.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. “Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical application”. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.981-1014, 2011.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. “Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering application using supercritical fluid technology”. *European Polymer Journal*, v. 45, p.141-148, 2009.

DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. “The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns”. *Burns*, S1-S9, 2004.

ESTARLICH, F. M. F.; EATON, P. J.; FLETCHER, R. L.; LEWEY, S. A.; NEVELL, T. G.; SMITH, J. R.; TSIBOUKLIS, J. “The effects of incorporated silicone oils and calcium carbonate on the resistance to settlement and the antifouling performance of a silicone elastomer”. *Journal of Adhesion Science and Technology*, v. 25, p.2183-2198, 2011.

- FAWCETT, A. S.; SO, H. Y.; BROOK, M. A. "Silicone foams stabilized by surfactants generated *in situ* from allyl-functionalized PEG". *Soft Matter*, v.6, p.1229-1237, 2010.
- FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. "Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura". *Revista da Escola de Enfermagem. USP*, 2003.
- FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. "Feridas cutâneas: A escolha do curativo adequado". *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.35, p.203-206, 2008.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. "Skin: Histology and physiology of wound healing". *Facial Plastic Surgery Clinics*, v.39, p.85-97, 2012.
- GAO, Z.; NAHRUP, J. S.; MARK, J. E.; SAKR, A. "Poly (Dimethylsiloxane) coatings for controlled drug release. III. Drug release profiles and swelling properties of the free-standing films". *Journal of Applied Polymer Science*, v.96, p.494-501, 2005.
- GIRATA, A. K. "Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata". Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, abril de 2011.
- GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. "Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications". *Carbohydrate Polymers*, v.88, p.1-12, 2012.
- GOYCOOLEA, F. M.; LOLLO, G.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; QUAGLIA, F.; ALONSO, M. J. "Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules". *Biomacromolecules*, v. 10, p.1736-1743, 2009.
- GRASSI, M.; GRASSI, G. "Mathematical modeling and controlled drug delivery: Matrix systems". *Current Drug Delivery*, v. 2, p.97-116, 2005.
- GREEN, B. "Understanding infection in wound care". *Professional Nursing Today*, v.16, n.2, 2012.
- HANSEN, B.; JEMEC, G. B. "The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfect". *Archives of dermatology*, v. 138, n. 7, p.909-10011, 2002.

- HASSLER, C.; BORETIUS, T.; STIEGLITZ, T. "Polymers for Neural Implants". *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v. 49, p.18-33, 2011.
- HE, Q.; AO, Q.; WANG, A.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. "In vitro cytotoxicity and protein drug release properties of chitosan/heparin microspheres". *Tsinghua Science & Technology*, v.12, p.361-365, 2007.
- IL'INA, A. V.; VARLAMOV, V. P. "Chitosan-based polyelectrolyte complexes: A review". *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.41, n.1, p.5-11, 2005.
- JAEGER, R.; GLERIA, M. "Inorganic Polymers". 1° ed. Estados Unidos: editor Nova, 2007, 925 p.
- JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing application". *Biotechnology Advances*, v.29, p.322-337, 2011.
- KARAKEÇILI, A. G.; SATRIANO, C.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; MARLETTA, G. "Surface characteristics of ionically crosslinked chitosan membranes". *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p.3884-3888, 2007.
- KHOR, E.; LIM, L. Y. "Implantable applications of chitin and chitosan". *Biomaterials*, v.24, p.2339-2349, 2003.
- KIM, J.; PENG, C.; CHAUHAN, A. "Extended release of dexamethasone from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E". *Journal of Controlled Release*, v.148, p.110-116, 2010.
- KIRSNER, R. S.; ORSTEAD, H.; WRIGHT, J. B. "Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role for nanocrystalline silver". *Wounds*, p.5-12, 2001.
- KLEINUBING, S. J. "Bioadsorção competitiva dos íons níquel e cobre em alginato e alga marinha *Sargassum filipendula*". Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, novembro de 2009.

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.

KRAYUKHINA, M. A.; SAMOILOVA, N. A.; YAMSKOV, I. A. "Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications". *Russian Chemical Reviews*, v.77, n.9, p.799-813, 2008.

LANKOFF, A.; SANDBERG, W. J.; WEGIEREK-CIUK, A.; LISOWSKA, H.; REFSNES, M.; SARTOWSKA, B.; SCHWARZE, P. E.; MECZYNSKA-WIELGOSZ, S.; WOJEWODZKA, M.; KRUSZEWSKI, M. "The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells". *Toxicology Letters*, v.208, p.197-213, 2012.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. "Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS". *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. "Alginate: Properties and biomedical applications". *Progress in Polymeric Science*, v.37, p.106-126, 2012.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. "Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes". *Polymer Degradation and Stability*, v.94, p.1-6, 2009.

LIU, X. M.; MAZIARZ, E. P.; PRICE, F.; DAVID, J. H.; GROBE, G. L. "Characterization of silicone rubber extractus using gel-permeation chromatography, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry". *European Journal of Mass Spectrometry*, v.7, p.473-480, 2001.

LIU, X.; LIN, T.; GAO, Y.; XU, Z.; HUANG, C.; YAO, G.; JIANG, L.; TANG, Y.; WANG, X. "Antimicrobial electrospun nanofibers of cellulose acetate and polyester urethane composite for wound dressing". *Society For Biomaterials*, 2012. DOI: 10.1002/jbm.b.32724.

LOSI, P.; BRIGANTI, E.; COSTA, M.; SANGUINETTI, E.; SOLDANI, G. “Silicone-coated non-woven polyester dressing enhances reepithelialisation in a sheep model of dermal wounds”. *Journal Material Science*, 2012. DOI: 10.1007/s10856-012-4701-8.

LUO, G.; TANG, J.; HE, W.; WU, J.; MA, B.; WANG, X.; CHEN, X.; YI, S.; ZHANG, X.; LI, X.; FITZGERALD, M. “Antibacterial effect of dressings containing multivalent silver ion carried by zirconium phosphate on experimental rat burn wounds”. *Wound Repair and Regeneration*, v.16, p.800-804, 2008.

MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. “A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts”. *Biomaterials*, v.22, p.331-336, 2001.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. “Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.207-233, 2007.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. “Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I”. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MANI, S. “Fundamentals aspects of crosslinking control of PDMS rubber at high temperatures using nitrogen dioxide”; Tese de doutorado; Faculdade de Ciências e Engenharia – Universidade de Laval, Canadá, 2011.

MARÓN, L. B.; PENICHE, C.; ARGUELLES-MONAL, W. “Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.34, p.127-133, 2004.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. “Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals”. *Journal of Chemical Education*, v.67, p.938, 1990.

MAURSTAD, G.; MORCH, Y. A.; BAUSCH, A. R.; SOKKE, B. T. “Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate-chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy”. *Carbohydrate Polymers*, v.71, p.672-681, 2008.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; HE, C.; XING, N.; LI, F. “Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application”. *Journal of Material Science*, v.21, p.1751-1759, 2010.

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.

MILLIKEN CHEMICAL. “A silver based antimicrobial from Milliken Chemical”. 2002. Disponível em: <<http://www.gfcmail.com/sqlimages/milchemical/AlphaSan%20Pdf%20Images/AlphaSan%20Brochure.pdf>> [Acesso em 19/06/2012].

MURAKAMI, K.; AOKI, H.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, S.; TAKIKAWA, M.; HANZAWA, M.; KISHIMOTO, S.; HATTORI, H.; TANAKA, Y.; KIYOSAWA, T.; SATO, Y.; ISHIHARA, M. “Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings”. *Biomaterials*, v.31, p.83-90, 2010.

NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME (NICNAS). “Silver sodium hydrogen zirconium phosphate”. 2004. Disponível em:<<http://www.nicnas.gov.au/publications/car/new/std/stdfullr/std1000fr/std1081fr.pdf>> [Acesso em 14/01/2013].

ONG, S.; WU, J.; MOOCHHALA, S.M.; TAN, M.; LU, J. “Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties”. *Biomaterials*, v.29, p.4323-4332, 2008.

PAES, A. T. “Desvio padrão ou erro padrão: qual utilizar?” *Einstein – Educação Continuada em Saúde*, v. 6, p.107-108, 2008.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. “Chitosan and alginate wound dressings: A short review”. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v.18, n.1, p.18-23, 2004.

QIN, Y. “Silver-containing alginate fibers and dressings”. *International Wound Journal*, v.2, n.2, p.172-176, 2005.

QIN, Y.; ZHU, C.; CHEN, J.; ZHON, J. "Preparation and characterization of silver containing chitosan fibers". *Journal of Applied Polymer Science*, v.104, p.3622-3627, 2006.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. "Biomaterials science, an introduction to materials in medicine". Segunda Edição. San Diego, Estados Unidos. *Elsevier Academic Press*, p.80-707, 2004.

REGIEL, A.; IRUSTA, S.; KYZIOL, A.; ARRUEBO, M.; SANTAMARIA, J. "Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*". *Nanotechnology*, 2013. DOI: 10.1088/0957-4484/24/1/015101.

RINAUDO, M. "Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials". *Polymer International*, v.57, p.397-430, 2008.

RODRIGUES, A. P. "Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões"; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, julho de 2008.

ROLIN, G.; PLACET, V.; JACQUET, E.; TAUZIN, H.; ROBIN, S.; PAZART, L.; VIENNET, C.; SAAS, P.; MURET, P.; BINDA, D.; HUMBERT, P. "Development and characterization of a human dermal equivalent with physiological mechanical properties". *Skin Research and Technology*, v.18, p.251-258, 2012.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. "Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, p.215-232, 2007.

SCHRIJVER, I.; ARAMENDIA, M.; VINCZE, L.; RESANO, M.; DUMOULIN, A.; VANHAECKE, F. "Comparison of atomic absorption, mass and X-ray spectrometry techniques using dissolution-based and solid sampling methods for the determination of silver in polymeric sample". *Spectrochimica Acta Part B*, v.62, p.1185-1194, 2007.

SEGATO, M. P. “Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio”; Dissertação de mestrado; Instituto de Química – Universidade de São Paulo; São Carlos, 2007.

SINGH, R.; CHACHARKAR, M. P. “Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care”. *Journal of Tissue Viability*, v.20, p.49-54, 2011.

SINGH, B.; PAL, L. “Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties”. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v.9, p.9-21, 2012.

SIONKOWSKA, A. “Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review”. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.1254-1276, 2011.

VEIGA, I. G.; MORAES, A. M. “Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes”. *Journal of Applied Science*, v.124, p.154-160, 2011.

VEIGA, I. G. “Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2009.

VERMA, D.; KATTI, K. S.; KATTI, D. R. “Effect of biopolymers on structure of hydroxyapatite and interfacial interactions in biomimetically synthesized hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites”. *Annals of Biomedical Engineering*, v.36, p.1024-1032, 2008.

VERMA, D.; DESAI, M. S.; KULKARNI, N.; LANGRANA, N. “Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials”. *Materials Science and Engineering C*, v.31, p.1741-1747, 2011.

WANG, D. M.; WANG, C. Y.; CHU, C. Y.; YEH, H. M. “Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes”. *AIChE Journal*, v.46, n.2, p.2383-2394, 2000.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L. “Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application”. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.90, n.8, 2001.

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.

WILLIAMS, D. F. “On the nature biomaterials”. *Biomaterials*, v.30, p.5897-5909, 2009.

WOUK, A. F. P. F.; DINIZ, J. M.; CÍRIO, S. M.; SANTOS, H.; BALTAZAR, E. L.; ACCO, A. “Membrana biológica (Biofill[®]) – Estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: Aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos”. *Archives of Veterinary Science*, v.3, n.1, p.31-37, 1998.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L. “PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates”. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.48, n.7, p.941-946, 2000.

ZHANG, J.; XIA, W.; LIU, P.; CHENG, Q.; TAHIROU, T.; GU, W.; LI, B. “Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications”. *Marine Drugs*, v.8, p.1962-1987, 2010.