

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de concentração - Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E
ALGINATO PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA DE LESÕES**

Autora: Ana Paula Rodrigues

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

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

Campinas - São Paulo

Julho - 2008

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

R618p Rodrigues, Ana Paula
Preparação e caracterização de membranas de
quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões /
Ana Paula Rodrigues.--Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Membranas
(Tecnologia). 4. Antibióticos. 5. Ferimentos e lesões. I.
Moraes, Ângela Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Preparation and characterization of chitosan and alginate
membranes designed for the therapy of lesions.

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginate, Membranes, Bacitran, Skin
lesions.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Leila Peres, Adriano Rodrigues Azzoni, Marcelino
Luiz Gimenes, José Alberto Fracassi da Silva.

Data da defesa: 02/07/2008

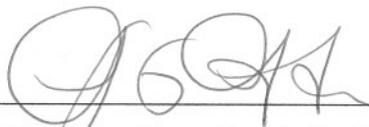
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Ana Paula Rodrigues e aprovada em 02 de julho de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP



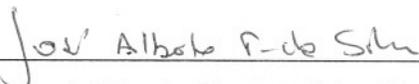
Prof. Dr. Marcelino Luiz Gimenes

Departamento de Engenharia Química/UEM



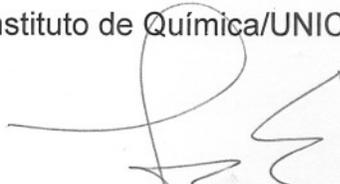
Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

Nanocore Biotecnologia Ltda



Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva

Instituto de Química/UNICAMP



Prof^a. Dr^a. Leila Peres

Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

200819307

Moraes, pela constante
convivência.
do Estado de São
e desenvolvimento
Tecnológico (CNPq)

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Ana Paula Rodrigues em 02 de julho de 2008.


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

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Ângela Maria Moraes, pela constante orientação, confiança e amizade em todos estes anos de harmoniosa convivência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa e de recursos para o desenvolvimento deste projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de recursos para este trabalho.

Aos professores: Dr^a Sônia Maria Malmonge, Dr^a Leila Peres, Dr^a Selma Candelária de Genari, Dr^a Elisabete Maria Saraiva Sanchez e Dr^a Maria Beatriz Puzzi pelas frutíferas sugestões fornecidas nos exames de qualificação.

Aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios. Às professoras: Dr^a Marisa Masumi Beppu pela utilização do liofilizador e Dr^a Aline Carvalho da Costa pelo auxílio prestado na análise dos dados estatísticos.

Aos meus pais, Floriano (*in memoriam*) e Odete, aos meus irmãos Liliane e Renato e a todos meus familiares, por sempre apoiarem minhas decisões. À Fabiano Santinon pelo constante incentivo e apoio durante todas as etapas deste projeto.

Às grandes amigas Érika, Fabiana, Alessandra e Oselys pelo apoio, incentivo, amizade e pelas muitas risadas durante todos estes anos de convivência e, à Raquel que além da grande amizade, sempre me garantiu pousada.

À Lidiana e Priscila que em pouco tempo de convivência mostraram-se pessoas incríveis, e a todos os amigos da pós-graduação, em especial: Goran, Tashima, Igor, Mariana, Paula, Luiza e Lucimara pela colaboração e convivência durante a realização deste projeto. Aos alunos Vivian e Alexandre, pela colaboração no laboratório.

À empresa IPEL, em especial à Eliane e Raquel pelos ensaios microbiológicos, e à empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pela esterilização das membranas.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia Química que de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização desta tese, em especial à Rosa, Gilson, Kelly, Andréia e Celso.

RESUMO

As membranas poliméricas destinadas ao tratamento de lesões cutâneas ou internas podem ser constituídas por vários tipos de polímeros, sendo a quitosana e o alginato compostos freqüentemente empregados para tal finalidade. Enquanto a quitosana é um aminopolissacarídeo derivado da quitina, o alginato é um polissacarídeo extraído de algas. Ambos são atóxicos, biocompatíveis e facilitam a cicatrização de feridas. Frente a isto, a obtenção de membranas de quitosana-alginato para serem utilizadas na terapia de lesões, como curativos, mostra-se de grande relevância. Neste contexto, este trabalho visou o desenvolvimento de metodologia escalonável de preparação e a caracterização de membranas de quitosana e alginato (contendo ou não bacitracina), empregando distintas condições controladas de vazão e agitação durante a mistura dos polissacarídeos. Em adição, o efeito da utilização do plastificante glicerol na preparação das membranas de quitosana-alginato, bem como a comparação das propriedades das mesmas às daquelas constituídas somente por quitosana, foi realizado. As membranas foram caracterizadas quanto à espessura, à capacidade máxima de absorção de diferentes soluções aquosas, à capacidade de drenagem de água, à perda de massa quando estocadas em água e em outros solventes, à resistência mecânica, à permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, à eficácia na proteção contra permeação de bactérias, à eficiência de incorporação de bacitracina, à morfologia de superfície antes e após a exposição à bacitracina, ao desempenho quanto à formação de halo de inibição antes e após a incorporação do fármaco e quanto ao desempenho *in vivo*. Os resultados mostraram que membranas de quitosana-alginato isentas de glicerol, capazes de absorver em torno de 19,2 g H₂O/g membrana seca, com capacidade de drenagem de água de até 14.343 g/m²-dia, resistência à tração em torno de 30 MPa, eficazes contra a permeação de bactérias, com permeabilidade ao vapor d'água de 2.678 g/m²-dia, eficiência de incorporação de bacitracina de até 25% e desempenho adequado *in vivo* foram obtidas pelo procedimento proposto, sugerindo assim, que as membranas de quitosana-alginato obtidas neste trabalho apresentam bom potencial para serem utilizadas como curativos temporários na terapia de lesões.

Palavras-chave: quitosana, alginato, membranas, bacitracina, terapia de lesões.

ABSTRACT

Polymeric membranes developed to treat cutaneous or internal lesions can be constituted by several types of polymers, being chitosan and alginate frequently employed for this purpose. While chitosan is a deacetylated derivative of chitin, alginate is a natural linear polysaccharide obtained from seaweed. Both polysaccharides are nontoxic, biodegradable and biocompatible, and in addition, show healing properties. In this way, the production of chitosan-alginate membranes designed to be used on lesion therapy, as wound dressings, is particularly relevant. In this context, this work focused the development of a reproducible and easy to scale up methodology to prepare and characterize chitosan-alginate membranes (containing or not bacitracin). Different controlled conditions of flow rate and stirring rate were employed during the mixture of both polysaccharides. In addition, the effects of glycerol utilization on chitosan-alginate membrane characteristics, as well as the comparison of the properties of the obtained membranes to those of membranes containing only of chitosan, was performed. The membranes were characterized regarding thickness, maximum uptake capacity of different aqueous solutions, water drainage ability, percentage of mass loss when stored in water and in other solvents, tensile strength and strain at break, permeability to water vapor and oxygen, effectiveness of protection against bacterial permeation, bacitracin incorporation efficiency, morphology before and after exposure to bacitracin, formation of inhibition zone before and after bacitracin incorporation and *in vivo* performance. The results obtained showed that glycerol-free chitosan-alginate membranes, able to absorb around 19.2 g H₂O/g membrane, with water drainage ability up to 14,343 g/m²-day, tensile strength around 30 MPa, effective against bacterial penetration, with water vapor permeability around 2,678 g/m²-day, bacitracin incorporation up to 25% and adequate performance *in vivo* can be obtained by the proposed procedure, suggesting that the chitosan-alginate membranes obtained in this work have good potential to be used as temporary dressings on lesions therapy.

Keywords: chitosan, alginate, membranes, bacitracin, lesion therapy.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Avanços no Desenvolvimento de Curativos para Lesões de Pele.....	6
2.1.1. <i>Características básicas da quitosana como constituinte de materiais biocompatíveis</i>	8
2.1.2 <i>Aspectos fundamentais do emprego de alginato na constituição de materiais biocompatíveis</i>	12
2.2. Hidrogéis e complexos polieletrólitos (PEC).....	15
2.2.1. <i>Obtenção de membranas de quitosana-alginato através da formação de complexos polieletrólitos</i>	19
2.3. Incorporação e permeação de fármacos em membranas poliméricas.....	22
2.3.1. <i>Bacitracina</i>	27
2.4. Caracterização física, química, mecânica e biológica das membranas	29
2.4.1. <i>Ensaio de resistência à tração</i>	30
2.4.2. <i>Determinação da atividade antibacteriana da bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato</i>	33
2.5. Possíveis aplicações de membranas compostas por quitosana-alginato e somente por quitosana em diferentes tipos de lesões.....	35
2.5.1. <i>Características e incidências de queimaduras e úlceras crônicas</i>	35
2.5.2. <i>Adesões peritoneais resultantes de intervenções cirúrgicas</i>	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Materiais	43
3.1.1. <i>Reagentes</i>	43
3.2. Métodos	43
3.2.1. <i>Preparação das membranas constituídas somente de quitosana</i>	43
3.2.2. <i>Ensaio para o estabelecimento das condições experimentais de preparação das membranas de quitosana e alginato</i>	44

3.2.3. Avaliação do efeito da taxa de agitação e da vazão de adição da solução de quitosana na solução de alginato nas características das membranas	49
3.2.4. Avaliação do efeito da adição de glicerol durante a preparação das membranas de quitosana e alginato	51
3.2.5. Ensaios para a avaliação da solubilidade e da estabilidade de bacitracina em diferentes solventes aquosos.....	51
3.2.6. Incorporação de bacitracina nas membranas de quitosana e alginato	52
3.2.7. Caracterização das membranas	52
3.2.7.1. Aspecto das membranas	52
3.2.7.2. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas	52
3.2.7.3. Espessura das membranas	53
3.2.7.4. Perfil de hidratação das membranas	53
3.2.7.5. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas	53
3.2.7.6. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas	54
3.2.7.7. Avaliação da capacidade de drenagem de água através das membranas	54
3.2.7.8. Avaliação das propriedades mecânicas	55
3.2.7.9. Permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água	56
3.2.7.10. Avaliação do grau de desestabilização das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções aquosas	57
3.2.7.11. Determinação da eficiência de incorporação da bacitracina	57
3.2.7.12. Avaliação da liberação da bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato.....	58
3.2.7.13. Avaliação da capacidade de permeação de bacitracina através das membranas de quitosana-alginato	58
3.2.7.14. Permeação a bactérias.....	59
3.2.7.15. Verificação da formação de halo de inibição das membranas de quitosana-alginato na ausência de fármaco e após a incorporação da bacitracina.....	60
3.2.7.16. Citotoxicidade <i>in vitro</i> a células Vero	60
3.2.7.17. Crescimento <i>in vitro</i> de queratinócitos na superfície das membranas de quitosana-alginato.....	61
3.2.7.18. Avaliação do desempenho das membranas <i>in vivo</i> em ferida cutânea contaminada de felino.....	62

3.2.7.19. Prevenção de aderência peritoneal em ratas com membranas somente de quitosana.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
4.1. Estabelecimento do protocolo básico experimental para a preparação de membranas de quitosana-alginato.....	66
4.2. Estudo do efeito da taxa de adição da solução de quitosana à de alginato e da taxa de agitação nas características das membranas	72
4.2.1. <i>Espessura das membranas no estado seco</i>	73
4.2.2. <i>Capacidade máxima de absorção de água das membranas</i>	74
4.2.3. <i>Morfologia das membranas</i>	75
4.2.4. <i>Perda de massa das membranas quando estocadas em água</i>	76
4.2.5. <i>Capacidade de drenagem de água das membranas</i>	77
4.2.6. <i>Propriedades mecânicas das membranas</i>	78
4.2.7. <i>Avaliação da eficácia das membranas contra a permeação de bactérias</i>	80
4.2.8. <i>Avaliação da formação de halo de inibição ao redor das membranas expostas às bactérias</i>	81
4.2.9. <i>Análise comparativa global dos efeitos operacionais nas diversas variáveis-reposta avaliadas</i>	83
4.3. Avaliação da utilização de glicerol na preparação de membranas de quitosana-alginato	85
4.4. Avaliação suplementar das características das membranas de quitosana-alginato obtidas na vazão de 40 mL/h.....	89
4.4.1. <i>Avaliação da capacidade máxima de absorção e da perda de massa das membranas em diferentes solventes</i>	89
4.4.2. <i>Avaliação da citotoxicidade direta das membranas a células Vero</i>	91
4.4.3. <i>Crescimento de queratinócitos in vitro na presença das membranas de quitosana e alginato</i>	95
4.5. Análise complementar das propriedades das membranas de quitosana-alginato obtidas na vazão de 40 mL/h e taxa de agitação de 100 rpm	96
4.5.1. <i>Estudo da permeabilidade das membranas ao vapor d'água e ao oxigênio</i>	96
4.5.2. <i>Avaliação do perfil de hidratação em água a 37°C</i>	98

4.5.3. <i>Estudo das propriedades mecânicas de membranas hidratadas de quitosana-alginato</i>	100
4.6. Comparação das propriedades das membranas de quitosana-alginato às constituídas somente por quitosana	102
4.7. Incorporação de bacitracina em membranas de quitosana-alginato	106
4.7.1. <i>Seleção do solvente para dissolução do fármaco e sua incorporação na membrana</i>	106
4.7.2. <i>Determinação do grau de desestruturação das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções aquosas</i>	108
4.7.3. <i>Determinação da quantidade de bacitracina incorporada</i>	109
4.7.4. <i>Avaliação da liberação da bacitracina incorporada às membranas</i>	110
4.7.5. <i>Avaliação da morfologia e das propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato após incorporação de bacitracina</i>	112
4.7.6. <i>Formação de halo de inibição por membranas de quitosana-alginato contendo bacitracina</i>	116
4.7.7. <i>Avaliação da capacidade de permeação da bacitracina através das membranas de quitosana-alginato</i>	118
4.8. Ensaio <i>in vivo</i>	121
4.8.1. <i>Desempenho in vivo das membranas de quitosana e de quitosana-alginato no tratamento de lesão cutânea em felino</i>	121
4.8.2. <i>Prevenção da aderência peritoneal em ratas quando da utilização das membranas de quitosana</i>	125
5. CONCLUSÕES	130
5.1. Sugestões para trabalhos futuros	130
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
ANEXO I.....	146
ANEXO II	148
ANEXO III	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.	9
Figura 2.2 - Fórmula molecular estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de α -L-guluronato e M, os copolímeros de α -D-manuronato.....	13
Figura 2.3 - Esquema das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca^{++} , enquanto as linhas representam as cadeias individuais de alginato.	14
Figura 2.4 - Estrutura e comportamento de inchamento (sensível a variações de pH) dos complexos polieletrólitos contendo quitosana; as elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas de um polímero aniônico (-) e as cargas positivas da quitosana (+) (adaptado de Berger <i>et al.</i> , 2004b).	20
Figura 2.5 - Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato de sódio e de quitosana (adaptado de Knill <i>et al.</i> , 2004).	21
Figura 2.6 - Rotas de ação na inibição do crescimento bacteriano pelas membranas de quitosana-alginato contendo antibiótico: (a) atuação da quitosana sobre a parede celular bacteriana, (b) atuação do antibiótico (adaptado de Yu <i>et al.</i> , 2005).	26
Figura 2.7 - Estruturas químicas das bacitracinas A e F (Pavli e Kmetec, 2001).	28
Figura 2.8 - Comportamento teórico de um corpo de prova ao sofrer tensão.	30
Figura 2.9 - Corte esquemático da pele (fonte: Abbott Laboratories, 2005).	36
Figura 3.1 – Variáveis operacionais avaliadas ao longo do estabelecimento do protocolo básico experimental para a preparação das membranas de quitosana-alginato.....	45
Figura 3.2 - Sistema utilizado na preparação das membranas.....	50
Figura 3.3 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas.	55
Figura 3.4 - Parte útil dos corpos de após a fixação nos cabeçotes do equipamento.	56
Figura 3.5 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de permeação de bacitracina através das membranas de quitosana-alginato.	59
Figura 3.6 - Fluxograma dos ensaios de caracterização das membranas de quitosana-alginato.	65

Figura 4.1 - Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 2A (a) e 3A (b): a) membrana preparada com quitosana a 0,5% (m/v) e alginato a 0,25% (m/v); b) membrana preparada com quitosana a 1,0% (m/v) e alginato a 0,5% (m/v).	67
Figura 4.2 - Sistema empregado na preparação das membranas de quitosana e alginato: a) impelidor de pás inclinadas acoplada ao agitador mecânico; b) tanque de vidro encamisado.	68
Figura 4.3 - Aspecto típico dos coacervados agregados após os procedimentos de lavagem propostos nos ensaios 4A, 5A e 6A.	69
Figura 4.4 - Aspecto das membranas obtidas no ensaio 7 ^a : a) após secagem em estufa a 35°C por 24h; b) após imersão em 200 mL de água deionizada por 2h.	70
Figura 4.5 - Aspecto das membranas obtidas no ensaio 8A: a) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em 150 mL de solução aquosa de CaCl ₂ 2% por 1 h; b) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em 200 mL de água deionizada por 2 h; c) aspecto da membrana seca, após as imersões.	70
Figura 4.6 - Aspecto da membrana obtida no ensaio 10A: a) membrana após secagem em estufa a 35°C por 24 h; b) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em solução de CaCl ₂ 2% seguida de imersão em água deionizada.	71
Figura 4.7 - Aspecto da membrana obtida no ensaio 11A: a) membrana após secagem em estufa a 35°C por 24 h; b) membrana imersa em 150 mL de solução de CaCl ₂ 2%; c) membrana ainda úmida, após os tratamentos de imersão.	72
Figura 4.8 - Morfologia de superfície (em ângulo de 40°) das membranas preparadas a: (a) 40mL/h e 100 rpm (3B) e (b) 40mL/h e 500 rpm (4B).	75
Figura 4.9 - Corte transversal das membranas preparadas a: 100 rpm, com aumento de 1000 vezes (a) e 3000 vezes (b); e a 500 rpm, com aumento de 1000 vezes (c) e 3000 vezes (d), ambas na vazão de 40 mL/h.	76
Figura 4.10 - Proteção típica contra a permeação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio de cultura conferida pelas membranas preparadas nos ensaios 1B (a), 2B (b) e 3B (c).	81
Figura 4.11 - Proteção típica contra a permeação de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio de cultura conferida pelas membranas preparadas nos ensaios 4B (a), 6B (b) e 7B (c).	81
Figura 4.12 - Placas de Petri contendo meio de cultura previamente inoculado com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : (a) controle; (b) com a membrana, na superfície, preparada no ensaio 3B.	82

Figura 4.13 - Placa controle contendo meio de cultura previamente inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> : (a) controle; (b) com a membrana, na superfície, preparada no ensaio 4B.	82
Figura 4.14 - Estrias feitas com amostras celulares coletadas da superfície das amostras, para verificação de crescimento bacteriano: (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em amostra do ensaio 3B e (b) <i>Staphylococcus aureus</i> em amostra do ensaio 4B.....	83
Figura 4.15 - Efeitos estatísticos calculados para as variáveis-resposta espessura, capacidade máxima de absorção de água, capacidade de drenagem, perda de massa em água e resistência mecânica. Para a comparação mais direta entre as variáveis-resposta, os efeitos referentes à capacidade de drenagem foram divididos por 100. * Valor estatisticamente significativo para $p < 0,10$	84
Figura 4.16 - Morfologia de superfície das membranas preparadas nas proporções 1:0,1:1 (a) e 1:1:1 (b) de quitosana: glicerol : alginato. O aumento de ambas as micrografias é de 500 vezes.	88
Figura 4.18 - Análise das células <i>Vero</i> inoculadas a 1×10^4 células/mL em microscópio de contraste de fases após contato com as membranas de quitosana-alginato: a) controle positivo após 24 h; b) após 24 h; c) controle positivo após 48h, d) após 48 h; e) controle positivo após 72 h, f) após 72 h.....	92
Figura 4.19 - a) Células <i>Vero</i> controle cultivadas sobre lamínulas de vidro, com morfologia típica e crescimento em monocamadas; b - c) células <i>Vero</i> cultivadas por 24 horas sobre membranas de quitosana-alginato apresentando adesão e morfologia achatada; d-e) células <i>Vero</i> cultivadas por 24 horas sobre membranas de quitosana-alginato, evidenciando a presença de material fibrilar na superfície das células (<i>setas</i>). Concentração do inóculo: 1×10^5 células/mL.	93
Figura 4.20 - Análise da evolução das concentrações celulares sobre as membranas de quitosana-alginato e do grupo controle. Dados referentes às membranas preparadas nas condições do ensaio 3B.	94
Figura 4.21 - Crescimento de queratinócitos na presença de membranas de quitosana-alginato preparadas de acordo com as condições dos ensaios 3B (a) e (c); 4B (b).	95
Figura 4.22 - Crescimento queratinócitos na ausência das membranas (ensaio controle). ..	95
Figura 4.23 - Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-alginato em água a 37°C , em 24 h.....	99

Figura 4.24 - Comportamento das amostras das membranas de quitosana-alginato, quando submetidas ao ensaio de tração.....	101
Figura 4.25 - Comportamento típico das membranas secas somente de quitosana, submetidas ao ensaio de resistência à tração (ensaio realizado com oito corpos de prova).	105
Figura 4.26 - Comportamento típico das membranas hidratadas somente de quitosana, submetidas aos ensaios de resistência à tração (ensaio realizado com oito corpos de prova).....	105
Figura 4.27 - Membrana exposta ao tampão PBS contendo 3,12 mg/mL de bacitracina por 24 h: a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).....	113
Figura 4.28 - Membrana exposta por 24 h à solução de bacitracina em água a 1,60 mg/mL: a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).....	113
Figura 4.29 - Membrana exposta por 24 h ao tampão PBS na ausência do fármaco (amostra lavada em água deionizada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).	114
Figura 4.30 - Membrana exposta por 24 h ao tampão PBS na ausência do fármaco (amostra não lavada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 3000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).....	115
Figura 4.31 - Membrana exposta por 24 h à solução de bacitracina em tampão PBS, a 3,12 mg/mL (amostra lavada com água deionizada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).	115
Figura 4.32 - Ensaio realizado de acordo com o procedimento fornecido pela Fluka (Suíça). a) solução inicial de bacitracina 3,6 mg/mL; b) amostra controle (membrana sem adição do fármaco). Condições experimentais: Symetry 150 x 4,6 mm DI C18 / MeCN:Ácido Fosfórico 0,01M em gradiente / 25°C / vazão 2,0 mL/min, detecção a 254 nm.	119
Figura 4.33 - Ensaio realizado de acordo com o procedimento fornecido pela Fluka (Suíça). a) amostra permeada oclusivo; b) amostra permeada não oclusivo. Condições experimentais: Symetry 150 x 4,6 mm DI C18 / MeCN:Ácido Fosfórico 0,01M em gradiente / 25°C / vazão 2,0 mL/min, detecção a 254 nm.....	119
Figura 4.34 - a) Gata com ferida contaminada na região lateral abdominal direita, ocasionada por mordida; b) ferida coberta com membrana de quitosana-alginato.	122

Figura 4.35 - a) Ferida após 48 h apresentando margem epitelizante (seta) e desenvolvimento de tecido de granulação na superfície da ferida; b) redução acentuada da área da ferida após 72 h.	123
Figura 4.36 - a) Ferida após 14 dias com avanço da margem epitelizante na região da lesão; b) ferida após 30 dias.	124
Figura 4.37 - Ferida após 50 dias de tratamento com membranas de quitosana e quitosana-alginato.	124
Figura 4.38 - Filme à base de quitosana (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.	126
Figura 4.39 - Filme à base de quitosana elevado sobre tela de polipropileno (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.	127
Figura 4.40 - Aderência do ceco, jejuno e fígado sobre tela de polipropileno (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.	127
Figura 4.41 - Incorporação da tela de polipropileno (oitavo dia após o implante). Formação de tecido conjuntivo fibroso concêntrico (seta) aos monofilamentos (M). Área focal de aderência (cabeça de seta) hepática (F). Microscopia de campo claro 100 x, coloração HE.	128
Figura 4.42 - Incorporação da tela de polipropileno associada à membrana de quitosana (oitavo dia após o implante).. Formação de tecido conjuntivo fibroso concêntrico (seta) aos monofilamentos (M). Mesotelização difusa da parede abdominal (cabeça de seta) Microscopia de campo claro 100 x, coloração HE.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais aplicações da quitina e quitosana.	10
Tabela 2.2 - Exemplos de curativos à base de alginato disponíveis no mercado (fonte: Calcium-Alginate-Dressings, 2004 e Quality Medical Supplies, 2007).	15
Tabela 2.3 - Polieletrólitos que podem formar complexos com a quitosana (adaptada de Berger <i>et al.</i> , 2004b).	17
Tabela 2.4 - Exemplos de complexos polieletrólitos de quitosana com variados poliânions e suas aplicações (adaptada de Berger <i>et al.</i> , 2004b).	18
Tabela 2.5 - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas nos ensaios de permeação de fármacos em membranas, verificadas nas referências bibliográficas consultadas.	24
Tabela 2.5 (continuação) - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas nos ensaios de permeação de fármacos em membranas, verificadas nas referências bibliográficas consultadas.	25
Tabela 2.6 - Valores prováveis de pKa dos radicais de grupos ionizantes dos aminoácidos da bacitracina A, quando não conectados entre si por ligação peptídica, em solução aquosa a 25 °C (Farfán, 1990)	28
Tabela 2.7 - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas na caracterização mecânica de membranas de quitosana isolada ou em conjunto com outros compostos verificadas nas referências bibliográficas consultadas.	32
Tabela 3.1 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.	46
Tabela 3.2 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.	47
Tabela 3.3 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.	48
Tabela 3.4 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da taxa de agitação e da vazão de adição entre as soluções de quitosana e alginato. Os ensaios 5, 6 e 7 referem-se às triplicatas no ponto central.	50
Tabela 4.1 - Valores das espessuras das membranas.	73
Tabela 4.2 - Valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água média dos corpos de prova com dimensões de 6 x 1 cm ² , a 37°C por 24h.	74
Tabela 4.3 - Valores obtidos para a perda de massa em água das membranas.	77
Tabela 4.4 - Valores obtidos para a capacidade de drenagem de água das membranas.	78

Tabela 4.5 - Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento das membranas na ruptura.	79
Tabela 4.6 - Comparação entre os valores de resistência à tração e de alongamento na ruptura de membranas secas de quitosana e alginato obtidos neste trabalho e os valores relatados na literatura consultada.	80
Tabela 4.7 - Resultados obtidos para as membranas de quitosana-glicerol-alginato (Q:G:A), obtidas em diferentes proporções mássicas, referentes à espessura, à capacidade máxima de absorção de água e à perda de massa.....	86
Tabela 4.8 - Resultados obtidos para as membranas de quitosana-glicerol-alginato (Q:G:A), obtidas em diferentes proporções mássicas, referentes à drenagem de água, à resistência à tração e ao alongamento na ruptura.....	87
Tabela 4.9 - Valores obtidos para a capacidade máxima de absorção (a 37°C por 24 h) e para perda de massa das membranas estocadas por 43 dias em diferentes solventes a 4°C, para amostras preparadas na vazão de 40 mL/h.	90
Tabela 4.10 - Comparação entre os valores TPVA das membranas de quitosana e alginato obtidos neste trabalho e os valores existentes na literatura consultada para membranas preparadas em diferentes condições experimentais.....	97
Tabela 4.11 - Curativos disponíveis comercialmente avaliados com relação à permeabilidade ao vapor d'água (modificada de Wu <i>et al.</i> , 1995).....	97
Tabela 4.12 - Permeabilidade ao oxigênio (TPO ₂) a 35°C e 1atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio, das membranas de quitosana-alginato preparadas sob as condições de agitação e vazão de 100 rpm / 40mL/h respectivamente.....	98
Tabela 4.13 - Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas de quitosana-alginato hidratadas.....	100
Tabela 4.14 – Valores referentes à espessura, à capacidade máxima de absorção, à perda de massa e à capacidade de drenagem, das membranas somente de quitosana e das compostas por quitosana-alginato.	102
Tabela 4.15 - Valores de solubilidade do fármaco e do pH das soluções utilizadas, antes e após a adição da bacitracina.	107
Tabela 4.16 - Avaliação da desestruturação das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções.....	108

Tabela 4.17 - Percentagem de bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato.	110
Tabela 4.18 - Percentagem de bacitracina liberada das membranas de quitosana-alginato, em água.	110
Tabela 4.19 - Percentagem de bacitracina liberada das membranas de quitosana-alginato, em tampão PBS.	111
Tabela 4.20 - Prováveis quantidades de bacitracina retidas nas membranas durante os ensaios de liberação.	112
Tabela 4.21 - Halos de inibição formados em meio de cultura inoculados com <i>Staphylococcus aureus</i> . As amostras foram divididas em dois grupos: amostras não lavadas após a incorporação do fármaco e amostras lavadas após a incorporação (água deionizada por 30 minutos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.	117

NOMENCLATURA

ASN = Asparagina

ASP = Ácido aspártico

ASTM = *American National Standards Institute*

CETEA = Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Embalagens

C_i = Grau de intumescimento

CMC = carboximetilcelulose

CM-quitosana = carboximetil quitosana

CNTP = Condições normais de temperatura e pressão

CTQ = Centro de Tratamento de Queimados

C_w = Capacidade máxima de absorção de água

DI = Diâmetro Interno

E = Constante de proporcionalidade (N/m)

EDTA = *Ethylene diamine tetra-acetic acid*

FCS = Fluido corpóreo simulado

GLU = Ácido glutâmico

HBSS = *Hank's Buffered Salt Solution*

HDL = *High Density Lipoproteins*

HIS = Histidina

IPEL = Itibanyl Produtos Especiais Ltda

ILE = Isoleucina

ISO = *International Organization for Standardization*

ITAL = Instituto de Tecnologia de Alimentos

LDL = *Low Density Lipoproteins*

LEU = Leucina

LYS = Lisina

MCCh= Quitosana microcristalina

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

M_{final} = Massa seca final

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

M_{inicial} = Massa seca inicial

M_p = Perda de massa

M_s = Massa seca das membranas

M_u = Massa úmida final

M_{ui} = Massa úmida no tempo i

NaOH = Hidróxido de sódio

NCCLS = *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

P = Grupo implantado com tela de polipropileno

PBS = Tampão fosfato salino

PEC = *Polyelectrolyte complex*

PHE = Fenilalanina

pI = Ponto isoelétrico

pK = Constante de ionização

Q = Grupo implantado filme de quitosana

QP = Grupo implantado com tela de polipropileno associada ao filme de quitosana

SFB = Soro fetal bovino

SS = Solução salina

TPO_2 = Permeabilidade ao oxigênio

TPVA = Taxa de permeação ao vapor de água

TSA = *Tryptic Soy Agar*

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

UI = Unidades Internacionais

UTI = Unidade de Terapia Intensiva

UV = Ultravioleta

ε = Deformação (m)

σ = Tensão (N)

1. INTRODUÇÃO

Diversos tipos de dispositivos constituídos dos mais variados materiais, destinados à regeneração de lesões, sejam elas externas ou internas, encontram-se comercialmente disponíveis no mercado. Entretanto, o custo da maioria dos tratamentos que utilizam dispositivos obtidos por tecnologias mais avançadas e que apresentam maior efetividade em sua função, ainda é bastante elevado, devido principalmente, ao valor dos mesmos e à necessidade de sua troca freqüente. Tais fatos restringem a utilização destes biomateriais a apenas uma pequena parcela da população.

Frente a isto, a busca de matérias-primas adequadas à realidade econômica do Brasil para a preparação de curativos temporários faz-se necessária, a fim de que estes possam ser mais amplamente utilizados nos tratamentos das mais variadas lesões. A obtenção de curativos com preços mais acessíveis contribuiria positivamente para o aumento da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que a regeneração dos tecidos lesados poderia acontecer de maneira mais rápida e eficiente, reduzindo ainda o período de internação de pacientes hospitalizados, o que, apesar do investimento para a aquisição dos curativos, promoveria uma diminuição do custo global da terapia. Neste contexto, a utilização de polímeros naturais como a quitosana e o alginato no desenvolvimento de curativos destinados a terapia de lesões é bastante atraente.

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, formado por uma seqüência linear de açúcares monoméricos do tipo β -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). Quando a maioria dos grupamentos acetil da quitina são removidos, normalmente por tratamento com bases fortes, obtém-se a quitosana (Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Canella e Garcia, 2001; Wang *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988). Este polímero possui a capacidade de ativar macrófagos, estimular a migração e proliferação celular e orientar a reorganização da arquitetura celular (Paul e Sharma, 2004; Mi *et al.*, 2003; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988) e, em adição, possui atividades hemostática, fungicida, antibacteriana e antitumoral, podendo ainda ser utilizado no tratamento da obesidade, na produção de microesferas para a incorporação e liberação controlada de variados agentes ativos, na preparação de filmes para embalagens de alimentos, de fios cirúrgicos, de

materiais para regeneração óssea e, especialmente, de curativos (Mi *et al.*, 2001; Suzuki e Mizushima, 1997), dentre outras aplicações.

O alginato consiste em um polissacarídeo natural extraído de algas, sendo comumente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia e também na preparação de matrizes poliméricas para a encapsulação de fármacos, macromoléculas e células (Chan *et al.*, 2002). Uma vez que este material é relativamente inerte, biocompatível, biodegradável e resulta em matrizes de gel de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas, sua aplicação na produção de dispositivos biomédicos é de grande importância. Algumas das propriedades dos dispositivos formados por quitosana e alginato, quando em conjunto, podem ser melhoradas em relação às dos polissacarídeos isolados, observando-se, por exemplo, maior estabilidade a variações de pH e maior eficiência na liberação controlada de princípios ativos (Wang *et al.*, 2001). Além disto, a associação de alginato a quitosana pode atuar de maneira positiva na absorção dos fluidos das lesões e ainda, baratear o custo final dos dispositivos.

Frente a isto, é de relevância a avaliação do potencial de utilização de membranas constituídas por quitosana-alginato, como dispositivos para a terapia de lesões, o que já vem sendo feito por vários grupos de pesquisa. Para tanto, o desenvolvimento de metodologia reprodutível e escalonável na preparação das mesmas, compostas por quitosana e alginato simultaneamente, também se mostra de grande importância, uma vez que a literatura consultada aponta que membranas preparadas pela complexação de tais polímeros são tradicionalmente obtidas de maneira artesanal, utilizando muitas vezes, a mistura manual dos mesmos, com posterior centrifugação e ressuspensão dos coacervados formados (Wang *et al.*, 2002 e 2001; Yan *et al.*, 2000), não visando à preparação em larga escala. Em adição, destaca-se que apesar das variáveis taxa de agitação do sistema, taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato e concentração dos polímeros serem apontadas como de fundamental importância na formação de membranas compostas de quitosana e alginato, não foram localizados estudos sistemáticos referentes ao estabelecimento de condições que otimizem a formação de membranas homogêneas. Desta forma, o estudo para o estabelecimento de condições experimentais de preparação que conduzam a membranas com características reprodutíveis e adequadas para a aplicação como curativos é fundamental quando se visa sua produção em maior escala. Em adição, a avaliação do efeito da adição de um plastificante como o glicerol às membranas, se faz

importante, sendo este assunto abordado na literatura, mas também de forma pouco detalhada.

A inclusão de medicamentos como antibióticos às membranas de quitosana-alginato é também de interesse, pois permitiria não só a recuperação dos tecidos lesados pela ação dos biopolímeros, mas também o controle do crescimento de microrganismos indesejáveis. A bacitracina mostra-se como um antibiótico interessante para esta aplicação, principalmente por apresentar alta solubilidade em soluções aquosas e por ser um antibiótico efetivo contra bactérias Gram-positivas e alguns tipos de bactérias Gram-negativas. Apesar destas atraentes características, não foram localizadas publicações enfocando a incorporação deste fármaco em membranas compostas simultaneamente por quitosana e alginato, o que confere o caráter de ineditismo ao presente estudo.

Além disto, a comparação das propriedades de membranas de quitosana-alginato com as de membranas constituídas somente por quitosana mostra-se relevante, pois as últimas constituem-se em dispositivos de mais fácil manufatura, apresentam maiores valores de tensão de ruptura, não estimulam a adesão celular e, sendo transparentes, seu uso às vezes é preferível aos daqueles constituídos por alginato e quitosana.

Com relação às possíveis aplicações *in vivo* das membranas de quitosana e de quitosana-alginato, estas podem ser utilizadas em diversos tipos de lesões, tais como as queimaduras e as úlceras crônicas, e mesmo na recuperação de lesões internas, como as adesões peritoneais.

As queimaduras são consideradas as mais traumáticas lesões que podem acometer a pele (Balasubramani *et al.*, 2001). Apesar de decorrerem de acidentes relativamente comuns, estas requerem tratamento multiprofissional (Beraldo *et al.*, 1999). Os dados disponíveis no Brasil com relação a pacientes queimados são deficientes e inconclusivos, uma vez que muitas pessoas que sofrem queimaduras não procuram o serviço médico-hospitalar. Estima-se que cerca de um milhão de pessoas sofram anualmente de queimaduras no país, no entanto, apenas cerca de cem mil pacientes procuram atendimento hospitalar e, destes, aproximadamente 2,5 mil morrem por razão direta ou indireta de suas lesões (Mendes Júnior *et al.*, 2007).

As úlceras crônicas de perna fazem parte de um conjunto de doenças, cuja incidência tem gradativamente aumentado em todo o mundo. Com relação ao impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes, as úlceras crônicas de membros inferiores

representam a problemática típica das lesões crônicas ao causarem dor em diferentes níveis, afetar a mobilidade e possuir caráter quase sempre recidivante. A utilização de curativos com capacidade de absorver o exsudato e de acelerar o processo cicatricial se faz de grande relevância nestes casos.

Visto que membranas densas de quitosana não estimulam a adesão de células animais à sua superfície (Dallan, 2005), uma de suas aplicações potenciais seria na prevenção de aderências, normalmente verificadas após cirurgias abdominais e procedimentos correlatos que envolvam danos ao peritônio. As aderências peritoneais formam-se, geralmente, entre sete e dez dias após procedimentos cirúrgicos, unindo órgãos abdominais entre si ou à parede abdominal (Binda *et al.*, 2003; Avital *et al.*, 2004; Sulaiman *et al.*, 2001). Caso não ocorra a fibrinólise, as aderências inicialmente fibrinosas tornam-se fibrosas devido à migração de fibroblastos na matriz de fibrina (Ozel *et al.*, 2005) com formação de novos vasos sanguíneos e nervos, ocasionando dores abdominais crônicas, obstrução intestinal, e infertilidade no ser humano. Assim, dispositivos que possam prevenir ou mesmo minimizar a formação de aderências se mostram de grande interesse.

Devido às parcerias realizadas com docentes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, a realização de diferentes ensaios *in vivo*, pôde ser realizada com as membranas produzidas neste trabalho. Assim, membranas somente de quitosana e de quitosana-alginato foram avaliadas com relação ao seu desempenho em ferida de pele profunda contaminada de felino, enquanto as membranas somente de quitosana foram avaliadas na prevenção de adesão peritoneal em ratas.

1.1. Objetivo

O trabalho em questão, que tem por objetivo geral contribuir para os estudos no ramo de obtenção de membranas com potencial para utilização na regeneração de lesões, teve os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecimento de metodologia experimental reprodutível e escalonável para a síntese de membranas à base de quitosana e alginato.
- Avaliação da influência da taxa de agitação do sistema e da taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato nas características das membranas;

-
- Avaliação da influência da adição de glicerol nas características das membranas;
 - Incorporação de bacitracina nas membranas compostas por quitosana e alginato;
 - Comparação das propriedades das membranas de quitosana-alginato com as das membranas somente de quitosana.
 - Avaliação do desempenho das membranas produzidas em aplicações *in vivo*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Avanços no Desenvolvimento de Curativos para Lesões de Pele

A produção de curativos e bandagens constituiu-se rapidamente em um novo campo de desenvolvimento e aplicação da química de polímeros. Os curativos modernos são significativamente diferentes dos tradicionais, em relação ao projeto e às propriedades desejáveis (Yudanova e Reshetov, 2006). A busca por um micro-ambiente úmido, com transporte adequado de gases e fluidos, assegurando assim, um ambiente aeróbico e ao mesmo tempo promovendo uma barreira funcional contra infecções, provendo o isolamento térmico da lesão, tem sido o foco de vários dispositivos destinados ao tratamento de lesões cutâneas (Clasen *et al.*, 2006).

Numerosas publicações revelam uma variedade de novas pesquisas direcionadas em mostrar quais as vantagens e as possibilidades no campo dos curativos. O constante interesse nesta área ocorre, principalmente, devido à grande importância dos mesmos no tratamento de traumas, queimaduras, feridas diabéticas, úlceras de pele e outros tipos de lesões cutâneas, como por exemplo, as feridas cirúrgicas (Campos *et al.*, 2005).

O processo de cicatrização dos tecidos envolve uma complexa interação entre as células, as moléculas da matriz extracelular e os mediadores solúveis. A complexidade deste processo pode ser resumida em quatro etapas, as quais coincidem com a seqüência temporal normal da cicatrização: homeostase, inflamação, proliferação e remodelagem (Öztürk, *et al.* 2006).

Em certos casos os curativos executam as funções da pele normal, protegendo a área lesada contra a perda de fluidos e proteínas e ainda, prevenindo a infecção por bactérias (Öztürk, *et al.* 2006). Diversos substituintes de pele estão disponíveis no mercado para uso clínico e também para testes clínicos. Dentre estes, destacam-se os substitutos temporários e permanentes, os substitutos epidérmicos e dérmicos e, os substitutos sintéticos, bio sintéticos e biológicos (Öztürk, *et al.* 2006).

As membranas poliméricas hidrofílicas têm, em geral, alta capacidade de absorção de líquidos, alta permeabilidade a gases, apropriado transporte de fluidos, e alta seletividade para o transporte de substâncias de altas massas molares e apolares. Tais características, combinadas com adequadas propriedades mecânicas, fazem com que as

membranas poliméricas sejam atraentes no tratamento de feridas como material de cobertura (Clasen *et al.*, 2006).

Segundo dados da literatura, vários curativos para feridas úmidas já estão comercialmente disponíveis, sendo a maioria deles baseada em matrizes de poliuretano sintético combinados com hidrogéis (ágar, gelatina ou carboximetil celulose) ou com um gel simples baseado em carboximetilcelulose concentrada, alginato de cálcio ou colágeno (Clasen *et al.*, 2006). Entretanto, especialmente para o tratamento de feridas problemáticas como queimaduras e feridas crônicas, os curativos disponíveis ainda apresentam desempenho pouco satisfatório. Frente a tal insuficiência de desempenho, há um crescente nível de requerimentos nos curativos atuais, relacionados com o desenvolvimento e sofisticação da tecnologia médica, visando aumentar a eficácia nos primeiros socorros, a recuperação durante o pós-operatório e o aspecto estético. Para que estes requerimentos sejam alcançados, os curativos devem assegurar boa modelagem às superfícies das feridas, serem atraumáticos, possuir o mínimo contato com a lesão (Clasen *et al.*, 2006; Yudanova e Reshetov, 2006), não produzir efeitos tóxicos ou irritantes, serem esterilizáveis, prover o máximo conforto, ser de manutenção simples, e empregados por um período relativamente longo nas lesões (Yudanova e Reshetov, 2006). Como se pode notar espera-se dos curativos modernos um efeito “curativo” de fato, por esta razão, muitos deles possuem substâncias ativas, as quais são liberadas nas lesões durante seu uso (Yudanova e Reshetov, 2006).

Os materiais para curativos baseados na quitina, na quitosana e em seus derivados são bem conhecidos no mercado, e são produzidos principalmente no Japão. A Eisai Co. é fabricante de curativos de quitina em forma de esponja (Chitopack C[®]), a Japanese Unitika Co. oferece curativos de fibras de quitosana não tecidas, a 3M americana desenvolveu uma preparação de quitosana em gel (Tegasorb[®]) e um hidrocolóide (Tegaderm[®]), ambos designados para cicatrização de feridas extensas. O Centro Médico da Universidade de Washington (EUA) produz um curativo de quitosana para regeneração de queimaduras de segundo e terceiro grau. O curativo de quitosana HemCon Bandage[™], em 2002, foi utilizado no campo de batalha do Iraque por soldados americanos como agente hemostático, sendo posteriormente incluído como um item de primeiros socorros pelas forças armadas americanas (Niekraszewicz, 2005). Em 2003 e 2004, respectivamente, as membranas de quitosana HemCon (Portland, Oregon, Estados Unidos) e Chitoskin

(SanguiBioTech GmbH, Witten, Alemanha) foram disponibilizadas no mercado para serem utilizadas em feridas consideradas como de difícil cicatrização (Clasen *et al.*, 2006).

Outro interessante curativo biológico é a esponja ChorioChit, obtida pela liofilização de placenta humana misturada com uma suspensão de quitosana microcristalina (MCCh), material este resultante da cooperação entre o Banco de Tecidos do Centro de Doadores de Sangue e a Academia Médica em Katowice (Polônia). Segundo dados da literatura, tal curativo é caracterizado pelo conforto proporcionado, bom isolamento da ferida e habilidade de limitar o crescimento da flora bacteriana patogênica (Niekraszewicz, 2005). Na mesma linha está o curativo ChitoFib, composto por MCCh e cola de fibrinogênio. Apesar das vantagens apresentadas por tais curativos, destaca-se que a utilização de substâncias originárias de mamíferos, como a placenta humana, e o fibrinogênio associadas aos polímeros para a obtenção de curativos, deve ser avaliada cuidadosamente, uma vez que podem possibilitar a transferência de agentes adventícios (como prions e vírus presentes) para o leito da lesão.

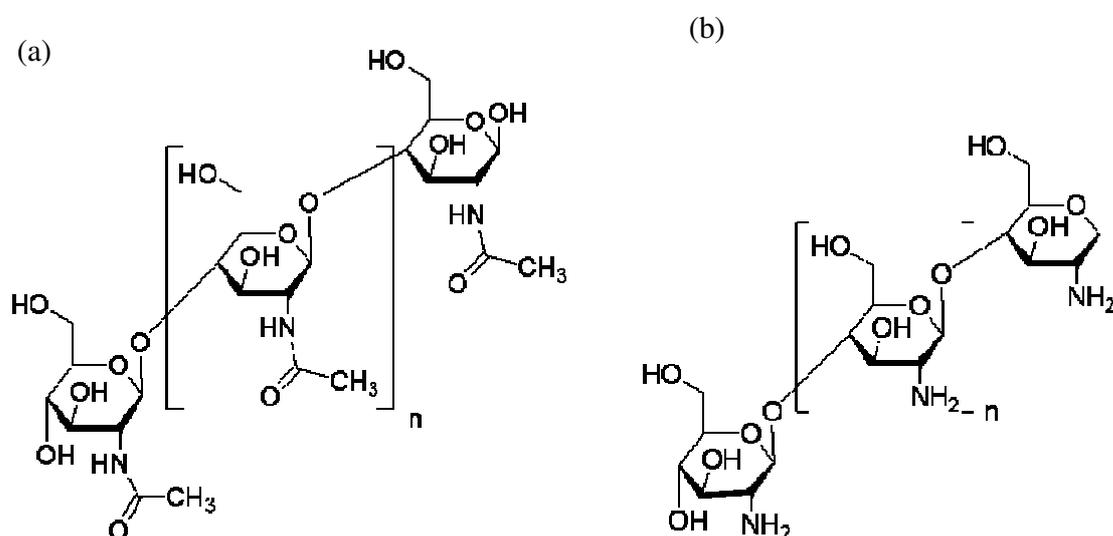
Vários estudos têm mostrado que a utilização de géis amorfos e curativos de hidrogéis pode proporcionar o bloqueio de terminais nervosos expostos nos ferimentos, aliviando a dor, além de promover o resfriamento e a subsequente cicatrização de queimaduras (Martineau e Shek, 2006a) e lesões cutâneas em geral. Assim, a obtenção de curativos temporários não aderentes ao leito da ferida mostra-se relevante, sendo que as membranas de quitosana e alginato apresentam ótimo potencial para esta aplicação em particular.

2.1.1. Características básicas da quitosana como constituinte de materiais biocompatíveis

A quitosana é um amino-polissacarídeo derivado da quitina, sendo este último o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza depois da celulose (Rodrigues, 2003). A quitosana é constituída de uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). Para sua obtenção, 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, desproteíntização e descoloração. A quitina obtida contém grupos acetil, os quais são removidos por desacetilação (com solução concentrada de

NaOH), para obtenção da quitosana (Yamaura, 2007). Comercialmente, a quitina e a quitosana são produzidas, principalmente, na Índia, no Japão, na Polônia, na Noruega, na Austrália e na China, sendo que o valor de mercado da quitosana depende diretamente de fatores relacionados às suas características físico-químicas, bem como, da sua aplicação final (Rodrigues, 2003).

A Figura 2.1 apresenta as estruturas químicas da quitina e da quitosana. Destaca-se que os resíduos de glucosamina e N-acetilglucosamina da quitosana são encontrados também em tecidos de mamíferos (Khan *et al.*, 2000), o que reforça ainda mais seu caráter de alta biocompatibilidade.



(Fonte: Catálogo de produtos Sigma-Aldrich, 2007).

Figura 2.1 - Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.

Assim, a quitosana é um produto de origem natural, renovável e biodegradável, de apreciável importância econômica e ambiental, uma vez que sua matéria-prima é proveniente de resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira. A utilização da quitosana em diversos campos de pesquisa, devido a suas interessantes propriedades biológicas, tem contribuído inclusive para a redução do impacto ambiental causado pelo acúmulo dos resíduos da pesca nos locais onde estes são gerados e/ou estocados (Yamaura, 2007). A Tabela 2.1 apresenta algumas das principais aplicações da quitina e da quitosana em variadas áreas.

Tabela 2.1 - Principais aplicações da quitina e quitosana.

Área Industrial	Áreas de Saúde e Nutrição
Purificação de água residual de indústrias	Agentes absorvedores de gorduras
Estabilizantes de aromas	Redução de colesterol LDL, auxiliar do colesterol HDL
Meios de troca iônica	Regeneração de pele
Aditivos de cosméticos e xampus	Antiácido
Absorventes na remoção de metais pesados	Auxiliar no controle na pressão arterial
Proteção bactericida de sementes	Regenerador de estrutura óssea
Estabilizantes de frutas e verduras perecíveis	Redução do nível de ácido úrico
Agentes para imobilização de microrganismos	Auxiliar na perda de peso
Estabilizantes de gorduras em alimentos	Bactericida/antiviral
	Inibidor da formação de placa dentária
	Auxiliar na absorção de cálcio
	Membranas artificiais

(Fonte: baseada em Marreco, 2004).

Dentre as principais propriedades da quitosana e da quitina, destacam-se sua biocompatibilidade (Fan *et al.*, 2006; Anal e Stevens, 2005), bioadesividade, atuação na abertura das junções epiteliais (Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b), possuindo ainda ação antimicrobiana, capacidade de ativar macrófagos, estimular a migração e proliferação celular, além de orientar a reorganização da histo-arquitetura celular (Clasen *et al.*, 2006; Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Niekraszewicz, 2005; Paul e Sharma, 2004; Mi *et al.*, 2003; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988).

Após a dissolução em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, a quitosana forma um polieletrólito viscoso e suas soluções são, geralmente, miscíveis com outros polímeros, formando complexos e quelatos. A presença de grupos amino na molécula da quitosana permite que esta seja modificada quimicamente quando desejável (Niekraszewicz, 2005).

O grau de desacetilação (percentagem de grupos acetil removidos dos grupos acetamino) pode ser considerado uma característica importante da quitosana, podendo influenciar no desempenho e na aplicação deste biopolímero (Canella e Garcia, 2001; Khan *et al.*, 2000). A degradação da quitosana é realizada *in vivo* por enzimas hidrolíticas, distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, tais como a N-acetilglicosamidase (Niekraszewicz, 2005), a lisozima (Sankalia *et al.*, 2007; Niekraszewicz, 2005), a α -amilase e a hialuronidase (Sankalia *et al.*, 2007). Ressalta-se que o tempo de degradação da quitosana em contato com tais fluidos é dependente, dentre outros fatores, do seu grau de

desacetilação. A diminuição do número de grupamentos acetil na molécula dificulta a ação de enzimas como a lisozima, por exemplo, que depende destes grupamentos químicos para se ligar ao polímero e iniciar o processo de degradação (Suh e Matthew, 2000).

Em decorrência das suas propriedades, a quitosana pode ser utilizada em várias aplicações médicas, tais como em medicamentos oculares tópicos (Felt *et al.*, 1999), lentes de contato (Niekraszewicz, 2005), injeções intra-articulares (Song *et al.*, 2001), sistemas de liberação controlada e curativos (Niekraszewicz, 2005; Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b).

Segundo Mi *et al.* (2001), membranas assimétricas de quitosana são capazes de apresentar excelente permeabilidade ao oxigênio, controlar a perda de água por evaporação e promover a drenagem de exsudato das lesões. Em experimentos com modelos animais, a quitosana mostrou ter influência em todos os estágios de cicatrização do tecido (Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Niekraszewicz, 2005; Howling *et al.*, 2001), processo este considerado complexo, envolvendo vários mecanismos como coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem. Ainda neste contexto, segundo Paul e Sharma (2004), lesões tratadas com quitina e quitosana em vários animais apresentaram substancial diminuição no tempo de tratamento, com mínima formação de cicatrizes.

A carboximetil quitosana (CM-quitosana), um derivado da quitosana solúvel em água, tem sido extensamente utilizada em uma gama de aplicações biomédicas, visto que a CM-quitosana não restringe a formação normal de fibroblastos humanos, mas impede a formação de fibroblastos quelóides pela inibição da secreção do colágeno do tipo I, atuando, assim, no controle de quelóides durante a cicatrização das feridas (Fan *et al.*, 2006).

Dentre os avanços recentes no desenvolvimento de membranas de quitosana para aplicação como curativo, mencionam-se as atividades do Instituto de Fibras Químicas (*Institute of Chemical Fibres* da Polônia), que atua na obtenção de suspensões de quitosana microcristalina (MCCh) pela agregação de macromoléculas em suspensão. Segundo Niekraszewicz (2005), a MCCh preserva as propriedades vantajosas iniciais da quitosana (como biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e biodegradabilidade), além de exibir habilidade para produzir filmes diretamente das suspensões aquosas, sendo ainda miscível com outros polímeros e outras substâncias. O mesmo Instituto também desenvolveu fibras de viscoso

modificadas com quitosana microcristalina para a produção de curativos, sendo que estas apresentaram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*. Em adição, a preparação de fibras combinadas de quitosana e alginato, destinadas a curativos multifuncionais, também vem sendo investigada (Niekraszewicz, 2005).

Finalmente, destaca-se que apesar de todos os seus benefícios, as membranas somente de quitosana apresentam algumas desvantagens quando utilizadas em feridas úmidas, estando estas relacionadas à insuficiente permeabilidade ao exsudato e ao oxigênio e à baixa flexibilidade no estado seco, causando certa dificuldade no momento da aplicação (Clasen *et al.*, 2006). Tais fatos tornam a associação da quitosana com outros polímeros, como o alginato, por exemplo, de grande interesse na área biomédica.

2.1.2 Aspectos fundamentais do emprego de alginato na constituição de materiais biocompatíveis

Os alginatos são polissacarídeos naturais lineares que na presença de cátions multivalentes têm a capacidade de formar géis. São compostos por duas diferentes unidades de repetição, (1,4)- α -L-gulonato (unidade G) e (1,4)- β -D-manuronato (unidade M), em variadas proporções e arranjos sequenciais, como pode ser visualizado na Figura 2.2 (Hou *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2006; Qin, 2004). São conhecidos tradicionalmente como agentes gelificantes e espessantes, sendo amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica (Qin, 2004), têxtil, cosmética, no setor agrícola e na indústria de química fina (Bioware, 2005). 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 (George e Abraham, 2006; Sankalia *et al.*, 2007; Mofidi *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2002). As algas da espécie *Macrocystis pyrifera* são tidas como as principais produtoras de alginato, podendo ser encontradas em várias zonas temperadas do oceano Pacífico e no sul da Califórnia.

Dentre um total de 32 mil espécies de macroalgas existentes no mundo, cerca de 820 espécies podem ser encontradas no Brasil, onde, anualmente, se consome em média 3.200 toneladas de derivados de algas (em torno de 20 milhões de dólares ao ano), sendo que apenas 10% destes derivados são produzidos no país. Neste universo, o consumo de

alginato corresponde a 600 toneladas por ano, a um custo que varia entre US\$ 600 e US\$ 800, dependendo da qualidade do produto (Bioware, 2005).

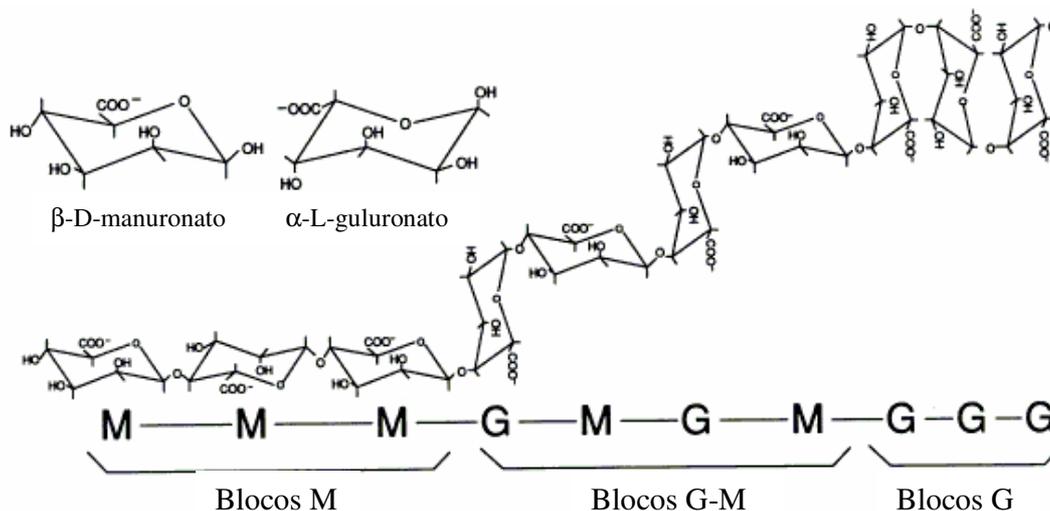


Figura 2.2 - Fórmula molecular estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de α-L-guluronato e M, os copolímeros de α-D-manuronato.

As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes com os blocos homopoliméricos dos resíduos do guluronato, os blocos G (Dong *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2006, Rodrigues, 2004). Dentre os cátions divalentes utilizados, destacam-se o magnésio, o cálcio, o estrôncio e o bário, sendo mais comumente empregado o cálcio. Os íons Ca^{++} localizam-se nas cavidades eletronegativas e as interações iônicas entre os blocos de guluronato e os íons Ca^{++} causam a formação de um gel termoestável resistente (Rodrigues, 2004). A Figura 2.3 mostra a representação esquemática das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio.

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. A utilização de curativos contendo alginato em pacientes queimados pode promover redução significativa da dor pelo bloqueio das terminais nervosas, e acelerar o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxerto (Paul e Sharma, 2004).

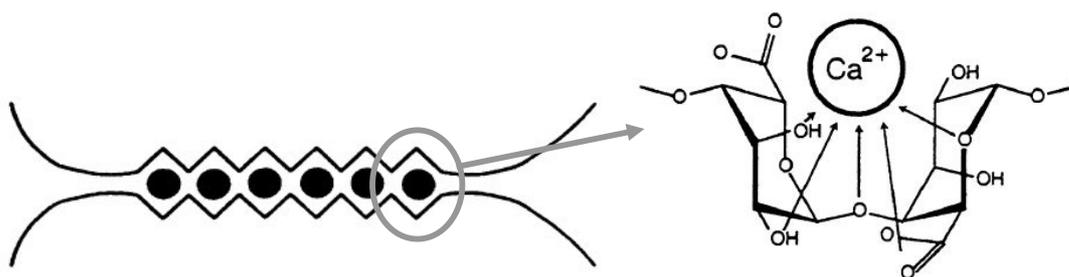


Figura 2.3 - Esquema das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca^{2+} , enquanto as linhas representam as cadeias individuais de alginato.

Por volta da década de 80, as fibras de alginato começaram a ser largamente utilizadas na produção de curativos, sendo que neste campo as suas propriedades foram consideradas particulares em vários aspectos. Primeiramente, o alginato é não-tóxico e seguro para ser utilizado na superfície de feridas e em suas cavidades (Qin, 2006). Segundo, quando o alginato de cálcio insolúvel em água é colocado em contato com feridas com exsudato, parte dos íons cálcio são trocados pelos íons sódio dos fluidos corpóreos (Fan *et al.*, 2006; Qin, 2006), sendo que os íons cálcio liberados podem atuar como agentes hemostáticos. Terceiro, a lenta conversão do alginato de cálcio em alginato de sódio promove intensa absorção do exsudato da lesão, auxiliando na manutenção da umidade do leito da ferida. Por fim, por ser um polímero natural, o alginato é uma fonte renovável com ilimitado estoque na natureza (Qin, 2006).

Os curativos contendo alginato têm demonstrado capacidade de ativação de macrófagos nos leitos das feridas crônicas e geram sinais pro-inflamatórios, os quais são indicativos iniciais do processo de cicatrização (Fan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002). Esta geração *in situ* do ambiente úmido de “cura”, que conduz à rápida granulação e re-epitelização do tecido (Fan *et al.*, 2006; Paul e Sharma, 2004), e a alta capacidade de absorção destes curativos são consideradas duas características de grande importância, colocando os alginatos entre os mais versáteis curativos disponíveis atualmente (Fan *et al.*, 2006).

A Tabela 2.2 apresenta exemplos de curativos à base de alginato disponíveis no mercado. Pode-se observar que os curativos de alginato apresentam relação direta entre

preço e tamanho, não apresentando grandes variações de preço entre os fabricantes, nas mesmas dimensões.

Tabela 2.2 - Exemplos de curativos à base de alginato disponíveis no mercado (fonte: Calcium-Alginate-Dressings, 2004 e Quality Medical Supplies, 2007).

Produto/Fabricante	Apresentação	Preço (US dólar)/Unidade
AlgiDerm [®] /Bard	4" x 8"	\$ 14.04/unidade
AlgiSite M [®] /Smith & Nephew, Inc	2" x 2"	\$40.11/cx 10 unidades
	2" x 2"	\$377.93/cx 100 unidades
	4" x 4"	\$6.64/unidade
	4" x 4"	\$60.78/cx 10 unidades
	4" x 4"	\$599.03 /cx 100 unidades
	6" x 8"	\$168.17/cx 10 unidades
Curasorb [®] /Kendall	fita 12" x (3/4)"	\$464.19/cx 60 unidades
	fita 12"	\$25.10/cx 5 unidades
	4" x 4"	\$ 5.95/unidade
Kaltostat [®] /ConvaTec	4"x 4"	\$42.91/cx 10 unidades
	2" x 2"	\$39.67/cx 10 unidades
Restore [®] /Hollister	6" x 9 (1/2) "	\$314.06/cx 10 unidades
	4" x 4"	\$ 46.55/cx 10 unidades
SeaSorb [®] /Coloplast Sween Corp	4" x 4"	\$56.57/cx 10 unidades
	fita 16"	\$41.14/cx 6 unidades
Sorbsan [®] /Bertek Pharmaceuticals	2" x 2"	\$32.48/cx 10 unidades
	2" x 2"	\$324.20/cx 100 unidades
	3" x 3"	\$55.49/cx 10 unidades
	4" x 4"	\$286.74/cx 50 unidades
	4" x 8"	\$12.34/unidade
Tegagen HI [®] /3M Health Care	4" x 4"	\$54.76/cx 10 unidades
	fita 12"	\$36.65/cx 5 unidades

2.2. Hidrogéis e complexos polieletrólitos (PEC)

Os hidrogéis são considerados macromoléculas ligadas em rede, passíveis de intumescimento em água ou em fluidos biológicos (Berger *et al.* 2004a; Lee *et al.*, 1999), tidos como excelentes carreadores para a liberação controlada de drogas e macromoléculas bioativas. Sua maior desvantagem, com relação à resistência mecânica, pode ser superada pela reticulação das cadeias poliméricas, promovendo reforço em sua estrutura (Lee *et al.*, 1999).

Devido às diversas definições do termo hidrogel, diferentes métodos de classificação são encontrados na literatura, dependendo da natureza e da estrutura do sistema. Um dos métodos de classificação fundamenta-se nos tipos de redes formadas: redes entrelaçadas, redes covalentemente ligadas e redes formadas por interações secundárias, sendo que esta última inclui todos os casos intermediários situados entre as duas outras (Berger *et al.*, 2004a).

Com relação aos hidrogéis de quitosana, esta classificação, não é inteiramente adequada. Berger *et al.* (2004a) sugerem uma classificação modificada para tais hidrogéis, separando-os em hidrogéis químicos e físicos. Os químicos seriam aqueles formados por ligações covalentes irreversíveis, como nos hidrogéis de quitosana covalentemente ligados, e os hidrogéis físicos seriam aqueles formados por várias ligações reversíveis, como as interações iônicas nos hidrogéis ligados ionicamente e nos complexos polieletrólitos - PECs (Berger *et al.*, 2004a). Os mesmos autores destacam que devido à natureza das interações serem as mesmas nos hidrogéis ligados ionicamente e nos PECs, uma divisão precisa entre tais estruturas é dificultada. Assim, estes autores consideraram hidrogéis ligados ionicamente aqueles nos quais a quitosana se liga a um íon, e como PECs, quando a quitosana interage com outros polímeros.

Os PECs são, assim, formados pela associação de dois ou mais polímeros complementares, os quais são ligados, principalmente, devido às forças eletrostáticas, a interações hidrofóbicas, a pontes de hidrogênio, a forças de van der Waals, ou pela combinação destas interações. A formação de complexos pode afetar fortemente algumas propriedades dos polímeros constituintes do sistema, tais como sua solubilidade, reologia, condutividade, suas propriedades mecânicas, sua permeabilidade, condutividade elétrica, além de modificar a turbidez das soluções (Lee *et al.*, 1999).

Outro aspecto importante na formação dos PECs está relacionado ao pH do meio, ou seja, para que ocorra a reação, ambos os polímeros devem estar ionizados e apresentar cargas opostas, sendo que, durante a complexação, os polieletrólitos podem formar coacervados, ou formar um hidrogel mais ou menos compacto (Berger *et al.*, 2004b). De qualquer forma, se as interações iônicas forem muito fortes, pode ocorrer precipitação, impedindo a formação dos hidrogéis. A Tabela 2.3 indica o tipo de material formado quando a quitosana é colocada em contato com outros tipos de polieletrólitos.

Tabela 2.3 - Polieletrólitos que podem formar complexos com a quitosana (adaptada de Berger *et al.*, 2004b).

Classe Química	Polieletrólito	Grupo	Tipo de complexo
Polissacarídeos	Alginato	-COO ⁻	Hidrogel, micropartículas com Ca ²⁺
	Carragena	-OSO ₃ ⁻	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Carboximetil celulose	-COO ⁻	Precipitado, hidrogel com Al ³⁺
	Sulfato de dextrana	-OSO ₃ ⁻	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Heparina	-OSO ₃ ⁻	Precipitado
	Ácido hialurônico	-COO ⁻	Precipitado
	Pectina	-COO ⁻	Hidrogel, filme, micropartículas com Ca ²⁺
	Xantana	-COO ⁻	Hidrogel
Proteínas	Colágeno	-COO ⁻	Precipitado, filmes
Polímeros Sintéticos	Ácido poli-acrílico	-COO ⁻	Precipitado
	Ácido polifosfórico	-OPO ₃ ⁻	Micropartículas
	Polifosfato	-OPO ₃ ⁻	Micropartículas
	Poli(l-lactato)	-COO ⁻	Matrizes Porosas

Neste contexto, uma grande variedade de polímeros hidrofílicos capazes de formar hidrogéis têm sido apontados como possíveis candidatos para substituir tecidos moles lesados ou para utilização em diversas aplicações biomédicas (Tabela 2.4), estando os hidrogéis de quitosana e alginato entre os mais estudados para a preparação de membranas para fins terapêuticos (Paul e Sharma, 2004; Mao *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Loke *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000; Beppu *et al.*, 1999; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988).

Tabela 2.4 - Exemplos de complexos polieletrólitos de quitosana com variados poliânions e suas aplicações (adaptada de Berger *et al.*, 2004b).

Tipo de Poliânion	Tipo de Aplicação
Alginato	Micropartículas para liberação controlada Micropartículas para cultura celular ou microencapsulação de agentes bioquímicos Esponjas impregnadas com ativos
Sulfato de condroitina	Hidrogel para liberação controlada (partículas para liberação subcutânea de ativos) Hidrogel para engenharia de tecidos Gel carreador para transplantes autólogos Matriz para reconstrução de tecidos em culturas de queratinócitos e fibroblastos humanos
Carboximetil celulose	Membranas para liberação controlada de ativos e de pesticidas agrícolas Hidrogel para imobilização celular
Quitina carboximetilada	Matriz para cultura de células
Sulfato de dextrana	Hidrogel para liberação oral de ativos Hidrogel para cicatrização de feridas dérmicas Membranas para controle e proliferação de vasos endoteliais e células musculares
Heparina	Membranas para cicatrização de feridas dérmicas
Ácido hialurônico	Filmes ou esponjas para cicatrização de feridas
Pectina	Partículas para liberação de ativos no cólon intestinal
Colágeno	Membrana para controle de ativos Análogo de tecido para testes toxicológicos <i>in vitro</i> Curativos para pacientes com queimaduras extensas
Ácido Polifosfórico	Partículas para liberação sustentada de ativos no trato gastrointestinal
Polifosfato	Partículas para liberação controlada de ativos

2.2.1. Obtenção de membranas de quitosana-alginato através da formação de complexos polieletrólitos

Uma das técnicas de preparação de membranas contendo simultaneamente quitosana e alginato foi proposta por Yan *et al.* (2000) e adaptada por Wang. *et al.* (2001, 2002). Tal metodologia fundamenta-se na produção controlada de coacervados das matérias-primas e em sua moldagem e secagem após suspensão em solução aquosa de cloreto de cálcio.

A mistura das soluções de quitosana e alginato, sob condições pré-estabelecidas de concentração dos polímeros, taxa de agitação, taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato, dentre outras, leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas de quitosana-alginato, juntamente com moléculas de quitosana e de alginato que não reagiram. A mistura obtida é então centrifugada, lavada para a remoção das moléculas não complexadas e, após seca, esta produz membranas flexíveis e consistentes (Wang *et al.*, 2001). O complexo polieletrólito formado entre a quitosana e o 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 (Yan *et al.*, 2000).

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 (Figura 2.4).

Como já mencionado anteriormente, a formação destes complexos ocorre devido à natureza catiônica da quitosana em solução, que permite a produção de complexos iônicos com espécies aniônicas como o alginato (George e Abraham, 2006; Anal e Stevens., 2005; Becherán-Marón *et al.*, 2004; Paul e Sharma, 2004; Lai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002 e 2001; Yan *et al.*, 2000), conforme ilustrado na Figura 2.5. As principais interações envolvidas neste processo são as forças de atração eletrostática (entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxil do alginato) e as pontes de hidrogênios. Os grupos amino da quitosana são facilmente protonados em condições de pH moderadamente ácidas (inferior a 6,3) para polieletrólitos catiônicos, e os grupos carboxílicos do alginato são facilmente ionizáveis em água (Yu *et al.*, 2005).

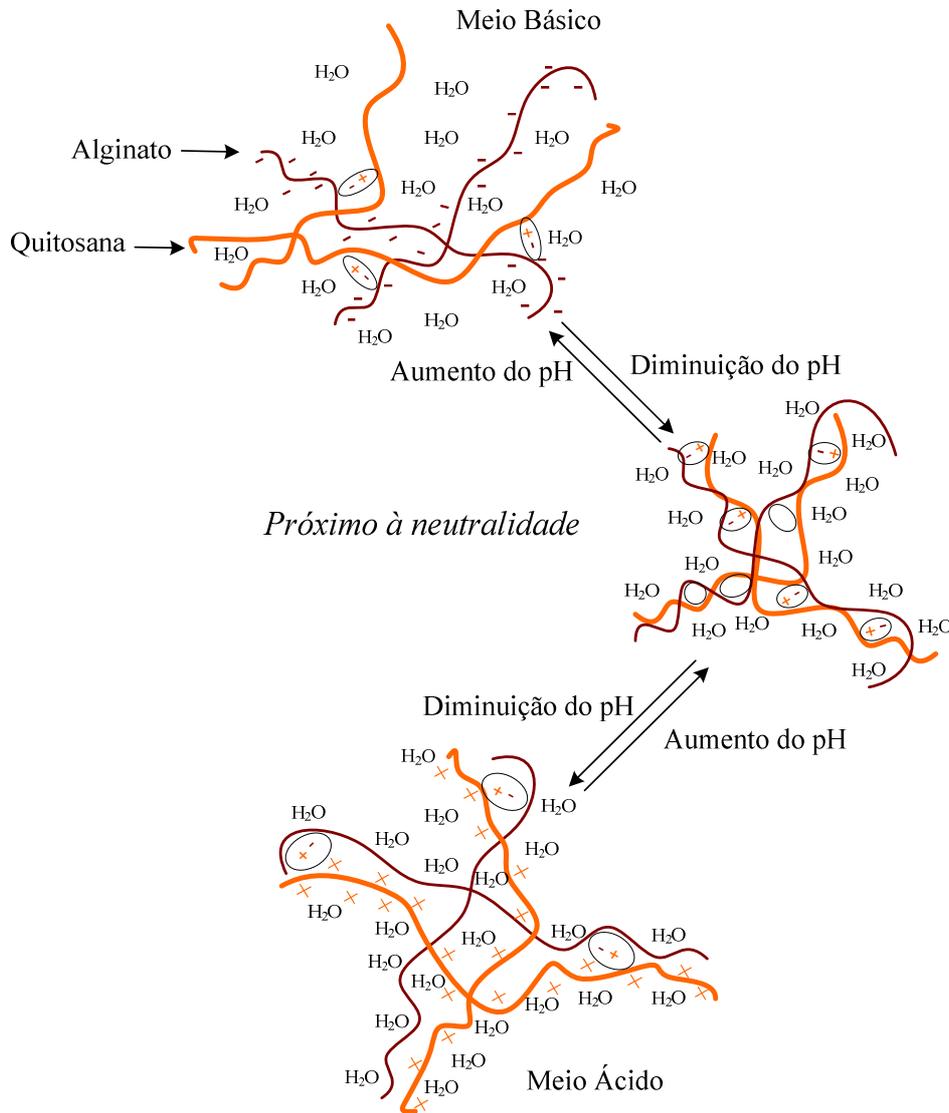


Figura 2.4 - Estrutura e comportamento de inchamento (sensível a variações de pH) dos complexos polieletrólitos contendo quitosana; as elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas de um polímero aniônico (-) e as cargas positivas da quitosana (+) (adaptado de Berger *et al.*, 2004b).

Em determinadas condições operacionais, quando as soluções de quitosana e alginato são misturadas sob agitação vigorosa, pela adição lenta de uma solução na outra, são obtidas cápsulas poliméricas. A coacervação rápida induz à formação de uma interfase densa que previne a reação adicional entre os polímeros. Embora esta técnica seja comumente empregada na preparação de microesferas de quitosana (ou alginato), ela não é

satisfatória para a obtenção de coacervados que serão utilizados na preparação de filmes, uma vez que as suspensões destas cápsulas produzem filmes heterogêneos distinguíveis pelas cápsulas dispersas na matriz de alginato. Assim, para se obter coacervados adequados para preparação de filmes homogêneos, a taxa de reação entre os dois polímeros deve ser suficientemente lenta para prevenir a formação de membranas interfásicas, permitindo que a reação entre os polímeros seja completa. Ainda neste contexto, a adição de um solvente orgânico de baixa polaridade (como a acetona) à solução de quitosana, faz com que este polímero assumira uma conformação menos estendida, o que restringe a taxa de reação entre os dois polieletrólitos, obtendo-se coacervados mais homogêneos (Yan *et al.*, 2000).

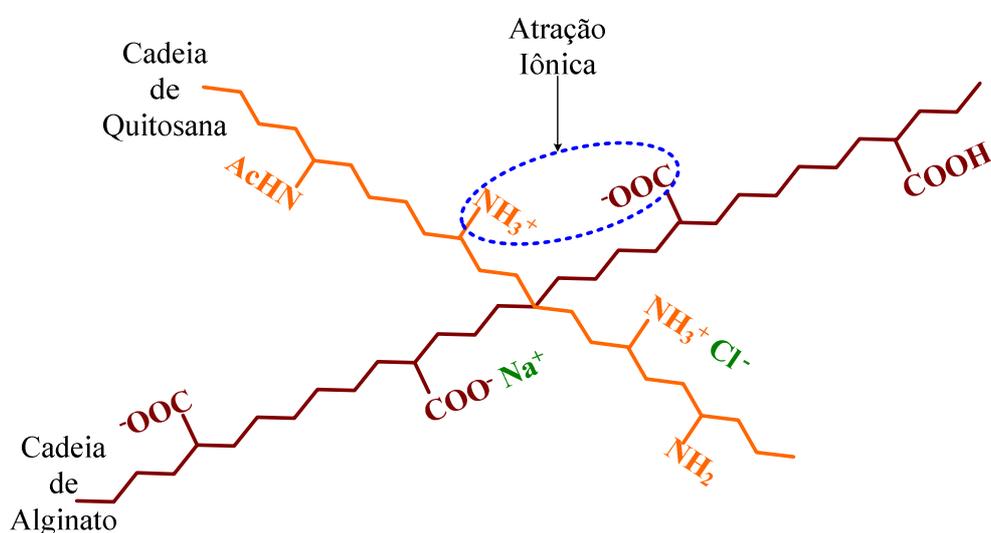


Figura 2.5 - Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato de sódio e de quitosana (adaptado de Knill *et al.*, 2004).

Tais complexos podem ser reforçados pela adição de íons que induzam a formação de sistemas estabilizados ionicamente, tais como o íon Al^{3+} em sistemas com a carboximetilcelulose (CMC), e o íon Ca^{2+} em sistemas contendo alginato (Berger *et al.*, 2004b) ou pectina (Munjeri *et al.*, 1997).

Por fim, como discutido anteriormente, apesar das variáveis taxa de agitação do sistema, taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato e concentração dos polímeros serem apontadas como de fundamental importância na formação de membranas baseadas em coacervados, não se localizou, na literatura consultada, estudos sistemáticos

referentes ao estabelecimento de tais condições para a formação de membranas homogêneas, sendo freqüentemente impossível à reprodução dos procedimentos empregados, uma vez que estes não explicitam ou detalham as condições de agitação do sistema, de taxa de adição dos polímeros entre si e dos tipos de equipamentos utilizados. Desta forma, o estudo sistemático para o estabelecimento de condições experimentais de preparação que conduzam a membranas reprodutíveis, sem a necessidade de centrifugação dos coacervados, e com características adequadas para a aplicação como curativos é de fundamental interesse, possibilitando, inclusive, estudos de ampliação de escala, de suma importância quando se tem interesse na produção em escala industrial.

2.3. Incorporação e permeação de fármacos em membranas poliméricas

A incorporação de fármacos em filmes poliméricos apresenta-se como uma das inúmeras aplicações destes na tecnologia farmacêutica. Numerosos sistemas de liberação de drogas são descritos na literatura, nos quais o princípio ativo a ser incorporado pode estar ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (Wang *et al.*, 2007).

Apesar dos fármacos poderem ser incorporados às membranas durante várias etapas de preparação das mesmas, geralmente, estes são adicionados à mistura resultante das soluções dos constituintes do filme, como no caso do hidrocloreto de ciprofloxacina em filmes de quitosana e polietilenoglicol (Wang *et al.*, 2007) e em filmes constituídos por alginato e gelatina (Dong *et al.*, 2006), e do paracetamol em membranas de quitosana e alginato (Lai *et al.*, 2003). Podem ainda ser incorporados em filmes prontos, por intumescimento, como no caso da ciprofloxacina (Öztürk *et al.*, 2006) e da sulfadiazina de prata (Yu *et al.*, 2005) em esponjas compostas de quitosana e alginato.

As propriedades físicas e químicas das membranas apresentam um importante papel na determinação da taxa de liberação de drogas incorporadas, sendo que o meio utilizado para a dissolução de um fármaco pode ter efeito decisivo em sua cinética de liberação (Wang *et al.*, 2000).

Alternativamente à incorporação, as membranas podem ser avaliadas com relação à sua capacidade de permeação a fármacos, uma vez que durante o tratamento de uma lesão cutânea pode haver o interesse na utilização de pomadas e/ou cremes tópicos, os quais poderiam ser administrados sobre as membranas, sem a necessidade de remover o curativo.

Segundo Wang *et al.* (2000), o modelo de difusão de soluções pode ser utilizado para descrever a permeação de drogas através de membranas densas (sem poros). Segundo tal modelo, o meio líquido pode afetar tanto a permeação das drogas como também sua partição, ou ainda influenciar na difusão da mesma. Ressalta-se que quando não há interação entre o meio e a membrana (ou seja, o meio não intumescer a membrana), a permeação ocorre devido à partição da droga. Por outro lado, quando o meio líquido contém um agente de intumescimento da membrana, este pode expandir a membrana de maneira controlada, alterando a difusão das drogas através dela. Altos graus de intumescimento das membranas resultam em altos graus de difusividade, sendo o aumento da difusividade das drogas causado pelo aumento do volume livre (Wang *et al.* 2000).

Assim como no caso da obtenção de membranas a partir de coacervados de alginato e quitosana, os relatos disponíveis na literatura acerca da determinação das características de permeação de fármacos em membranas também não apontam para procedimentos sistemáticos. As condições dos ensaios e os tipos de equipamentos empregados variam muito, o que dificulta a comparação direta dos resultados. A Tabela 2.5 apresenta as variações encontradas na realização dos ensaios de permeação descritos na literatura consultada.

Uma vez que a permeabilidade polimérica é a base de uma gama de importantes aplicações de interesse farmacêutico, como revestimentos de fármacos, sistemas de hemodiálise e curativos, uma quantidade considerável de estudos tem sido realizada utilizando-se membranas poliméricas para liberação e permeação de fármacos. Neste contexto, um possível fármaco a ser incorporado e/ou permeado nas membranas de quitosana-alginato destinadas a curativos seria o antibiótico bacitracina, uma vez que como anteriormente mencionado, os pacientes com lesões cutâneas podem ser acometidos por diversos tipos de infecções, sendo que as mais comuns são as causadas pelas bactérias dos gêneros *Pseudomonas* (G-) e *Staphylococcus* (G+). Entretanto, durante os cinco primeiros dias de internação, os pacientes apresentam nas culturas de exsudato das lesões principalmente bactérias gram positivas, constituintes da flora natural da pele (Moreira, comunicação pessoal, 2004). Desta forma, a utilização de um curativo contendo um antibiótico efetivo para bactérias gram positivas nestes primeiros dias seria de interesse.

Tabela 2.5 - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas nos ensaios de permeação de fármacos em membranas, verificadas nas referências bibliográficas consultadas.

Composição da membrana/Fármaco	Condições do ensaio	Técnica de análise do fármaco	Referência
Celulose e quitina/Ceftazidina, Cefazolina sódica e Tiuréia	Agitação contínua Temperatura controlada Ensaio em tampão fosfato Hidratação em tampão fosfato por 4h	Espectrofotometria UV-Visível	Liang <i>et al.</i> , 2007
Quitosana/Isoniazida e Amitriptilina	Agitação contínua Temperatura de 30°C Hidratação em água por 12h Ensaio em água deionizada	Espectrofotometria UV-Visível	Rocha <i>et al.</i> , 2002
Quitosana/Diclofenaco de Sódio	Agitação contínua a 600 rpm Temperatura de 37°C Ensaio em tampão fosfato pH 7.4 com formaldeído Ensaio realizado em célula de Franz	Espectrofotometria UV-Visível	Dureja <i>et al.</i> , 2001
Pectina e quitosana (PEC)/Paracetamol	Agitação contínua a 60 rpm/min Temperatura de 37°C Ensaio em tampão fosfato pH 5,0	Espectrofotometria UV-Visível	Macleod <i>et al.</i> , 1999
Glutamato de quitosana e alginato (PEC)/Maleato de Clorfeniramina e Guaifenisina	Agitação contínua Temperatura de 37°C Hidratação por 10 min	Espectrofotometria UV-Visível	Remuñán-López e Bodmeier, 1997

Tabela 2.5 (continuação) - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas nos ensaios de permeação de fármacos em membranas, verificadas nas referências bibliográficas consultadas.

Composição da membrana/Fármaco	Condições do ensaio	Técnica de análise do fármaco	Referência
Membranas à base de bromometilato poli 2,6-dimetil-1,4- óxido de fenileno, modificadas e não modificadas/Salicilato de Sódio	Temperatura controlada Ensaio em água deionizada Hidratação em água deionizada em temperatura ambiente	Espectrofotometria UV-Visível	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Pele humana/Ácido salicílico	Agitação contínua Temperatura de 37°C Ensaio em tampão fosfato pH 7.4 com albumina humana (1,4%) Ensaio realizado em célula de Franz	Cromatografia líquida de alta eficiência	Leveque <i>et al.</i> , 2004
Acetato de celulose e acetato de celulose com policaprolactona triol/paracetamol	Agitação contínua a 120 rpm Temperatura de 37°C Ensaio em tampão fosfato Hidratação em tampão fosfato por 1h	Espectrofotometria UV-Visível	Meier <i>et al.</i> , 2004
Silicone/Derivado de lavendustina	Agitação contínua a 300 rpm Temperatura de 32°C Ensaio em etanol e água (1:1)	Cromatografia líquida de alta eficiência	Moser <i>et al.</i> , 2001
Poli(etileno-co-vinilacetato) e poliuretano/Benzocaína	Agitação contínua Temperatura de 37°C Hidratação antes do ensaio	Espectrofotometria UV-Visível	Wang <i>et al.</i> , 2000
Hidrogel de óxido de polietileno/Teofilina	Agitação contínua a 600 rpm Temperatura de 37°C Hidratação em água a 37°C	Espectrofotometria UV-Visível	Stringer e Peppas, 1996
Durapore® com poli-(3-hexiltiofeno)/Dopamina	Ensaio em água deionizada	Espectrometria de massas termospray	Stassen <i>et al.</i> , 1995

A Figura 2.6 ilustra as possíveis rotas de ação da quitosana complexada com alginato e de um antibiótico que atue sobre a parede bacteriana (como a bacitracina), quando em contato com as bactérias. Neste caso, a ação antibacteriana dar-se-ia por duas possíveis rotas: pela interação da quitosana carregada positivamente, após sua dissociação do complexo formado com o alginato, com os componentes negativamente carregados da parede celular bacteriana, causando a inibição do crescimento bacteriano pela destruição da parede celular ou ainda, através da liberação do fármaco incorporado nas membranas, o qual atuaria também sobre a parede celular bacteriana.

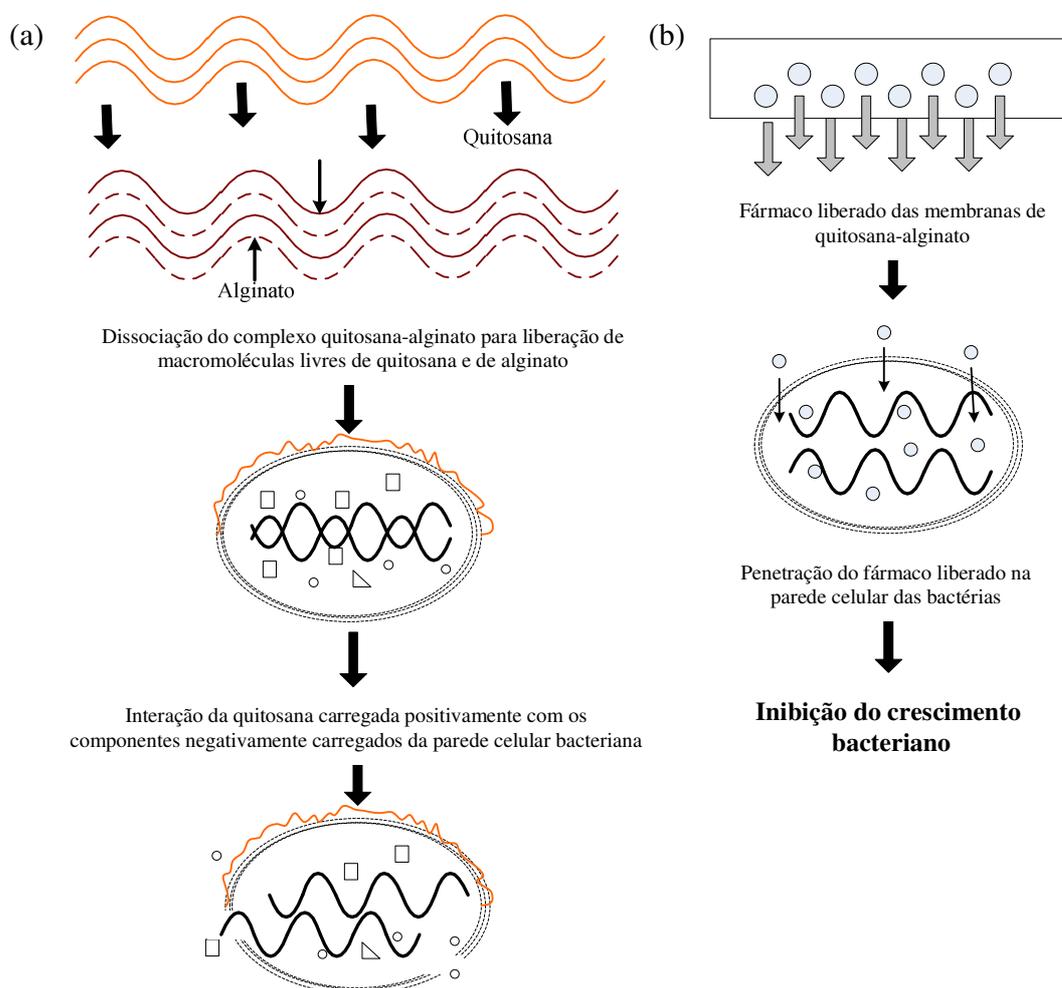


Figura 2.6 - Rotas de ação na inibição do crescimento bacteriano pelas membranas de quitosana-alginato contendo antibiótico: (a) atuação da quitosana sobre a parede celular bacteriana, (b) atuação do antibiótico (adaptado de Yu *et al.*, 2005).

2.3.1. Bacitracina

A bacitracina foi isolada pela primeira vez em 1943, a partir do *Bacillus subtilis*. Constitui-se de um complexo polipeptídico contendo moléculas de variadas estruturas, denominadas bacitracinas A, B, C, D, E, F e G. A estrutura A é seu principal componente (Sin e Wong, 2003; Pavli e Kmetec, 2006 e 2001; Rogelj *et al.*, 2000; Farzana *et al.*, 2004; Merck Index, 1996), sendo este um decapeptídeo cíclico com massa molar de cerca de 1500 Da contendo em sua molécula um anel tiazolidina (Vaucher e Schapoval, 2003).

Este antibiótico caracteriza-se por possuir intenso efeito sobre bactérias Gram-positivas (Vaucher e Schapoval, 2003; Rogelj *et al.*, 2000), possuindo mecanismo de ação inibitório sobre a síntese da parede celular dos microrganismos (Farzana *et al.*, 2004; Lafepe, 2007; Stachelhaus *et al.*, 1996). Mais recentemente, este fármaco tem sido utilizado como ferramenta de investigação em laboratórios, atuando como inibidor de diversas reações enzimáticas e, como modificador de processos fisiológicos, incluindo o aumento da atividade da insulina em vários tipos de células e a inibição de várias enzimas, como a insulinase, a encefalinase e a dissulfeto isomerase (Rogelj *et al.*, 2000).

A bacitracina possui uma grande afinidade por íons metálicos divalentes, tais como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , com eles formando complexos. Assim, para fins farmacêuticos, sua forma mais utilizada é na forma de sal de zinco, pois tal composto aumenta sua atividade e sua estabilidade. Em adição, em preparações para uso humano, seu maior emprego ocorre na forma associada ao antibiótico aminoglicosídico neomicina, em pomadas (Vaucher e Schapoval, 2003).

A bacitracina zíncica apresenta centros nucleofílicos bem definidos, com grupamentos amino e átomos de nitrogênio em anéis heterocíclicos (Vaucher e Schapoval, 2003). Ao ser exposto à luz solar e a variações de temperatura entre 20 e 35°C, este fármaco apresenta perda de 20 a 35% de sua atividade em 6 dias (Florey, 1980).

A Figura 2.7 apresenta as estruturas químicas das bacitracinas A e F, sendo o componente F ($C_{65}H_{97}N_{16}O_{17}S$) o principal produto de degradação da bacitracina A ($C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$). Apesar de ser um composto inativo, o componente F, é considerado nefrotóxico (Sin e Wong, 2003; Pavli e Kmetec, 2001).

Com relação ao comportamento de ionização, a bacitracina apresenta ponto isoelétrico igual a 8,8 (Florey, 1980; Catálogo de produtos on-line Sigma-Aldrich, 2006). A

título de ilustração, na Tabela 2.6 são apresentados os valores de pK de alguns dos resíduos encontrados na estrutura química da bacitracina, tomando-se por base o pK de aminoácidos não conectados entre si por ligações peptídicas. Supõe-se que estes resíduos, a pH abaixo de 8,8 estejam, portanto, todos protonados.

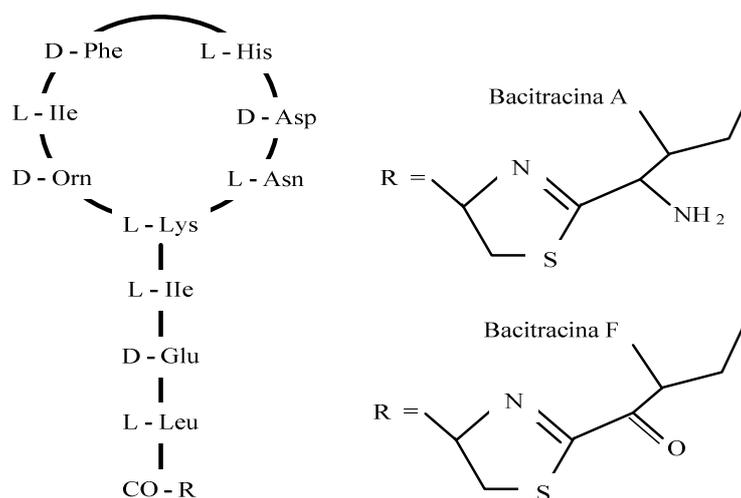


Figura 2.7 - Estruturas químicas das bacitracinas A e F (Pavli e Kmetec, 2001).

Tabela 2.6 - Valores prováveis de pKa dos radicais de grupos ionizantes dos aminoácidos da bacitracina A, quando não conectados entre si por ligação peptídica, em solução aquosa a 25 °C (Farfán, 1990)

Aminoácido	Abreviatura Inglesa	pK ₃ grupo R
Leucina	(LEU)	-
Isoleucina	(ILE)	-
Fenilalanina	(PHE)	-
Asparagina	(ASN)	-
Ácido aspártico	(ASP)	3,86
Ácido glutâmico	(GLU)	4,25
Histidina	(HIS)	6,00
Lisina	(LYS)	10,53

Por fim, apesar da bacitracina ser um fármaco interessante para ser incorporado às membranas de quitosana-alginato destinadas a curativos, destaca-se que não foram localizados estudos onde tal incorporação tenha sido realizada. Neste sentido, a

incorporação deste fármaco às membranas confere caráter de ineditismo a este trabalho. Em adição, a incorporação da bacitracina às membranas pode ser realizada no decorrer das etapas de preparação das mesmas ou ainda, este fármaco pode ser incorporado em filmes prontos, por intumescimento com solução de bacitracina.

2.4. Caracterização física, química, mecânica e biológica das membranas

De acordo com a literatura consultada, os testes normalmente realizados nas membranas com potencial para utilização em processos de regeneração de tecidos lesados são: determinação das propriedades mecânicas das mesmas, ou seja, resistência à tração, elasticidade e flexibilidade (Marreco *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000; Madihally e Matthew, 1999); determinação da espessura (Marreco *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Ma *et al.* (2001); Yan *et al.*, 2000); determinação do grau de hidratação ou intumescimento das membranas quando da imersão em água ou tampão (Marreco, 2004; Mi *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001; Madihally e Matthew, 1999); avaliação da permeabilidade das membranas ao vapor d'água (Mi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000) e ao oxigênio (Mi *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2001); e da morfologia da superfície (Marreco *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Madihally e Matthew, 1999). No caso da preparação de membranas com agentes ativos incorporados, faz-se também necessária a determinação da sua eficiência de incorporação e de seu perfil de liberação (Lai *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2003).

Dentre as técnicas relatadas na literatura pesquisada quanto à caracterização biológica destes dispositivos, as mais frequentemente citadas são os testes de citotoxicidade *in vitro* (Marreco *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000) e *in vivo* (Wang *et al.*, 2002; Mi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000), e de adesão e crescimento celular sobre a superfície das membranas (Marreco, 2004; Mi *et al.*, 2001; Suzuki e Mizushima, 1997).

Destaca-se que não foi localizada uma padronização estabelecida para a realização dos testes de caracterização física, química, mecânica e biológica de membranas compostas por quitosana e alginato utilizadas como pele artificial ou como curativos na terapia de

tecidos danificados. Neste contexto, visto que várias particularidades foram encontradas na literatura com relação à realização dos ensaios de resistência mecânica das membranas assim como com referência a determinação da atividade antimicrobiana da bacitracina incorporada neste tipo de material, estes assuntos específicos serão abordados a seguir.

2.4.1. Ensaios de resistência à tração

Os ensaios de resistência mecânica são considerados de grande importância na caracterização de membranas destinadas a curativos. O comportamento do material ao longo do ensaio passa normalmente pelas etapas representadas na Figura 2.8.

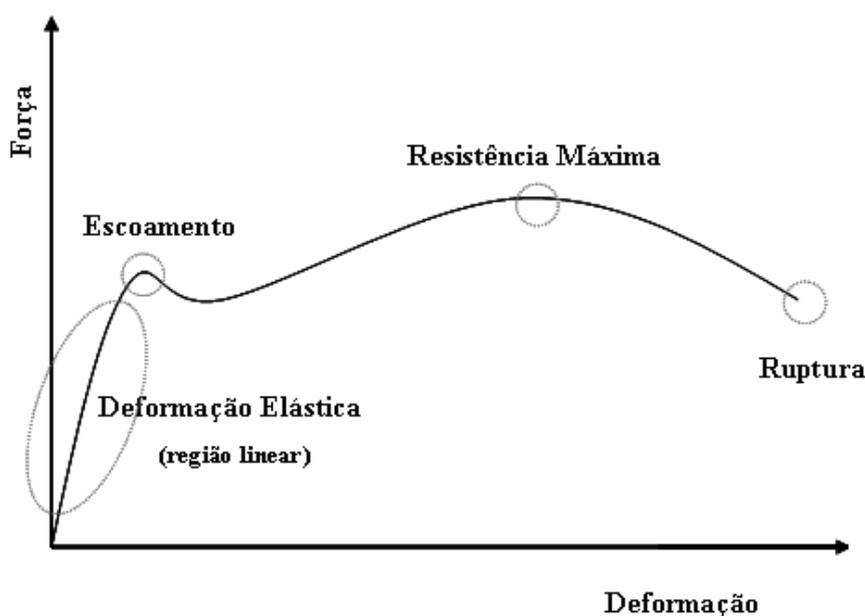


Figura 2.8 - Comportamento teórico de um corpo de prova ao sofrer tensão.

Quando a tensão é interrompida na região linear da curva, o polímero volta à sua conformação inicial, sendo a deformação chamada de elástica. Neste caso, a tensão e a deformação são linearmente proporcionais e seguem a Lei de Hook (Equação 1).

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1)$$

onde: σ é a tensão, E é a constante de proporcionalidade e ε é a deformação.

A fase elástica é seguida pela fase plástica, na qual as deformações sofridas pelos polímeros são permanentes. No começo da fase plástica ocorre escoamento, caracterizado pela deformação permanente do corpo de prova sem que haja um aumento na carga, mas com aumento na velocidade de deformação. Após o escoamento, há uma fase conhecida como encruamento ou endurecimento. Nessa fase, o material resiste mais à tensão, exigindo uma força maior para se deformar. Finalmente, aumentando a tração, chega-se à ruptura do material. Em geral, materiais frágeis apresentam ruptura antes mesmo de entrarem na fase de escoamento, sofrendo praticamente apenas deformação elástica.

Para a realização dos ensaios mecânicos, fundamentalmente, as membranas são cortadas em determinadas dimensões, fixadas ao equipamento de tração por garras distantes entre si por uma distância específica e alongadas a uma taxa de deformação (velocidade) constante. Destaca-se que apesar de existirem normas para a realização de tais ensaios, como a ASTM D638 e a ASTM D882, estas nem sempre são seguidas com rigor, devido à necessidade de adequação das mesmas às características específicas do material a ser avaliado. A Tabela 2.7 destaca algumas das variações encontradas nas condições experimentais utilizadas na realização de ensaios de resistência mecânica de membranas de quitosana isolada ou em mistura com outros compostos. A largura dos corpos de prova mais frequentemente utilizada, segundo as referências consultadas, é de 10 mm, enquanto seu comprimento varia de 40 a 75 mm. A distância entre garras, por outro lado, varia de 15 a 50 mm, e a deformação pode ser muito lenta (1 mm/min) ou bastante rápida (100 mm/min). De 3 a 10 amostras são avaliadas por ensaio e frequentemente, emprega-se temperatura próxima à ambiente (25°C), mas o grau de umidade dos corpos de prova é bastante variável. Com relação a este último aspecto, em particular, deve-se salientar que o controle da umidade da amostra durante o ensaio é relativamente difícil, uma vez que há acentuada tendência de perda de água durante o ensaio, se a umidade do ambiente for menor que a da amostra, em função de sua pequena espessura. Desta forma, apesar da condição de uso como curativo não ser, necessariamente, aquela em que a membrana se encontra completamente seca, esta condição é frequentemente empregada na avaliação da resistência mecânica, por facilitar a análise comparativa dos resultados.

Tabela 2.7 - Variações encontradas nas condições experimentais empregadas na caracterização mecânica de membranas de quitosana isolada ou em conjunto com outros compostos verificadas nas referências bibliográficas consultadas.

Composição da membrana	Condições do ensaio	Referência
Quitosana e dimetil 3,3,ditio-bis-propionamido	Dimensão da amostra: 10 mm Distância entre garras: 15 mm Velocidade: 6 mm/min Temperatura: 25°C, amostras secas e úmidas	Adekogbe e Ghanem (2005)
Quitosana	Distância entre garras: 50 mm Velocidade: 50 mm/min	Srinivasa <i>et al.</i> , 2004 ASTM D882 (1995)
Quitosana e gelatina; quitosana, gelatina e ácido hialurônico	Dimensões da amostra: 40 x 10 mm ² Velocidade: 5 mm/min, ensaios em triplicata	Mao <i>et al.</i> , 2003
Quitosana e alginato (PEC)	Dimensões da amostra: 75 x 10 mm ² Velocidade: 1 mm/min Temperatura: 25°C, umidade relativa: 50%	Wang <i>et al.</i> , 2002 ASTM D638
Quitosana e alginato (PEC)	Velocidade: 1 mm/min Temperatura: 25°C, ensaios realizados: n=10	Wang <i>et al.</i> , 2001 ASTM D638
Quitosana e alginato (PEC)	Dimensões da amostra: 70 x 10 mm ² Distância entre garras: 50 mm Velocidade: 1 mm/min Temperatura: 25°C, umidade relativa: 50% Ensaio realizado: n=5	Yan <i>et al.</i> , 2000
Quitosana	Dimensões da amostra: 10 x 50 mm ² Distância entre garras: 30 mm Velocidade: 0,5 mm/s Célula de carga: 5 Kg	Khan <i>et al.</i> , 2000
Quitosana carboximetilada e alginato	Dimensões da amostra: 20 x 50 mm ² Velocidade: 100 mm/min Amostras secas e úmidas (10 minutos em água) Ensaio realizado: n=3	Zhang <i>et al.</i> , 2000 <i>Chinese Standard Method</i>

2.4.2. Determinação da atividade antibacteriana da bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato

Várias técnicas têm sido empregadas na extração e purificação da bacitracina comercial em variados tipos de amostras, incluindo algumas que envolvem procedimentos confidenciais (Rogelj *et al.*, 2000). Em formulações como as pomadas, por exemplo, a bacitracina deve ser extraída dos componentes da matriz, para que se possa determinar sua atividade. Por este motivo, a bacitracina é ainda analisada quase que exclusivamente por métodos microbiológicos, considerados como oficiais para seu doseamento, empregando-se para tal, discos de papel ou cilindros nos quais se deposita a droga, sobre meios sólidos inoculados com as bactérias contra as quais se deseja testar a atividade do fármaco. Tanto para a matéria-prima como para as preparações farmacêuticas utiliza-se tal abordagem (Vaucher e Schapoval, 2003).

A atividade microbiana de uma substância pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo (MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*). A eficácia de um antibiótico na inibição deste crescimento pode ser avaliada com base na formação de halos de inibição pelo método de difusão em ágar. Na classificação da susceptibilidade de bactérias a antibióticos com base neste método, pode-se recorrer a procedimentos experimentais padronizados e a valores de referência tabelados do diâmetro dos halos de inibição, como os divulgados pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, EUA) (Instituto Superior Técnico, 2007).

Pinzelik *et al.* (1953) avaliaram a susceptibilidade do *Micrococcus flavus* a discos contendo bacitracina em concentrações variáveis, tendo sido encontrados halos de inibição de cerca de 18 mm quando da utilização de discos contendo 0,8 UI bacitracina/mL. Para identificar grupos de *Streptococcus* beta-hemolíticos do tipo A, vários grupos de pesquisa também utilizaram discos contendo bacitracina. Destaca-se que os discos de bacitracina fornecidos por diferentes fabricantes não necessariamente contêm concentrações iguais de antibiótico, podendo variar de 0,02 a 0,2 UI por disco e, diferentes conteúdos de bacitracina presentes nos discos podem influenciar a precisão e a exatidão dos testes de inibição (Chitwood *et al.*, 1969 *apud* Coleman *et al.*, 1977). Tais autores utilizaram a formação ou a ausência de formação da zona de inibição como critério de avaliação dos testes, tendo sido

encontradas diferenças consideradas inaceitáveis entre o desempenho dos discos de diferentes fabricantes. Washington *et al.* (1974 *apud* Coleman *et al.*, 1977), utilizaram discos contendo de 0,02 a 0,04 UI com sucesso para diferenciar *Streptococcus* do tipo A de outros tipos de *Streptococcus*, empregando o método de tamanho de halo específico (11 mm). Por outro lado, Ederer *et al.* (1972, *apud* Coleman *et al.*, 1977), utilizaram discos contendo 0,04 UI de bacitracina e seguiram as recomendações do fabricante para zona específica de inibição de 10 mm, classificando erroneamente algumas cepas.

Cotter e Adley (2001) fizeram uma comparação dos testes de avaliação de susceptibilidade antimicrobiana para o microrganismo *Enterococci faecalis* utilizando bacitracina, segundo procedimentos padronizados de seis Comitês Científicos Internacionais. Os resultados obtidos apontaram que a incidência de resistência, susceptibilidade, e resistência intermediária diferem de procedimento para procedimento, sendo que os pontos de parada (*breakpoints*) recomendados pelos Comitês para o mesmo agente podem ser significativamente diferentes, uma vez que o estabelecimento de tais pontos requer a consideração de vários fatores.

Outro fator que deve ser levado em consideração durante os ensaios de halo de inibição, de acordo com Pinzelik *et al.* (1953), é a existência de três períodos de atraso que podem ocorrer durante o ensaio de susceptibilidade com os antibióticos, podendo tais atrasos resultar na formação de halos maiores ou menores. O primeiro refere-se ao intervalo entre a preparação das placas e a adição do antibiótico, sendo que durante este período o microrganismo em teste tem a chance de crescer à temperatura ambiente antes da adição do antibiótico. Como exemplo, um padrão de referência de bacitracina contendo 1 UI/mL gera um halo de cerca de 19,8 mm quando o antibiótico é adicionado assim que as placas são preparadas. Por sua vez, o atraso de 1 hora entre a preparação e a adição do antibiótico resulta em halos 2 mm menores. O segundo atraso está compreendido entre a adição do antibiótico e a colocação das placas para a incubação. As zonas formadas neste segundo período, para o padrão acima referido, foram 1 mm maiores quando comparadas com as das placas deixadas por 1 h à temperatura ambiente após a adição dos antibióticos e antes da incubação a 37°C. O terceiro atraso pode ocorrer entre a adição da amostra em teste e a adição do padrão de referência. Assim, tais atrasos tornam-se importantes quando a amostra e o padrão de referência não são adicionados ao mesmo tempo, podendo introduzir alguns erros ao ensaio (Pinzelik *et al.*, 1953), interferindo na avaliação da potência do material.

Desta forma, pode-se inferir que apesar da extensa utilização dos ensaios de halo de inibição para os testes de susceptibilidade aos antibióticos, vários fatores podem influenciar nos resultados e na interpretação dos mesmos. Desta forma, tais testes devem ser conduzidos sob condições pré-determinadas, visando minimizar possíveis erros experimentais.

2.5. Possíveis aplicações de membranas compostas por quitosana-alginato e somente por quitosana em diferentes tipos de lesões

As membranas de quitosana-alginato e somente de quitosana podem ser potencialmente utilizadas em vários tipos de lesões, como lesões cutâneas e lesões internas.

Dentre os variados tipos de lesões cutâneas, somente as queimaduras e as úlceras crônicas serão discutidas a seguir, sendo que, com relação às lesões internas, os aspectos relacionados às aderências peritoneais pós-operatórias serão abordados, por serem foco do desenvolvimento deste trabalho.

2.5.1. Características e incidências de queimaduras e úlceras crônicas

A pele é um dos maiores e mais complexos órgãos do corpo humano. Conhecida também como cutis ou tegumento, possui área superficial de 1,5 a 2,0 m². A pele promove a regulação térmica através do ajuste do fluxo sanguíneo e da transpiração, previne a desidratação e atua como barreira contra microrganismos, agentes físicos e químicos (Paul e Sharma, 2004; Balasubramani *et al.*, 2001). Sua espessura pode variar de acordo com a idade e com a localização no corpo. Possui três camadas distintas, sendo estas chamadas de epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo, conforme indicado na Figura 2.9.

A epiderme é dividida em estratos que representam as diferentes fases de maturação dos queratinócitos, produtores da proteína queratina. Nela, ocorre um processo contínuo de proliferação, maturação e morte celular. Por ser a camada mais externa da pele, assegura resistência e proteção contra as agressões do meio ambiente. A derme ou camada intermediária é responsável pela estrutura, suporte e proteção dos órgãos. Nela, estão presentes vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. A hipoderme, também chamada de tecido subcutâneo, é a camada mais

profunda da pele, sendo formada basicamente por células que armazenam gordura, e desempenha principalmente as funções de absorção de choques mecânicos e isolamento térmico (Paul e Sharma, 2004; Balasubramani *et al.*, 2001).

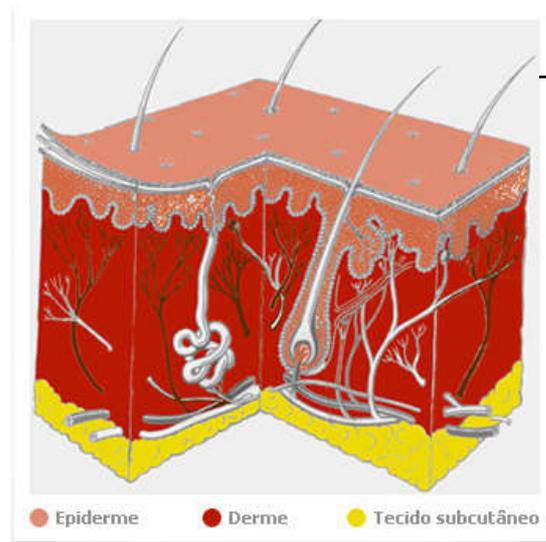


Figura 2.9 - Corte esquemático da pele (fonte: Abbott Laboratories, 2005).

As queimaduras são lesões que ocorrem nos tecidos em decorrência de trauma resultante da exposição a chamas, líquidos e superfícies quentes, frio, substâncias químicas, radiação, atrito, fricção ou eletricidade (Piccolo *et al.*, 2002).

Dependendo do tipo de agente causador, da extensão e da profundidade da lesão, as queimaduras podem ocasionar danos complexos ao organismo, sendo que as repercussões para a vítima podem variar de uma simples lesão superficial ao óbito (Beraldo *et al.*, 1999). Assim, várias funções podem ser afetadas, ocasionando danos ao sistema respiratório com possível obstrução das vias aéreas, desequilíbrio dos fluidos/eletrólitos orgânicos e desregulação da temperatura corpórea, dentre outras. Deve-se ressaltar que além dos danos físicos causados pelas queimaduras, os pacientes podem ser acometidos por seqüelas funcionais, emocionais e psíquicas, necessitando freqüentemente de acompanhamento adequado até seu total restabelecimento.

As estatísticas de incidência de queimaduras são muito dispersas e não comparáveis entre países e até mesmo dentro de um mesmo país (Marreco, 2004). As queimaduras severas podem ser consideradas como um significativo problema de saúde pública em

países industrializados e em desenvolvimento, em termos de incidência, custo e severidade. Somente nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que mais de 2,5 milhões de indivíduos por ano irão receber tratamento médico para queimaduras, ou terão pelo menos um dia de restrição das suas atividades devido a este tipo de lesão (Martineau e Shek, 2006a). Felizmente, a mortalidade causada pelas queimaduras declinou na última década, porém, quando aproximadamente 70% da superfície corpórea é atingida, os valores de mortalidade ainda são considerados altos (Alemdaroğlu *et al.*, 2006).

Segundo dados divulgados pela Organização Não Governamental Criança Segura, que faz parte da rede internacional *Safe Kids Worldwide*, o governo brasileiro gasta anualmente cerca de R\$ 63 milhões na rede do SUS - Sistema Único de Saúde devido a acidentes, estando as queimaduras em quarto lugar em incidência. A organização registrou, em 2004, 387 casos de mortes de crianças entre 0 e 14 anos, em função de queimaduras, sendo que dos 387 casos, 190 foram devidos à exposição à fumaça, fogo e chamas, 184 resultantes de exposição a correntes elétricas, radiação ou a temperaturas extremas do ambiente, e 13 devido a contato com uma fonte de calor ou com substâncias quentes (Criança Segura Brasil, 2004).

O Centro de Tratamento de Queimados (CTQ) do Hospital da Restauração (HR) em Pernambuco, que é referência nacional no tratamento de queimados, vem registrando nos últimos anos um crescimento do número de atendimentos. Em 2006, 2.872 pacientes queimados deram entrada no hospital, o que representa um aumento de 10% em relação a 2005 e 15% em relação a 2004, sendo que cerca de 60% desses pacientes vêm do interior do Estado e até de outros Estados para serem atendidos no CTQ (Hospital da Restauração, 2007). Em São Paulo, o Hospital do Servidor Público atendeu 131 vítimas de queimaduras em 2006, sendo que 17 eram crianças. Em mais de 70% dos casos houve necessidade de internação em UTIs com períodos de internação variando entre 30 e 90 dias, sendo que o custo de internação em UTIs, sejam elas públicas ou privadas, é de cerca de R\$ 3 mil reais por dia (Associação Brasileira da Defesa do Consumidor, 2007).

As infecções em lesões causadas por queimaduras podem trazer várias complicações ao paciente, sendo que diversos são os fatores que contribuem para a colonização destas feridas, como: presença de exsudato, presença de tecidos necrosados e a queda da imunidade natural do organismo (Martineau e Shek, 2006b). De acordo com a

Coordenação Estadual de Queimaduras do Rio de Janeiro, aproximadamente 80% dos óbitos em pacientes com queimaduras são decorrentes de complicações infecciosas.

As queimaduras geralmente originam tecidos desvitalizados e úmidos, proporcionando um ambiente ideal para a proliferação de microrganismos. Estas, quando não protegidas, são colonizadas por bactérias em um período de 12 a 24 h, podendo alcançar níveis de até 100 milhões de micróbios por grama de tecido dentro de 48 h (Loke *et al.*, 2000). Assim, pode-se afirmar, que as infecções são as maiores causas de morte entre os pacientes queimados (Loke *et al.*, 2000), sendo que os estudos visando a obtenção de curativos para utilização neste segmento merecem especial atenção. Destaca-se que a proteção de queimaduras contra os ataques microbianos pelo uso de curativos é uma prática hospitalar comum.

Segundo a médica Silvia Moreira, cirurgiã plástica do Hospital Sanatorinhos de Itu (2004), anteriormente à aplicação dos curativos realiza-se a assepsia do paciente queimado. Esta é feita diariamente utilizando-se água e sabões degermantes (como clorexidina de 0,5 a 2,0% e triclosan a 0,3%, ou Saboex[®]). Tal procedimento é tido como um dos mais dolorosos para o paciente, assim, antes de sua realização, costuma-se administrar algum tipo de medicamento para aliviar a dor, podendo-se também associar um indutor do sono para que o paciente fique menos ansioso e corra menor risco de desenvolvimento de trauma. Os curativos comumente empregados são geralmente compostos de várias camadas (gaze, algodão e sulfadiazina de prata) e são trocados diariamente, sendo que os medicamentos tópicos utilizados na realização dos mesmos são a sulfadiazina de prata (1%) e o Dermacerium[®] (nitrato de cério), que atuam como antibacterianos e antibióticos tópicos. Destaca-se que a administração de antibióticos orais ou injetáveis com finalidade profilática não é realizada em pacientes queimados.

Além das queimaduras, as úlceras ou feridas crônicas são lesões cutâneas de grande expressão, sendo consideradas causas significativas de mortalidade em todo o mundo (Howell-Jones *et al.*, 2005). Podem ser classificadas como úlceras de pressão, úlceras de pernas e pés diabéticos, dentre outras, sendo que a cicatrização por intenção secundária pode ser considerada comum para todos os casos (O'Meara *et al.*, 2000). Tais lesões ocorrem, normalmente, devido ao colapso fisiológico do paciente, sendo que estes transtornos estão freqüentemente associados com vasos, artérias ou fatores metabólicos.

Estudos realizados no Reino Unido estimaram que a prevalência das úlceras de pernas e pés está em torno de 1,48/1000 pessoas e há clara evidência que esta prevalência aumenta com o aumento da idade em até 36/1000 pessoas para a população em torno de 65 anos (Howell-Jones *et al.*, 2005). Segundo Clasen *et al.* (2006), tais feridas são responsáveis pela perda de cerca de 2 milhões de dias de trabalho por ano somente na Alemanha.

O impacto dos microrganismos em feridas crônicas tem sido amplamente estudado e revisado através da utilização de diferentes abordagens, para elucidar o papel dos mesmos na não-cicatrização das feridas. Tais estudos têm destacado a ocorrência de espécies particulares ou grupos de organismos, sendo que em muitos casos, os estudos são dificilmente comparáveis entre si devido ao uso de diferentes métodos de coleta e análise microbiana, assim como em decorrência das diferenças demográficas dos pacientes e na etiologia e na condição de infecção das úlceras. Em adição, as análises clínicas tendem a ser limitadas ao escopo do problema, sendo baseadas apenas nas considerações relativas à patogenicidade do microrganismo (Howell-Jones *et al.*, 2005).

A microflora das úlceras de pernas e pés tem caráter usualmente polimicrobiano, sendo que estudos recentes utilizando técnicas moleculares têm enfatizado a ecologia complexa de tais feridas. Através das técnicas convencionais, o número médio de espécies bacterianas encontradas por úlcera tem sido de 1,6 a 4,4 espécies. Em adição, observou-se que 86% das úlceras com sinais de infecção apresentam mais de uma espécie bacteriana (Howell-Jones *et al.*, 2005). Microrganismos freqüentemente isolados nestas feridas são o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa. A presença de *S. aureus* tem sido descrita com freqüências variando de 43% em úlceras de perna infectadas a 88% em úlceras de perna não-infectadas, enquanto que bactérias da espécie *Staphylococcus epidermidis* foram detectadas em 14% das úlceras venosas e 20,6% das úlceras diabéticas de pés. Bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa* têm sido encontradas com freqüência entre 7 e 33% em úlceras. Outros organismos aeróbios também têm sido reportados em feridas crônicas, como a *Escherichia coli*, o *Enterobacter cloacae*, bem como algumas espécies de *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Proteus* (Howell-Jones *et al.*, 2005). Destaca-se que a prevenção e o tratamento das feridas crônicas incluem muitas estratégias, as quais abrangem principalmente, a utilização de vários tipos de curativos, bandagens e agentes antimicrobianos (O'Meara *et al.*, 2000).

Por fim pode-se concluir que uma vez lesada, a pele pode ser contaminada por uma gama de microrganismos distintos, os quais podem acarretar as mais diversas complicações durante o período de tratamento da lesão (Godin e Touitou, 2004). Neste sentido, a utilização de coberturas compostas de quitosana e alginato, capazes de evitar a contaminação das lesões, sejam elas originadas por queimaduras ou por feridas crônicas, mostra-se de fundamental importância.

2.5.2. Adesões peritoneais resultantes de intervenções cirúrgicas

O campo da engenharia de tecidos tem apresentado rápidos avanços e introduzido novos conceitos nas ciências biológicas (Losanoff *et al.*, 2002). A integração multidisciplinar para a busca de materiais biocompatíveis, que promovam resposta celular e biológica aceitável pelo ambiente hospedeiro, com um mínimo de reação inflamatória e de corpo estranho, é fundamental para a condução experimental. Neste contexto, a avaliação de membranas poliméricas de quitosana e/ou quitosana e alginato na prevenção de aderências peritoneais faz-se de grande interesse.

O peritônio, a maior membrana serosa do corpo, é composto por duas camadas, sendo uma de tecido conectivo (ou membrana basal), e a outra, mesotelial. O tecido conectivo corresponde à matriz extracelular, sendo constituído por colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas, apresentando ainda fibroblastos, macrófagos, mastócitos e gordura. No espaço subseroso situam-se vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Duron, 2007). As células mesoteliais apresentam microvilosidades e estão frouxamente ligadas à membrana basal, podendo ser destacadas ao menor trauma. Os macrófagos e células mesoteliais produzem o líquido peritoneal que contém mediadores celulares, importantes para a cicatrização do peritônio por modularem a resposta inflamatória em uma grande área. O líquido peritoneal é constituído por leucócitos e em menor quantidade, macrófagos, eosinófilos e basófilos, o que pode variar conforme o ambiente peritoneal (Cheong *et al.*, 2001).

Quando o peritônio é lesado ou na presença de corpos estranhos, ocorre primeiramente uma reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular e formação de exsudato rico em fibrinogênio, que não pode ser reabsorvido. Concomitantemente, há ativação das células inflamatórias e da cascata de coagulação. A

trombina é ativada e converte o fibrinogênio em fibrina, que serve nos primeiros dias para o adequado processo de cicatrização (Canis *et al.*, 2001; Boland e Weigel, 2006).

Para que o mesotélio seja reparado sem formação de aderências, é necessário que a fibrina seja degradada pela plasmina, enzima ativa produzida a partir de uma pro-enzima inativa (o plasminogênio), que por sua vez, pode ser inibida pela presença de aderências. (Cheong *et al.*, 2001). A redução da atividade fibrinolítica está relacionada a traumas, inflamação ou isquemia peritoneal, sendo um fenômeno local (Canis *et al.*, 2001).

Como consequência, as aderências causam dores abdominais crônicas, obstrução intestinal, e infertilidade no ser humano. Em adição, aumentam o tempo cirúrgico em seus portadores e as dificuldades técnicas decorrentes das adesiólises (Cheong *et al.*, 2001; Canis *et al.*, 2001; Binda *et al.*, 2003; Avital *et al.*, 2004; Sulaiman *et al.*, 2001; Proudman 2007).

Apesar do risco potencial de indução de aderências decorrentes da introdução de um corpo estranho na cavidade peritoneal, os defeitos da parede abdominal, como as hérnias, requerem correção, freqüentemente, com implantes de biomateriais. Neste contexto, em 1958 nos Estados Unidos, telas de polipropileno foram introduzidas em cirurgias de reparação da parede abdominal. Em princípio, apesar dos aparentes benefícios, os cirurgiões mostraram-se relutantes em usar as telas, temendo o surgimento de infecções, porém, após vários relatos favoráveis, as telas começaram a ser amplamente utilizadas nas reparações das hérnias inguinais e umbilicais (Greca *et al.*, 2001).

Dentre todas as telas sintéticas disponíveis no mercado, as constituídas de polipropileno apresentam as características mais promissoras (Greca *et al.*, 2001), sendo comumente utilizadas. Porém, segundo Bellón *et al.* (2001), apesar da sua boa aceitação tecidual, estas telas podem desencadear reações de corpo estranho e formação de aderências, ocasionadas geralmente, pelo contato direto com as alças intestinais. Este tipo de aderência pode levar ao surgimento de fístulas entero-cutâneas ou entre alças intestinais, à migração do material para o interior de um órgão e a erosões viscerais (Borrazzo *et al.*, 2004; Butler e Prieto, 2004; Basílio 2003; Greca *et al.*, 2001, Mutter *et al.*, 2000; Dinsmore *et al.*, 2000).

Diante das diversas complicações relatadas pela literatura, a adoção de sistemas de barreira alternativos, como os filmes e os géis (Basílio 2003; Zhou *et al.*, 2004), torna-se necessária. Neste sentido, filmes à base de quitosana têm se destacado, devido às suas

variadas propriedades biológicas. Zhou *et al.* (2004), sugerem que a quitosana pode atuar bloqueando a adesão de fibroblastos nas superfícies lesadas, interrompendo assim, a formação da matriz de fibrina. Zhang *et al.* (2006), apresentaram relatos positivos com a utilização de géis à base de quitosana, uma vez que estes mostraram efeitos preventivos sobre aderências de origem isquêmica e traumática. Em adição, quando utilizado em um modelo de formação de aderências por lesão em corno uterino em ratas, os géis de quitosana apresentaram resultados satisfatórios, atuando provavelmente, sobre os mediadores da inflamação (Duran *et al.*, 2003).

Assim, o estudo de filmes preparados à base de quitosana na prevenção de aderências peritoneais faz-se de grande interesse, uma vez que a maioria dos dados disponíveis na literatura consultada relaciona-se à utilização de géis e soluções de quitosana, e não de membranas deste polímero. Em adição, a utilização das membranas de quitosana nesta área abre uma nova perspectiva de utilização das mesmas no campo biomédico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana no mínimo 85% desacetilada, alginato de sódio de baixa viscosidade e glicerol da Sigma Chemical Co.; bacitracina zínica da Fluka; ácido acético glacial, álcool etílico e acetona da Synth; cloreto de cálcio, fosfato monobásico, fosfato dibásico e cloreto de sódio da Merck; soro fetal bovino da Nutricell; hidróxido de sódio e citrato de sódio da Ecibra. A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore.

3.2. Métodos

3.2.1. *Preparação das membranas constituídas somente de quitosana*

As membranas contendo apenas quitosana foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Dallan (2005). Uma solução de quitosana a 2,0% (m/m) foi preparada a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v). A solução foi mantida em repouso em geladeira por 72 h e, após este período, foi filtrada em placa de vidro sinterizado com tamanho de poro G1. A solução filtrada foi então desaerada sob pressão reduzida. Alíquotas de 95,06 mL de solução de quitosana foram transferidas para placas de Petri de poliestireno com diâmetro de 15 cm, as quais foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida por três horas. Em seguida, as placas foram armazenadas em geladeira por um período de quatro dias, sendo posteriormente colocadas em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, à temperatura de 50°C até obtenção de massa constante (~ 6 h). Após a secagem, as membranas foram imersas em uma solução de NaOH a 1 mol.L⁻¹ por 24 h à temperatura ambiente, visando a neutralização do ácido acético residual. Por fim, as membranas foram lavadas com água destilada

(aproximadamente 2 L por membrana) para a remoção do excesso de base presente e secas à temperatura ambiente sob prensagem entre duas folhas de papel de filtro.

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

3.2.2. Ensaios para o estabelecimento das condições experimentais de preparação das membranas de quitosana e alginato

As membranas foram preparadas com base na metodologia proposta por Yan *et al.* (2000) e Wang *et al.* (2001 e 2002), sendo esta fundamentada na formação de coacervados. Nesta técnica, uma solução de quitosana deve ser lentamente adicionada, sob agitação, a uma solução aquosa de alginato, sendo que a solução de quitosana pode estar misturada a um solvente orgânico como a acetona, para controlar a velocidade de formação dos complexos poliméricos. Em seguida, os coacervados formados devem ser centrifugados e ressuspensos em solução aquosa de cloreto de cálcio, sendo tal mistura adicionada a uma placa de Petri e levada à estufa até obtenção de massa constante.

Com o intuito de se determinar as condições necessárias para a preparação reprodutível e escalonável das membranas constituídas simultaneamente por quitosana e alginato, vários ensaios preliminares foram realizados. Nestes, diversos parâmetros foram avaliados, tais como: a concentração das soluções poliméricas (solução de alginato de 0,25 a 0,5% m/v e solução de quitosana de 0,5 a 1,0% m/m), a taxa de agitação do sistema (desde agitação magnética a agitação mecânica entre 100 e 500 rpm), a vazão de adição da solução de quitosana na solução de alginato (de adição manual a bomba de infusão entre 20 e 40 mL/h), a recuperação dos coacervados formados (centrifugação à 5000 rpm, filtração à vácuo ou filtração em papel de filtro), a adição de CaCl₂ 2% m/v (de 0,5 a 1,0 mL para a

reticulação inicial das membranas) e de NaOH (para ajustar o pH do sistema), a desaeração à vácuo da mistura final obtida e o tratamento das membranas após a secagem em solução de CaCl_2 2% m/v (visando a reticulação adicional das membranas obtidas) seguido de lavagem em água deionizada.

As Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3 apresentam detalhadamente os procedimentos utilizados para a realização destes ensaios, bem como as alterações adotadas no decorrer de cada ensaio, sendo que a Figura 3.1, apresenta de forma geral as variáveis operacionais avaliadas ao longo do estabelecimento do protocolo básico experimental para a preparação das membranas de quitosana-alginato.

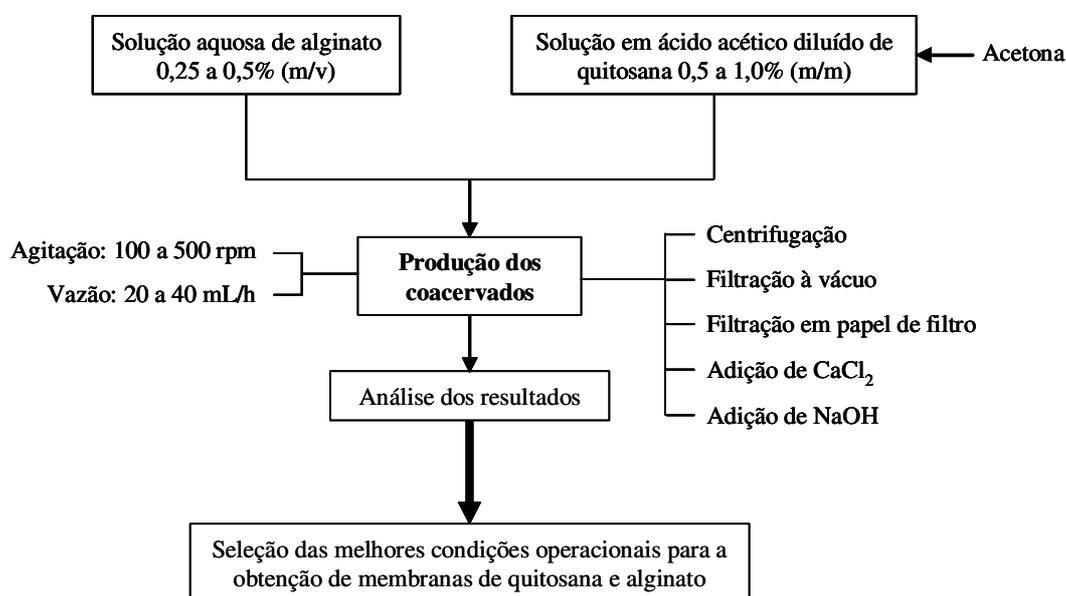


Figura 3.1 – Variáveis operacionais avaliadas ao longo do estabelecimento do protocolo básico experimental para a preparação das membranas de quitosana-alginato.

Tabela 3.1 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.

Ensaio	Composição da mistura inicial	Procedimento
1A	25 mL de quitosana 0,5% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,25% (m/v)	Adição manual da solução de quitosana na solução de alginato, sob agitação magnética em agitador magnético Fisatom modelo 752 por 1 h; Centrifugação dos coacervados a 5000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5804 R por 10 minutos; Lavagem com água deionizada (3x); Ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação; Secagem em estufa a 37°C por 24 h.
2A	25 mL de quitosana 0,5% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,25% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato (sob agitação) na vazão 20 mL/h Centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos; Lavagem com água deionizada (3x); Ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação por 1h; Secagem em estufa a 37°C por 24 h.
3A	25 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,5 % (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato (sob agitação) na vazão 20 mL/h; Centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos; Lavagem com água deionizada (3x); Ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) agitação por 1h; Secagem em estufa a 37°C por 24 h.
4A	25 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato (sob agitação) na vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Filtração a vácuo dos coacervados; Lavagem com água deionizada (3x); Ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm (1h); Secagem em estufa a 37°C por 24 h.

Tabela 3.2 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.

Ensaio	Composição da mistura inicial	Procedimento
5A	25 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato com bomba de infusão (vazão de 40 mL/h) sob agitação de 100 rpm; Centrifugação dos coacervados a 5000 rpm por 10 minutos; Lavagem com água deionizada (3x) ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 1h; Secagem em estufa a 37°C por 24 h.
6A	25 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana à solução de alginato sob vazão de 40 mL/h e agitação de 100 rpm; Filtração dos coacervados em papel de filtro (sem vácuo); Lavagem com água deionizada (3x); Ressuspensão dos coacervados em 20 mL de água deionizada; Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 1h; Secagem em estufa a 37°C por 24 h.
7A	25 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 25 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Adição de solução de NaOH a 1 mol.L ⁻¹ (sob agitação de 100 rpm por 10 minutos); Adição de 0,5 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 10 minutos; Secagem em estufa a 37°C por 24 h Imersão em 200 mL de água deionizada (2 h).
8A	50 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 50 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Adição de solução de NaOH a 1 mol.L ⁻¹ (sob agitação de 100 rpm por 10 minutos); Adição de 1,0 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 10 minutos; Secagem em estufa a 37°C por 24 h; Imersão em 150 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) por 1 h Imersão em 200 mL de água deionizada (2 h) secagem sob prensagem (temperatura ambiente)

Tabela 3.3 - Procedimentos detalhados utilizados na realização dos ensaios preliminares.

Ensaio	Composição da mistura inicial	Procedimento
9A	50 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 50 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato na vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Adição de solução de NaOH a 1 mol.L ⁻¹ (sob agitação de 100 rpm por 10 minutos); Adição de 1,0 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 10 minutos; Desaeração a vácuo da mistura; Secagem em estufa a 37°C por 24 h; Imersão em 150 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) por 1 h; Imersão em 200 mL de água deionizada (2 h) Secagem (temperatura ambiente)
10A	30 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 30 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato na vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Adição de solução de NaOH a 1 mol.L ⁻¹ (sob agitação de 100 rpm por 10 minutos); Adição de 1,0 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 100 rpm por 10 minutos; Desaeração a vácuo em kitassato (1-2 h); Secagem em estufa a 37°C por 24 h; Imersão em 150 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) por 1 h; Imersão em 200 mL de água deionizada (2 h) Secagem (temperatura ambiente)
11A	30 mL de quitosana 1,0% em ácido acético 2% (m/m) e acetona 1:1 (v/v) 30 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v)	Adição da solução de quitosana na solução de alginato na vazão de 40 mL/h sob agitação de 100 rpm; Adição de solução de NaOH a 1 mol.L ⁻¹ (sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos); Adição de 1,0 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos; Desaeração a vácuo em kitassato (1-2 h) Secagem em estufa a 37°C por 24 h; Imersão em 150 mL de CaCl ₂ 2% (m/v) por 1 h; Imersão em 200 mL de água deionizada (2 h) Secagem (temperatura ambiente)

3.2.3. Avaliação do efeito da taxa de agitação e da vazão de adição da solução de quitosana na solução de alginato nas características das membranas

Após a avaliação dos resultados obtidos nos ensaios preliminares anteriormente descritos, os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento estatístico do tipo 2^2 (Rodrigues e Iemma, 2005) composto de sete experimentos (quatro pontos experimentais e três pontos centrais). As variáveis independentes estudadas neste planejamento foram a taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato e a taxa de agitação da mistura, sendo que o efeito destas variáveis na espessura seca, na capacidade máxima de absorção de água, na perda de massa em água, na capacidade de drenagem, na resistência à tração e no alongamento na ruptura das membranas foi avaliado. Os ensaios deste planejamento foram fundamentalmente realizados nas condições experimentais propostas no ensaio preliminar 11A, sendo que durante a preparação das membranas alguns ajustes foram realizados visando melhorar o procedimento e a obtenção das mesmas. O procedimento final adotado para obtenção das membranas de quitosana-alginato é discutido a seguir.

Basicamente, 90 mL de solução ácida de quitosana e acetona (45 mL de solução de quitosana a 1% m/m em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v misturada com 45 mL de acetona 1:1 v/v) foram colocados em uma seringa de vidro Arti-glass e gotejados com uma bomba de infusão Samtronic modelo 670 T, em 90 mL de solução aquosa de alginato a 0,5% (m/v). A temperatura no reator de vidro Pyrex foi mantida a 25°C utilizando-se um banho termostático Quimis modelo 214 M2, durante todo o processo de produção das membranas, estando às condições experimentais empregadas listadas na Tabela 3.4. O sistema utilizado na preparação das membranas pode ser visualizado na Figura 3.2.

A mistura obtida foi agitada por 10 minutos a 1000 rpm. Em seguida, adicionou-se 8,4 mL de NaOH a 1 mol.L⁻¹ sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos (agitador mecânico Quimis modelo 251 D), visando ajustar o pH para o valor de 5,28 conforme proposto por Cárdenas *et al.* (2003). Por fim, 1,8 mL de CaCl₂ a 2% (m/v) foi adicionado ao sistema sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos.

A mistura polimérica obtida foi desaerada em bomba de vácuo Quimis modelo Q-355B por 90 minutos, transferida para placa de Petri de poliestireno de 15 cm e seca a 37°C em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, por 20 h, sendo que nas primeiras duas horas de secagem a placa foi girada em sentido horário de 30 em 30 minutos em um

ângulo de 90° para obtenção de membranas homogêneas. Após a etapa de secagem, as membranas foram imersas em 150 mL de solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 1 h, sendo em seguida, efetuadas duas imersões consecutivas em 200 mL de água deionizada por 1 h a cada vez. Ao final do tratamento em água deionizada, as membranas foram secas à temperatura ambiente e guardadas em embalagens plásticas específicas para esterilização com Oxyfume 30 (30% óxido de etileno e 70% CO₂), realizada conforme descrito para as membranas somente de quitosana.

A influência estatística da variação das taxas de agitação e da adição sobre as variáveis-resposta foi avaliada através do programa Statistica 5.1.

Tabela 3.4 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da taxa de agitação e da vazão de adição entre as soluções de quitosana e alginato. Os ensaios 5, 6 e 7 referem-se às triplicatas no ponto central.

Ensaio	Taxa de agitação (rpm)	Vazão (mL/h)
1B	100	20
2B	500	20
3B	100	40
4B	500	40
5B	300	30
6B	300	30
7B	300	30



Figura 3.2 - Sistema utilizado na preparação das membranas.

3.2.4. Avaliação do efeito da adição de glicerol durante a preparação das membranas de quitosana e alginato

A preparação das membranas contendo glicerol também se baseou na metodologia proposta por Yan *et al.* (2000) adaptada por Wang *et al.* (2001 e 2002).

Alíquotas de 90 mL de solução de quitosana e acetona (45 mL de solução de quitosana a 1% m/m em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v misturada com 45 mL de acetona 1:1 v/v) foram adicionadas em 90 mL de solução aquosa de alginato 0,5% (m/v) na vazão de 40 mL/h e agitação de 100rpm. A mistura formada foi homogeneizada por 10 minutos a 1000 rpm e, nesta etapa efetuou-se a adição do glicerol, sob quatro diferentes proporções mássicas deste componente nas membranas (ensaios 1C a 4C): 1:1:1; 1:0,5:1; 1:0,25:1 e 1:0,1:1 (quitosana:glicerol:alginato). Em seguida, 8,4 mL de NaOH a 1 mol.L⁻¹ foram adicionados ao sistema sob agitação de 1000 rpm, por 10 min, seguido da adição de 1,8 mL de CaCl₂ 2% (m/v), também a 1000 rpm por 10 min. A mistura final obtida foi desaerada em bomba de vácuo por 90 min e seca em estufa com circulação de ar a 37°C por 20 h. As membranas secas foram imersas por 1 h em 150 mL de CaCl₂ 2% (m/v), e posteriormente foram efetuadas duas imersões consecutivas em 200 mL de água deionizada por 1h a cada vez. Após esta etapa de tratamento, as membranas foram secas à temperatura ambiente por 24 h e esterilizadas com Oxyfume 30 (30% Óxido de etileno e 70% CO₂), conforme discutido anteriormente.

3.2.5. Ensaios para a avaliação da solubilidade e da estabilidade de bacitracina em diferentes solventes aquosos

Anteriormente à incorporação nas membranas, a bacitracina zíncica em pó foi previamente pesada em balança analítica e solubilizada em três diferentes solventes: água deionizada (pH 4.97), solução salina a pH 5,9 (cloreto de sódio a 0,9% m/v) e tampão fosfato-salina (PBS) a pH 7.4 e 50 mmol.L⁻¹. Para garantir a completa dissolução do fármaco, as amostras foram sonicadas em um banho sonicador (Bransonic, modelo 3510) por 15 min e a seguir deixadas em repouso por uma noite. Os frascos utilizados foram cobertos com papel alumínio e deixados em geladeira para minimizar a degradação do fármaco. Após este período, os frascos foram centrifugados e o sobrenadante foi analisado

em espectrofotômetro a 253 nm para determinar a concentração de fármaco solubilizado. A estabilidade das amostras de bacitracina solubilizada foi avaliada através de leituras de absorvância em espectrofotômetro UV-visível modelo DU640 (Beckman) a 253 nm e leituras de pH, realizadas em medidor de pH (Oakton).

3.2.6. Incorporação de bacitracina nas membranas de quitosana e alginato

Para os ensaios de incorporação, as membranas foram cortadas em corpos de prova circulares de 2 cm de diâmetro. Estes foram colocados em frascos âmbar e, hidratados em solução de bacitracina por 24 h a 37°C. Duas diferentes concentrações de bacitracina foram avaliadas nos ensaios de incorporação, sendo elas 1,5 e 3,5 mg de bacitracina/mL de solvente.

3.2.7. Caracterização das membranas

As membranas de quitosana-alginato e as compostas somente por quitosana foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

3.2.7.1. Aspecto das membranas

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu e fotografadas com uma câmera digital modelo MVC-FD75 (Sony).

3.2.7.2. Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440, Leica. As membranas foram cortadas nas dimensões de 2 x 1 cm² com auxílio de um molde metálico. As amostras foram liofilizadas, fraturadas, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92Å) em suas superfícies. Destaca-se que este mesmo procedimento foi utilizado para análise morfológica das membranas após o contato com o fármaco bacitracina.

3.2.7.3. Espessura das membranas

A espessura das membranas foi determinada pela utilização de micrômetro (Digimess), através de medições em sete diferentes pontos ao longo da extensão da membrana. Os valores médios das espessuras foram calculados.

3.2.7.4. Perfil de hidratação das membranas

O perfil de hidratação de água foi determinado através do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água. As membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm². Estes foram pesados em balança analítica Quimis (massa seca) e posteriormente hidratados com 10 mL de água deionizada por períodos variando de 1 minuto a 24 h em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, a 37°C. Após a hidratação, o excesso de água foi removido com a ajuda de papel de filtro, e os corpos de prova (quintuplicata) foram novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa úmida. Para cada período, o grau de intumescimento, C_i , foi determinado através da Equação 2.

$$C_i = \frac{(M_{ui} - M_s)}{M_s} \quad (\text{Equação 2})$$

onde M_{ui} refere-se à massa úmida no tempo i e M_s refere-se à massa seca das membranas.

3.2.7.5. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas

A capacidade máxima das membranas secas de absorver água e diferentes meios, sendo eles fluido corpóreo simulado (FCS) preparado com concentração convencional 1 x FCS, em mmol.L⁻¹: 142.0 Na⁺, 5.0 K⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.5 Mg²⁺, 148.8 Cl⁻, 4.2 HCO₃⁻, 1.0 HPO₄²⁻, e 0.5 SO₄²⁻, usando tampão TRIS (Aimoli *et al.*, 2007; Kokubo *et al.*, 1990), soro fetal bovino (SFB) e solução salina a 0,9% (SS) foi determinada empregando-se corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm² (triplicata). Estes foram pesados em balança analítica Quimis (massa seca) e posteriormente hidratados com 10 mL das soluções aquosas acima descritas

por 24 h em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, a 37°C. Após este período, o excesso de solvente foi removido com a ajuda de papel de filtro e os corpos de prova foram novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa úmida. A capacidade máxima de absorção de água, C_w , foi determinada através da Equação 3 (Cárdenas *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Macleod *et al.*, 1999):

$$C_w = \frac{(M_U - M_S)}{M_S} \quad (\text{Equação 3})$$

onde M_U refere-se à massa úmida final e M_S refere-se à massa seca das membranas.

3.2.7.6. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Neste ensaio, as membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm², os quais foram pesados em balança analítica Quimis (massa seca inicial) e posteriormente expostos à 10 mL de água deionizada, fluido corpóreo simulado (FCS), soro fetal bovino (SFB) e solução salina 0,9% (SS) por 43 dias (em geladeira). Após este período, os corpos de prova (triplicata) foram secos por 24 h, a 37°C em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, e novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa seca final. A perda de massa em água, M_p foi determinada através da Equação 4.

$$M_p = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}})}{M_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde M_{inicial} refere-se à massa seca inicial e M_{final} refere-se à massa seca final após 43 dias de estocagem.

3.2.7.7. Avaliação da capacidade de drenagem de água através das membranas

As membranas foram hidratadas em água deionizada a 37°C por 2h, e cortadas em amostras circulares de cerca de 2,0 cm de diâmetro. As amostras foram dispostas na superfície de tubos plásticos de centrífuga (TPP) contendo 7 mL de água deionizada. Sobre as membranas foram colocados anéis de vedação para evitar vazamentos e, em seguida os tubos foram tampados com tampas plásticas com vão circular na parte superior, de

aproximadamente 1,2 cm de diâmetro. Em um suporte de metal, os tubos foram colocados invertidos para que a água ficasse diretamente em contato com as membranas e suas bases foram perfuradas com agulhas para equalização da pressão, conforme indicado na Figura 3.3. As amostras foram incubadas em um dessecador contendo sílica-gel ativada por 72 h a 37°C. Os tubos foram pesados em tempos pré-determinados para avaliar a quantidade de água drenada pelas membranas.

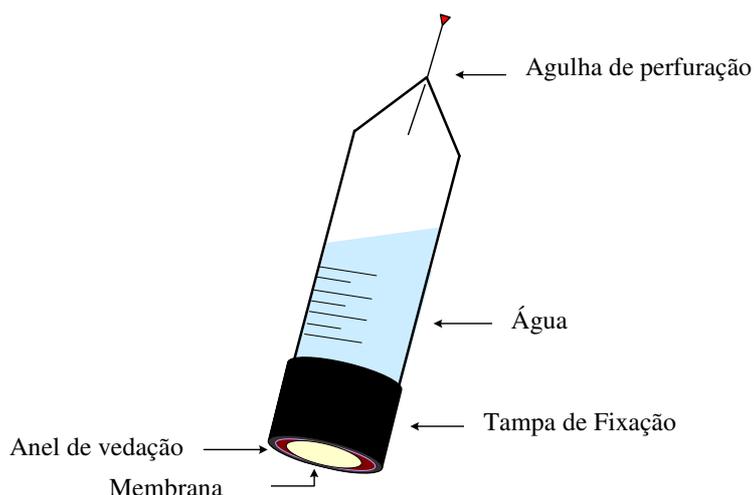


Figura 3.3 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas.

3.2.7.8. Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas referentes à resistência à tração foram determinadas com base em adaptações da norma ASTM D882. Estes ensaios foram realizados com as membranas secas, cortadas em corpos de prova de dimensões de 10,0 x 1,0 cm². Os corpos de prova foram fixados nas garras pneumáticas com mordentes de borracha do equipamento Tinius Olsen modelo H5K-S, e alongados a uma taxa de deformação constante de 10 mm/min, com distância entre garras de 4,5 cm, utilizando-se uma célula de carga de 200 N a 28 ± 2°C e umidade relativa do ar de 40 ± 5%. A Figura 3.4 ilustra a parte útil dos corpos de prova utilizados neste ensaio, após a fixação nos cabeçotes do equipamento. Os ensaios foram realizados com dez corpos de prova para cada tipo de membrana.

As mesmas condições descritas foram também utilizadas em ensaios com membranas hidratadas a 37°C por 1, 30 e 240 min, sendo o excesso de água retirado com papel de filtro antes da fixação do corpo de prova no equipamento.

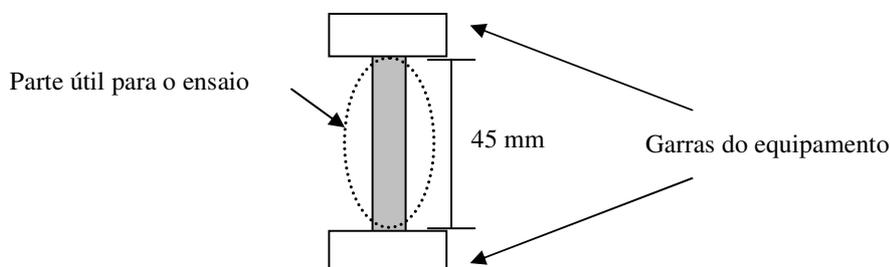


Figura 3.4 - Parte útil dos corpos de após a fixação nos cabeçotes do equipamento.

3.2.7.9. Permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água

Os ensaios de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água descritos a seguir foram realizados no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Embalagens (CETEA) localizado no ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP). As membranas utilizadas neste ensaio foram as obtidas nas condições do ensaio 3 B (Tabela 3.4), tendo estas sido escolhidas devido à sua alta capacidade de absorção de água.

A taxa de permeabilidade ao oxigênio foi determinada pelo método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F 1927, em equipamento Oxtran (Mocon) modelo 2/20, operando com oxigênio puro como gás permeante à temperatura de 35°C. A umidade inicial foi fixada em 30%UR na superfície do filme em contato com o oxigênio e 90%UR na superfície em contato com o gás de arraste (nitrogênio). O ensaio foi finalizado a 58%UR na superfície do filme em contato com o oxigênio e 81 a 94UR na superfície em contato com o gás de arraste. A área efetiva de permeação de cada corpo de prova foi de 5 cm². Os corpos de prova foram condicionados previamente ao ensaio, por imersão em água bidistilada por 5 minutos e secos com papel de filtro antes de serem fixados nas células de difusão, com a finalidade de tornar o filme mais maleável, favorecendo sua fixação hermética no equipamento. Os resultados obtidos foram corrigidos para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio.

A taxa de permeabilidade ao vapor d'água foi determinada para a condição de 35°C e 40%UR por meio do método gravimétrico, baseado na metodologia ASTM E 96/E 96 M-05. Este método baseia-se na perda de peso da água bidestilada, colocada no interior de uma cápsula de alumínio (100 %UR internamente) e isolada do ambiente de condicionamento pelo material cuja permeabilidade se deseja conhecer, no caso, a membrana de quitosana-alginato. A perda de peso foi quantificada em balança analítica Mettler modelo AT400, com resolução de 10^{-4} g. O condicionamento foi feito em câmara Vötsch modelo VC 0033. Como anteriormente, as membranas utilizadas foram previamente embebidas em água bidestilada por 5 min e secas em papel de filtro antes de serem fixadas na cápsula, com a finalidade de tornar as amostras mais maleáveis. Devido à prévia umidificação e pelas amostras mostrarem-se higroscópicas, em paralelo, montou-se uma cápsula sem água bidestilada com a finalidade de descontar a variação de peso devido à absorção/dessorção de água pela membrana.

3.2.7.10. Avaliação do grau de desestabilização das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções aquosas

Com o intuito de solubilizar as membranas para a recuperação e posterior quantificação do fármaco incorporado às mesmas, as amostras foram expostas às soluções aquosas de ácido acético a 1 mol.L^{-1} , hidróxido de sódio a 1 mol.L^{-1} , tampão citrato de sódio a 55 mmol.L^{-1} (pH 3,2) e ácido clorídrico a 1 mol.L^{-1} . Para tanto, amostras retangulares de $6 \times 1 \text{ cm}^2$ foram cortadas e pesadas em balança analítica, tendo sido posteriormente deixadas em contato com as soluções acima mencionadas, por 24 h em incubadora rotatória Tecnal modelo TE053 a 37°C, operando a 70 bpm (batidas por minuto). Após este período, as amostras foram avaliadas visualmente quanto ao seu aspecto, secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 37°C. Em seguida, estas foram analisadas com relação à perda de massa, através de uma nova pesagem em balança analítica.

3.2.7.11. Determinação da eficiência de incorporação da bacitracina

Membranas estéreis foram cortadas em corpos de prova circulares de 2 cm de diâmetro, os quais foram imersos em soluções aquosas com diferentes concentrações iniciais de fármaco (1,5 e 3,5 mg/mL) a 37°C por 24 h (equilíbrio de intumescimento). Em seguida, as amostras foram removidas dos frascos e, as concentrações do fármaco nas soluções (soluções de equilíbrio), foram avaliadas em espectrofotômetro UV-visível a 253 nm. Através da diferença entre a quantidade de fármaco inicial e a quantidade de fármaco na solução de equilíbrio (após a retirada da membrana), determinou-se a quantidade de fármaco incorporado na membrana.

3.2.7.12. Avaliação da liberação da bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato

Após a incorporação do fármaco, os corpos de prova foram expostos a 10 mL de água deionizada ou a 10 mL de tampão PBS (pH 7,4), dependendo do grupo de ensaios, por até 96 h a 37°C para a recuperação da bacitracina. Após determinados períodos as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o fármaco liberado no sobrenadante, determinado em espectrofotômetro a 253 nm.

3.2.7.13. Avaliação da capacidade de permeação de bacitracina através das membranas de quitosana-alginato

Visando avaliar a habilidade em transportar ativos ao longo de sua espessura, as membranas foram submetidas a um estudo de permeação utilizando-se bacitracina em solução.

Para tanto, as membranas de quitosana-alginato foram cortadas em amostras circulares de 2 cm de diâmetro (previamente hidratadas em água deionizada por 24 h a 37°C) e acopladas a tampas plásticas com vão circular na parte superior (de aproximadamente 1,2 cm de diâmetro). As tampas contendo as membranas foram conectadas aos frascos de vidro (célula receptora), os quais foram preenchidos com 9 mL de água deionizada (Figura 3.5). Em seguida 0,5 mL de solução aquosa de bacitracina (3,6 mg/mL) foi adicionado sobre as membranas de quitosana-alginato, sendo os dispositivos de permeação, em seguida, dispostos sobre uma mesa agitadora Quimis modelo Q225M,

operando a 130 rpm por 24 h. Em adição, visando simular duas possíveis situações de uso das membranas: uso oclusivo (com uma cobertura secundária sobre a membrana em contato com a lesão cutânea) e uso não oclusivo (membrana sobre a lesão cutânea exposta ao ambiente, sem curativo suplementar), uma tampa plástica adicional foi acoplada sobre as tampas vazadas já acondicionadas nos dispositivos de permeação. Após este período, alíquotas da célula receptora foram retiradas e analisadas visando quantificar a bacitracina permeada através da membrana.

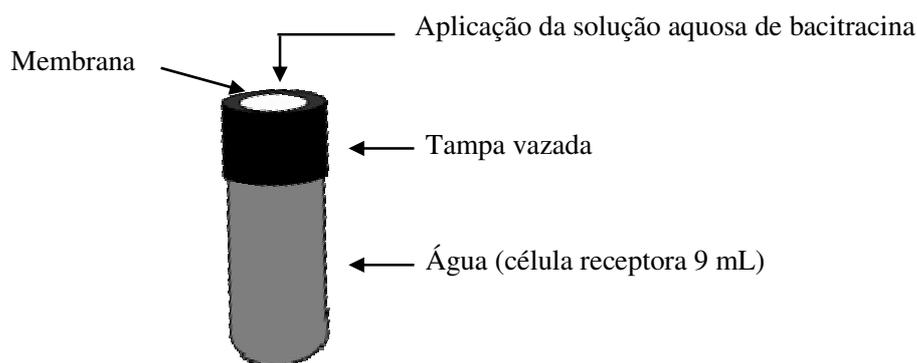


Figura 3.5 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de permeação de bacitracina através das membranas de quitosana-alginato.

As análises quantitativas do fármaco permeado foram realizadas em HPLC Waters modelo 1525, com coluna C18 Symetry 150 x 4,6 mm DI, com fase móvel composta de acetonitrila e ácido fosfórico a 0,01 M, com vazão de 2,0 mL/min a 25°C (*Fluka Production GmbH Industriestrasse 25, 2004*). Paralelamente, alíquotas dos permeados foram analisadas através da determinação espectrofotométrica de complexos de cobre formados com o fármaco. Para tanto, a cada 2 mL de amostra permeada, foram adicionados 0,2 mL de solução de sulfato de cobre a 5% e 0,2 mL de solução de NaOH a 2 mol.L⁻¹. Os frascos foram agitados e deixados em repouso por 5 min. O precipitado de hidróxido cúprico formado foi separado por centrifugação a 4.000 rpm durante 5 min (*Vaucher e Schapoval, 2003*). Finalmente, as absorvâncias foram determinadas a 550 nm em espectrofotômetro Beckmam modelo DU640.

3.2.7.14. Permeação a bactérias

Amostras estéreis de membranas de quitosana-alginato cortadas em corpos de prova de 2,5 x 2,5 cm² foram empregadas neste ensaio. Dentro de uma câmara de fluxo laminar, as amostras foram hidratadas por 30 s em água estéril e colocadas no centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo de 20 a 25 mL de meio de cultura TSA solidificado (40 g/L de meio Tryptic Soy AgarTM - Difco, dissolvido em água destilada e esterilizado por 15 minutos em autoclave). Em seguida, foram adicionados 100 µL de suspensão aquosa de *Pseudomonas aeruginosa* contendo 5,0x10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro ou de *Staphylococcus aureus* apresentando 4,3x10⁸ UFC/mL na superfície das membranas apenas. As placas foram incubadas a 35±2°C em estufa de cultura (FANEM 002-CB) por 48 h. A superfície dos corpos de prova em contato com o meio de cultura (lado oposto ao inoculado inicialmente) foi avaliada com relação ao crescimento bacteriano. Os ensaios de permeação aqui descritos foram realizados na empresa IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda (Jarinú, SP).

3.2.7.15. Verificação da formação de halo de inibição das membranas de quitosana-alginato na ausência de fármaco e após a incorporação da bacitracina

Amostras estéreis de membranas de quitosana-alginato cortadas em corpos de prova de 1,5 x 1,5 cm² foram empregadas neste ensaio. Dentro de uma câmara de fluxo laminar, as amostras foram hidratadas por 1 minuto em água estéril e colocadas na superfície de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo de 20 a 25 mL de meio de cultura TSA previamente inoculadas com 0,1% (v/v) de *Pseudomonas aeruginosa* contendo 5,0x10⁸ ufc/mL ou com 0,1% (v/v) de *Staphylococcus aureus* apresentando 4,3x10⁸ ufc/mL. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ± 2°C em estufa de cultura por 48 h, quando se verificou se havia a formação de um halo mais claro na área que circundava a membrana, indicando inibição do crescimento celular. O mesmo procedimento foi realizado para amostras estéreis de membranas contendo bacitracina, porém para estes ensaios, os corpos de prova utilizados foram de 7 mm de diâmetro. Os ensaios aqui descritos foram realizados na empresa IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda (Jarinú, SP).

3.2.7.16. Citotoxicidade *in vitro* a células Vero

Este ensaio foi realizado com a colaboração da prof^a Dr^a Selma Candelária de Genari, docente do Departamento de Biologia do Centro Regional Universitário Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL). Os ensaios *in vitro* foram realizados de acordo com as recomendações de avaliação biológica de dispositivos médicos, padronizados pela ISO 10993-5(E). As células *Vero* (Instituto Adolfo Lutz, S.P., Brasil) uma linhagem de fibroblastos, utilizadas neste ensaio, são recomendadas pela norma ASTM F-813-83 para verificação da citotoxicidade de biomateriais. Para o crescimento celular sobre as membranas de quitosana-alginato, utilizou-se um inóculo na concentração de 10^4 células/mL mantidas em meio Ham-F10 (Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell em estufa a 37°C, por 24, 48 e 72h. Como controle negativo de citotoxicidade, as células foram cultivadas sobre a superfície das placas. As imagens foram analisadas pelo *software Image Tool* (versão 3.0 *National Institute of Health*, USA).

3.2.7.17. Crescimento *in vitro* de queratinócitos na superfície das membranas de quitosana-alginato

Este ensaio foi realizado, com o intuito de avaliar o perfil de crescimento de queratinócitos na presença das membranas de quitosana-alginato. O experimento foi efetuado com o auxílio de Jussara Rehder, do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob a supervisão da Prof^a Dra. Maria Beatriz Puzzi, dermatologista docente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Um fragmento de pele foi obtido de uma paciente submetida à cirurgia plástica. Este procedimento foi aprovado e está em conformidade com as normas do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP e com a Declaração de Helsinki de 1975. O fragmento de pele, de aproximadamente 2,0 por 1,0 cm², após coletado, foi acondicionado em frasco estéril e conservado em soro fisiológico (NaCl a 0,9%) a 4°C, não ultrapassando 12 h até o momento de sua utilização. O fragmento foi separado do tecido adiposo e colocado em frasco com solução salina balanceada de Hank (HBSS) da Gibco Brasil, adicionada de agentes antibióticos e antimicóticos (penicilina G sódica, estreptomicina e anfotericina B, da Gibco BRL). A pele foi cortada em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm². Em seguida, o fragmento de pele foi colocado em placa de Petri com tripsina 0,25% contendo EDTA

(Gibco BRL) e foi mantido em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO₂, por 4 h, separando-se, então, a derme da epiderme.

A tripsina foi neutralizada com soro fetal bovino (Gibco BRL). O sobrenadante (contendo as células dérmicas e epidérmicas) foi recuperado, passado em filtro de Nylon (Falcon) de 40µm e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. O precipitado contendo as células foi lavado com HBSS suplementada com antibiótico e antimicótico, e novamente centrifugado. Em seguida, a massa celular foi ressuspensa em meio de cultura e uma alíquota foi coletada para contagem manual das células em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com azul de trypan.

Após a contagem, as células foram distribuídas na superfície de uma membrana de quitosana-alginato (preparada de acordo com as condições dos ensaios 3B e 4B descritos na Tabela 3.4) em frascos de cultura com 1,0 x 10⁵ células por cm² e, então, incubadas a 37°C, com tensão de 5% de CO₂ em meio de cultura específico para queratinócitos (Gibco), suplementado com 2 mM/mL de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino. Em adição, foram realizados ensaios controle de crescimento celular na ausência das membranas.

3.2.7.18. Avaliação do desempenho das membranas *in vivo* em ferida cutânea contaminada de felino

A apresentação do caso, assim como todo o procedimento realizado, foi efetuada e gentilmente disponibilizada pela equipe da prof^a. Dr^a Neusa Margarida de Paulo, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG).

Uma gata siamesa, de 1 ano de idade, pesando 1,5 kg foi levada ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás, por apresentar uma extensa ferida na região tóraco-abdominal lateral direita. Durante o exame clínico foi constatado que a gata se apresentava abaixo do peso normal para sua idade e raça, com pêlos eriçados e sem brilho. A temperatura retal era 38,5°C e conforme relato da proprietária, o apetite estava normal. A ferida apresentava intensa secreção purulenta com perda de tecido subcutâneo. As mucosas aparentes estavam hipocoradas e os demais parâmetros fisiológicos estavam dentro da normalidade. O animal foi anestesiado com 10 mg/kg de Tiletamina/Zolazepan (Zoletil[®]) e uma tricotomia da região da ferida foi realizada. A ferida foi tratada com filmes à base de

quitosana e quitosana-alginato. Os filmes esterilizados foram hidratados em solução de Ringer lactato (Equiplax[®]) a temperatura ambiente, sendo em seguida posicionados sobre a ferida e colados na pele íntegra com adesivo de cianoacrilato (Super Bonder[®]). Sobre os filmes aplicados usou-se uma atadura de crepe. Foi administrada uma dose de 20 mg/kg de Amoxicilina SC (Agemox LA[®]), a cada 48 horas, totalizando cinco aplicações e, nenhum medicamento tópico foi usado durante o tratamento. Os filmes foram trocados em intervalos de 48, 72 h, 4, 7, 14, 21 e 24 dias. Destaca-se que os filmes foram utilizados durante o tratamento da lesão na seguinte seqüência: filmes de quitosana até 48 h, filmes de quitosana e alginato entre o segundo dia e o 14º dias e filmes de quitosana do 14º dia em diante. A alternância de utilização de diferentes filmes (somente de quitosana e/ou quitosana-alginato) visou atender aos requerimentos terapêuticos da própria lesão em distintos períodos do tratamento, como por exemplo, a presença mais ou menos intensa de exsudato em diversos momentos.

3.2.7.19. Prevenção de aderência peritoneal em ratas com membranas somente de quitosana

Este estudo foi também realizado em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Neusa Margarida de Paulo, docente de cirurgia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG).

Os ensaios foram conduzidos em 15 ratas Wistar pesando entre 250 e 300 g, sendo que os animais foram divididos em três grupos de cinco animais cada. Os animais do grupo Q foram tratados somente com filmes de quitosana (2 x 2 cm²), os animais do grupo QP foram tratados com filmes de quitosana associados a tela de polipropileno (2 x 2 cm² e 1,8 x 1,8 cm²) e os animais do grupo P foram tratados somente com a tela de polipropileno (2 x 2 cm²). Os filmes estéreis foram cortados assepticamente e hidratados em solução de Ringer lactato (Equiplax[®]) a temperatura ambiente, imediatamente antes de sua implantação (Figura IA - ANEXO I). O protocolo anestésico consistiu de indução anestésica com Tiletamina/Zolazepan IM (10 mg/kg) (Zoletil[®], Virbac) e manutenção com Halotano (Cristália, SP) em circuito aberto com máscara em aparelho artesanal.

Após a laparotomia mediana, fez-se a omentectomia e o ceco foi identificado e submetido à abrasão com escova interdental (Oral B[®]) (Figura IB - ANEXO I). A parede abdominal direita foi evertida e com lâmina de bisturi (Med Blade, EUA) promoveram-se

quatro incisões paralelas entre si e transversais à linha média (Figura IC - ANEXO I). Os filmes de quitosana foram fixados à parede abdominal por meio de quatro pontos separados simples com fio de ácido poliglicólico 4-0 (Figura ID - ANEXO I). Já as telas de polipropileno foram suturadas à parede com fio de nylon (Bioline, Go.) 3-0 em ponto contínuo simples.

No grupo QP, inicialmente se fixou a tela de polipropileno e sobre ela foi posicionado o filme de quitosana. No 8º dia pós-operatório os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, para avaliar a possível ocorrência de adesão peritoneal nos animais pertencentes aos grupos Q, QP e P. As alterações microscópicas foram avaliadas quanto à presença de fibrina, à mesotelização, ao tipo de infiltrado inflamatório (polimorfonuclear, mononuclear), à presença de células gigantes, à angiogênese, à proliferação de fibroblastos, à hemorragia, ao edema e à necrose.

Por fim, a Figura 3.6 mostra de forma resumida o fluxograma dos ensaios de caracterização das membranas de quitosana-alginato.

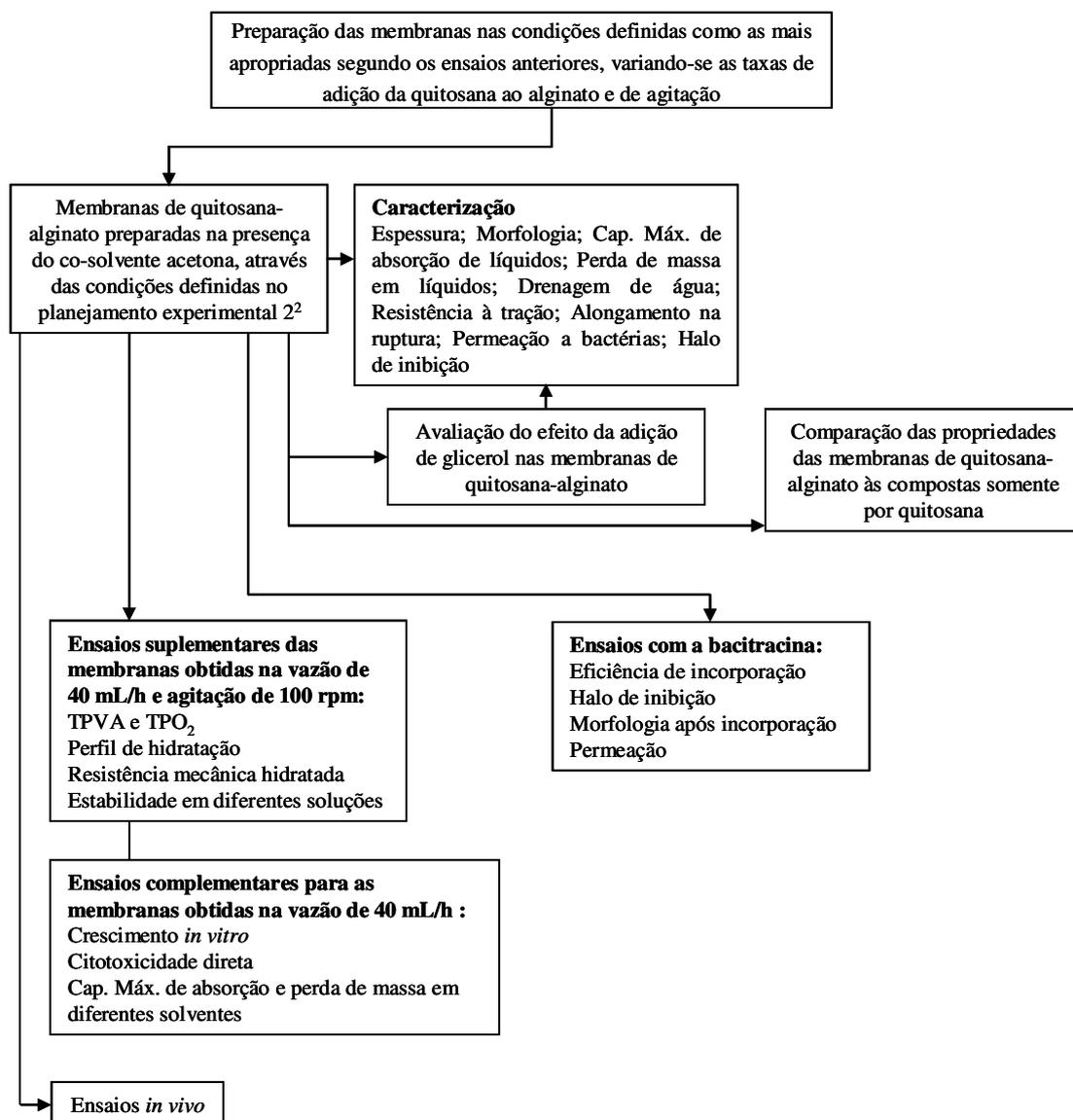


Figura 3.6 - Fluxograma dos ensaios de caracterização das membranas de quitosana-alginato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, enfocando a preparação passível de escalonamento e reproduzível de membranas de quitosana-alginato, sua caracterização e comparação de desempenho com relação às membranas somente de quitosana.

4.1. Estabelecimento do protocolo básico experimental para a preparação de membranas de quitosana-alginato

Com o objetivo de estabelecer um protocolo experimental detalhado para a obtenção das membranas de quitosana e alginato, diversas condições experimentais foram testadas no decorrer dos ensaios preliminares. Conforme já mencionado, apesar da literatura consultada ressaltar a importância de se controlar a taxa de agitação e a taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato durante a formação dos complexos iônicos (Yan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), um procedimento detalhado e reproduzível para a preparação das membranas de quitosana-alginato não foi localizado.

Inicialmente, promoveu-se a mistura das soluções de quitosana e alginato, preparadas nas mesmas condições experimentais, manualmente (ensaio 1A) ou pelo uso de uma bomba de infusão (ensaio 2A), na vazão de 20 mL/h. Os complexos iônicos formados nestes ensaios, apesar da pequena diferença no procedimento, apresentaram grande diferença entre si. No ensaio 1A os coacervados não se formaram de maneira adequada, apresentando-se na forma de aglomerados poliméricos, devido provavelmente à falta de controle da vazão durante a adição da solução de quitosana na solução de alginato, sendo que tal fato impossibilitou a obtenção de uma membrana ao final do processo. Por outro lado, os coacervados formados através da utilização da bomba de deslocamento positivo possibilitaram a obtenção de membranas finas, entretanto, frágeis, ao final do ensaio, conforme indicado para uma amostra típica na Figura 4.1 a. Destaca-se que a adição da solução de cloreto de cálcio visou garantir a reticulação de possíveis cadeias de alginato não complexadas com as cadeias da quitosana, procedimento este adotado em todos os ensaios.

Segundo Yan *et al.* (2000), para se obter coacervados adequados para preparação de filmes homogêneos, a taxa de reação entre os dois polímeros deve ser suficientemente lenta para prevenir a formação de membranas interfásicas, permitindo assim, que a reação entre os polímeros seja completa. Assim, visando o controle eficiente da vazão de adição entre as soluções poliméricas durante a produção dos coacervados, a utilização da bomba de infusão foi adotada em todos os ensaios subsequentes.

Com o intuito de melhorar as características gerais da membrana obtida no ensaio 2A, principalmente no que se referia à resistência mecânica, as concentrações das soluções de partida de quitosana e alginato foram dobradas no ensaio 3A, passando a 1,0% (m/v) e 0,5% (m/v), respectivamente. O aumento da concentração polimérica promoveu a formação de membranas mais resistentes que as anteriormente obtidas, porém ainda finas e frágeis devido, provavelmente, à baixa homogeneidade do sistema durante a formação dos coacervados e da distribuição irregular dos mesmos (Figura 4.1 b). As concentrações poliméricas empregadas neste ensaio foram, então, utilizadas nos ensaios seguintes.

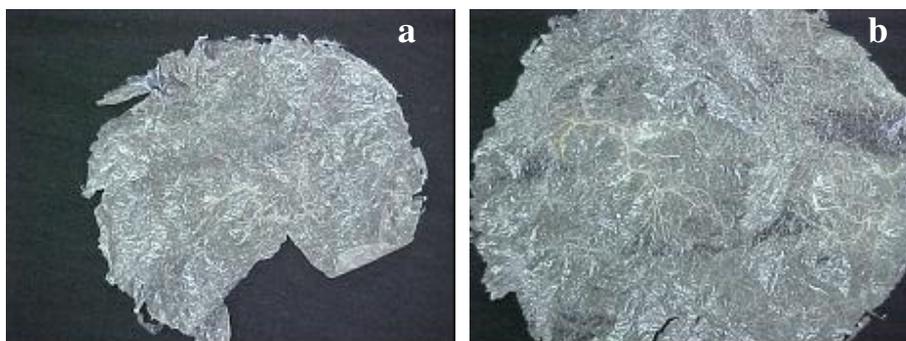


Figura 4.1 - Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 2A (a) e 3A (b): a) membrana preparada com quitosana a 0,5% (m/v) e alginato a 0,25% (m/v); b) membrana preparada com quitosana a 1,0% (m/v) e alginato a 0,5% (m/v).

Outro parâmetro que foi controlado, objetivando ainda a produção de coacervados mais homogêneos, foi a taxa de agitação durante a mistura dos polímeros, visto que até o momento se havia utilizado um agitador magnético. Para tanto, visando um controle mais efetivo e reprodutível da taxa de agitação, o uso de um agitador mecânico provido de um impelidor de três pás curvas inclinadas foi adotado em todos os ensaios subsequentes (Figura 4.2 a). Em adição, um tanque de vidro encamisado acoplado a um banho

termostático a 25°C foi também incorporado ao sistema (Figura 4.2 b) para controlar a temperatura durante a obtenção dos coacervados.

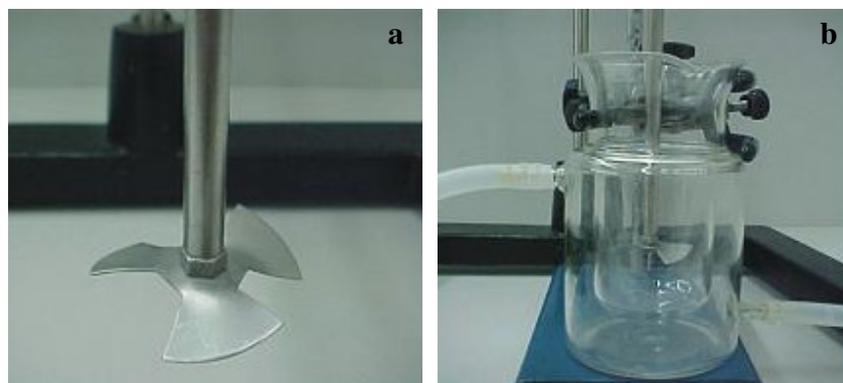


Figura 4.2 - Sistema empregado na preparação das membranas de quitosana e alginato: a) impelidor de pás inclinadas acoplada ao agitador mecânico; b) tanque de vidro encamisado.

Dando continuidade aos ensaios preliminares, foram realizados novos ensaios, diferindo apenas nos procedimentos utilizados para a recuperação e lavagem dos coacervados formados. Segundo Yan *et al.* (2000), os procedimentos de lavagem devem ser realizados para remover as moléculas dos polímeros que não reagiram e os complexos polieletrólitos instáveis formados durante o processamento das membranas. Os procedimentos empregados para tal finalidade foram: filtração a vácuo em funil de Buckner (Ensaio 4A), centrifugação a 5000 rpm (Ensaio 5A) e filtração em papel de filtro sem a utilização de vácuo (Ensaio 6A). Os três procedimentos avaliados promoveram acentuada agregação dos coacervados, impossibilitando sua ressuspensão em água destilada e, conseqüentemente, a obtenção de membranas ao final destes ensaios, conforme mostrado na Figura 4.3.

Diante dos resultados obtidos, os coacervados formados nos ensaios seguintes não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento de lavagem, evitando assim a sua agregação.

Conforme já discutido, a mistura das soluções de quitosana e alginato leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas de quitosana-alginato (coacervados) dissolvidas em uma mistura de água, acetona e ácido acético, juntamente com moléculas de quitosana e de alginato que não reagiram (Wang *et al.*, 2001). Como após a evaporação dos solventes ainda se detecta, pelo odor, resíduos de acetona e ácido acético, que poderiam ser

prejudiciais visando à aplicação final *in vivo* do material, deve-se remover ou neutralizar tais compostos, o que poderia ser efetuado, por exemplo, por lavagem com excesso de água e neutralização com solução básica. De acordo com Yan *et al.* (2000), os meios alcalinos podem causar a dissociação dos complexos iônicos de quitosana-alginato em alginato de sódio solúvel e quitosana precipitada. Desta forma, a neutralização do ácido acético residual presente nas membranas após a secagem não deve ser realizada através de sua imersão direta em solução aquosa de NaOH, pois tal procedimento poderia promover a dissolução de moléculas de alginato ainda fracamente ligadas ao complexo iônico, optando-se, assim, pela sua remoção por lavagem com água.

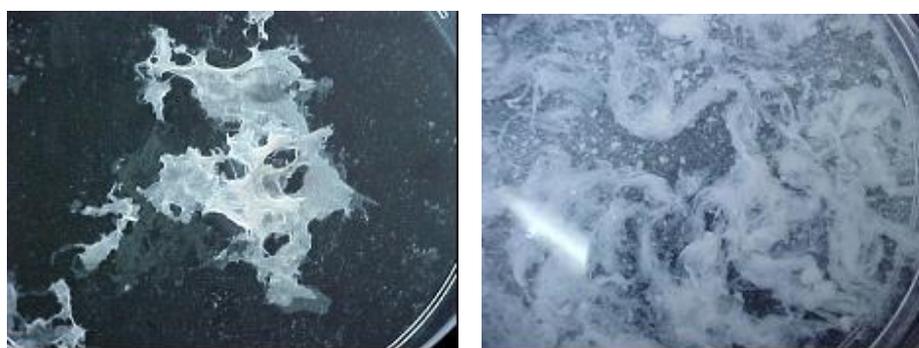


Figura 4.3 - Aspecto típico dos coacervados agregados após os procedimentos de lavagem propostos nos ensaios 4A, 5A e 6A.

Ainda durante a etapa de coacervação, com o intuito de favorecer ainda mais a formação dos complexos entre a quitosana e o alginato, o pH do sistema foi ajustado para 5,28 (pH este no qual a quitosana apresenta-se potencialmente protonada e o alginato, desprotonado) através da adição de uma solução aquosa de NaOH com base no procedimento de Cárdenas *et al.* (2003), anteriormente à adição da solução reticulante de CaCl_2 a 2%.

Após as medidas adotadas, a membrana obtida no ensaio 7A mostrou-se fina e razoavelmente flexível, porém aparentemente mais resistente que as obtidas anteriormente (Figura 4.4 a). O procedimento de lavagem realizado com 200 mL de água deionizada promoveu o inchamento dos polímeros presentes na membrana e a revelação de falhas ao longo de sua extensão (Figura 4.4 b). Provavelmente, tais falhas foram decorrentes da solubilização de moléculas de alginato livres na matriz da membrana, as quais não se

encontravam suficientemente reticuladas ou ainda resultaram do enclausuramento de bolhas no meio viscoso antes que o processo de secagem fosse efetuado.

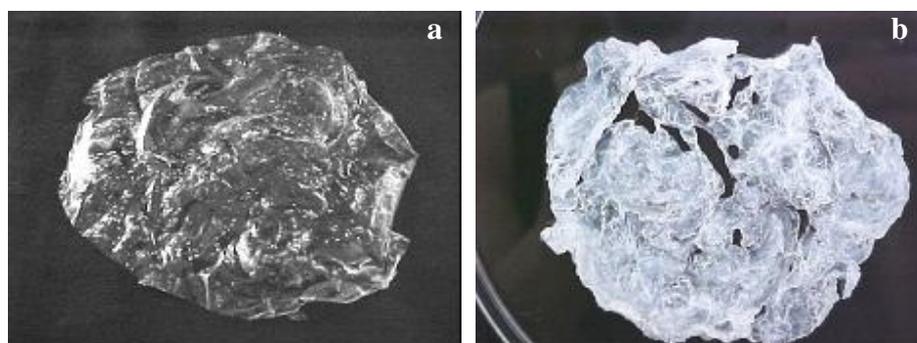


Figura 4.4 - Aspecto das membranas obtidas no ensaio 7^a: a) após secagem em estufa a 35°C por 24h; b) após imersão em 200 mL de água deionizada por 2h.

Assim, visando melhorar ainda mais as características finais das membranas anteriormente obtidas, uma nova etapa foi acoplada ao processo. Tal etapa consistiu na imersão das membranas secas em 150 mL de solução aquosa de CaCl_2 2% por 1 h, antes destas serem imersas em 200 mL de água deionizada por 1 h duas vezes, visando acentuar a reticulação das regiões das cadeias de alginato ainda não completamente complexadas com as cadeias de quitosana. A Figura 4.5 apresenta as características das membranas obtidas sob tais condições (ensaio 8A).



Figura 4.5 - Aspecto das membranas obtidas no ensaio 8A: a) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em 150 mL de solução aquosa de CaCl_2 2% por 1 h; b) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em 200 mL de água deionizada por 2 h; c) aspecto da membrana seca, após as imersões.

As membranas submetidas à imersão em solução de CaCl_2 a 2% (ensaio 8A), tornaram-se mecanicamente mais resistentes quando comparadas às anteriormente obtidas. Porém, estas apresentaram uma grande quantidade de bolhas de ar ao longo de sua extensão, o que tende a diminuir a resistência mecânica das mesmas. Assim, visando evitar a retenção de bolhas, nos ensaios 9A e 10A, duas condições distintas de desaeração a vácuo foram testadas.

Os resultados obtidos pela desaeração a vácuo mostraram-se muito promissores. A desaeração realizada diretamente na placa de Petri ocasionou elevada perda de material por transbordamento, enquanto a desaeração realizada em kitassato promoveu uma efetiva remoção das bolhas de ar presentes no sistema, o que pode ser visualizado na Figura 4.6, pelo aspecto da membrana obtida ao final do ensaio 10A.

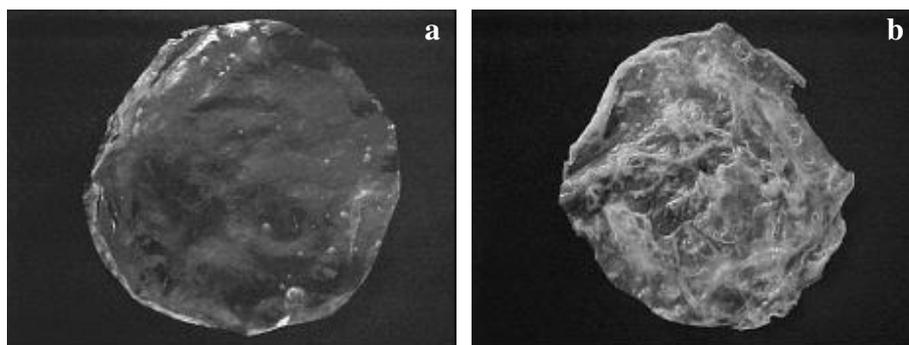


Figura 4.6 - Aspecto da membrana obtida no ensaio 10A: a) membrana após secagem em estufa a 35°C por 24 h; b) aspecto da membrana ainda úmida, após imersão em solução de CaCl_2 2% seguida de imersão em água deionizada.

Diante de todas as condições estudadas e dos resultados obtidos ao longo dos ensaios preliminares, o protocolo experimental utilizado para a realização do ensaio 10A foi considerado o mais adequado para a obtenção das membranas de quitosana e alginato. Porém, analisando-se o aspecto da membrana apresentada na Figura 4.6 (b), pode-se perceber que a distribuição polimérica ao longo da membrana não foi homogênea, fato este evidenciado após os tratamentos de imersão em CaCl_2 2% e em água deionizada. Diante de tal constatação, uma vez que a distribuição homogênea dos coacervados ao longo da membrana é um fator que afeta fortemente o desempenho esperado da mesma, o ensaio 11A foi realizado nas mesmas condições experimentais do ensaio 10A, mas intensificando

a agitação empregada após a obtenção dos coacervados de quitosana-alginato, que passou de 100 para 1000 rpm.

As membranas obtidas no ensaio 11A apresentaram as melhores características em relação às demais anteriormente obtidas. O aumento na taxa de agitação após a formação dos coacervados promoveu uma melhor dispersão dos mesmos, resultando em distribuição polimérica mais adequada ao longo de toda a extensão da membrana, fato este que pôde ser evidenciado após os tratamentos de imersão. A Figura 4.7 apresenta o aspecto das membranas obtidas neste ensaio.

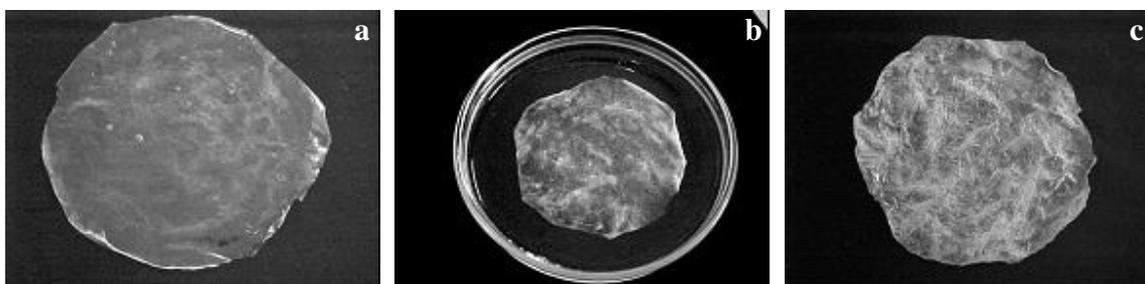


Figura 4.7 - Aspecto da membrana obtida no ensaio 11A: a) membrana após secagem em estufa a 35°C por 24 h; b) membrana imersa em 150 mL de solução de CaCl₂ 2%; c) membrana ainda úmida, após os tratamentos de imersão.

Assim, os ensaios posteriores para preparação das membranas foram realizados fundamentalmente seguindo o procedimento descrito para o ensaio 11A, buscando-se, entretanto determinar de forma mais sistemática os efeitos da vazão de adição da solução de quitosana à de alginato e da taxa de agitação do sistema durante a mistura dos polissacarídeos nas características finais das amostras.

4.2. Estudo do efeito da taxas de adição da solução de quitosana à de alginato e da taxa de agitação nas características das membranas

A influência das condições de processamento nas variáveis-resposta espessura no estado seco, capacidade máxima de absorção de água, perda de massa em água, capacidade de drenagem, resistência mecânica e a eficácia contra a permeação de bactérias, características estas de grande importância na preparação de curativos, foram avaliadas

empregando-se taxas de agitação de 100 a 500 rpm, taxas de adição de solução de quitosana à de alginato de 20 a 40 mL/h e proporções iguais (1:1) entre os polímeros quitosana e alginato, conforme indicado na Tabela 3.4 do capítulo de Materiais e Métodos.

Destaca-se que os efeitos estatísticos calculados da taxa de agitação e da vazão de adição sobre as variáveis estudadas serão apresentados e discutidos de maneira global e detalhada no item 4.2.9.

4.2.1. Espessura das membranas no estado seco

Os valores referentes à espessura das membranas secas encontram-se listados na Tabela 4.1, sendo que os efeitos estatísticos calculados para esta variável resposta encontram-se na Tabela IIA no Anexo II. As espessuras médias variaram de 66 a 80 μm , sendo considerada uma variação estreita para o sistema em questão. Uma vez que, em cada ensaio, toda a mistura obtida foi transferida para uma única placa de Petri para a secagem e, como a mesma massa de todas as matérias-primas foi empregada em todos os ensaios, as variações observadas na espessura das membranas devem ser decorrentes do tamanho e da forma dos coacervados formados e de seu empacotamento e distribuição durante a secagem.

Tabela 4.1 - Valores das espessuras das membranas.

Ensaio	Taxa de agitação (rpm)	Vazão (mL/h)	Espessura média (μm)
1B	100	20	66 \pm 5
2B	500	20	72 \pm 24
3B	100	40	78 \pm 18
4B	500	40	73 \pm 19
5B	300	30	68 \pm 15
6B	300	30	76 \pm 22
7B	300	30	80 \pm 18

Os valores de espessura obtidos neste trabalho foram superiores aos descritos na literatura para membranas constituídas simultaneamente por quitosana e alginato, valores estes entre 18 e 48 μm (Yan *et al.*, 2000) e entre 24 e 26 μm (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). No entanto, a comparação direta dos resultados obtidos torna-se dificultada, uma

vez que há diferenças nas condições de preparo das membranas, principalmente no que se refere à massa polimérica inicial empregada para a preparação das mesmas.

Segundo Ma *et al.* (2001) os substitutos poliméricos da derme devem ser idealmente mais finos que a pele humana normal, cuja espessura varia entre 0,5 e 2 mm, dependendo da idade, sexo e região do corpo. Assim, filmes poliméricos destinados à recuperação de lesões cutâneas com espessuras secas entre 66 e 80 μm podem ser considerados adequados para tal utilização. Neste aspecto, todas as membranas obtidas neste trabalho apresentaram potencial para serem utilizadas como curativos poliméricos.

4.2.2. Capacidade máxima de absorção de água das membranas

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água estão listados na Tabela 4.2. Os efeitos estatísticos calculados da taxa de agitação e da vazão de adição sobre esta variável encontram-se indicados na Tabela IIB no Anexo II.

Tabela 4.2 - Valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água média dos corpos de prova com dimensões de 6 x 1 cm^2 , a 37°C por 24h.

Ensaio	C_w (g/g)
1B	15 ± 1
2B	12 ± 2
3B	19 ± 1
4B	11 ± 4
5B	13 ± 2
6B	15 ± 1
7B	16 ± 2

Todas as membranas preparadas apresentaram capacidades elevadas de absorção de água, variando de 11 a 19 g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ membrana seca. Segundo Hoffman (2002), quando um hidrogel seco começa a absorver água, as primeiras moléculas a entrarem na matriz irão hidratar os grupos hidrofílicos mais polares, conduzindo assim a uma ligação primária com a água. Com a hidratação dos grupos polares, a rede polimérica sofre um intumescimento que ocasiona a exposição de grupos hidrofóbicos, os quais irão forçar a reorganização das moléculas de água presentes nas proximidades, levando a um fenômeno de hidratação secundária.

Em seguida, a rede polimérica é embebida de moléculas adicionais de água em seus interstícios. A água adicional incorporada após os grupos iônicos e polares tornarem-se saturados e os grupos hidrofóbicos se ordenarem é chamada de água livre ou água de preenchimento (Hoffman, 2002). Dentro deste contexto, supõe-se que somente a água livre superficial presente na superfície deste sistema é retirada quando da discreta compressão entre papéis de filtro, enquanto as moléculas de água ligadas ou incorporadas ao sistema continuam retidas na rede polimérica da membrana, contribuindo assim para os altos valores obtidos referentes à capacidade de absorção de água.

4.2.3. Morfologia das membranas

A análise por MEV da morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi avaliada, apenas para as amostras que apresentaram a maior (3B) e a menor (4B) capacidade máxima de absorção de água, visando elucidar as possíveis razões para tal comportamento. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.8 e 4.9.

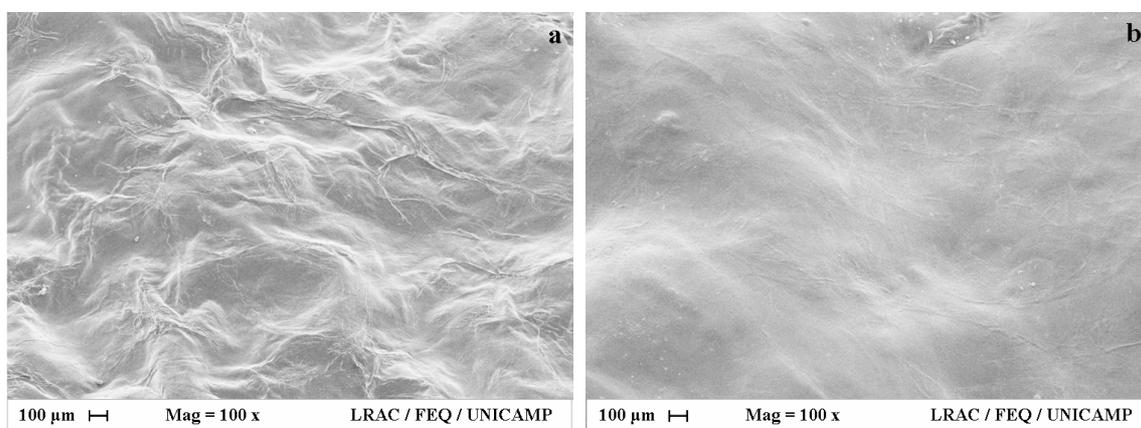


Figura 4.8 - Morfologia de superfície (em ângulo de 40°) das membranas preparadas a: (a) 40mL/h e 100 rpm (3B) e (b) 40mL/h e 500 rpm (4B).

Através das micrografias observou-se que as membranas apresentaram superfícies onduladas, com elevações distribuídas uniformemente ao longo de sua extensão, não sendo observada a presença de poros para aumentos de até 3000 x. Maior rugosidade foi observada para as membranas preparadas na condição de agitação menos intensa, provavelmente em função da menor compactação das fibras poliméricas.

Os cortes transversais mostraram diferenças significativas na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, sendo que a amostra menos compactada (referente ao ensaio 3B) apresentou maior espessura média, o que, conseqüentemente, facilitou sua hidratação, visto que, potencialmente, esta apresentava menor resistência à transferência de água através das múltiplas lamelas observadas. Os coacervados obtidos em baixas taxas de agitação, provavelmente, formam fibras mais longas e conseqüentemente, membranas menos compactadas.

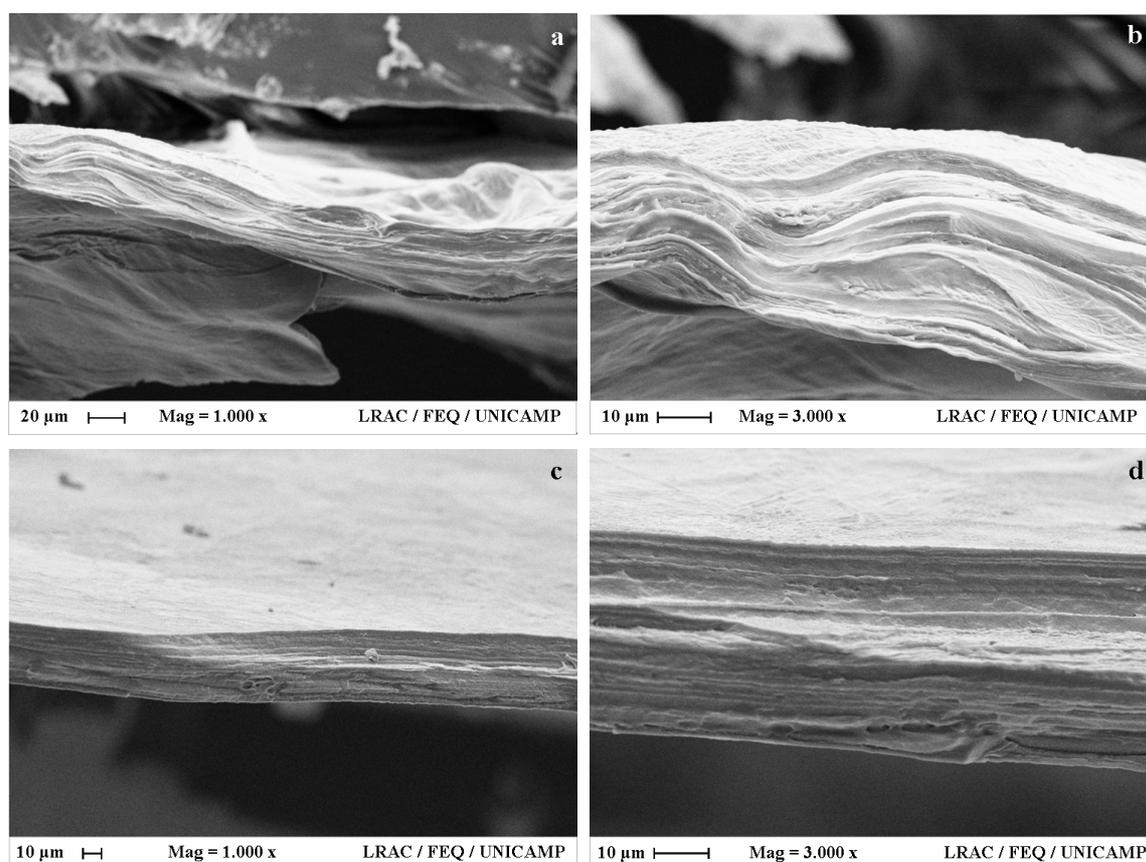


Figura 4.9 - Corte transversal das membranas preparadas a: 100 rpm, com aumento de 1000 vezes (a) e 3000 vezes (b); e a 500 rpm, com aumento de 1000 vezes (c) e 3000 vezes (d), ambas na vazão de 40 mL/h.

4.2.4. Perda de massa das membranas quando estocadas em água

Os valores obtidos para a variável-resposta perda de massa das membranas em água estão listados na Tabela 4.3. Os efeitos estatísticos da taxa de agitação e da vazão de adição

calculados sobre esta variável-resposta encontram-se indicados na Tabela IIC no Anexo II. Os valores obtidos para a variável perda de massa das membranas variaram de 9 a 21% após 43 dias de estocagem em água a 4°C.

Tabela 4.3 - Valores obtidos para a perda de massa em água das membranas.

Ensaio	Perda de massa em água (%)
1B	14 ± 2
2B	11 ± 3
3B	21 ± 4
4B	9 ± 3
5B	10 ± 2
6B	16 ± 3
7B	16 ± 2

Como citado anteriormente, segundo Wang *et al.* (2001) a mistura das soluções de quitosana e alginato leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas de quitosana-alginato, juntamente com moléculas de quitosana e de alginato que não reagiram. Uma vez que o complexo formado entre a quitosana e o alginato é insolúvel em água (Yan *et al.*, 2000; Peniche e Argüelles-Monal, 2001), a perda de massa obtida neste ensaio deve-se provavelmente à dissolução do alginato não ligado aos coacervados, ou ainda, à solubilização de cadeias de quitosana neste solvente. Ressalta-se que as membranas de maior e menor perda de massa correspondem aos pontos de maior e menor capacidade de absorção de água (Tabela 4.2), respectivamente. Assim, supõe-se que as cadeias de alginato não complexadas com as de quitosana ou com os íons Ca^{2+} solubilizaram-se durante o período de estocagem, sendo a perda mássica relacionada à facilidade com que a água é capaz de se deslocar através da membrana. Os valores obtidos corroboram com os descritos por Yan *et al.* (2000), que relatam perdas de massa entre 20 e 25% para membranas de quitosana e alginato preparadas pelo método de coacervação (PEC), durante o processo de imersão das mesmas em diferentes soluções.

4.2.5. Capacidade de drenagem de água das membranas

Com o intuito de avaliar a eficácia das membranas de quitosana-alginato no tratamento de lesões com alta quantidade de exsudato, as membranas foram colocadas em

contato direto com a água em uma das faces, a fim de simular as condições do leito da lesão, enquanto a outra face estava voltada para um ambiente com baixa umidade.

Os valores referentes à capacidade de drenagem das membranas podem ser visualizados na Tabela 4.4. Observou-se elevada capacidade de drenagem das membranas, variando de 12.219 a 14.343 g/m²-dia. A influência da taxa de agitação e vazão de adição sobre esta variável foi avaliada estatisticamente, e os efeitos calculados encontram-se listados na Tabela IID no Anexo II.

Tabela 4.4 - Valores obtidos para a capacidade de drenagem de água das membranas.

Ensaio	Taxa de agitação (rpm)	Vazão (mL/h)	Capacidade de Drenagem (g/m ² -dia)
1B	100	20	12.219 ± 891
2B	500	20	13.241 ± 943
3B	100	40	13.559 ± 1.119
4B	500	40	12.507 ± 359
5B	300	30	13.605 ± 240
6B	300	30	12.910 ± 359
7B	300	30	14.343 ± 1.038

Segundo Behar *et al.* (1985), a média diária de perda natural de líquido pelo corpo através da pele saudável é de 240 g/m²-dia, sendo que as superfícies danificadas têm fluxo muito superior a esta média, podendo atingir de 3.400 a 5.200 g/m²-dia dependendo do tipo da lesão. Neste mesmo trabalho, os autores consideraram valores de permeabilidade à água em torno de 5.000 g/m²-dia como adequados para curativos a serem utilizados em feridas com grande quantidade de exsudato. Neste contexto, todas as membranas de quitosana-alginato produzidas têm potencial para serem utilizadas em feridas com grandes quantidades de exsudato.

4.2.6. Propriedades mecânicas das membranas

Os valores referentes à resistência à tração e ao alongamento na ruptura das membranas podem ser visualizados na Tabela 4.5. A influência da taxa de agitação e da vazão de adição de quitosana em alginato sobre estas variáveis foi avaliada

estatisticamente, e os efeitos calculados encontram-se listados nas Tabelas IIE e IIF no Anexo II.

Foram obtidos neste experimento valores de resistência à tração entre 7 e 31 MPa e de alongamento na ruptura entre 4 e 8%, sendo que as membranas obtidas na vazão de 40 mL/h, referentes aos ensaios 3B e 4B, apresentaram os melhores resultados para tais variáveis. Estes resultados podem ser potencialmente atribuídos às diferentes formas de empacotamento e de tamanho dos coacervados poliméricos decorrentes das distintas condições de preparação empregadas, conforme ilustrado nas Figuras 4.8 e 4.9.

Tabela 4.5 - Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento das membranas na ruptura.

Ensaio	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1B	7 ± 1	4 ± 1
2B	19 ± 5	4 ± 1
3B	28 ± 3	8 ± 3
4B	31 ± 6	6 ± 1
5B	14 ± 3	4 ± 1
6B	21 ± 3	5 ± 1
7B	12 ± 9	4 ± 1

A comparação entre os valores de resistência à tração e de alongamento na ruptura obtidos neste trabalho e os valores existentes na literatura foi realizada apenas para verificação da magnitude dos resultados (Tabela 4.6), uma vez que a comparação direta é dificultada pelas diferenças nas condições de preparo das membranas e na realização dos ensaios. Observa-se que as membranas obtidas por complexação polimérica (PEC) relatadas na literatura apresentam valores inferiores aos obtidos neste trabalho, apesar da comparação direta dos resultados não ser possível devido às diferenças anteriormente explicitadas.

Segundo Wang *et al.* (2002), a resistência à tração da pele normal varia de 2,5 a 16 MPa. Diante de tal afirmação, todas as membranas de quitosana-alginato preparadas neste trabalho apresentaram potencial para serem utilizadas como curativos poliméricos. Por outro lado, nenhuma das membranas obtidas apresentou resultados adequados com relação à variável alongamento na ruptura quando secas, visto que a pele normal apresenta elasticidade de aproximadamente 70% segundo Hansen e Jemec (2002), o que implica que

seu uso deveria ser feito em regiões do corpo com baixo requerimento mecânico, como a coxa e o antebraço, mas não em joelhos e cotovelos, por exemplo.

Tabela 4.6 - Comparação entre os valores de resistência à tração e de alongamento na ruptura de membranas secas de quitosana e alginato obtidos neste trabalho e os valores relatados na literatura consultada.

Fonte	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
Este trabalho	7 a 31	4 a 8
Wang <i>et al.</i> , 2002	9 a 19	1 a 3
Wang <i>et al.</i> , 2001	9 a 18	1 a 3
Yan <i>et al.</i> , 2000	5 a 12	2 a 8

Destaca-se que os dados apresentados neste item foram obtidos para membranas secas, sendo que, quando úmidas, estas apresentaram desempenho diferente conforme será discutido no item 4.5.3.

4.2.7. Avaliação da eficácia das membranas contra a permeação de bactérias

Como descrito anteriormente, as queimaduras, quando não protegidas, são colonizadas por bactérias dentro de 12 a 24 h. Assim, a proteção destas lesões contra a permeação de bactérias pelo uso de curativos na forma de membranas mostra-se de grande relevância.

Neste contexto, os resultados obtidos neste experimento sugerem que as membranas de quitosana-alginato produzidas neste trabalho possuem potencial para serem utilizadas como curativos, uma vez que estas não permitiram a permeação das bactérias, conforme indicado nas Figuras 4.10 e 4.11, que ilustram o comportamento típico observado de proliferação celular restrita à região central da superfície das membranas na qual as bactérias foram inoculadas.

Após o período de incubação, não foi observado crescimento bacteriano no lado da membrana em contato direto com o meio de cultura, confirmando que não houve permeação celular através das mesmas. Segundo Mi *et al.* (2001), a não permeação de bactérias através das membranas de quitosana pode ser atribuída a dois fatores: ao tamanho

reduzido dos poros da membrana e/ou às propriedades bactericida e bacteriostática inerentes da quitosana.

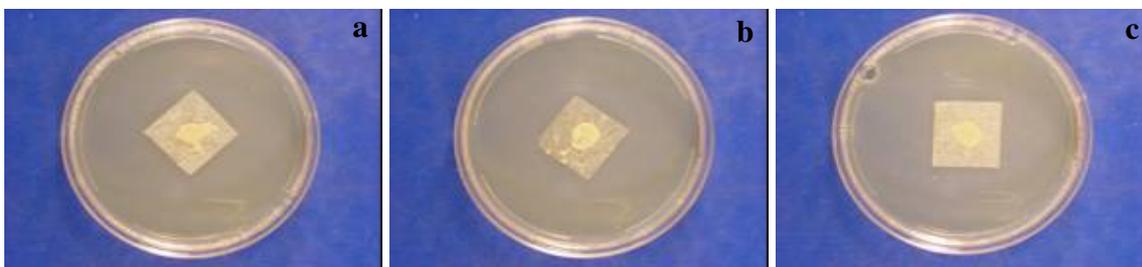


Figura 4.10 - Proteção típica contra a permeação de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura conferida pelas membranas preparadas nos ensaios 1B (a), 2B (b) e 3B (c).

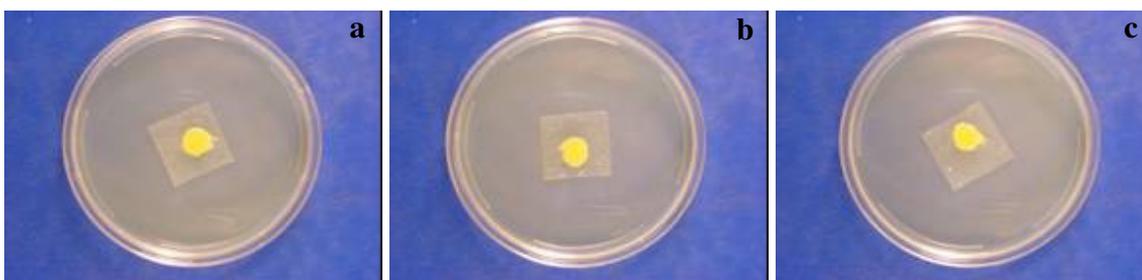


Figura 4.11 - Proteção típica contra a permeação de *Staphylococcus aureus* em meio de cultura conferida pelas membranas preparadas nos ensaios 4B (a), 6B (b) e 7B (c).

Neste contexto, ensaios de formação de halos de inibição foram realizados com o intuito de verificar se as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* não permearam através da membrana de quitosana-alginato devido à estrutura da mesma, ou em decorrência da atividade bactericida da quitosana, conforme relatado a seguir.

4.2.8. Avaliação da formação de halo de inibição ao redor das membranas expostas às bactérias

Neste ensaio, as células foram inoculadas na superfície do meio de cultura antes da colocação da membrana. As Figuras 4.12 e 4.13 ilustram os resultados típicos obtidos neste ensaio.

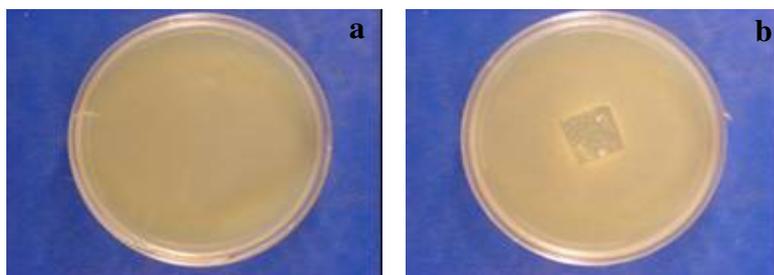


Figura 4.12 - Placas de Petri contendo meio de cultura previamente inoculado com *Pseudomonas aeruginosa*: (a) controle; (b) com a membrana, na superfície, preparada no ensaio 3B.

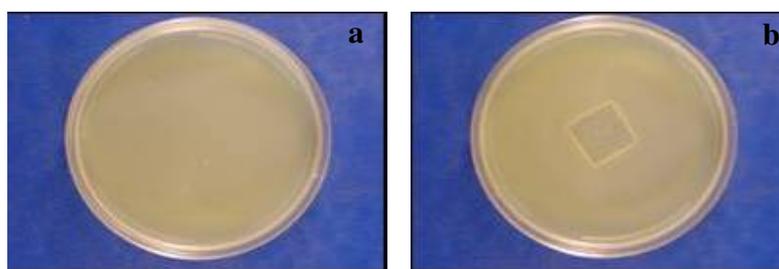


Figura 4.13 - Placa controle contendo meio de cultura previamente inoculado com *Staphylococcus aureus*: (a) controle; (b) com a membrana, na superfície, preparada no ensaio 4B.

Não foi observada a formação típica do halo de inibição no meio de cultura em nenhuma amostra, supondo-se então que as membranas de quitosana-alginato não estavam liberando substâncias bactericidas e/ou bacteriostáticas no meio de cultura. Porém, as membranas poderiam ter inibido o crescimento bacteriano sobre as suas superfícies. Para verificar tal afirmação, placas contendo meio de cultura foram estriadas com o *swab* das superfícies das amostras referentes às Figuras 4.12 e 4.13.

A Figura 4.14 ilustra os resultados obtidos, nos quais se constatou que as membranas de quitosana-alginato não apresentaram atividade bactericida e/ou bacteriostática para as bactérias testadas, visto que, de fato não impediram o crescimento destas nas suas superfícies, conforme já visualizado no ensaio anterior, no qual as membranas foram inoculadas com maiores concentrações celulares.

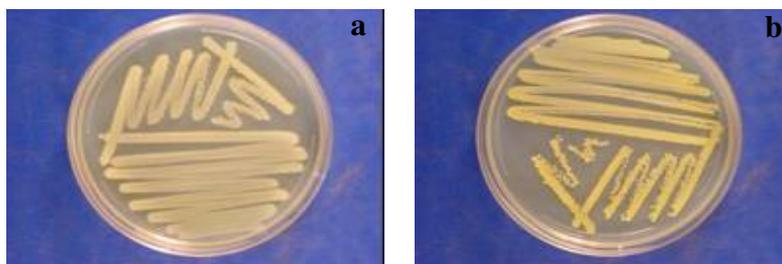


Figura 4.14 - Estrias feitas com amostras celulares coletadas da superfície das amostras, para verificação de crescimento bacteriano: (a) *Pseudomonas aeruginosa* em amostra do ensaio 3B e (b) *Staphylococcus aureus* em amostra do ensaio 4B.

Uma vez que a quitosana, de acordo com a literatura, possui efeito bactericida e bacteriostático comprovado, o resultado obtido neste ensaio não era o esperado. Entretanto, como as membranas testadas foram preparadas pela complexação dos polímeros quitosana e alginato, tal procedimento provavelmente ocasionou a blindagem dos grupamentos responsáveis pela atividade bactericida e/ou bacteriostática da quitosana. Por sua vez, segundo Yu *et al.* (2005), *in vivo*, a dissociação paulatina do complexo quitosana-alginato ocasionaria a liberação de macromoléculas livres de quitosana e de alginato, possibilitando a interação da quitosana carregada positivamente com os componentes negativamente carregados da parede celular bacteriana, como consequência, ocorreria à inibição do crescimento bacteriano pela destruição da parede celular, restaurando assim, a atividade bactericida e/ou bacteriostática normalmente atribuída a quitosana.

Assim, foi possível comprovar que as bactérias utilizadas neste trabalho não permearam através das membranas, devido, provavelmente, à morfologia das mesmas.

4.2.9. Análise comparativa global dos efeitos operacionais nas diversas variáveis-reposta avaliadas

A comparação global dos efeitos estatísticos das condições de processamento nas variáveis-resposta: espessura, capacidade máxima de absorção de água, capacidade de drenagem, perda de massa em água, resistência à tração e alongamento na ruptura encontra-se indicada na Figura 4.15.

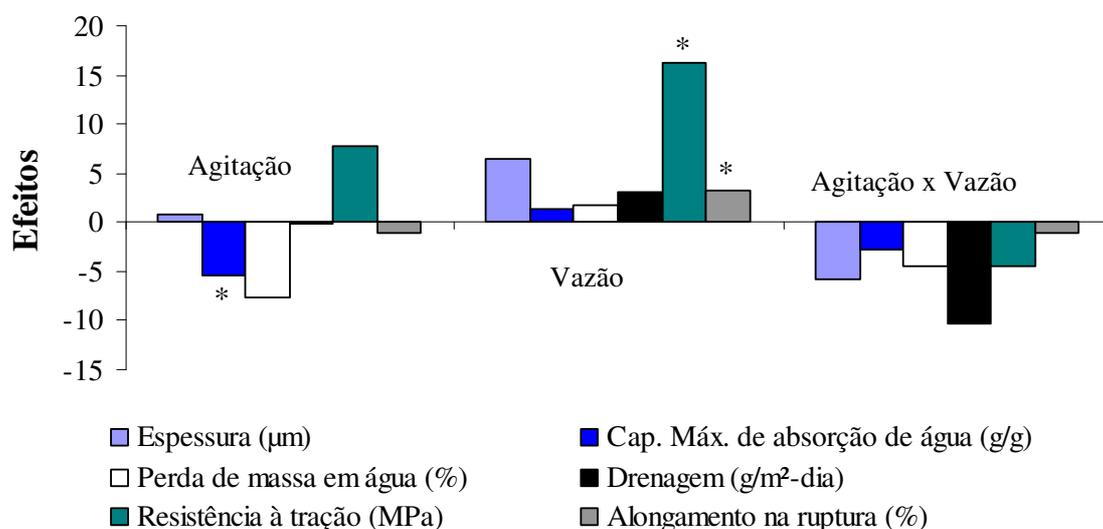


Figura 4.15 - Efeitos estatísticos calculados para as variáveis-resposta espessura, capacidade máxima de absorção de água, capacidade de drenagem, perda de massa em água e resistência mecânica. Para a comparação mais direta entre as variáveis-resposta, os efeitos referentes à capacidade de drenagem foram divididos por 100. * Valor estatisticamente significativo para $p < 0,10$.

Enquanto o aumento da taxa de agitação resultou na elevação da espessura (discreta) e da resistência à tração das membranas, a diminuição desta variável reduziu a perda de massa, a capacidade de drenagem, o alongamento na ruptura e a capacidade máxima de absorção de água das membranas.

Através da análise morfológica, observou-se que as membranas obtidas no ensaio 3B na condição de 40 mL/h e 100 rpm apresentaram menor compactação da rede polimérica (Figura 4.9 b) e, conseqüentemente, estas absorveram maiores quantidades de água, apresentando maior perda de massa. Em contrapartida, as membranas obtidas no ensaio 4B nas condições de 40 mL/h e 500 rpm, apresentaram maior grau de compactação da rede polimérica (Figura 4.9 d) e, conseqüentemente, menores valores de absorção de água e menor perda de massa durante a estocagem. Os resultados sugerem que o aumento na taxa de agitação do sistema proporciona maior aproximação das cadeias poliméricas, tornando a estrutura mais compacta e conseqüentemente, menos susceptível à entrada de água.

A análise dos efeitos estatísticos da variável vazão de adição de solução de quitosana em solução de alginato indica que o aumento da vazão ocasiona um efeito positivo na resposta de todas as variáveis dependentes avaliadas, entretanto, dentro do limite de confiança estabelecido, este efeito foi estatisticamente significativo apenas para as variáveis resistência à tração e alongamento na ruptura. As membranas obtidas na vazão de 40 mL/h apresentaram valores maiores de resistência à tração e de alongamento na ruptura o que, potencialmente, pode ser atribuído ao empacotamento ordenado das cadeias poliméricas, uma vez que o ordenamento lamelar das fibras pode favorecer a resistência e o alongamento das membranas.

A interação das variáveis taxa de agitação e vazão de adição, por sua vez, apresentou um efeito negativo na resposta de todas as variáveis dependentes avaliadas, sendo que nenhuma destas apresentou efeito estatisticamente significativo dentro do limite de confiança estabelecido. Assim, as alterações nas condições operacionais do sistema apresentaram influência estatisticamente significativa somente em três das variáveis avaliadas dentro do limite de confiança estabelecido.

4.3. Avaliação da utilização de glicerol na preparação de membranas de quitosana-alginato

A adição de glicerol às membranas de quitosana-alginato teve por objetivo melhorar as propriedades mecânicas das mesmas, característica importante em dispositivos destinados ao uso como curativos. Os resultados obtidos referentes à espessura, à capacidade máxima de absorção de água e à perda de massa estão apresentados na Tabela 4.7.

Os valores de espessura obtidos para as membranas nas quatro proporções mássicas analisadas variaram de 70 a 100 μm , variação esta considerada relativamente pequena. Estes resultados eram esperados, uma vez que massas iguais de alginato e quitosana foram utilizadas em todos os ensaios, sendo que as variações observadas podem ser atribuídas, possivelmente, ao tamanho e à forma dos coacervados formados e ao seu empacotamento e disposição durante a etapa de secagem, além do fato da incorporação de glicerol nas membranas. Conforme mostrado nos resultados anteriores, membranas livres de glicerol preparadas nas mesmas condições, apresentam espessura média de 78 μm , notando-se,

assim, que apenas a proporção mais elevada de glicerol resultou em maior espessura, talvez pela possível modificação da estrutura da membrana ao se adicionar o plastificante.

Tabela 4.7 - Resultados obtidos para as membranas de quitosana-glicerol-alginato (Q:G:A), obtidas em diferentes proporções mássicas, referentes à espessura, à capacidade máxima de absorção de água e à perda de massa.

Proporção mássica (Q:G:A)	Espessura média (μm)	C_w (g/g)	Perda de massa (%)	
			24 h / 37°C	43 dias / 4°C
1:0,10:1	70 \pm 15	8 \pm 1	5 \pm 1	3 \pm 2
1:0,25:1	81 \pm 13	10 \pm 0	5 \pm 1	1 \pm 1
1:0,50:1	78 \pm 13	9 \pm 0	5 \pm 1	2 \pm 1
1:1,00:1	100 \pm 15	5 \pm 1	3 \pm 0	-1 \pm 1

Com relação à capacidade máxima de absorção de água, as membranas apresentaram variações entre 5 e 10,5 g H₂O / g membrana, valores estes, inferiores aos apresentados pelas membranas preparadas na ausência deste composto. O glicerol incorporado às membranas pode ter modificado a estrutura das mesmas, influenciando negativamente na absorção de água, provavelmente, através da diminuição do número de grupos disponíveis para interagir com tal solvente.

As membranas estocadas em água por 43 dias, apresentaram perdas mássicas bastante reduzidas, não chegando a 4%. Estes valores podem ser considerados baixos quando comparados aos obtidos para amostras isentas de glicerol, de cerca de 20%, nas mesmas condições de estocagem. Resultados similares foram observados para as membranas expostas à temperatura de 37°C por 24 h, atingindo-se perdas mássicas máximas em torno de 5% após este período. Ressalta-se que as perdas mássicas obtidas podem ser provavelmente atribuídas, à saída de parte do plastificante incorporado às membranas, durante os períodos de estocagem.

Os valores obtidos referentes à drenagem de água, à resistência à tração e ao alongamento na ruptura, estão listados na Tabela 4.8.

A capacidade de drenagem das membranas variou entre 11.330 e 13.000 g/m²-dia, valores estes bastante similares aos apresentados pelas membranas preparadas nas mesmas condições, isentas de glicerol. Os valores de resistência à tração variaram entre 14 e 23 MPa, não superando o valor de 28 MPa obtido para membranas preparadas com a mesma

metodologia, porém isentas de glicerol. Todas as amostras preparadas apresentaram alongamento de ruptura inferior a 7%, estando na mesma ordem de grandeza dos obtidos para as membranas sem glicerol (8%). Os resultados observados para as propriedades mecânicas não eram esperados, uma vez que adicionado o plastificante, esperava-se obter melhorias nas propriedades mecânicas das membranas. Frente a isto, supõe-se que boa parte do glicerol incorporado tenha sido lavado das membranas durante a etapa de tratamento por imersão em 200 mL de água por 24 h, o que explicaria o baixo desempenho observado, do ponto de vista das propriedades mecânicas.

Tabela 4.8 - Resultados obtidos para as membranas de quitosana-glicerol-alginato (Q:G:A), obtidas em diferentes proporções mássicas, referentes à drenagem de água, à resistência à tração e ao alongamento na ruptura.

Proporção mássica (Q:G:A)	Drenagem (g/m ² -dia)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1:0,10:1	13.000 ± 620	21 ± 2	7 ± 2
1:0,25:1	11.330 ± 230	23 ± 6	4 ± 1
1:0,50:1	12.380 ± 1.180	14 ± 4	6 ± 1
1:1,00:1	12.800 ± 1.050	20 ± 3	5 ± 1

As membranas contendo a menor e a maior quantidade de glicerol foram analisadas morfologicamente, como mostra as Figuras 4.16 e 4.17.

Como anteriormente observado para as membranas obtidas na ausência do plastificante, as membranas contendo glicerol apresentaram superfícies onduladas com elevações e, grande quantidade de fibras distribuídas ao longo de sua extensão, não sendo observada a presença de poros. Uma maior rugosidade foi observada para as membranas preparadas na condição de menor quantidade de glicerol, provavelmente em função da menor compactação das fibras poliméricas.

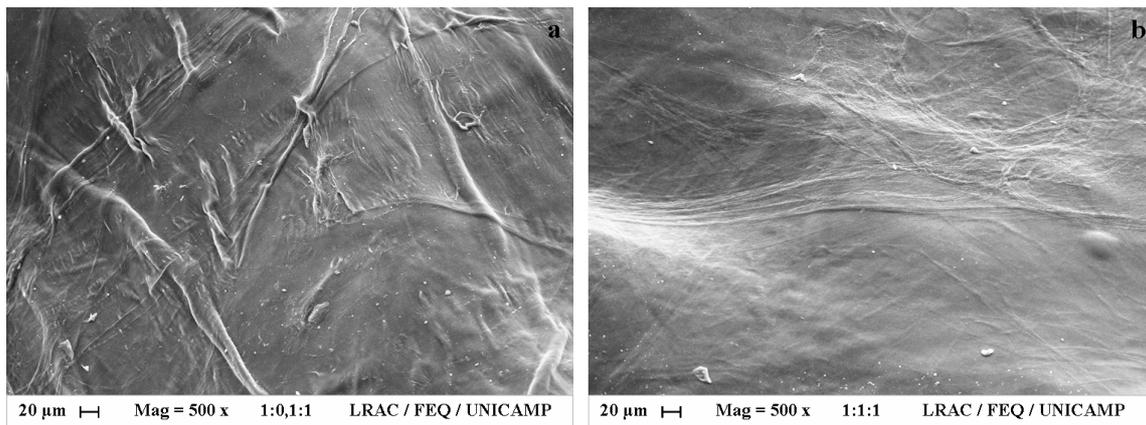


Figura 4.16 - Morfologia de superfície das membranas preparadas nas proporções 1:0,1:1 (a) e 1:1:1 (b) de quitosana: glicerol : alginato. O aumento de ambas as micrografias é de 500 vezes.

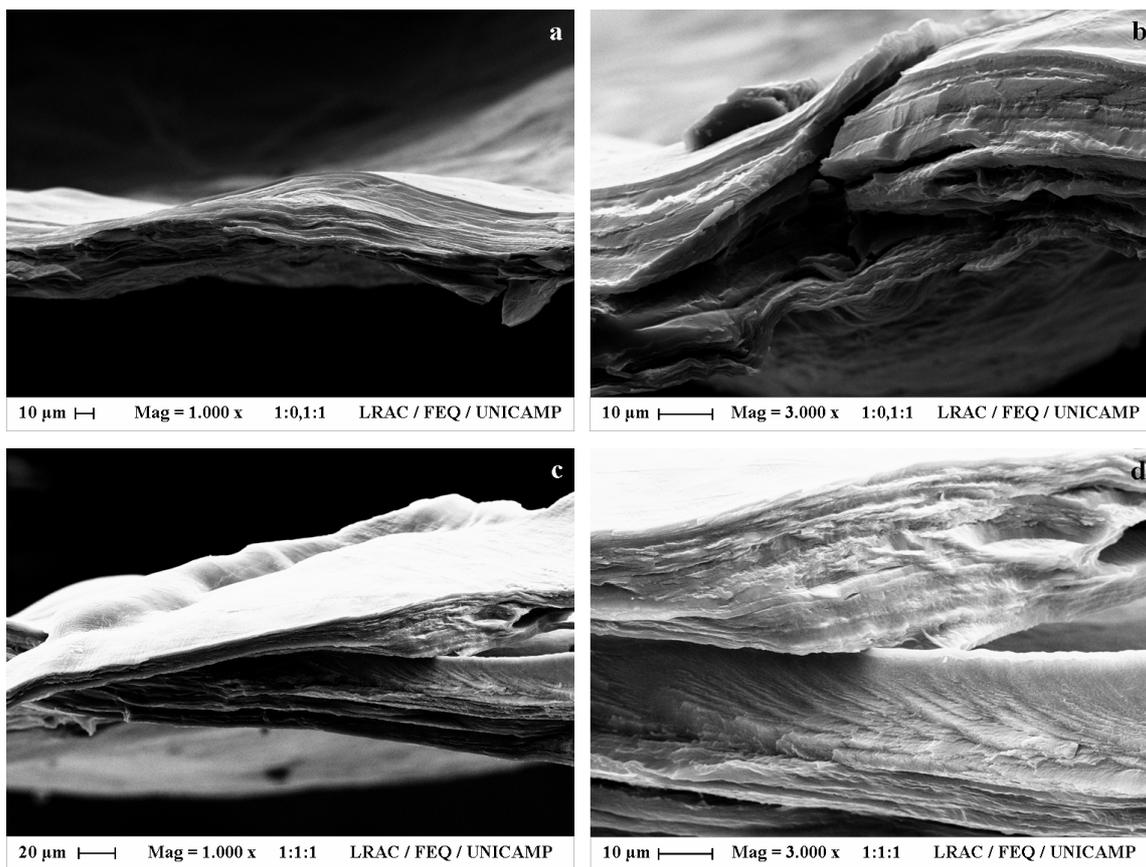


Figura 4.15 - Corte transversal das membranas preparadas nas proporções 1:0,1:1 (a;b) e 1:1:1 (c;d) de quitosana : glicerol : alginato. a) aumento de 1.000 vezes; b) aumento de 3.000 vezes; c) aumento de 1.000 vezes; d) aumento de 3.000 vezes.

Os cortes transversais mostraram pouca diferença na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, sendo que a amostra 1:0,1:1, aparentemente, apresentou compactação mais discreta (Figura 4.17 b) quando comparada à amostra apresentada na Figura 4.17 d. Esta pequena diferença na compactação das membranas pode ter contribuído para que as membranas obtidas nas proporções 1:0,1:1 apresentassem maior hidratação, visto que, potencialmente, esta apresentava menor resistência à transferência de água através das múltiplas lamelas observadas.

Por fim, uma vez que a adição do plastificante glicerol não promoveu melhorias expressivas nas características gerais das membranas com relação às preparadas nas mesmas condições isentas deste composto, optou-se pela não adição do glicerol nas membranas preparadas nos ensaios seguintes. Destaca-se, entretanto, que este composto poderia, eventualmente, ser empregado com sucesso na estocagem de membranas de quitosana/alginate, minimizando, assim, problemas com ruptura precoce e indesejada.

4.4. Avaliação suplementar das características das membranas de quitosana-alginate obtidas na vazão de 40 mL/h

As membranas obtidas na vazão de 40 mL/h e, respectivamente, nas taxas de agitação de 100 e 500 rpm (respectivamente, ensaios 3B e 4B), foram selecionadas para a realização dos estudos de avaliação da capacidade máxima de absorção e da perda de massa em diferentes solventes e para os ensaios *in vitro*, com queratinócitos humanos e células *Vero*. Tal seleção baseou-se nos extremos encontrados para as variáveis: capacidade máxima de absorção e perda de massa em água, e no fato de que o uso de valores elevados de vazão propicia a obtenção de membranas com maior resistência mecânica, características estas importantes na preparação de curativos poliméricos.

4.4.1. Avaliação da capacidade máxima de absorção e da perda de massa das membranas em diferentes solventes

O estudo da capacidade de absorção das membranas foi ampliado visando incluir outros fluidos que mais se aproximassem das prováveis aplicações clínicas das membranas,

incluindo soluções contendo sais que pudessem eventualmente desestabilizar as membranas, sendo elas: solução salina 0,9% (SS), soro fetal bovino (SFB) e fluido corpóreo simulado (FCS). Os valores obtidos nestes ensaios, realizados a 4°C para diminuir a probabilidade do crescimento de microrganismos contaminantes, estão listados na Tabela 4.9.

Em solução salina, a qual seria potencialmente empregada para a hidratação das membranas antes de seu uso *in vivo*, as membranas obtidas a 500 rpm apresentaram absorção maior que a verificada para as membranas preparadas a 100 rpm, porém, as perdas de massa de ambas neste solvente foram de, no máximo, 3,5%.

Tabela 4.9 - Valores obtidos para a capacidade máxima de absorção (a 37°C por 24 h) e para perda de massa das membranas estocadas por 43 dias em diferentes solventes a 4°C, para amostras preparadas na vazão de 40 mL/h.

Solução	Membranas preparadas a 100 rpm		Membranas preparadas a 500 rpm	
	C_w (g/g)	Perda de massa (%)	C_w (g/g)	Perda de massa (%)
Água *	19 ± 1	21 ± 4	11 ± 4	9 ± 3
SS	11 ± 2	3 ± 0	17 ± 2	2 ± 2
SFB	5 ± 0	3 ± 2	5 ± 1	- 4 ± 2
FCS	5 ± 2	2 ± 1	6 ± 1	1 ± 1

* Dados já apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Nos ensaios realizados em presença de SFB, ambas as membranas apresentaram capacidade de absorção em torno de 5 g de solvente/g de membrana seca. A alta concentração de proteínas presentes no soro, aliada a sua maior viscosidade, podem ter contribuído para a menor capacidade de absorção deste pelas membranas, quando da comparação dos resultados em água e em solução salina. Em adição, as perdas de massa das membranas em soro foram da ordem de 3%, sendo que em certos casos, houve um discreto aumento de massa. Tal comportamento pode ser explicado pela provável adsorção de proteínas presentes no soro na superfície das membranas de quitosana-alginato.

Assim como o SFB, a solução de fluido corpóreo simulado é composta de diversos sais. Os resultados obtidos para este solvente mostraram que as membranas apresentaram capacidades de absorção similares, entre 5 e 6 g de fluido corpóreo simulado/g de

membrana seca e perdas de massa variando de 1 a 2% após 43 dias de experimento, o que ocorre em concordância com os resultados obtidos em SFB.

Este conjunto de ensaios mostrou que as membranas de quitosana-alginato preparadas neste trabalho possuem grande capacidade de absorção de solventes, podendo variar de 5 a 19 g solvente/g membrana seca. Em adição, na presença de solventes apresentando alta força iônica, como o fluido corpóreo simulado, ou alta osmolalidade e elevada concentração de proteínas, como o soro fetal bovino, a capacidade de absorção das membranas diminuiu quando comparada à da água deionizada.

Notou-se também a alta estabilidade das membranas à exposição por 43 dias em todos os fluidos a 4°C. Um ensaio realizado a 37°C (por 43 dias) empregando SFB mostrou que ocorre aumento apreciável na perda de massa, que passa a ser de cerca de 30%, o que ainda assim, mostra a boa estabilidade do material preparado.

4.4.2. Avaliação da citotoxicidade direta das membranas a células Vero

Resultados previamente obtidos por nosso grupo de pesquisa (Dallan, 2005), para membranas somente de quitosana, mostraram que células da linhagem *Vero* (derivada de rim de macaco e utilizada com frequência no estudo de toxicidade de biomateriais a células de mamíferos), aderem fracamente à superfície das membranas quando inoculadas em concentrações em torno de 2×10^5 células/mL. Neste contexto, as membranas de quitosana-alginato preparadas neste trabalho apresentaram comportamento similar quando inoculadas com concentrações celulares em torno 1×10^4 células/mL, como mostrado na Figura 4.18.

Por outro lado, quando as mesmas membranas de quitosana-alginato foram inoculadas em concentrações em torno de 10^5 células/mL em sua superfície, estas aparentemente estimularam a adesão e a proliferação celular, e ainda a organização da histo-arquitetura celular pela produção de elementos da matriz, como pode ser visualizado na Figura 4.19. Uma vez que o comportamento verificado para as membranas preparadas nas condições dos ensaios 3B e 4B foram bastante similares, as Figuras 4.18 e 4.19, apresentam somente os dados referentes às membranas do ensaio 3B.

A diferença observada no comportamento das células em relação às membranas de quitosana-alginato, hora mostrando-se aderidas e hora não, pode ser atribuída, provavelmente, à concentração inicial do inóculo utilizado, uma vez que em maior

concentração, as células podem ter tido sua adesão e proliferação favorecidas, visto que vários tipos de células animais devem produzir e acumular no meio fatores de crescimento e de condicionamento imprescindíveis para seu desenvolvimento, sendo este fato favorecido para inóculos mais concentrados. Por sua vez, a utilização de inóculos com grande densidade celular pode dificultar o acompanhamento de ensaios avaliados por longos períodos, uma vez que em um curto espaço de tempo, as células tendem a preencher toda a área superficial da membrana utilizada no ensaio, não mais se reproduzindo, por inibição de contato.

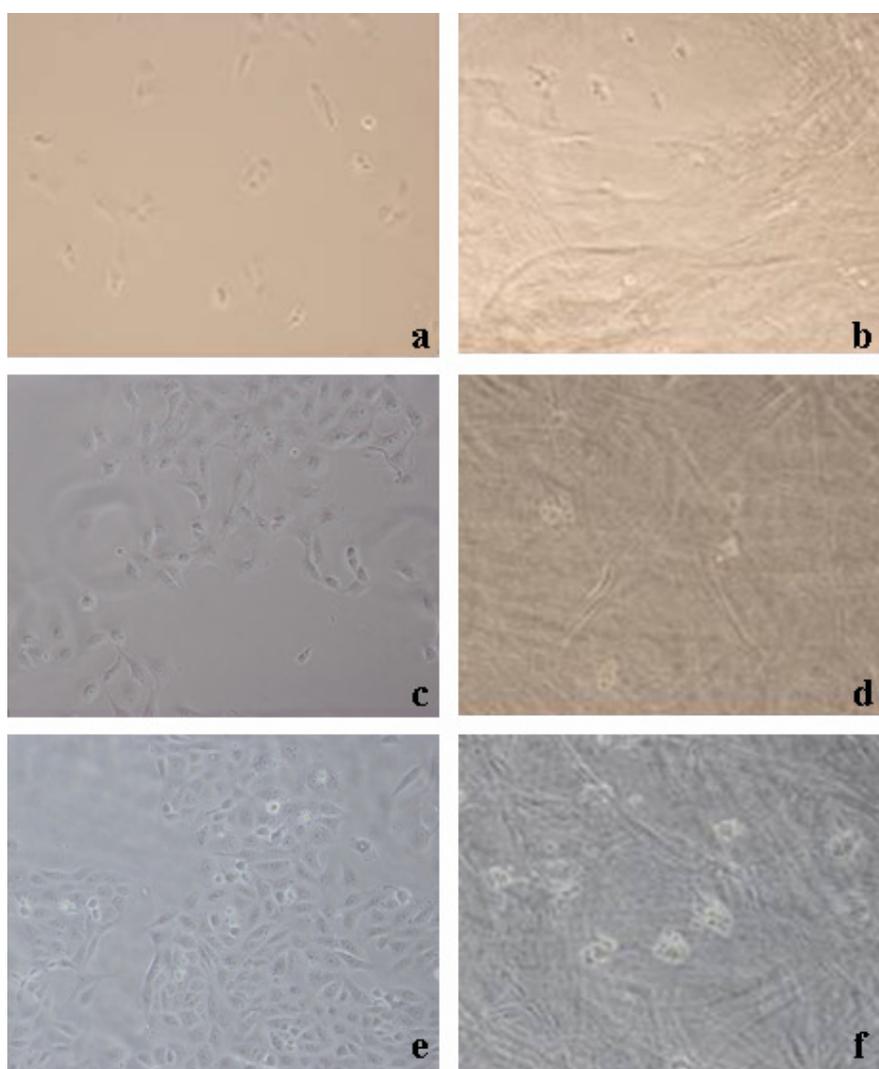


Figura 4.18 - Análise das células *Vero* inoculadas a 1×10^4 células/mL em microscópio de contraste de fases após contato com as membranes de quitosana-alginato: a) controle

positivo após 24 h; b) após 24 h; c) controle positivo após 48h, d) após 48 h; e) controle positivo após 72 h, f) após 72 h.

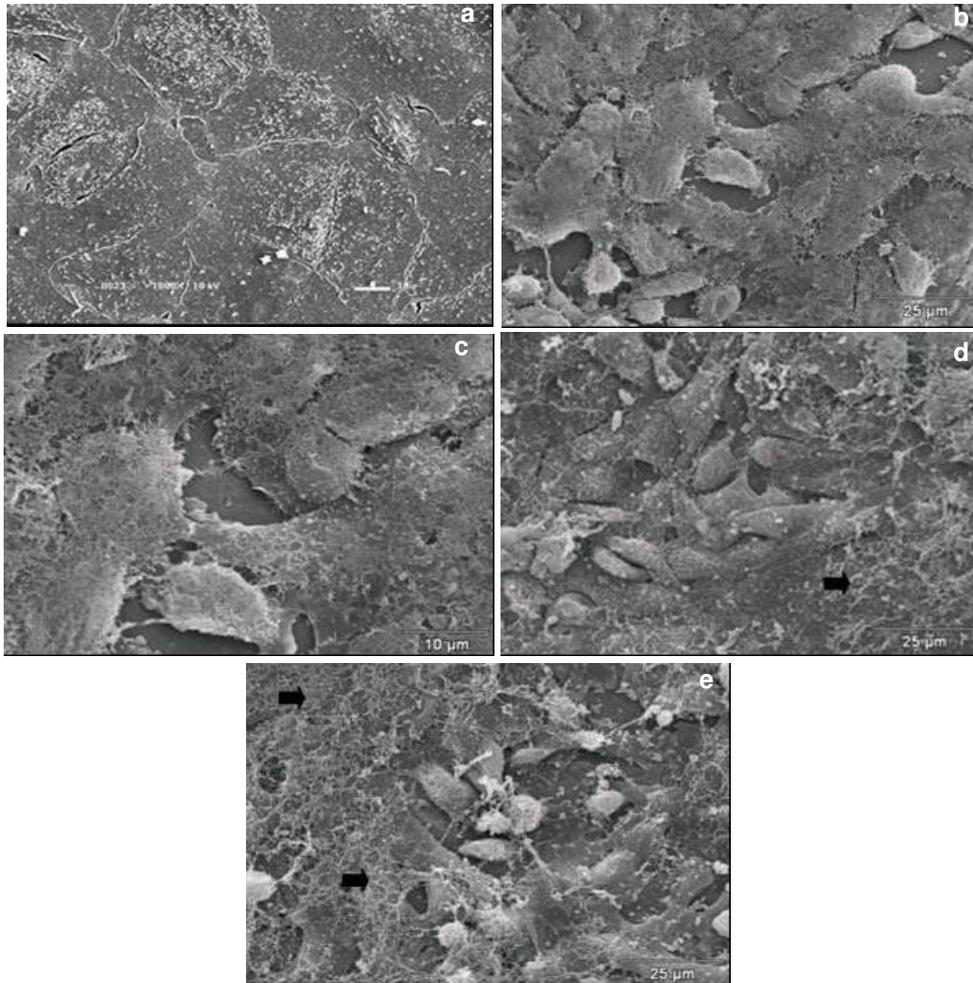


Figura 4.19 - a) Células *Vero* controle cultivadas sobre lamínulas de vidro, com morfologia típica e crescimento em monocamadas; b - c) células *Vero* cultivadas por 24 horas sobre membranas de quitosana-alginato apresentando adesão e morfologia achatada; d-e) células *Vero* cultivadas por 24 horas sobre membranas de quitosana-alginato, evidenciando a presença de material fibrilar na superfície das células (*setas*). Concentração do inóculo: 1×10^5 células/mL.

Segundo Dallan (2005), as células *Vero*, por serem dependentes de ancoragem para sua reprodução, se ligam às superfícies dos materiais, apresentando morfologia alongada, como pode ser observado nas Figuras 4.18 a, 4.18 c e 4.18 e referentes aos grupos controle.

Quando as condições ambientais não são adequadas ou quando a superfície não é apropriada, tal comportamento não é observado e as células apresentam morfologia arredondada (Figuras 4.18 b, 4.18 d e 4.18 f), ficando presas às superfícies dos materiais apenas por poucos pontos de contato, ou seja, fracamente aderidas.

Com relação à proliferação das células inoculadas a 1×10^4 células/mL nas membranas de quitosana-alginato, verificou-se discreta proliferação celular, mas não tão efetiva como na superfície da placa, onde estava o grupo controle (Figura 4.20). Observou-se crescimento tridimensional das células, com formação de agregados celulares que aumentaram seu tamanho de acordo com o tempo da cultura. Após 24 e 48 h, o número de células cultivadas sobre as membranas foi muito similar ao apresentado pelo grupo controle, apesar destas apresentarem-se agrupadas sobre as membranas.

A baixa aderência apresentada pelas células com relação às membranas de quitosana-alginato no ensaio com o inóculo de menor concentração pode ser considerada uma característica favorável, uma vez que se almeja que tais membranas possam ser utilizadas como curativos temporários, os quais devem ser facilmente removíveis das lesões quando necessário. Entretanto, os resultados para maior concentração de inóculo também são interessantes, visto que se verifica histo-arquitetura organizada e formação de elementos da matriz extracelular, desejáveis durante a cicatrização de uma lesão.

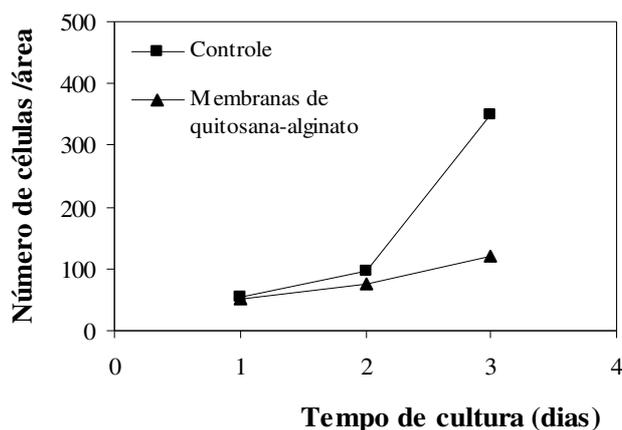


Figura 4.20 - Análise da evolução das concentrações celulares sobre as membranas de quitosana-alginato e do grupo controle. Dados referentes às membranas preparadas nas condições do ensaio 3B.

4.4.3. Crescimento de queratinócitos *in vitro* na presença das membranas de quitosana e alginato

Com o intuito de verificar preliminarmente o comportamento do crescimento de queratinócitos (células típicas da pele) na superfície das membranas, realizou-se este ensaio. A Figura 4.21 ilustra o comportamento do crescimento das células na presença das membranas, enquanto a Figura 4.22 ilustra o controle do crescimento das células na ausência das membranas.

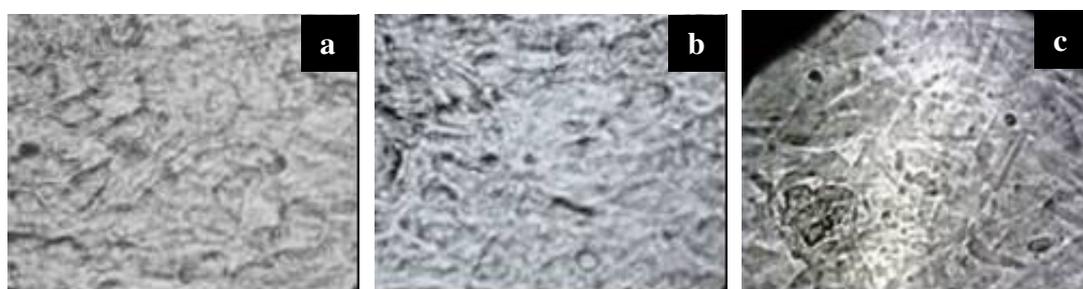


Figura 4.21 - Crescimento de queratinócitos na presença de membranas de quitosana-alginato preparadas de acordo com as condições dos ensaios 3B (a) e (c); 4B (b).

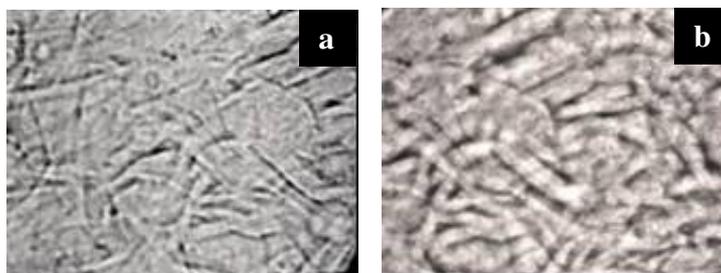


Figura 4.22 - Crescimento queratinócitos na ausência das membranas (ensaio controle).

Pela análise das Figuras 4.21 e 4.22, pode-se verificar que os queratinócitos cresceram normalmente na presença das membranas quando comparados ao grupo controle, indicando, assim, que estas não apresentaram citotoxicidade detectável visualmente para as células. Tal resultado pode ser considerado de grande importância uma vez que as membranas preparadas neste trabalho visam sua utilização na terapia de lesões cutâneas *in vivo*.

4.5. Análise complementar das propriedades das membranas de quitosana-alginato obtidas na vazão de 40 mL/h e taxa de agitação de 100 rpm

Após uma análise geral de todos os resultados obtidos, a membrana preparada sob as condições de vazão e agitação de 40 mL/h e 100 rpm, respectivamente, foi selecionada como a mais promissora para ser utilizada como curativo em feridas com alto grau de exsudato. Assim, tal membrana foi adicionalmente avaliada quanto à permeabilidade ao vapor d'água e oxigênio, ao perfil de hidratação em água e à resistência mecânica quando hidratada, sendo ainda utilizada em todos os ensaios com o fármaco bacitracina e em todos os ensaios *in vivo*.

4.5.1. Estudo da permeabilidade das membranas ao vapor d'água e ao oxigênio

Os curativos modernos, como citado anteriormente, requerem um ambiente úmido com adequado transporte de fluidos e gás entre a ferida e a membrana (Clasen *et al.*, 2006). Devem ainda evitar ou pelo menos reduzir a perda excessiva de líquido corpóreo, controlar a absorção e a transmissão de vapores e drenar adequadamente o exsudato, acelerando assim o processo de granulação e epitelização. Por outro lado, se a taxa de permeação ao vapor de água (TPVA) for muito baixa, pode ocorrer o acúmulo de exsudato no leito da lesão causando a desaceleração do processo de cicatrização e um possível crescimento bacteriano (Kim *et al.*, 2007). O resultado obtido pela análise de TPVA da membrana de quitosana-alginato preparada neste trabalho variou de 2.556 a 2.832 g/m²-dia, apresentando valor médio de 2.678 g/m²-dia. Tal valor foi discretamente superior ao obtido por Dallan (2005) 2.082 g/m²-dia, para membranas somente de quitosana a 2,5%.

Segundo Kim *et al.* (2007), a perda de água por evaporação para peles lesadas pode variar entre 279 ± 26 g/m²-dia para queimaduras de primeiro grau, e 5.138 ± 202 g/m²-dia para feridas em granulação. Curativos que apresentam taxas de permeabilidade entre 2.000 e 2.500 g/m²-dia podem promover adequado nível de umidade sem risco de desidratar o leito da ferida (Kim *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2001). Neste contexto, o resultado obtido mostrou que a membrana de quitosana-alginato preparada neste trabalho possui valor de TPVA adequado para ser utilizada como curativo, corroborando com os valores encontrados na literatura consultada (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 - Comparação entre os valores TPVA das membranas de quitosana e alginato obtidos neste trabalho e os valores existentes na literatura consultada para membranas preparadas em diferentes condições experimentais.

Fonte	Permeabilidade ao vapor d'água TPVA (g/m ² dia)
Neste trabalho	2.556 a 2.832
Kim <i>et al.</i> (2007)	1.938 a 2.212
Adekogbe <i>et al.</i> (2005)	2.228 a 2.628
Mi <i>et al.</i> (2003)	2.109 a 2.792
Wang <i>et al.</i> (2002)	566 a 658
Loke <i>et al.</i> (2000)	1635 a 3005
Remuñán-López <i>et al.</i> (1997)	288 a 1008

Em adição, a membrana apresentou valores de TPVA superiores a vários curativos comercialmente disponíveis (Tabela 4.11), o que reforça ainda mais seu bom potencial de uso. Porém, como discutido por Dallan (2005), a comparação direta do resultado obtido neste trabalho com os dados encontrados na literatura deve ser feita com cautela, uma vez que as condições experimentais usadas no ensaio, bem como as características das membranas, são bastante variáveis.

Tabela 4.11 - Curativos disponíveis comercialmente avaliados com relação à permeabilidade ao vapor d'água (modificada de Wu *et al.*, 1995).

Nome Comercial	Fabricante	Permeabilidade ao vapor d'água TPVA (g/m ² dia)
Biofilm®	CliniMed Ltd	6512 ± 445
Comfeel®	Coloplast A/S	285 ± 8
Dermiflex®	Johnson & Johnson	76 ± 5
Duoderm®	ConvaTec Ltd.	889 ± 49
Granuflex E®	ConvaTec Ltd.	216 ± 6
IntraSite®	Smith & Nephew	357 ± 29
Restore Cx®	Hollister Inc.	476 ± 18
Tegasorb®	ConvaTec Ltd.	136 ± 15
Ultec®	Sherwood Med.	534 ± 63
Geliperm®	Geistlich Ltd.	9009 ± 319
Bioclusive®	Johnson & Johnson	394 ± 12

Com relação à permeabilidade ao oxigênio (TPO₂), pode-se dizer que sua importância consiste na atuação direta na inibição do crescimento de bactérias anaeróbicas,

bem como na aceleração do processo de regeneração do tecido lesado (Dallan, 2005). Os resultados obtidos pela análise de TPO_2 da membrana de quitosana-alginato preparada neste trabalho encontram-se listados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) a 35°C e 1atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio, das membranas de quitosana-alginato preparadas sob as condições de agitação e vazão de 100 rpm / 40mL/h respectivamente.

Amostra	% UR superfície do filme em contato com o gás de arraste	Permeabilidade ao oxigênio TPO_2 (mL O_2 (CNTP)/m ² dia)*
Membrana quitosana-alginato	Teste 1 - 81%	33
	Teste 2 - 94%	47
	Média	40
	Coefficiente de variação	25%

*58%UR na superfície do filme em contato com o oxigênio

Valores referentes a duas determinações

A média encontrada para a permeabilidade ao oxigênio para as membranas de quitosana-alginato foi de 40 mL O_2 (CNTP)/m²-dia, valor este bastante semelhante ao obtido por Dallan (2005), igual a 44 cm³ O_2 (CNTP)/m²-dia para membranas densas de quitosana. Porém, como citado por tal autora, este valor pode ser considerado baixo e inadequado no caso do uso contínuo da membrana no tratamento de feridas por um período de aproximadamente cinco a sete dias, período este recomendado para o uso do curativo comercial Omiderm®, por exemplo, que apresenta valor de valor TPO_2 de cerca de 82 cm³ O_2 (CNTP)/m²-dia (Dallan, 2005).

Por fim, apesar da importância da avaliação de TPO_2 em curativos, não se encontrou na literatura consultada valores de referência para a discussão mais aprofundada dos valores considerados como mais apropriados, como no caso da TPVA. Além disso, poucos grupos de pesquisa analisaram tal propriedade.

4.5.2. Avaliação do perfil de hidratação em água a 37°C

Com o intuito de monitorar a hidratação gradativa das membranas de quitosana-alginato ao longo de 24 h, realizou-se este ensaio. Os valores de absorção de água obtidos são apresentados na Figura 4.23.

Os resultados mostraram que as membranas absorveram quantidades crescentes de água durante boa parte do ensaio. Porém, o comportamento normalmente observado na literatura para curvas de hidratação, verificado nas primeiras 8 h do ensaio, sofreu uma alteração não esperada: a partir de 12 h de exposição à água, observou-se novo aumento na hidratação das amostras.

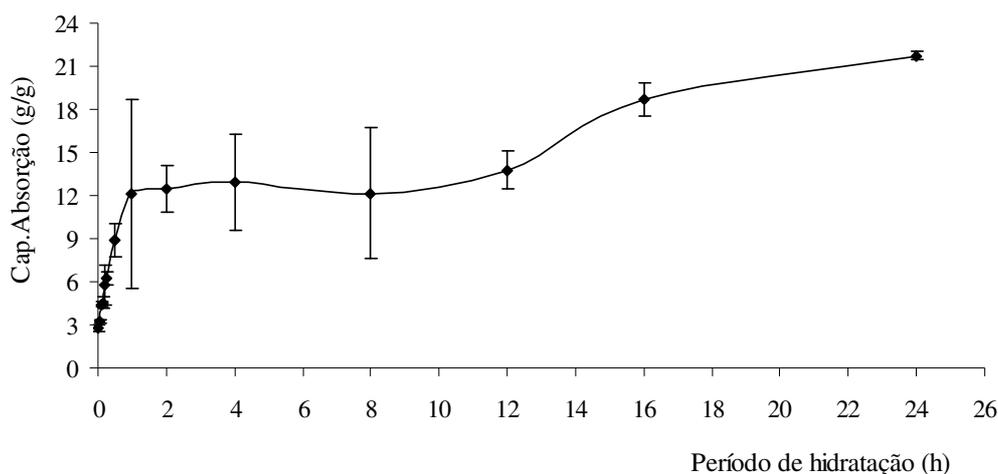


Figura 4.23 - Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-alginato em água a 37°C, em 24 h.

Tal comportamento pode ser possivelmente atribuído à expansão das cadeias poliméricas da membrana, ou ainda, à dissolução parcial das mesmas. Segundo Bernabé *et al.* (2005), a integridade da estrutura dos PECs durante o processo de absorção de água é mantida pela reticulação das cadeias. Entretanto, em valores baixos de pH (como o pH da água deionizada utilizada no ensaio, próximo de 4,96) ou altos, estas ligações podem ser rompidas, resultando na desintegração dos PECs e na dissolução parcial das membranas.

A quitosana é um polímero catiônico com capacidade de fazer ligações com a água, possuindo grupos hidroxila abundantes, necessários para tais interações (Kim, 2007). Em meio ácido, a protonação seguida do afastamento dos grupos amino residuais nos PECs pode causar uma expansão da estrutura polimérica, facilitando a penetração e a absorção de água. Assim, a presença de grupos amino protonados nos filmes aumenta a capacidade de absorção de água (Yan *et al.*, 2000). Em adição, durante o intumescimento, pequenos íons presentes na rede polimérica podem deixar a membrana, diminuindo a pressão osmótica e,

em pH próximo de 5, os grupos carboxílicos livres provenientes do alginato estariam mais frequentemente presentes na forma de carboxilato (Cardenás *et al.*, 2003), favorecendo a formação de pontes de hidrogênio. Todos estes fatores podem atuar contribuindo para que maiores valores de absorção do solvente sejam obtidos.

4.5.3. Estudo das propriedades mecânicas de membranas hidratadas de quitosana-alginato

A avaliação das propriedades mecânicas da membrana de quitosana-alginato no estado úmido mostra-se relevante, uma vez que estas apresentam alta capacidade de absorção de água, que poderia, então, atuar de forma similar a um plastificante, facilitando o deslizamento das lamelas e cadeias entre si e melhorando as propriedades mecânicas quando de sua aplicação *in vivo*.

Com base nos valores de hidratação obtidos no ensaio anterior, optou-se por avaliar as propriedades mecânicas das membranas hidratadas pelos períodos de 1, 30 e 240 minutos, uma vez que nestes períodos as membranas apresentaram valores de absorção de água bastante distintos, conforme se observa na Figura 4.23. Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se listados na Tabela 4.13, destacando-se que as amostras de quitosana-alginato hidratadas por 240 minutos não puderam ser avaliadas de maneira adequada, sofrendo ruptura por compressão ao serem fixadas nos mordentes do equipamento, impossibilitando a realização do ensaio.

Tabela 4.13 - Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas de quitosana-alginato hidratadas.

Período de hidratação (min)	Água absorvida (g H ₂ O/g membrana)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1	3 ± 0	3 ± 0	46 ± 13
30	9 ± 1	1 ± 1	40 ± 3

Os resultados obtidos mostraram apreciável diminuição nos valores encontrados para resistência à tração para as membranas hidratadas em comparação à membrana seca, que apresentava resistência à tração de 28 MPa.

Por outro lado, os valores encontrados para as membranas de quitosana-alginato referentes ao alongamento na ruptura aumentaram cerca de cinco a seis vezes com relação às amostras secas, comportamento bastante semelhante ao verificado para membranas somente de quitosana.

A Figura 4.24 apresenta o comportamento de amostras úmidas e secas quando submetidas aos ensaios de tração. Nota-se que apesar dos diferentes períodos de hidratação (1 minuto e 30 minutos), as membranas hidratadas apresentaram comportamento bastante semelhante entre si, independente do tempo de hidratação.

A queda da resistência à tração observada para as membranas hidratadas pode ser potencialmente atribuída à desestruturação do empacotamento ordenado das lamelas que constituem as membranas, devido à entrada de água na estrutura da mesma. Por sua vez, a entrada de água na estrutura das membranas favoreceu o aumento do seu alongamento, atuando como um plastificante (Dallan 2005; Remuñan-López *et al.*, 1997) através do aumento da flexibilidade da estrutura polimérica. Zhang *et al.* (2000), também observaram diminuição na resistência à tração de membranas úmidas preparadas a partir de blendas de quitosana e alginato, quando comparadas às mesmas amostras secas.

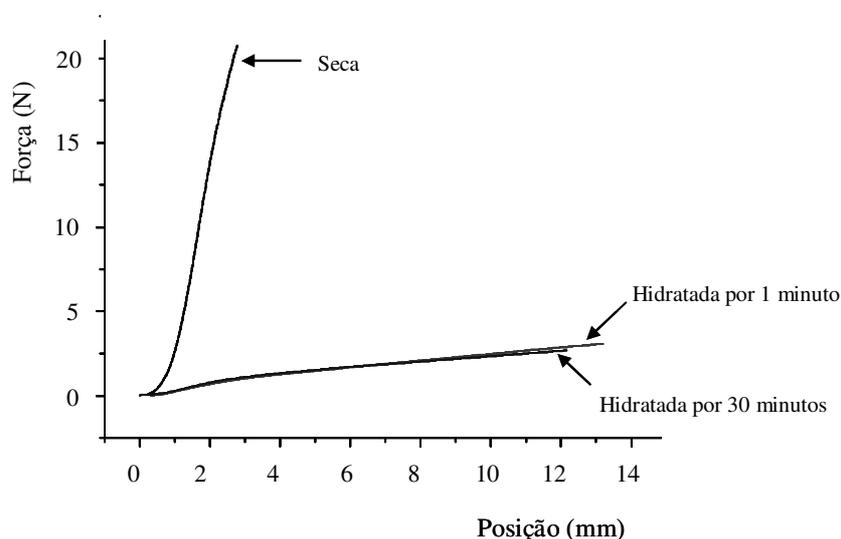


Figura 4.24 - Comportamento das amostras das membranas de quitosana-alginato, quando submetidas ao ensaio de tração.

Por fim, apesar da queda na resistência à tração das membranas hidratadas, estas ainda podem ser consideradas com bom potencial para serem utilizadas como curativos

poliméricos temporários. Ressalta-se ainda que, hidratadas, as membranas apresentaram valores de elasticidade mais próximos aos encontrados para a pele normal.

4.6. Comparação das propriedades das membranas de quitosana-alginato às constituídas somente por quitosana

Membranas densas somente de quitosana foram previamente estudadas e detalhadamente caracterizadas por nosso grupo de pesquisa (Dallan, 2005), tendo estas apresentado características promissoras para serem utilizadas como curativos temporários. As propriedades apresentadas por tais membranas foram comparadas às das membranas constituídas por quitosana-alginato, visando avaliar quais as mudanças e quais as possíveis melhorias obtidas pela adição do alginato. Neste sentido, segundo Paul e Sharma (2004), membranas constituídas por quitosana e alginato simultaneamente podem apresentar desempenho *in vivo* mais satisfatório, quando comparados aos verificados por filmes constituídos dos mesmos polímeros isolados.

Os valores referentes às espessuras seca e úmida, à capacidade máxima de absorção de água e de SFB, à perda de massa nestes mesmos solventes e à capacidade de drenagem de água encontram-se listados na Tabela 4.14, para as membranas somente de quitosana a 2% e, para as compostas simultaneamente por quitosana-alginato, obtidas na vazão de 40 mL/h e agitação de 100 rpm.

Tabela 4.14 – Valores referentes à espessura, à capacidade máxima de absorção, à perda de massa e à capacidade de drenagem, das membranas somente de quitosana e das compostas por quitosana-alginato.

Ensaio	Membrana de quitosana 2%	Membrana de quitosana-alginato
Espessura seca (μm)	152 ± 24	78 ± 18
Espessura úmida (μm)	202 ± 19	633 ± 22
Capacidade máx. de absorção de água (g/g)	1 ± 0	19 ± 1
Capacidade máx. de absorção de SFB (g/g)	2 ± 0	5 ± 0
Perda de massa em água (%)	4 ± 0	21 ± 4
Perda de massa em SFB (%)	3 ± 2	3 ± 2
Capacidade de drenagem ($\text{g}/\text{m}^2\text{-dia}$)	9.966 ± 1.038	13.559 ± 1.119

A espessura seca das membranas somente de quitosana a 2% foi de cerca de 150 μm e, em torno de 202 μm , quando hidratadas. Tais resultados corroboram com os obtidos por Dallan (2005) para membranas somente de quitosana a 1 e 2,5%, onde espessuras secas entre 130 e 140 μm e, hidratadas entre 180 μm e 210 μm , respectivamente, foram obtidas. No entanto, o valor obtido para a espessura seca das membranas de quitosana foi superior ao encontrado para as membranas compostas simultaneamente por quitosana e alginato (em torno de 80 μm), e inferior ao encontrado para tais membranas hidratadas (espessura de até 633 μm). Porém, ambas as membranas apresentaram espessuras consideradas adequadas para serem utilizadas como curativos temporários, conforme discutido anteriormente. Destaca-se que as membranas preparadas somente com quitosana apresentam de partida, massa polimérica em torno de 53% maior que as compostas de quitosana-alginato.

Nos ensaios de capacidade máxima de absorção, as amostras expostas ao SFB apresentaram capacidades de absorção em torno de 1,5 g de soro/g de membrana seca, valor este discretamente superior ao encontrado para as mesmas amostras expostas à água, 1,15 g de água/g de membrana seca. Tais valores foram bastante inferiores aos obtidos para as membranas de quitosana-alginato em água, cerca de 19 g de água/g de membrana seca e, em soro, cerca de 5 g de soro/g de membrana seca, sendo tais diferenças atribuídas à presença do alginato, polímero altamente hidrofílico, que confere à membrana alta capacidade de absorção de solventes.

A alta concentração de proteínas presentes no soro aliada a sua maior viscosidade podem ter resultado na menor capacidade de absorção deste pelas membranas de quitosana-alginato, quando da comparação dos resultados em água. Este mesmo comportamento não foi verificado para as membranas somente de quitosana, uma vez que os valores de absorção obtidos, quando da exposição à água e ao soro, foram bastante semelhantes. Frente a tais observações, a presença do alginato, aparentemente, define o comportamento das membranas nos ensaios de absorção. Em adição, ressalta-se que a capacidade de absorção pode ser considerada uma das características mais importantes quando se almeja o uso das membranas em lesões que apresentam grandes quantidades de exsudato. Assim, neste sentido, as membranas de quitosana-alginato apresentam-se mais promissoras que as somente de quitosana, para tal finalidade.

A perda de massa obtida para as membranas somente de quitosana em soro fetal bovino foi de cerca de 2,8%, valor bastante semelhante ao observado para as membranas de

quitosana-alginato, as quais apresentaram perdas mássicas em torno de 3,0% nas mesmas condições. Por sua vez, as membranas somente de quitosana apresentaram perdas mássicas em água em torno de 4,0%, enquanto as membranas compostas simultaneamente por quitosana e alginato, apresentaram perdas mássicas, no mesmo período, de cerca de 20%. Neste contexto, pode-se inferir que a presença de alginato além de contribuir para um aumento na capacidade de absorção de líquidos, contribuiu para que maiores perdas mássicas fossem obtidas, uma vez que tais perdas podem estar relacionadas com a dissolução de cadeias de alginato não complexadas com a quitosana ou não adequadamente reticuladas, além da própria dissolução de parte da quitosana. Frente a isto, sugere-se que haja uma relação proporcional entre a capacidade de absorção e a perda de massa das membranas.

A capacidade de drenagem de água das membranas somente de quitosana foi de cerca de 10.000 g/m²-dia, valor este inferior ao encontrado para as membranas de quitosana-alginato (13.000 g/m²-dia). Apesar disto, o valor encontrado para as membranas somente de quitosana foi considerado adequado, uma vez que, como citado anteriormente, a perda de líquido médio da pele lesada varia entre 3.400 e 5.200 g/m²-dia, dependendo do tipo da lesão, sendo que materiais com capacidade de drenagem em torno de 5.000 g/m²-dia foram considerados adequados (Behar *et al.* 1985) para serem utilizados como curativos.

As amostras das membranas somente de quitosana, quando hidratadas, apresentaram valores de resistência à tração em torno de 6,25 MPa, valores estes bastante inferiores aos apresentados pelas amostras quando secas, em torno de 44 MPa. Segundo Dallan (2005), a organização estrutural das cadeias da quitosana confere cristalinidade ao polímero e, portanto, boa resistência mecânica. Além disso, não se deve desprezar o efeito de plastificação promovido pela água ao se comparar a resistência mecânica de membranas hidratadas à de membranas secas, visto que o alongamento de membranas úmidas é maior que o de amostras secas.

Os valores encontrados para o alongamento na ruptura das membranas somente de quitosana, quando hidratadas, aumentaram cerca de seis vezes (85%) com relação às mesmas amostras secas (14%). As Figuras 4.25 e 4.26 apresentam o comportamento típico das membranas de quitosana, quando submetidas aos ensaios de tração.

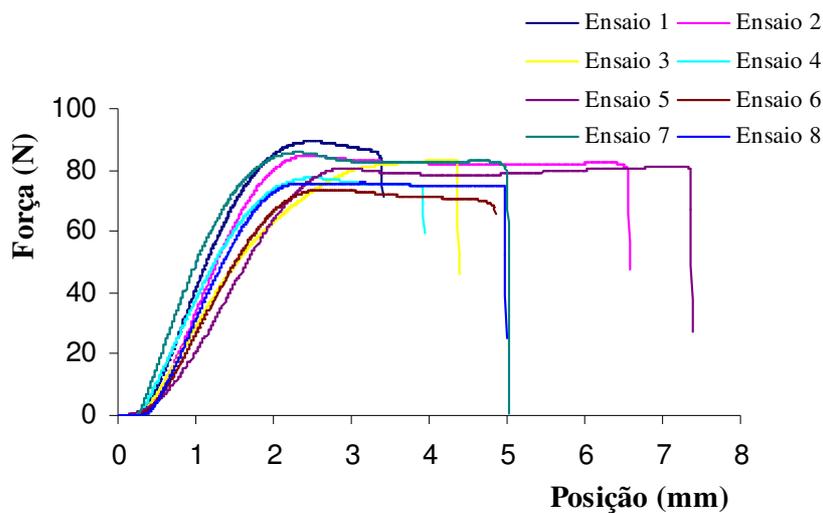


Figura 4.25 - Comportamento típico das membranas secas somente de quitosana, submetidas ao ensaio de resistência à tração (ensaios realizados com oito corpos de prova).

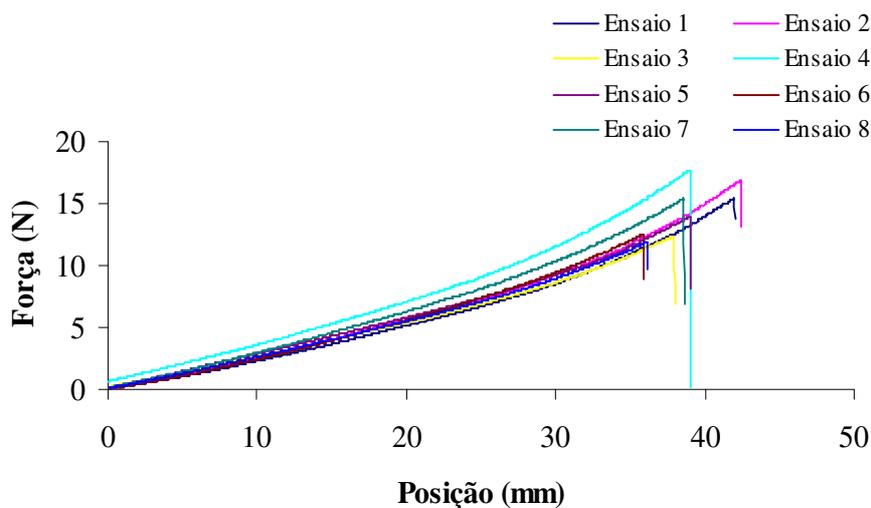


Figura 4.26 - Comportamento típico das membranas hidratadas somente de quitosana, submetidas aos ensaios de resistência à tração (ensaios realizados com oito corpos de prova).

As membranas de quitosana apresentaram valores de resistência à tração considerados adequados para a utilização como curativos temporários, uma vez que, como anteriormente explicitado, a pele humana normal apresenta valores de resistência à tração

entre 2,5 e 16 MPa (Wang *et al.*, 2002). Em adição, os valores de alongamento obtidos para as membranas de quitosana foram considerados satisfatórios para a finalidade proposta, já que a pele humana normal apresenta alongamento na ruptura de aproximadamente 70% (Hansen e Jemec, 2002) e valores de cerca de 85% foram obtidos.

Ambos os resultados referentes às membranas de quitosana-alginato foram inferiores aos apresentados pelas membranas somente de quitosana secas e hidratadas. Assim, se por um lado a adição de alginato atuou de maneira positiva na capacidade de absorção das membranas, tal adição não contribuiu da mesma forma para o aumento da resistência à tração. Além disto, uma vez que membranas compostas simultaneamente por quitosana-alginato formam uma rede polimérica fibrosa, era esperado que sua resistência à tração fosse inferior à apresentada pelas membranas somente de quitosana, a qual apresenta uma estrutura mais contínua e uniforme.

Mudanças semelhantes nas propriedades mecânicas de membranas secas e úmidas foram comentadas por Remuñan-López *et al.* (1997), que avaliaram a resistência mecânica de filmes úmidos de alginato e de quitosana preparados separadamente. Segundo tais autores, para os filmes de alginato, a tensão de ruptura apresentou uma queda de cerca de 4 vezes e o alongamento apresentou um aumento de cerca de 8,5 vezes em relação às mesmas amostras secas. Em adição, o tempo de hidratação dos filmes, de 30 min a 8 h, não influenciou de maneira acentuada nos valores obtidos para as propriedades mecânicas. Para filmes somente de quitosana, os autores observaram uma queda em ambas as propriedades mecânicas com relação às mesmas amostras secas.

4.7. Incorporação de bacitracina em membranas de quitosana-alginato

4.7.1. Seleção do solvente para dissolução do fármaco e sua incorporação na membrana

Como exposto anteriormente, a bacitracina é um antibiótico polipeptídico complexo que possui em sua forma comercial uma mistura de pelo menos nove componentes, sendo a bacitracina A o principal componente desta mistura (Sin e Wong, 2003; Pavli e Kmetec, 2001; Rogelj *et al.*, 2000; Merck Index, 1996). Este fármaco apresenta maior atividade e estabilidade na forma de sal de zinco, sendo esta a forma mais utilizada para fins farmacêuticos (Vaucher e Schapoval, 2003) e também a utilizada neste trabalho.

Uma vez que a adição do fármaco aos coacervados durante a etapa de preparação se apresentou inviável devido a provável degradação de parte do mesmo, durante a etapa de secagem das membranas, optou-se por incorporar o fármaco às membranas embebendo-se as mesmas em soluções aquosas contendo bacitracina por 24 h. Assim, a primeira etapa destes ensaios envolveu a seleção do solvente mais apropriado, considerando-se como candidatos água deionizada, solução salina e PBS. Para tal, avaliou-se a solubilidade atingida após 24 h a 4°C e a variação periódica do pH, visando detectar uma possível degradação do fármaco. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 4.15.

Os valores de pH da água deionizada e da solução salina sofreram alterações significativas imediatamente após a adição do fármaco, entretanto, após 7 dias de armazenamento a 4°C tais valores praticamente não apresentaram novas alterações. Por sua vez, o tampão PBS não apresentou alteração significativa mesmo após a adição do antibiótico, assim permanecendo até o final do período avaliado.

Tabela 4.15 - Valores de solubilidade do fármaco e do pH das soluções utilizadas, antes e após a adição da bacitracina.

Solvente	Solubilidade máx. (mg/mL)	pH após diferentes períodos de exposição			
		<i>t = 30 min</i>	<i>t = 1 h</i>	<i>t = 24 h</i>	<i>t = 7 dias</i>
Água deionizada (pH 4,97)	3,67	7,90	7,91	7,92	7,94
Solução salina (pH 5,91)	1,75	8,12	8,18	8,29	8,31
PBS (pH 7,40)	4,30	7,41	7,41	7,49	7,50

Com relação à solubilidade, segundo dados da literatura, a bacitracina é um fármaco altamente solúvel em água e álcool, sendo praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e acetona (Merck Index, 1996). Porém, dentre os solventes avaliados neste trabalho (água deionizada, solução salina e tampão PBS a pH 7,4), a bacitracina apresentou maior grau de solubilidade no tampão PBS do que em água deionizada.

A bacitracina possui em sua cadeia aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis. Neste contexto, através dos valores de pKa das cadeias laterais e do pI do fármaco, uma estimativa do grau de ionização do mesmo poderia ser realizada para um melhor entendimento do seu grau de solubilidade em cada solução. Porém, a simples análise de tais grupos ionizáveis através dos seus valores de pKa não é suficiente para determinar com segurança o grau de ionização do fármaco frente às soluções testadas, uma vez que tais

grupamentos podem ou não estar ionizados nos meios em questão, ou ainda, quando ionizados, estes aminoácidos podem estar envolvidos em ligações intra ou inter cadeias, ou em ligações com os contra-íons presentes nas soluções, não contribuindo de maneira efetiva para o favorecimento da solubilização do fármaco (Farfán, comunicação pessoal, 2007).

Simultaneamente a este ensaio, avaliou-se a estabilidade da membrana de quitosana-alginato nestes mesmos solventes para averiguar se a mesma não se desestabilizaria durante a incorporação do fármaco, verificando-se que a máxima perda de massa observada, de apenas 2,7%, ocorreu em solução salina.

Assim, através dos resultados relacionados à solubilidade do fármaco e à estabilidade do mesmo nas soluções testadas, optou-se por realizar os ensaios de incorporação do antibiótico nas membranas com soluções de bacitracina em PBS pH 7,4, sendo que a verificação da liberação deste fármaco após a incorporação foi realizada em dois solventes: água deionizada e tampão PBS.

4.7.2. Determinação do grau de desestruturação das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções aquosas

Uma vez que a quantificação do fármaco incorporado à membrana dependia diretamente da solubilização da mesma para a recuperação do fármaco, várias soluções foram testadas para tal finalidade. Para tanto, inicialmente, membranas de quitosana-alginato isentas de fármaco foram expostas a diversas soluções, sob agitação de 70 bpm a 37°C por 24 h. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 - Avaliação da desestruturação das membranas de quitosana-alginato em diferentes soluções.

Soluções	Perda de massa (%)
Ácido acético a 1 mol/L ⁻¹	11,55
Hidróxido de sódio a 1 mol/L ⁻¹	10,61
Tampão citrato de sódio a 55 mmol/L ⁻¹	7,86
Ácido clorídrico a 1 mol/L ⁻¹	13,00

Os resultados indicaram que as membranas de quitosana-alginato, mostraram-se bastante estáveis nas soluções testadas, apresentando perda mássica máxima de 13% em presença de ácido clorídrico. As amostras expostas às soluções ácidas permaneceram com

as mesmas características visuais iniciais, sendo que a perda mássica detectada pode ser atribuída à solubilização de cadeias de quitosana não complexadas com as cadeias de alginato quando em contato com tais soluções.

As amostras expostas à solução de NaOH a 1 mol/L^{-1} mostraram-se mais finas e sensíveis ao manuseio ao final do ensaio. Apesar disso, a perda mássica obtida não foi superior a 11%, sendo tal perda possivelmente atribuída ao deslocamento dos íons cálcio pelos íons sódio presentes na solução. Como anteriormente discutido, uma vez que os íons cálcio são utilizados para reticulação das cadeias de alginato não complexadas com a quitosana, estes, ao serem deslocados, poderiam ter promovido a perda mássica observada. De maneira geral, os resultados obtidos mostraram que a utilização de agitação (70 bpm) e de temperatura controlada (37°C), não favoreceu a solubilização das membranas (isentas de fármaco) em nenhuma das soluções testadas.

Assim, apesar de não se conseguir em nenhum dos ensaios uma desestruturação total e efetiva das membranas, o que seria necessário para confirmar com exatidão a quantidade de fármaco incorporado, supôs-se que a exposição das amostras a um excesso de água ou de PBS já seria suficiente para a recuperação do fármaco incorporado. Alternativamente, poder-se-ia determinar a percentagem de incorporação em relação à diferença na solução de partida.

4.7.3. Determinação da quantidade de bacitracina incorporada

Os resultados observados para a percentagem de bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato, com relação à diferença da concentração inicial de fármaco em solução, podem ser visualizados na Tabela 4.17.

Os valores obtidos para a incorporação de bacitracina variaram entre 11 e 25,5%, sendo tal variação dependente da concentração inicial de fármaco na solução. A solução de fármaco mais concentrada (ensaio 2) apresentou a menor percentagem de incorporação ($11,15\% \pm 0,89$), enquanto a maior percentagem de incorporação ($25,49\% \pm 2,87$) foi obtida para a solução de fármaco menos concentrada. (ensaio 1).

Tabela 4.17 - Percentagem de bacitracina incorporada nas membranas de quitosana-alginato.

Ensaio	Razão mássica bacitracina/membrana seca (g/g)		Eficiência de incorporação (%)
	Inicial	Final	
1	0,83 ± 0,02	0,21 ± 0,01	25,49 ± 2,87
2	2,21 ± 0,27	0,25 ± 0,03	11,15 ± 0,89

A menor concentração inicial do fármaco em solução pode ter favorecido a incorporação do mesmo nas membranas, uma vez que as moléculas de bacitracina podem ter penetrado mais facilmente na estrutura lamelar da membrana devido ao menor impedimento estérico entre as moléculas.

4.7.4. Avaliação da liberação da bacitracina incorporada às membranas

Os ensaios de liberação do fármaco foram realizados na presença de água deionizada a 37°C, visando garantir um alto grau de intumescimento das membranas, o que potencialmente, poderia contribuir para a liberação do fármaco incorporado. Paralelamente, ensaios de liberação em tampão PBS foram realizados, sendo tal tampão selecionado devido ao seu vasto uso em ensaios de liberação de fármacos (Öztürk *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2006; Loke *et al.*, 2000) e à proximidade com as características fisiológicas. Os resultados referentes à liberação da bacitracina incorporada, em água e em tampão PBS, encontram-se listados nas Tabelas 4.18 e 4.19, respectivamente.

Tabela 4.18 - Percentagem de bacitracina liberada das membranas de quitosana-alginato, em água.

Razão mássica inicial bacitracina/membrana (g/g)	Bacitracina liberada em água (%)		
	24 h	48 h	96 h
0,21 ± 0,01	8,67 ± 0,80	8,15 ± 1,15	8,56 ± 0,95
0,25 ± 0,03	20,18 ± 7,08	25,32 ± 6,43	27,55 ± 8,16

Uma variação na taxa de liberação do fármaco com relação à concentração inicial da solução de incorporação foi observada, quando da realização dos ensaios em água. A solução inicial de incorporação mais concentrada (ensaio 2), apresentou os maiores valores de liberação, cerca de 27,6% após 96 h do início do ensaio. Por sua vez, as membranas

expostas à solução de fármaco de menor concentração (ensaio 1) apresentaram liberação máxima de cerca de 8,6% do fármaco incorporado, mesmo após 96 h de contato com a água. Tal comportamento assemelha-se ao descrito por Öztürk *et al.* (2006), que observaram que as maiores taxas de liberação de ciprofloxacina foram obtidas quando da utilização inicial de concentrações maiores deste fármaco, sendo que tais liberações variaram entre 53 e 92% dependendo das condições envolvidas nos ensaios.

Tabela 4.19 - Percentagem de bacitracina liberada das membranas de quitosana-alginato, em tampão PBS.

Razão mássica inicial bacitracina/membrana (g/g)	Bacitracina liberada em PBS (%)		
	24 h	48 h	96 h
0,21 ± 0,01	21,42 ± 1,32	23,85 ± 2,59	22,81 ± 0,50
0,25 ± 0,03	28,17 ± 6,05	29,62 ± 6,72	30,21 ± 6,61

Por sua vez, as amostras expostas ao tampão PBS comportaram-se de maneira bastante diferente, uma vez que independentemente da concentração de fármaco utilizada na solução de incorporação, liberações variando entre 21,42 e 28,17% foram obtidas nas primeiras 24 h. Após 96 h do início do ensaio, obteve-se uma liberação máxima de 30,21% do fármaco incorporado. Em adição, as amostras expostas ao PBS apresentaram liberações superiores com relação à água em todos os períodos, fato este possivelmente explicado pela maior desestabilização da estrutura das membranas e pela boa solubilidade do fármaco no meio em questão.

Dong *et al.* (2006) destacaram que o pH dos meios utilizados atua sobre a liberação dos fármacos, tendo tais autores obtido liberações de cerca de 60% em pH 5,0 e de cerca de 75% em pH 7,4 para o antibiótico ciprofloxacina. Em adição, segundo tais autores, as membranas de alginato-gelatina expostas a diferentes períodos de reticulação variando de 5 a 30 minutos apresentaram taxas de liberação de ciprofloxacino entre 100% e 52,4%, respectivamente, sugerindo que o período de reticulação das membranas pode influenciar de maneira direta na liberação do fármaco incorporado, quando realizada posteriormente à incorporação do mesmo.

Apesar do ensaio ter sido realizado por até 96 h, percentagens significativas da bacitracina permaneceram incorporadas às membranas de quitosana-alginato. A Tabela 4.20 apresenta as prováveis quantidades de bacitracina não liberadas durante os ensaios de

liberação realizados em água e em PBS, valores estes estimados a partir dos valores de incorporação obtidos experimentalmente no ensaio descrito no item 4.7.3.

Tabela 4.20 - Prováveis quantidades de bacitracina retidas nas membranas durante os ensaios de liberação.

Razão mássica inicial bacitracina/membrana (g/g)	Bacitracina retida nas membranas (%)	
	Água (96 h)	PBS (96 h)
0,21 ± 0,01	91,44	77,19
0,25 ± 0,03	72,45	69,79

Observou-se que quantidades entre 69,8 e 91,4% do fármaco incorporado não foram liberadas mesmo após 96 h do início do ensaio. Lai *et al.* (2003) obtiveram uma liberação lenta do paracetamol incorporado a esponjas de quitosana-alginato, sendo que após 24 h, apenas as esponjas preparadas com estes polímeros isolados apresentaram liberação completa do fármaco, enquanto as esponjas compostas simultaneamente de quitosana-alginato apresentaram liberação de cerca de 70% do fármaco incorporado.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a bacitracina incorporada pode ter interagido com a estrutura das membranas de maneira relativamente estável, dificultando sua liberação. Ressalta-se que frente aos resultados observados, a adição de um agente porogênico durante a etapa de preparação das membranas poderia atuar de maneira positiva, auxiliando na liberação do fármaco incorporado.

4.7.5. Avaliação da morfologia e das propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato após incorporação de bacitracina

Com o intuito de verificar possíveis mudanças na morfologia das membranas após sua exposição ao fármaco, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 4.27 apresenta as imagens típicas obtidas. Através dos cortes transversais, verificou-se a presença de material incorporado à membrana. Em adição, as imagens de superfície mostraram apreciável erosão das membranas, fato este não visualizado nas microscopias de superfície obtidas anteriormente (Figura 4.8) para membranas iguais, livres do fármaco.

Uma vez que as membranas não foram lavadas após sua imersão em tampão PBS contendo bacitracina antes da etapa de liofilização necessária para a realização da análise, o composto visualizado poderia ser decorrente da deposição dos sais do tampão na superfície das membranas, sendo o mesmo responsável pela alteração morfológica na superfície destas. Diante de tal suposição, uma série de novas micrografias foi obtida para verificação da atuação do tampão PBS e do fármaco, de forma isolada, na morfologia das membranas. As Figuras 4.28, 4.29, 4.30 e 4.31 mostram os resultados obtidos.

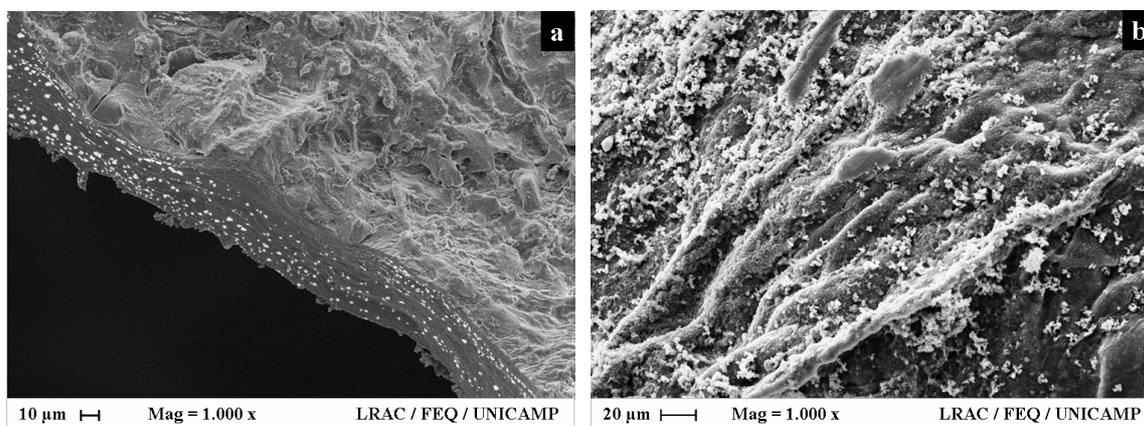


Figura 4.27 - Membrana exposta ao tampão PBS contendo 3,12 mg/mL de bacitracina por 24 h: a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).

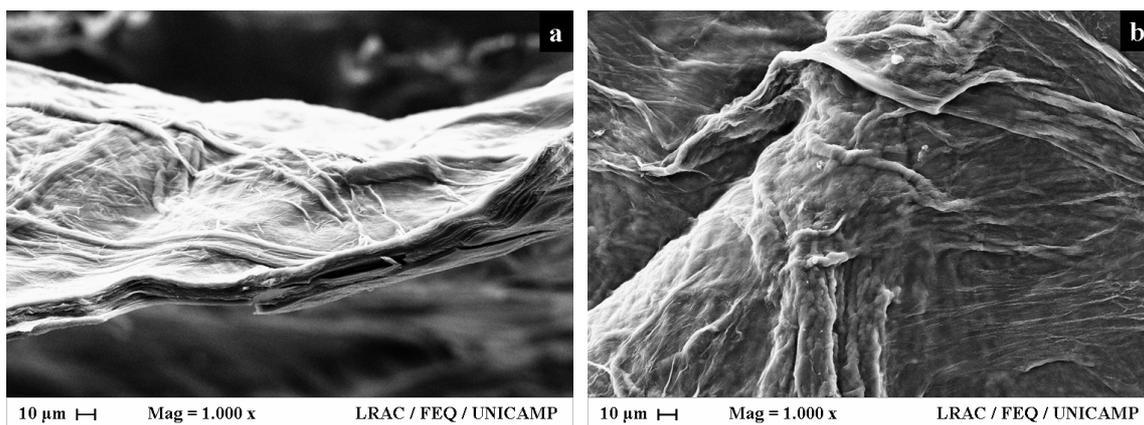


Figura 4.28 - Membrana exposta por 24 h à solução de bacitracina em água a 1,60 mg/mL: a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).

Através da análise conjunta das micrografias, constatou-se que a substância incorporada às membranas verificada na Figura 4.27, provavelmente não se referia majoritariamente ao fármaco e sim aos sais do tampão, uma vez que as micrografias contendo a membrana exposta somente ao tampão na ausência de fármaco (Figuras 4.29 e 4.30) apresentaram características similares às encontradas na Figura 4.27. As micrografias das membranas expostas à bacitracina em água (Figura 4.28) não apresentaram o mesmo padrão de imagem quando da presença do tampão PBS (Figuras 4.28, 4.29 e 4.30).

Destaca-se, entretanto, que a quantidade de material precipitado observado em ambas as imagens (Figuras 4.29 e 4.30), apresentava-se em menor proporção quando comparada à da Figura 4.27. Após a lavagem da membrana exposta à solução de bacitracina/PBS com água deionizada, observou-se a presença de pouco material depositado (Figura 4.31).

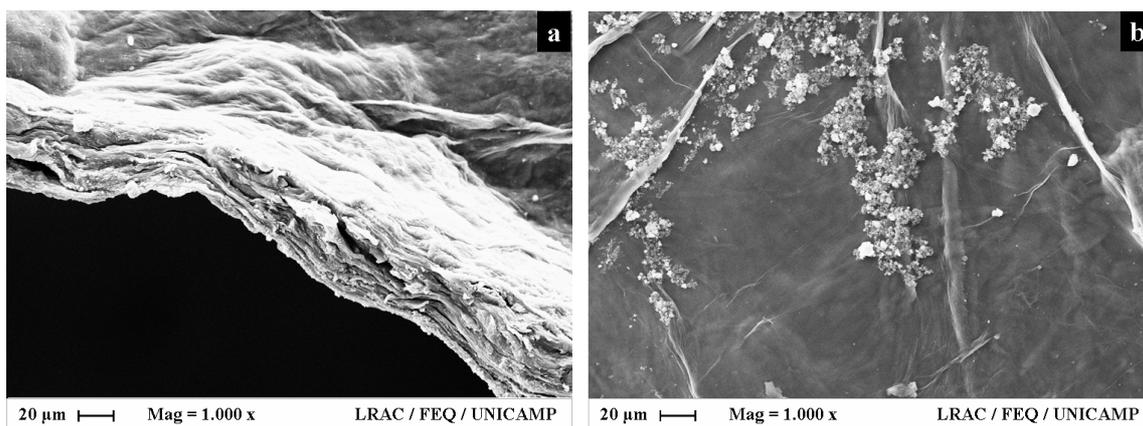


Figura 4.29 - Membrana exposta por 24 h ao tampão PBS na ausência do fármaco (amostra lavada em água deionizada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).

Em adição as membranas expostas a soluções aquosas de bacitracina foram analisadas com relação as suas propriedades mecânicas. Os resultados obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura, para membranas de quitosana-alginato expostas a soluções aquosas de bacitracina a 3,5 mg/mL, foram de cerca de $17,3 \pm 7,9$ MPa e $4,3 \pm 0,95\%$, respectivamente. Ambos os valores encontrados após a incorporação do fármaco foram inferiores aos observados para amostras isentas de bacitracina (27,7 MPa e

8,42%), sendo que tais resultados, sugerem que a incorporação da bacitracina pode ter promovido uma redução na capacidade das membranas em suportar tensões. Desta forma, a estrutura polimérica pode romper-se com maior facilidade nos locais onde o fármaco fora incorporado, reduzindo assim, a resistência à tração e o alongamento na ruptura das membranas avaliadas.

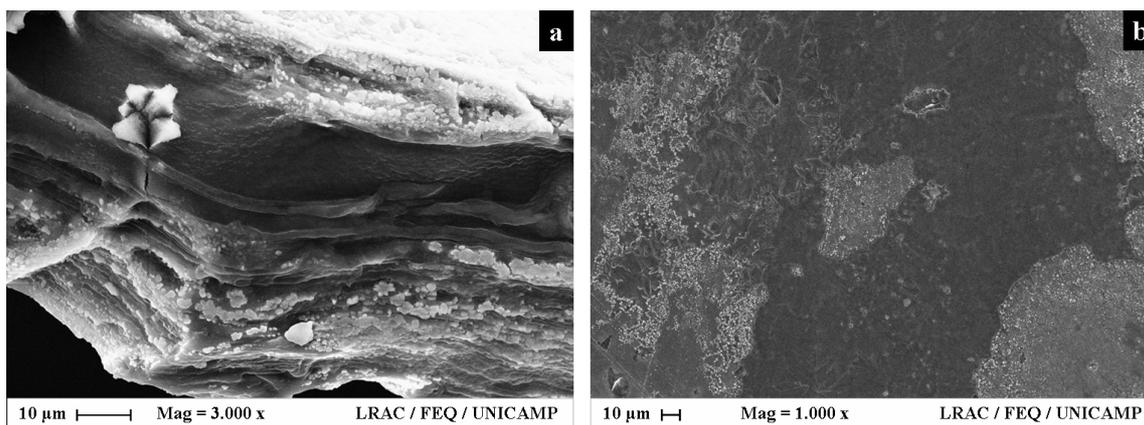


Figura 4.30 - Membrana exposta por 24 h ao tampão PBS na ausência do fármaco (amostra não lavada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 3000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).

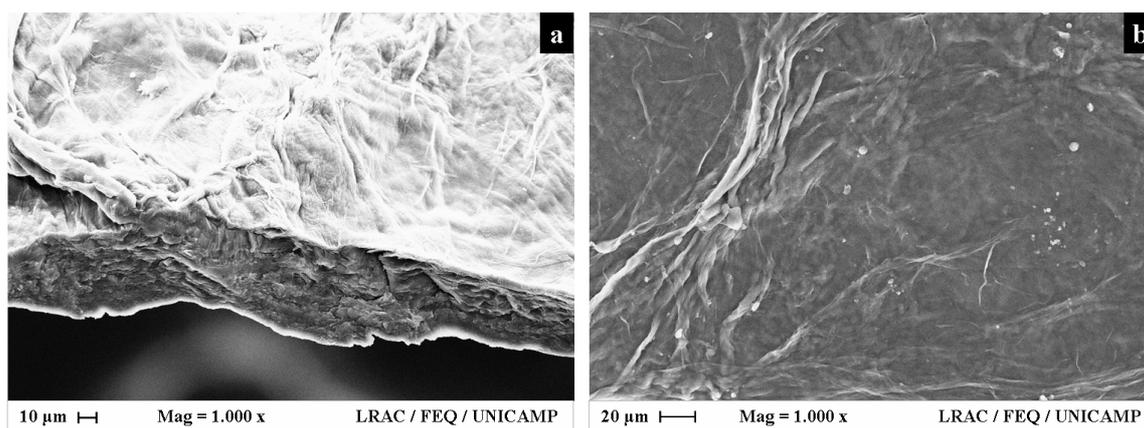


Figura 4.31 - Membrana exposta por 24 h à solução de bacitracina em tampão PBS, a 3,12 mg/mL (amostra lavada com água deionizada antes da liofilização): a) fratura (aumento de 1000 x); b) superfície (aumento de 1000 x).

Apesar das análises realizadas por MEV e dos ensaios de resistência mecânica não terem sido capazes de indicar de maneira inequívoca a incorporação do fármaco nas membranas, observou-se uma clara mudança nas propriedades das membranas expostas ao fármaco. Assim, ensaios de avaliação da eficácia biológica pela inibição de crescimento microbiano foram realizados com as amostras contendo bacitracina, com o objetivo de confirmar sua incorporação e sua estabilidade.

4.7.6. Formação de halo de inibição por membranas de quitosana-alginato contendo bacitracina

Os ensaios de halo de inibição foram realizados com o intuito de confirmar se a bacitracina fora, de fato, incorporada à membrana e, se o antibiótico havia sofrido algum tipo de degradação não detectada ao longo dos ensaios de incorporação, perdendo, assim, sua atividade biológica. Para este ensaio utilizaram-se amostras de membranas de quitosana-alginato expostas a três soluções contendo bacitracina, sendo que em duas o fármaco estava solubilizado em tampão PBS nas concentrações 3,12 mg/mL (Solução 1) e 2,20 mg/mL (Solução 2), e na outra, a bacitracina estava solubilizada em água na concentração de 1,61 mg/mL (Solução 3).

O efeito antimicrobiano de um curativo, geralmente, é realizado utilizando-se as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Porém, uma vez que a bacitracina é conhecida e efetiva contra bactérias Gram-positivas, este ensaio foi realizado somente na presença da bactéria *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.21.

Os resultados indicaram que houve incorporação de bacitracina nas membranas de quitosana-alginato e que o fármaco não sofreu alterações consideráveis, uma vez que todas as amostras formaram halos de inibição de 9 a 11 mm (Figuras IIIA, IIIB e IIIC no Anexo III). Deve-se ressaltar que as amostras submetidas à lavagem após a incorporação apresentaram halos 2 mm menores, sugerindo assim que, durante a lavagem, parte do fármaco incorporado nas membranas pode ter sido removido.

O aumento da concentração da solução de bacitracina não resultou em aumento no efeito antimicrobiano, fato este que condiz com o observado por Baker *et al.* (1986), que relataram que a utilização de discos de bacitracina contendo 0,04 U, 2 U e 10 U por disco,

não resultou em aumento do halo de inibição formado quando os discos com potências maiores foram usados.

Tabela 4.21 - Halos de inibição formados em meio de cultura inoculados com *Staphylococcus aureus*. As amostras foram divididas em dois grupos: amostras não lavadas após a incorporação do fármaco e amostras lavadas após a incorporação (água deionizada por 30 minutos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Amostra	Halo (mm)		
	placa 1	placa 2	placa 3
<i>Solução (3,12 mg/mL)</i>			
Não lavada	11	11	11
Lavada	9	9	9
<i>Solução (2,20 mg/mL)</i>			
Não lavada	11	11	11
Lavada	9	9	9
<i>Solução (1,61 mg/mL)</i>			
Não lavada	11	11	11
Lavada	9	9	9

Mi *et al.* (2003) verificaram que membranas assimétricas de quitosana impregnadas com sulfadiazina de prata, após uma semana, foram capazes de formar halos de inibição entre 7 e 15 mm para as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Porém, as amostras mostraram uma redução gradual na zona inibitória, sugerindo assim que apesar das membranas possuírem capacidade de controlar o crescimento bacteriano, a atividade antimicrobiana das mesmas diminui com o aumento do tempo de incubação.

Yu *et al.* (2005) relataram a formação de halos de inibição entre 6 e 16 mm para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, quando da avaliação de PECs contendo sulfadiazina de prata incubados em meio de cultura. Tais resultados foram considerados satisfatórios pelos autores para supressão da proliferação bacteriana na proteção de feridas, sendo que a efetividade na inibição de ambos os microrganismos pode ser atribuída a dois fatores: o primeiro relacionado ao composto incorporado às membranas e, o segundo relacionado à desestruturação do complexo quitosana-alginato, o qual pode ser gradualmente rompido sob incubação, liberando assim, alginato e quitosana na forma livre. Conforme já discutido, uma vez livre, a quitosana, que é um polieletrólito positivamente carregado, poderia se ligar com as cargas negativas dos componentes da parede celular das bactérias Gram negativas e

Gram-positivas, sendo que tais interações poderiam levar à desestruturação da parede e à liberação de constituintes intracelulares das bactérias (Yu *et al.*, 2005).

No entanto, a partir dos resultados obtidos para as membranas de quitosana-alginato preparadas na ausência da bacitracina, relatados no item 4.2.8, conclui-se que provavelmente, não houve desestabilização do complexo quitosana-alginato, não ocorrendo, portanto, efeito bactericida ou bacteriostático decorrente de cadeias livres de quitosana.

Assim, pode-se inferir que os halos de inibição obtidos (de 9 a 11 mm) para as membranas preparadas neste trabalho foram comparáveis com os encontrados na literatura consultada para membranas contendo sulfadiazina de prata (Yu *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2003), sugerindo que as membranas com bacitracina possuem potencial para assegurar proteção contra a proliferação de bactérias Gram-positivas junto ao leito da lesão, além de prevenir sua penetração através do curativo.

4.7.7. Avaliação da capacidade de permeação da bacitracina através das membranas de quitosana-alginato

Os ensaios de permeação podem ser considerados úteis para simular o desempenho de uma membrana em situações nas quais se deseja aplicar o fármaco em feridas já recobertas com o curativo. Assim, visando avaliar a habilidade de transporte de agentes ativos ao longo de sua espessura, as membranas foram submetidas a um estudo de permeação utilizando-se bacitracina em solução. As análises quantitativas do fármaco permeado foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), estando os resultados obtidos ilustrados nas Figuras 4.32 e 4.33.

Os cromatogramas obtidos mostraram que não houve separação adequada da bacitracina com a coluna utilizada, impossibilitando assim, determinar quantitativamente o fármaco permeado através das membranas. Além disto, a amostra controle, isenta de fármaco (Figura 4.32 b), apresentou perfil cromatográfico semelhante ao das amostras contendo bacitracina (Figuras 4.32 a, 4.33 a e 4.33 b), sugerindo assim, que o pico cromatográfico observado poderia ser referente a um possível constituinte da membrana, liberado durante a permeação e não somente ao fármaco.

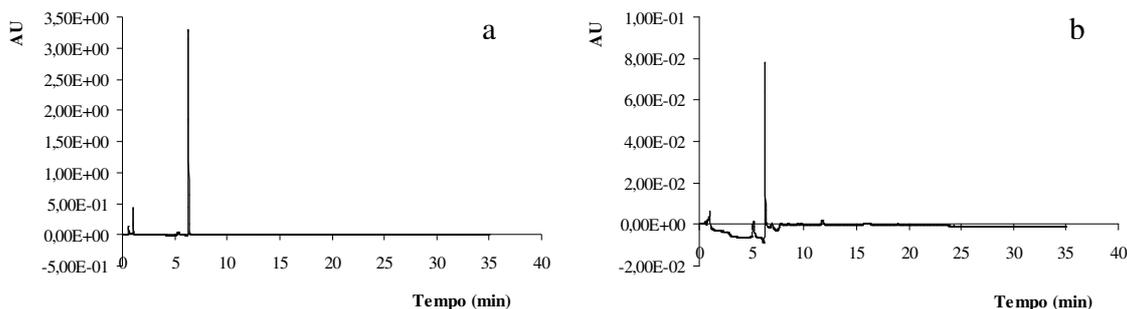


Figura 4.32 - Ensaio realizado de acordo com o procedimento fornecido pela Fluka (Suíça). a) solução inicial de bacitracina 3,6 mg/mL; b) amostra controle (membrana sem adição do fármaco). Condições experimentais: Symetry 150 x 4,6 mm DI C18 / MeCN:Ácido Fosfórico 0,01M em gradiente / 25°C / vazão 2,0 mL/min, detecção a 254 nm.

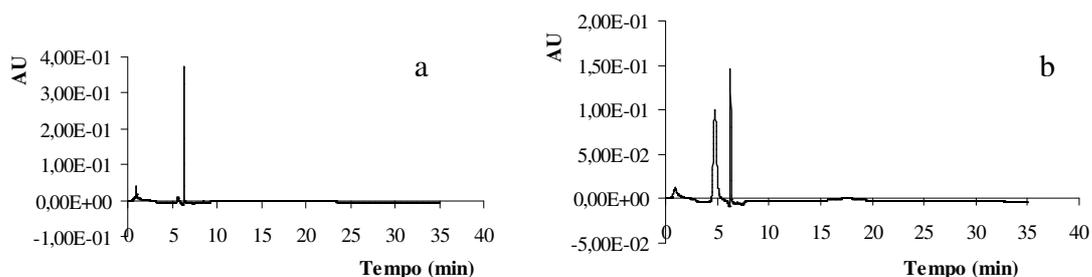


Figura 4.33 - Ensaio realizado de acordo com o procedimento fornecido pela Fluka (Suíça). a) amostra permeada oclusivo; b) amostra permeada não oclusivo. Condições experimentais: Symetry 150 x 4,6 mm DI C18 / MeCN:Ácido Fosfórico 0,01M em gradiente / 25°C / vazão 2,0 mL/min, detecção a 254 nm.

Destaca-se que apesar de se ter utilizado a fase móvel e as condições sugeridas pelo fabricante do fármaco em questão, visando à possibilidade de se realizar uma comparação direta dos cromatogramas aqui obtidos com os fornecidos pelo certificado de análise do produto (padrão secundário), não se dispunha exatamente da coluna indicada pela Fluka para a determinação da bacitracina, podendo tal fato estar diretamente relacionado aos resultados obtidos. Uma vez que colunas de marcas diferentes apresentam características distintas no que se refere à alcalinidade, ao tamanho de partículas e à porosidade da fase estacionária, a reprodução exata dos cromatogramas para determinação da bacitracina foi

dificultada, impossibilitando assim, uma análise comparativa direta com os cromatogramas fornecidos pelo fabricante.

Assim, frente aos resultados acima descritos, uma nova abordagem foi realizada visando determinar de maneira efetiva a percentagem de fármaco permeado através das membranas de quitosana-alginato. Para tanto, alíquotas das amostras permeadas foram submetidas a um método de análise físico-químico para doseamento de bacitracina, o qual se baseia na determinação espectrofotométrica de complexos de cobre formados com a bacitracina (Vaucher e Schapoval, 2003). Segundo os autores, a bacitracina zínica apresenta em sua estrutura centros de nucleofilia bem definidos, como os grupamentos amino e átomos de nitrogênio em anéis heterocíclicos, sendo estes centros responsáveis pela quelação do Cu^{+2} , produzindo um complexo azul de intensidade variada conforme a concentração do antibiótico.

Neste contexto, os resultados obtidos através da análise colorimétrica da fase receptora, com sulfato de cobre, indicaram valores de permeação de bacitracina entre 13,8 e 16,4%, após 24 h do início do ensaio.

Segundo Macleod *et al.* (1999), vários fatores podem influenciar a permeabilidade de membranas poliméricas a fármacos, incluindo o tamanho da molécula do fármaco, o estado de ionização das drogas e o grau de reticulação da membrana. Tais autores avaliaram a permeabilidade do paracetamol através de membranas de pectina-quitosana, tendo observado que a permeabilidade das membranas preparadas nas proporções pectina-quitosana 2:1 e 3:1 foram consideravelmente menores que as daquelas preparadas na proporção 1:1. Estudos de permeação realizados por Liang *et al.* (2007), mostraram que a permeabilidade das drogas através das membranas, diminui com o aumento da massa molecular ou do raio molecular dos fármacos. Além disto, tais autores observaram a influência do conteúdo de quitina na permeabilidade de membranas compostas de celulose-quitina, sendo que a permeabilidade ao fármaco cefazolina de sódio, por exemplo, aumentou com o aumento do conteúdo de quitina, uma vez que altos conteúdos de quitina produzem poros maiores, conferindo alta porosidade a membranas de celulose-quitina e, conseqüentemente, aumento na permeabilidade.

Desta forma, os resultados obtidos para o ensaio de permeação, foram considerados relativamente baixos, sugerindo que a permeação da bacitracina pode ter sido dificultada

pela própria estrutura lamelar das membranas e/ou ainda, pela interação entre o fármaco e a membrana.

4.8. Ensaio *in vivo*

Uma vez que as membranas formadas somente por quitosana ou simultaneamente por quitosana-alginato visam ser utilizadas como coberturas nos processos de reparação de lesões, sejam elas externas ou internas, a realização de ensaios *in vivo* se mostra de grande relevância.

Neste contexto, as membranas de quitosana-alginato e as somente de quitosana tiveram seu desempenho avaliado *in vivo*, no tratamento da lesão cutânea de um felino. Na avaliação da prevenção de adesão peritoneal, entretanto, somente as membranas de quitosana foram utilizadas, visto que apresentam propriedades mecânicas mais apropriadas que as de quitosana-alginato para a finalidade proposta, e dificultam a adesão celular.

*4.8.1. Desempenho *in vivo* das membranas de quitosana e de quitosana-alginato no tratamento de lesão cutânea em felino*

Conforme já mencionado no item 3.2.7.18, uma gata apresentando uma lesão infeccionada, causada por mordida de animal, foi tratada subseqüentemente com membranas de quitosana nas primeiras 48 h, membranas de quitosana e alginato entre o 2º e o 14º dias e, novamente, por membranas somente de quitosana do 14º dia em diante, fixadas à pele sadia com cola de cianoacrilato. Os filmes foram trocados em intervalos de 48, 72 horas, quatro, sete, 14, 21 e 24 dias, sendo que durante o tratamento da lesão, os filmes foram utilizados na seguinte seqüência: filmes somente de quitosana até 48 h, filmes de quitosana e alginato entre o segundo dia e o 14º dias e filmes somente de quitosana do 14º dia em diante.

Os resultados e observações seguintes foram disponibilizados gentilmente pela equipe do Departamento de Medicina Veterinária (Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás), que realizou em parceria esta parte do estudo aqui relatado.

Segundo informações coletadas pela equipe clínica, apesar do animal apresentar redução de peso, a ferida se apresentava em condições de receber o tratamento com os

filmes de quitosana-alginato e/ou quitosana, embora houvesse secreção purulenta intensa sobre a mesma. A Figura 4.34, mostra as condições e dimensões da ferida antes da colocação da membrana de quitosana-alginato (a) e após a colocação da mesma (b).

A temperatura corpórea, dentro da faixa normal para a espécie, sugeria que o processo infeccioso era localizado. Durante as trocas do filme foram realizadas lavagens da ferida com solução de NaCl e sua avaliação quanto à resolução da infecção. A cola de cianoacrilato não interferiu na cicatrização, colaborando apenas para que fragmentos de filme ficassem aderidos sobre a pele íntegra, sofrendo desprendimento espontâneo posterior, sem trauma para o animal. Com o intuito de auxiliar a aderência do filme sobre a superfície da ferida e para evitar que o animal removesse a membrana, uma vez que não foi adotado o colar elizabetano, uma bandagem foi utilizada sobre a mesma.



Figura 4.34 - a) Gata com ferida contaminada na região lateral abdominal direita, ocasionada por mordida; b) ferida coberta com membrana de quitosana-alginato.

O filme à base de quitosana-alginato, além de absorver a secreção, estimulou a produção de colágeno e também favoreceu a reepitelização (Figura 4.35 a), visto que a ferida já evidenciava granulação e epitelização 48 horas após a colocação do filme. A perda do tecido subcutâneo na gata era considerável, o que poderia sugerir um longo tempo de tratamento convencional com bandagens oclusivas. As bordas irregulares da lesão e a bolsa ventral não foram corrigidas cirurgicamente. No entanto, o fechamento da ferida ocorreu sem complicações, sendo o animal liberado 30 dias após o início do tratamento. Uma redução acentuada da ferida pode ser verificada após 72 h (Figura 4.35 b).

Conforme sugerem Stashak *et al.* (2004), uma bandagem deve manter a ferida úmida e aquecida. Os filmes de quitosana e quitosana-alginato usados como bandagens

atenderam adequadamente a esta exigência por serem fundamentalmente hidrofílicos. O acúmulo de moléculas de água na ferida reduz o risco de cicatriz hipertrófica (Tucci *et al.*, 2001), sendo que o calor permite que a ferida cicatrize mais rapidamente e com maior força tênsil do que em temperatura ambiente (Hedlund 2002).



Figura 4.35 - a) Ferida após 48 h apresentando margem epitelizante (seta) e desenvolvimento de tecido de granulação na superfície da ferida; b) redução acentuada da área da ferida após 72 h.

Quando necessário, a troca dos curativos foi facilmente realizada, sem grandes problemas de adesão ao leito da ferida e sem causar desconforto aparente ao animal.

De acordo com Pope (1996), os neocapilares em uma ferida cicatrizada por segunda intenção são muito frágeis e podem facilmente ser colabados em caso de traumatismos, resultando em hipoperfusão, o que gera um ambiente hipóxico e ácido, retardando a cicatrização. Esta afirmação reforça a necessidade de se evitar ao máximo os traumatismos decorrentes das trocas de bandagens e o uso de materiais não aderentes. A facilidade na remoção de filmes de quitosana foi também relatada por Khan e Peh (2003), os quais se referiram também ao benefício da transparência dos mesmos, fator que permite o monitoramento diário da ferida. Tais autores salientaram ainda que, à medida que o processo cicatricial vai se completando, ocorre o ressecamento do filme, o que foi também observado no tratamento em questão.

Segundo Ueno *et al.* (1999), as membranas de quitosana estimulam a infiltração de células polimorfonucleares na ferida, predominantes durante a fase inflamatória da cicatrização, sendo que tais células têm por função destruir as bactérias presentes (Probst & Bright, 1989). No presente relato, notou-se que a resolução da infecção foi progressiva,

embora não se possa descartar a importância da terapia antibiótica sistêmica instituída (doses de 20 mg/kg de Amoxicilina intramuscular a cada 48 horas).

Assim, diante dos dados obtidos, os filmes de quitosana e quitosana-alginato foram eficazes para o tratamento de ferida aberta contaminada em uma gata, promovendo a formação de um tecido saudável de granulação, rápida epitelização (Figura 4.36 a) e cicatrização evidente aos 30 dias (Figura 4.36 b). Após 50 dias do início do tratamento, a ferida estava completamente recuperada, o animal apresentava ausência de cicatrização hipertrófica e crescimento normal dos pêlos (Figura 4.37), o que, de acordo com os profissionais da Universidade Federal de Goiás envolvidos neste estudo, constitui-se em um excelente resultado.



Figura 4.36 - a) Ferida após 14 dias com avanço da margem epitelizante na região da lesão; b) ferida após 30 dias.

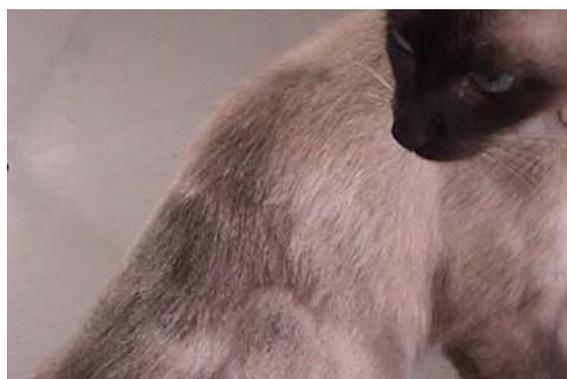


Figura 4.37 - Ferida após 50 dias de tratamento com membranas de quitosana e quitosana-alginato.

4.8.2. Prevenção da aderência peritoneal em ratas quando da utilização das membranas de quitosana

Conforme já mencionado, apesar do risco potencial de indução de aderências decorrentes da introdução de um corpo estranho na cavidade peritoneal, os defeitos da parede abdominal, como as hérnias, requerem correção, freqüentemente com implantes de biomateriais. Neste contexto, um material comumente utilizado é a tela de polipropileno, a qual apesar da sua boa aceitação tecidual desencadeia reação de corpo estranho e formação de aderências, sendo que estas, geralmente, ficam em contato direto com as alças intestinais (Bellón *et al.*, 2001). Como consequência, as aderências causam dores abdominais crônicas, obstrução intestinal, e infertilidade no ser humano, além de aumentarem o tempo cirúrgico em seus portadores e as dificuldades técnicas decorrentes das adesiólises (Cheong *et al.*, 2001; Canis *et al.*, 2001; Binda *et al.*, 2003; Avital *et al.*, 2004; Sulaiman *et al.*, 2001; Proudman 2007).

Os resultados apresentados a seguir referem-se a estudos realizados também em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Neusa Margarida de Paulo docente do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, fundamentando-se no uso de membranas somente de quitosana para prevenção de aderência peritoneal, já que estas são capazes de eficientemente prevenir a adesão de células *in vitro* e apresentam resistência mecânica adequada. Neste sentido, uma vez que as membranas de quitosana-alginato apresentaram-se relativamente frágeis e permitiram adesão celular na presença de inóculos com altas concentrações celulares, optou-se por não utilizá-las nestes ensaios.

Como anteriormente explicitado, os ensaios foram conduzidos em 15 ratas Wistar pesando entre 250 e 300 g, sendo que os animais foram divididos em três grupos de cinco animais cada. Os animais do grupo Q foram tratados com filmes somente de quitosana, os do grupo QP foram tratados com filmes de quitosana associados à tela de polipropileno e os do grupo P foram tratados somente com a tela de polipropileno. Os animais implantados foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, no 8º dia pós-operatório, sendo que os fragmentos dos sítios implantados foram colhidos para avaliações histopatológicas.

O exame macroscópico da cavidade abdominal revelou que duas ratas pertencentes ao Grupo Q apresentaram aderências entero-entéricas. Porém, deve-se ressaltar que a metodologia utilizada, abrasão intestinal produzida pela escova interdental, visava à

promoção de um forte estímulo à formação de aderência, funcionando assim como um gatilho adicional para indução das mesmas, associado à implantação do corpo estranho, sendo estes resultados considerados normais. Frente a estímulos tão consideráveis, o material implantado poderia exibir o seu verdadeiro potencial de prevenção ou de minimização da formação e intensidade das aderências.

Outros dois animais pertencentes ao Grupo Q apresentaram aderências frouxas sobre os pontos de sutura, sendo que todos os animais apresentaram o peritônio sub-implantar liso e mesotelizado, como pode ser visualizado na Figura 4.38.

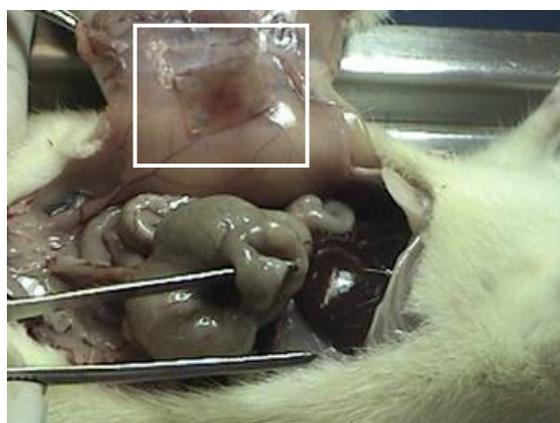


Figura 4.38 - Filme à base de quitosana (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.

Em quatro animais do Grupo QP foram observadas aderências frouxas sobre os pontos de sutura, as quais podem ser consideradas normais e esperadas. Em todos os animais, a tela de polipropileno se apresentou peritonizada, não permitindo a sua visualização quando da remoção do filme (Figura 4.39). Todos os animais no Grupo P apresentaram aderências intestinais sobre a tela (Figura 4.40) sendo que, em um deles, ocorreu aderência hepática sobre a mesma.

Os resultados observados indicaram que as membranas, associadas ou não à tela de polipropileno possuem potencial para prevenir a formação de aderências peritoneais. Em adição, a aderência observada sobre os pontos de sutura sugere que se mesmo após o estímulo, as vísceras não se aderiram à membrana e sim aos nós aplicados, o que seguramente garante o efeito de barreira. Assim, uma vez que os fios de sutura, por menos adesiogênicos que possam ser ainda são considerados corpos estranhos, sempre haverá

aderências sobre os mesmos, sendo estas na maioria das vezes esperadas. E, desde que não haja comprometimento funcional, este tipo de aderência não é o mais preocupante.

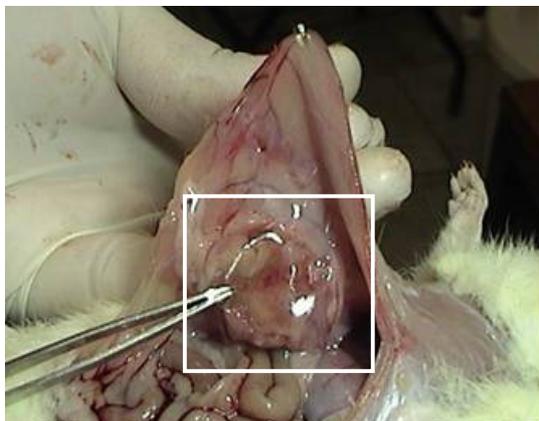


Figura 4.39 - Filme à base de quitosana elevado sobre tela de polipropileno (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.

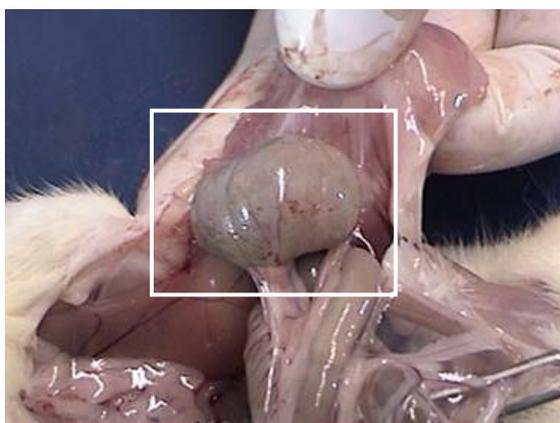


Figura 4.40 - Aderência do ceco, jejuno e fígado sobre tela de polipropileno (detalhe), oito dias após implantação na parede abdominal de rata.

Nota-se que todas as aderências observadas na presença da membrana de quitosana foram do tipo frouxas, de fácil rompimento e não envolveram estruturas importantes. A tela de polipropileno que, na maioria das vezes promove uma intensa reação tissular, com liberação de mediadores da inflamação, quando blindada pela membrana de quitosana, foi eficientemente recoberta pela camada mesotelial nos primeiros oito dias da implantação, tempo este crucial na cronologia da formação das aderências.

As análises microscópicas realizadas nos animais do grupo P apresentaram próximo aos monofilamentos de polipropileno, a presença de células gigantes de caráter discreto a moderado e de macrófagos de caráter moderado. A fibroplasia foi observada entre e próximo aos monofilamentos de forma concêntrica à tela de polipropileno, sendo que, em 60% das amostras foi de caráter acentuado e, em 40%, moderado. Entre os monofilamentos da tela de forma concêntrica, foi verificada a presença de tecido conjuntivo fibroso de caráter moderado a acentuado, além de neovascularização discreta a moderada. O infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear de caráter moderado e difuso (Figura 4.41).

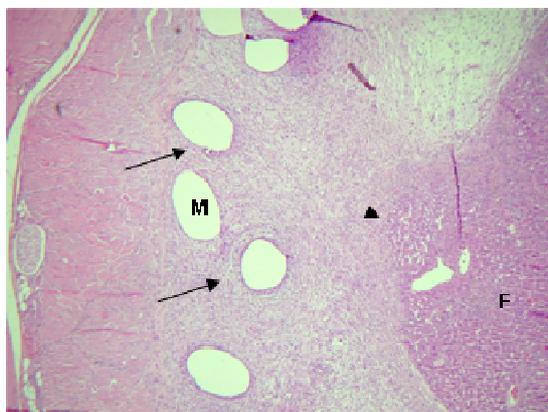


Figura 4.41 - Incorporação da tela de polipropileno (oitavo dia após o implante). Formação de tecido conjuntivo fibroso concêntrico (seta) aos monofilamentos (M). Área focal de aderência (cabeça de seta) hepática (F). Microscopia de campo claro 100 x, coloração HE.

No grupo QP, próximo aos monofilamentos de polipropileno observou-se a presença de células gigantes de caráter moderado a acentuado e de macrófagos de caráter acentuado. A fibroplasia entre e próximo aos monofilamentos da tela de polipropileno foi de caráter moderado e, na região abaixo ao filme à base de quitosana, esta proliferação foi acentuada. Entre os monofilamentos da tela foi verificada a presença de tecido conjuntivo fibroso de caráter moderado a acentuado e neovascularização moderada. O infiltrado inflamatório foi similar ao grupo P (Figura 4.42).



Figura 4.42 - Incorporação da tela de polipropileno associada à membrana de quitosana (oitavo dia após o implante).. Formação de tecido conjuntivo fibroso concêntrico (seta) aos monofilamentos (M). Mesotelização difusa da parede abdominal (cabeça de seta) Microscopia de campo claro 100 x, coloração HE.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as membranas de quitosana-alginato preparadas com acetona como co-solvente indicaram que membranas com espessuras adequadas, elevadas capacidades de absorção de água, perdas de massa máximas de 20 %, alta capacidade de drenagem, resistência à tração de até 31,14 MPa quando secas, capazes de atuarem eficientemente como barreira protetora contra a entrada de bactérias e não tóxicas ao crescimento celular, podem ser obtidas através da metodologia empregada.

A incorporação do plastificante glicerol não propiciou a formação de membranas com características mais apropriadas que as obtidas na ausência deste composto.

A bacitracina apresentou valores de incorporação, liberação e permeação nas membranas relativamente baixos, o que pode ser possivelmente atribuído ao excesso de fármaco adicionado e à grande quantidade de grupamentos, na estrutura do fármaco, passíveis de ligação iônica com a membrana, não permitindo sua adequada liberação e permeação. Porém, o fármaco incorporado às membranas apresentou atividade biológica residual apropriada.

Com relação aos ensaios *in vivo*, as membranas de quitosana-alginato, assim como as produzidas usando somente quitosana, apresentaram resultados satisfatórios em ambos os casos abordados, confirmando assim, seu bom potencial de uso como curativos.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

As sugestões para trabalhos futuros baseiam-se nas limitações observadas ao longo deste trabalho e na necessidade de melhorar certas características das membranas. Assim, sugere-se:

1. O estudo do aumento de escala para obtenção das membranas;
2. A avaliação da estabilidade de estocagem das membranas preparadas, por exemplo, na presença de glicerol.
3. A avaliação do uso de diferentes proporções e concentrações dos polímeros quitosana e alginato, bem como a ampliação das faixas de vazão e agitação utilizadas na preparação das membranas;

4. Avaliação da eficiência de incorporação de bacitracina em menores proporções mássicas iniciais, assim como a incorporação, liberação e permeação de outros fármacos;
5. Associação da quitosana e/ou o alginato a um polímero que atue favorecendo a melhoria das propriedades mecânicas das membranas.
6. Avaliação da utilização de membranas porosas de quitosana-alginato incorporando fármacos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott Laboratories. Cicatrização, 2005. Disponível em: <<http://www.venocur.com.br/site/content/cicatrizacao/default.asp>>. Acesso em 22 out. 2007.
2. Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 7241-7250, 2005.
3. Aimoli, C.G.; Nogueira, G.M.; Nascimento, L.S.; Baceti, A.; Leirner, A.A.; Maizato, M.J.S.; Higa, O.Z.; Polakiewicz, B.; Pitombo, R.N.M.; Beppu, M.M. Lyophilized Bovine Pericardium Treated With a Phenethylamine-Diepoxide as an Alternative to Preventing Calcification of Cardiovascular Bioprosthesis: Preliminary Calcification Results. *Artificial Organs*, v. 31(4), 278-283, 2007.
4. Alemdaroğlu, C.; Değim, Z.; Celebi, N.; Zor, F.; Öztürk, S.; Erdoğan, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, v. 32, p. 319-327, 2006.
5. American Society for Testing and Materials ASTM F 1927-07: *Standart test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector*, Philadelphia, 2007. 6 p.
6. American Society for Testing and Materials ASTM E 96/E 96 M-05: *Standart test method for water vapor transmission of materials*, Philadelphia, 2005. 11 p.
7. American Society for Testing and Materials ASTM D882-95a: *Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*, 1995.
8. Anal, A. K.; Stevens, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicilin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 290, p. 45-54, 2005.
9. Associação Brasileira de Defesa do Consumidor. *Os dados dos hospitais de referência e a cruel realidade de um serviço de atendimento a vítimas de queimaduras*. Disponível em: <www.proteste.org.br/private/44/448201_Attach.pdf>. Acesso em: 07 out. 2007.
10. Avital, S.; Bollinger, T. J.; Wilkinson, J. D.; Marchetti, F.; Hellinger, M. D.; Sands, L. R. Preventing intra-abdominal adhesions with polylactic acid film. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 48(1), p. 153-157, 2004.

11. Baker, J. S.; Hackett, M. F.; Simard, D. J. Variations in Bacitracin Susceptibility Observed in Staphylococcus and micrococcus Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 23(5), p. 963-964, 1986.
12. Balasubramani, M.; Kumar, T. R.; Babu, M. Skin substitutes: a review. *Burns*, v. 27, p. 534-544, 2001.
13. Basílio, P. C. Obstrução intestinal por aderências: utilização de membrana bio-reabsorvível (hialuronato de sódio + carboximetilcelulose) Seprafilm® na profilaxia de complicações em reoperações abdominopélvicas. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 23(3), p. 168-171, 2003.
14. Becherán-Marón L.; Peniche, C.; Argüelles-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.
15. Behar, D.; Juszynski, M.; Hur, N. B.; Golan, J.; Eldad, A.; Tuchman, Y.; Sterenberg, N.; Rudensky, B. Omiderm, a new synthetic wound covering: Physical properties and drug permeability studies. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20(6), p. 731-738, 1985.
16. Bellón, J. M.; García-Carranza, A.; Jurado, F.; García-Honduvilla, N.; Martin, A. C. S.; Buján, J. Peritoneal regeneration after Implant of a composite prosthesis in the abdominal wall. *World Journal of Surgery*, v. 25, p. 147-152, 2001.
17. Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Santana, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. *Polímeros*, v. 9(4), out-dez 1999.
18. Beraldo, P. S. S.; Nunes, L. G. N.; Silva, I. P.; Ramos, M. F. G. Sazonalidade de queimaduras por fogo, em pacientes admitidos numa unidade especializada do Distrito Federal, no período 1993-1996. *Revista Brasíla Médica*, v. 36, p. 72-81, 1999.
19. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34, 2004(a).
20. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52, 2004(b).

21. Bernabé, P.; Peniche, C.; Argüelles-Monal, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linkng. *Polymer Bulletin*, v. 55, p. 367-375, 2005.
22. Binda, M. M.; Molinas, C. R.; Koninckx, P. R. Reactive oxygen species and adhesion formation. *Human Reproduction*, v. 18(12), p. 2503-2507, 2003.
23. Bioware. Alginato (2003-2005). Disponível em: <<http://www.bioware.com.br/index.php?c=5&id=7>>. Acesso em: 15 de maio de 2008.
24. Boland, G. M.; Weigel, R. J. Formation and Prevention of Postoperative Abdominal Adhesions. *Journal of Surgical Research*, v. 132, p. 3-12, 2006.
25. Borrazzo, E. C.; Belmont, M. F.; Boffa, D.; Fowler, D. L. Effect of prosthetic material on adhesion formation after laparoscopic ventral hernia repair in a porcine model. *Hernia*, v. 8, p. 108-112, 2004.
26. Butler, C. E.; Prieto, V. G. Experimental. reduction of adhesions with composite AlloDerm/Polypropylene mesh implants for adbominal wall reconstructon. *Plastic Reconstructive Surgery*, v. 114(2), p. 464-473, 2004.
27. Calcium-Alginate-Dressings. 2004. Disponível em: <<http://www.psychosomatic-medicine.com/vitality-medical/Calcium-Alginate-Dressings.html>>. Acesso em: 17 out. 2007.
28. Campos, M. G.; Grosso, C. R. F.; Cárdenas, G.; Mei, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. *Macromolecular Symposia*, v. 229, p. 253-257, 2005.
29. Canella, A. M. N. C.; Garcia, R. B. Caracterização de Quitosana por Cromatografia de permeação em Gel - Influência do Método de Preparação e do Solvente. *Química Nova*, v. 24, 2001. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/publicacoes/quimicanova/qnol/2001/vol24n1>>. Acesso em: 17 fev. 2005.
30. Canis, M.; Botchorishvili, R.; Wattiez, A.; Rabischongm C.; Houlle, C.; Mage, G.; Pouly, J. L.; Manhes, H.; Bruhat, M. A. Prévention des adherences péritonéales. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction*, v. 30, p. 305-324, 2001.
31. Cárdenas, A.; Arguelles-Monal, W.; Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciapara, I.; Peniche, C. Diffusion Through Membranes of the Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromolecular Bioscience*, v. 3(10), p.535-539, 2003.

32. Catálogo de produtos Sigma-aldrich, Chitin from crab shells. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C9752>>. Acesso em: 01 out. 2007.
33. Catálogo de produtos Sigma-aldrich, Chitosan from crab shells. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C3646>>. Acesso em: 01 out. 2007.
34. Chan, L. W.; Lee, H. Y.; Heng, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 242, p. 259-262, 2002.
35. Cheong, Y. C.; Laird, S. M.; Shelton, J. B.; Ledger, W. L.; Cooke, I. D. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human Reproduction*, v. 7(6), p. 556-566, 2001.
36. Clasen, C.; Wilhelms, T.; Kulicke, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3210-3222, 2006.
37. Coleman, D. J.; McGhie, D.; Tebbutt, G. M. Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for the presumptive identification of Lancefield group A streptococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 30, p. 421-426, 1977.
38. Cotter G.; Adley, C. C. Comparison and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci Performed in Accordance with Six National Committee Standardized Disk Diffusion Procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39(10), p. 3753-3756, 2001.
39. Criança Segura Brasil. ABIB, Simone de Campos Vieira. Prevenção de Acidentes com Crianças. Artigo apresentado no I Fórum de Prevenção de Acidentes com Crianças, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.criancasegura.org.br/dados_acidentes.asp>. Acesso em 01 nov. 2007.
40. Dallan, P. R. M. *Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele*. 2005. 212f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, outubro de 2005.
41. Dinsmore, R. C.; Calton Junior W. C.; Harvey, S.B.; Blaney, M.W. Prevention of adhesions to polypropylene mesh in a traumatized bowel model. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 191(2), p. 131-136, 2000.

42. Dong, Z.; Wang, Q.; Du, Y. Alginate/gelation blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, v. 280, p. 37-44, 2006.
43. Duran, B.; Dogan, A. K.; Cetin, A.; Guvenal, T.; Cetin, M.; Imir, A. G. Reduction of postoperative adhesions by N,O Carboxymethylchitosan, and Spermine NONOate in Rats. *Experimental Animals*, v. 52(4), p. 267-272, 2003.
44. Dureja H., Tiwary A. K., Gupta S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 193-198, 2001.
45. Duron, J. J. The basic of peritoneal physiology for surgeons. Adhesions news and views. Disponível em <http://www.adept-and-adhesions.co.uk/anv/02The_basics_of.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2007.
46. Fan, L.; Du, Y.; Zhang, B.; Yang, J.; Zhou, J.; Kennedy, J. F. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. *Carbohydrate Polymers*, v. 65, p. 447-452, 2006.
47. Farfán, J. A. Informações sobre a bacitracina [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <Ana Paula Rodrigues> em set. 2007.
48. Farfán, J. A. *Química de Proteínas Aplicada à Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1990. 134 p. ISBN 85-268-0155-4.
49. Farzana, K.; Shah, S. N. H.; Butt, F. B.; Bukhsh, S. Biosynthesis of Bacitracin in Stirred Fermenter by *Bacillus licheniformis* Using Defatted Oil Seed Cakes as Substrate. *Journal of Research (Science)*, v. 15(3), p. 285-290, 2004.
50. Felt, O.; Furrer, P.; Mayer, J. M.; Plazonnet, B.; Buri, P.; Gurny, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 180(2), p. 185-193, 1999.
51. Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Nova York: Academic Press Inc., 1980.
52. Fluka Production GmbH Industriestrasse 25, CH-9470, Buchs, Switzerland. Análise de HPLC fornecida pela empresa para *bacitracin zinc salt* (11704). Lotes 1111119 (2004) e 1176731 (2005).
53. George M., Abraham T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.

54. Godin B., Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 365-379, 2004.
55. Greca FH, Paula JB, Biondo-Simões MLP, Costa FD, Silva APG, Time S, Mansur A. The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. *Hernia*, v. 5, p. 59-64, 2001.
56. Hansen, B. e Jemec, G.B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. *Archives of dermatology*, v. 138(7), p. 909-1011, 2002.
57. Hedlund C.S. *Cirurgia do sistema tegumentar*. In: *Cirurgia de Pequenos Animais*, 1. ed. São Paulo: Roca, 2002. cap.13, p. 101-162.
58. Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 3-12, 2002.
59. Hou Q., Walsh M. C., Freeman R., Barry J. J. A., Howdle S. M., Shakesheff K. M. Incorporation of proteins within alginate fibre-based scaffolds using a post-fabrication entrapment method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, p. 895-902, 2006.
60. Howell-Jones R. S., Wilson M. J., Hill K. E., Howard A. J., Price P. E., Thomas D. W. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, p. 143-149, 2005.
61. Hospital da Restauração. *Aumenta número de pacientes vítimas de queimaduras*, 2007. Disponível em: <http://www.saude.pe.gov.br/noticias.php?codigo=243&pagina=17&publicar=1>. Acesso em: 20 out. 2007.
62. Howling, G. I.; Dettmar, P. W.; Goddard, P. A.; Hampson, F. C.; Dornish, M.; Wood, E. J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, v. 22, p. 2959-2966, 2001.
63. Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa. Avaliação da susceptibilidade de bactérias Gram-negativas a antibióticos. Disponível em: <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=308&canal=5>. Acesso em: 27 jul. 2007.
64. International Standardization Organization ISO 10993-5(E). Biological evaluation of medical devices-Part 5- Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, 1992.

65. Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3(3), p. 303-311, 2000.
66. Khan, T. A. e Peh, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, v. 6(1), p. 20-26, 2003.
67. Kim, I.Y.; Yoo, M.K.; Seo, J.H.; Park, S.S.; Na, H.S.; Lee, H.C.; Kim, S.K.; Cho, C.S. Evaluation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer for wound dressing application. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341(1-2), p. 35-43, 2007.
68. Knill, C. J.; Kennedy, J. F.; Mistry, J.; Mirafteb, M.; Smart, G.; Grocock, M. R.; Williams, H. J. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, p. 65-76, 2004.
69. 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. Disponível em: <<http://www.life.kyutech.ac.jp/~tmiya/SBF-e.html>>. Acesso em: 23 de jun. de 2008.
70. Lai, H.L.; Abu'khalil, A.; Craig, D.Q.M. "The preparation and characterization of drug-loaded alginate and chitosan sponges". *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 175-181, 2003.
71. Lafepe Neomicina + Bacitracina: pomada. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco S/A. Pernambuco: LAFEPE, [s.d.]. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/medicamentos/antibioticos/neomicina_bacitracina.html>. Acesso em: 18 out. 2007.
72. Lee, J. W.; Kim, S. Y.; Kim, S. S.; Lee, Y. M.; Lee, K. H.; Kim S. J. Synthesis and Characteristics of Interpenetrating Polymer network Hydrogel Composed of Chitosan and Poly (acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 73, p. 113-120, 1999.
73. Leveque N., Makki S., Hadgraft J., Humbert Ph. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, p. 323-328, 2004.
74. Liang S., Zhang L., Xu J. Morphology and permeability of cellulose/chitin blend membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 287, p. 19-28, 2007.

75. Losanoff J. E., Richman B. W., Jones J. W. Entero-colocutaneous fistula: a late consequence of polypropylene mesh abdominal wall repair: case report and review of the literature. *Hernia*, v. 6, p. 144-147, 2002.
76. Loke, W. K.; Lau, S. K.; Yong, L. L.; Khor, E.; Sum, C.K. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v. 53, p. 8-17, 2000.
77. 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.
78. Macleod, G. S.; Collett, J. H.; Fell, J. T. The potencial use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303-310, 1999.
79. Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133-1142, 1999.
80. Mao, J. S.; Feng liu, H.; Yin, Y. J.; De Yao, K. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, v. 24, p. 1621-1629, 2003.
81. Marreco, P. R. *Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele*. 2004. Segundo Exame de Qualificação - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
82. Marreco, P. R.; Moreira, P. L.; Genari, C. S.; Moraes, A. M.. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71B, p. 268-277, 2004.
83. Martineau, L.; Shek, P. N. Evaluation of a bi-layer wound dressing for burn care I. Cooling and wound healing properties. *Burns*, v. 32, p. 70-76, 2006(a).
84. Martineau, L.; Shek, P. N. Evaluation of a bi-layer wound dressing for burn care II. *In vitro* and *in vivo* bactericidal properties. *Burns*, v. 32, p. 172-179, 2006(b).
85. Meier, M. M., Kanis L. A., Soldi V. Characterization and drug-permeation profiles of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore forming agent. *International journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 99-110, 2004.

86. Mendes Júnior, E.C.S., Viterbo, F., Rosa, C.S. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 53(5), p. 395-400, 2007.
87. Merck Index. Merck Research Laboratories Division Of. Merck & Co. Inc., 1996. 12. ed. p.160-161.
88. Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Wu, Y. B.; Lee, S. T.; Shyong, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p. 165-173, 2001.
89. Mi, F. L.; Wu, Y. B.; Shyu, S. S.; Chao, A. C.; Lai, J. Y.; Su, C. C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*, v. 212, p. 237-254, 2003.
90. Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., Sarbolouki, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 885-888, 2000.
91. Moreira, S. Informações sobre o tratamento de pacientes queimados [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <Ana Paula Rodrigues> em fev.2004.
92. Moser, K.; Kriwet, K.; Froehlich, C.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R. H. Permeation Enhancement of Highly Lipophilic Drug Using Supersaturated Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 607-616, 2001.
93. Munjeri, O.; Collett, J. H.; Fell, J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role chitosan in modifying drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 46, p. 273-278, 1997.
94. Mutter, D.; Jamali, F. R.; Rodeheaver, G. T.; Thérin, M.; Marescaux, J. The concept of protected mesh to minimize adhesion formation in intraperitoneal abdominal wall reinforcement. Preclinical evaluation of a new composite mesh. *Hernia*, v. 4, p. 53-59, 2000.
95. Muzzarelli, R.; Baldassarre, V.; Ferrara, P.; Biagini, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, v. 9, p. 247-252, 1988.
96. Newton, G. G. F.; Abraham, E. P. Some properties of the bacitracin polypeptides. *Biochemical Journal*, v. 53(4), p. 597-604, 1953.

97. Niekraszewicz, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13(6), p. 16-18, 2005.
98. O'Meara, S.; Cullum, N.; Majid, M.; Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technology Assessment*, v. 4, n. 21, 2000. Disponível em: <<http://www.ncchta.org/execsumm/summ421.htm>>. Acesso em: 07 maio 2007.
99. Ozel, H.; Avsar, F. M.; Topaloglu, S.; Sahin, M. Induction and assessment methods used in experimental adhesion studies. *Wound Repair and Regeneration*, v. 13(4), p. 358-364, 2005.
100. Öztürk, E.; Ağalar, C.; Keçeci, K.; Denkbaş, E. B. Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 101, p. 1602-1609, 2006.
101. Paul, W.; Sharma, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 18-23, 2004.
102. Pavli, V.; Kmetec, V. Optimization of HPLC method for stability testing of bacitracin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 977-982, 2001.
103. Peniche, C.; Monal-Arquëlles, W. Chitosan based polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia*, v. 168, p. 103-116, 2001.
104. Piccolo, N. S.; Correa, M. D.; Amaral, C. R.; Leonardi, D. F.; Novaes, F. N.; Prestes, M. A.; Serra, M. C. F.; Cunha, S. C. R.; Piccolo M. T. S. Queimaduras. *Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica - Projeto Diretrizes*, 2002. Disponível em: <http://www.amb.org.br/projeto_diretrizes/100_diretrizes/queimadu.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2004.
105. Pinzelik, J.; Nisonger, L. L.; Murray, F. J. Some Variables in the Assay of Bacitracin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 1(6), p. 293-296, 1953.
106. Pope, E. R. Cicatrização da pele. In: Bojrab, M. J. *Mecanismo da moléstia na cirurgia de pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. cap. 24, p.178-183.
107. Probst, C. W.; Bright, M. R. Cicatrización de heridas. In: *Texto de cirurgia de los pequeños animales*. 2. ed. Barcelona: Salvat. 1989. cap. 3, p. 32-41.
108. Proudman, C. Adhesions news and views. Peritoneal adhesions in the horse: prevalence and prevention. Disponível em: <http://www.adept-and-adhesions.co.uk/anv/02The_basics_of.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2007.

109. Qin, Y. The Characterization of Alginate Wound Dressings with Different Fiber and Textile Structures. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, p. 2516-2520, 2006.
110. Qin, Y. Absorption Characteristics of Alginate Wound Dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, p. 953-957, 2004.
111. Quality Medical Supplies. Disponível em: <<http://www.qualitymedicalsupplies.com/>>. Acesso em: 05 out. 2007.
112. Remuñán-López C. e Bodmeier R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, v. 44, p. 215-225, 1997.
113. Rocha, A. N. L.; Dantas, T. N. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. Permeation of drugs in chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 84, p. 44-49, 2002.
114. Rodrigues, A.P. *Produção e caracterização de microparticulas de alginato incorporando Aeromonas Hydrophila inativada para imunização de tilapia do nilo por via oral*. 2004. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
115. Rodrigues, C.A. Aproveitamento da casca do camarão: quitina e polímeros derivados. *I Workshop Brasileiro em Aproveitamento de Sub-Produtos do Pescado*, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, dezembro 2003.
116. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. Campinas: Ed.Casa do Pão, 2005. 326p.
117. Rogelj, S.; Reiter, K. J.; Kesner, L.; Li, M.; Essex, D. Enzyme destruction by a protease contaminant in bacitracin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 273, p. 829-832, 2000.
118. 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(2), p. 215-232, 2007.
119. Sin, D. W.; Wong, Y. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. *Trends In Analytical Chemistry*. v. 22(11), p. 799-809, 2003.
120. Song, J.; Chang, H. S.; Park, Y. B.; lee, S. H.; Yoo, N. C.; Lee, J. D.; Kim, K. H.; Lee, S. K. A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for

- the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28(4), p. 489-497, 2001.
121. Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N.; Kumar, K. R.; Tharanathan, R. N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*, v. 63, p. 79-85, 2004.
122. Stachelhaus, T.; Schneider, A.; Marahiel, M. A. Engineered Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, v. 52, p. 177-186, 1996.
123. Stashak, T. S.; Farstvedt, E.; Othick, A. Update on wound dressing: Indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 3, p. 148-163, 2004.
124. Stassen, I.; Sloboda, T.; Hambitzer, G. Membrane with controllable Permeability for Drugs. *Synthetic Metals*, v. 71, p. 2243-2244, 1995.
125. Stringer, J. L. e Peppas, N. A. Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels. *Journal of Controlled Release*, v. 42, p. 195-202, 1996.
126. Suh, J. K. F.; Matthew, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v. 21, p. 2589-2598, 2000.
127. Sulaiman, H.; Gabella, G.; Davis, C.; Mutsaers, S. E.; Boulos, P.; Laurent, G. J.; Herrick, S. E. Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Annals of Surgery*, v. 234(2), p. 256-261, 2001.
128. Suzuki, T. e Mizushima, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84(2), p. 128-132, 1997.
129. Tucci, G. M.; Ricotti, G.; Belmonte, M. M.; Gabbanelli, F.; Lucarini, G.; Orlando, F.; Viticchi, C.; Bigi, A.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Morganti, G.; Sud, M.; Muzzarelli, R. A. A. Chitosan and gelatin as engineered dressing for wound repair. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 16, p. 145-157, 2001.
130. Ueno, H.; Yamada, H.; Tanaka, I.; Kaba, N.; Matsura, M.; Okumura, M.; Kadosawa, T.; Fujinaga, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, v. 20, p. 1407-1414, 1999.

131. Vaucher L.C., Schapoval E.E.S. Método físico-químico para doseamento de bacitracina. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.84(2), 43-45, 2003.
132. 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(2), p. 2383-2394, 2000.
133. Wang, L.; Khor, E.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
134. 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.
135. Wang, Q.; Dong, Z.; Du, Y.; Kennedy, J. F. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 69 (2), p. 336-343, 2007.
136. Yamaura, M. A química das quitosanas. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/qv_quitosanas>. Acesso em: 08 out.2007.
137. Yan, X.; Khor, E.; Lim, L. Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48(7), p. 941-946, 2000.
138. Yu, S. H.; Mi, F. L.; Wu, Y. B.; Peng, C. K.; Shyu, S. S.; Huang, R. N. Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 98, p. 538-549, 2005.
139. Yudanov, T.,N.; Reshetov, I. V. Modern wound dressings: manufacturing and properties. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 40(2), p. 85-92, 2006.
140. Zhang, L.; Xu, T.; Lin, Z. Controlled release of ionic drug through the positively charged temperature-responsive membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 281, p. 491-499, 2006.
141. Zhang, Z. L.; Xu, S. W.; Zhou, X. L. Preventive effects of chitosan on peritoneal adhesion in rats. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12(28), p. 4572-4577, 2006.
142. Zhang, L.; Guo, J.; Zhou, J.; Yang, G.; Du, Y. Blend Membranes from Carboxymethylated Chitosan/Alginate in Aqueous Solution. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 77, p. 610-616, 2000.

-
143. Zhou, J., Elson, C., Lee, T. D. G. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N, O – Carboxymethyl Chitosan. *Surgery*, v. 135(3), p. 307-312, 2004.

ANEXO I



Figura IA - Implantação em rata dos filmes de quitosana previamente esterilizados e hidratados em solução de Ringer Lactato.

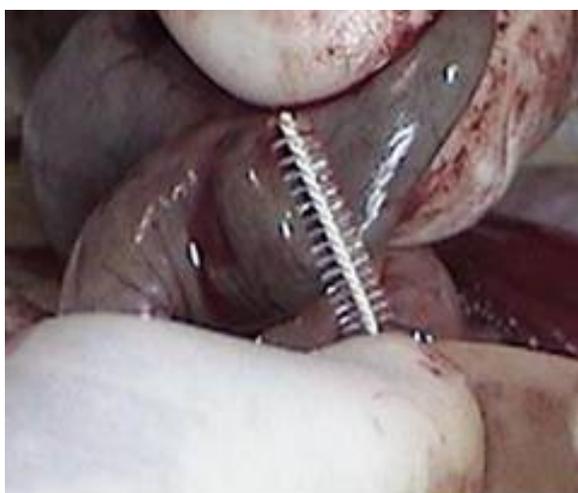


Figura IB - Indução de lesão do peritônio visceral de rata por abrasão em ceco de rata, com escova interdental.

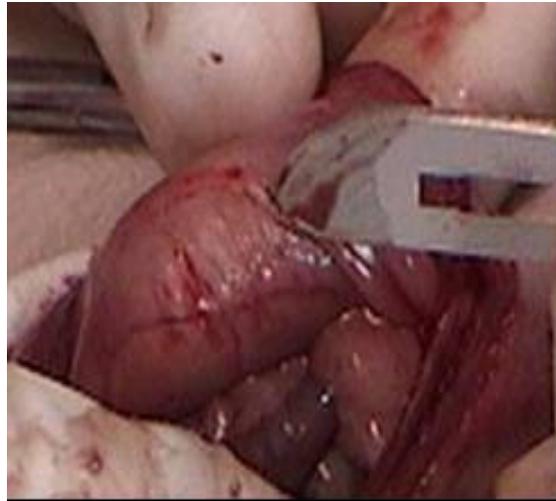


Figura IC - Indução de lesão do peritônio parietal de rata por meio de incisões na parede abdominal.

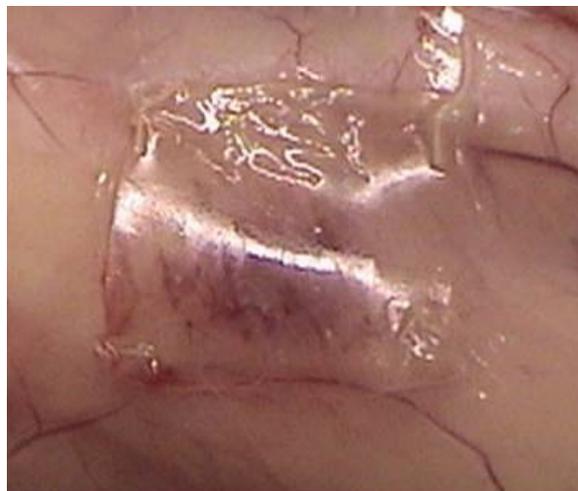


Figura ID – Fixação dos filmes de quitosana à parede abdominal de rata por meio de quatro pontos separados simples com fio de ácido poliglicólico 4-0.

ANEXO II

Tabela IIA - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes: taxa de agitação e vazão sobre a variável-resposta espessura, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	t _{calc} (2)	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	73,26*	2,36*	31,07*	0,0010*	66,38*	80,15*
Agitação	0,72	6,24	0,11	0,9192	-17,50	18,93
Vazão	6,44	6,24	1,03	0,4108	-11,78	24,65
Agitação x Vazão	-5,72	6,24	-0,92	0,4564	-23,93	12,50

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro Puro = 38,92823

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela IIB - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes taxa de agitação e vazão na resposta capacidade máxima de absorção de água, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	t _{calc} (2)	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	14,61*	0,58*	25,03*	0,0016*	12,91*	16,32*
Agitação	-5,39*	1,54*	-3,49*	0,0732*	-9,90*	-0,88*
Vazão	1,39	1,54	0,90	0,4631	-3,12	5,90
Agitação x Vazão	-2,69	1,54	-1,74	0,2237	-7,20	1,82

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro Puro = 2,3853

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela IIC - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes taxa de agitação e vazão na resposta perda de massa em água, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	t _{calc} (2)	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	13,94*	1,37*	10,19*	0,0095*	9,95*	17,94*
Agitação	-7,61	3,62	-2,10	0,1704	-18,18	2,96
Vazão	1,80	3,62	0,50	0,6689	-8,78	12,37
Agitação x Vazão	-4,46	3,62	-1,23	0,3435	-15,03	6,12

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro Puro=13,11008

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela IID - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes taxa de agitação e vazão sobre a variável-resposta capacidade de drenagem de água, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	$t_{\text{calc}} (2)$	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	13197,71*	270,85*	48,73*	0,0004*	12406,83*	13988,60*
Agitação	-15,00	716,61	-0,02	0,9852	-2107,48	2077,48
Vazão	303,00	716,61	0,42	0,7135	-1789,48	2395,48
Agitação x Vazão	-1037,00	716,61	-1,45	0,2848	-3129,48	1055,48

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro puro = 513526,3

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela IIE - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes taxa de agitação e vazão sobre a variável-resposta resistência à tração, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	$t_{\text{calc}} (2)$	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	18,85*	1,94*	9,74*	0,0104*	13,20*	24,50*
Agitação	7,96	5,12	1,55	0,2602	-6,99	22,91
Vazão	16,32*	5,12*	3,19*	0,0859*	1,37*	31,27*
Agitação x Vazão	-4,52	5,12	-0,88	0,4704	-19,47	10,43

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro puro = 26,21103

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela IIF - Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes taxa de agitação e vazão sobre a variável-resposta alongamento na ruptura, para membranas preparadas com o co-solvente acetona.

Variáveis	Efeitos	Desvio	$t_{\text{calc}} (2)$	p-valor	Limite de confiança	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	5,27*	0,24*	21,76*	0,0021*	4,56*	5,97*
Agitação	-1,07	0,64	-1,67	0,2367	-2,94	0,80
Vazão	3,33*	0,64*	5,20*	0,3505*	1,46*	5,20*
Agitação x Vazão	-1,12	0,64	-1,75	0,2224	-2,99	0,75

Desvios calculados tomando-se por base o desvio padrão do Erro puro = 0,4100333

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

ANEXO III

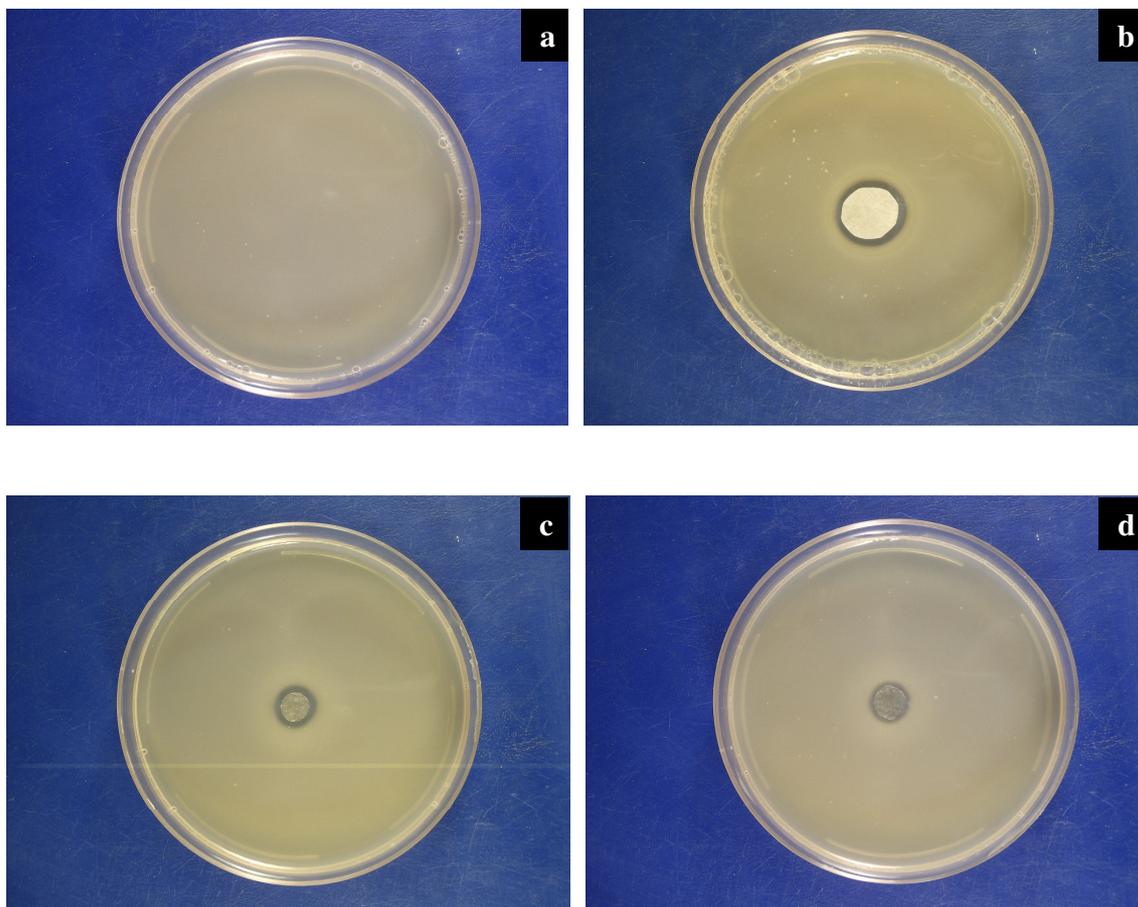


Figura IIIA - a) Placa do controle da cultura de *Staphylococcus aureus*; b) papel de filtro embebido em solução 1 (C=3,12 mg de bacitracina/mL de PBS); c) membrana exposta à solução 1 por 24h; d) membrana exposta à solução 1 por 24 h, lavada por 30 minutos em água deionizada após a incorporação.

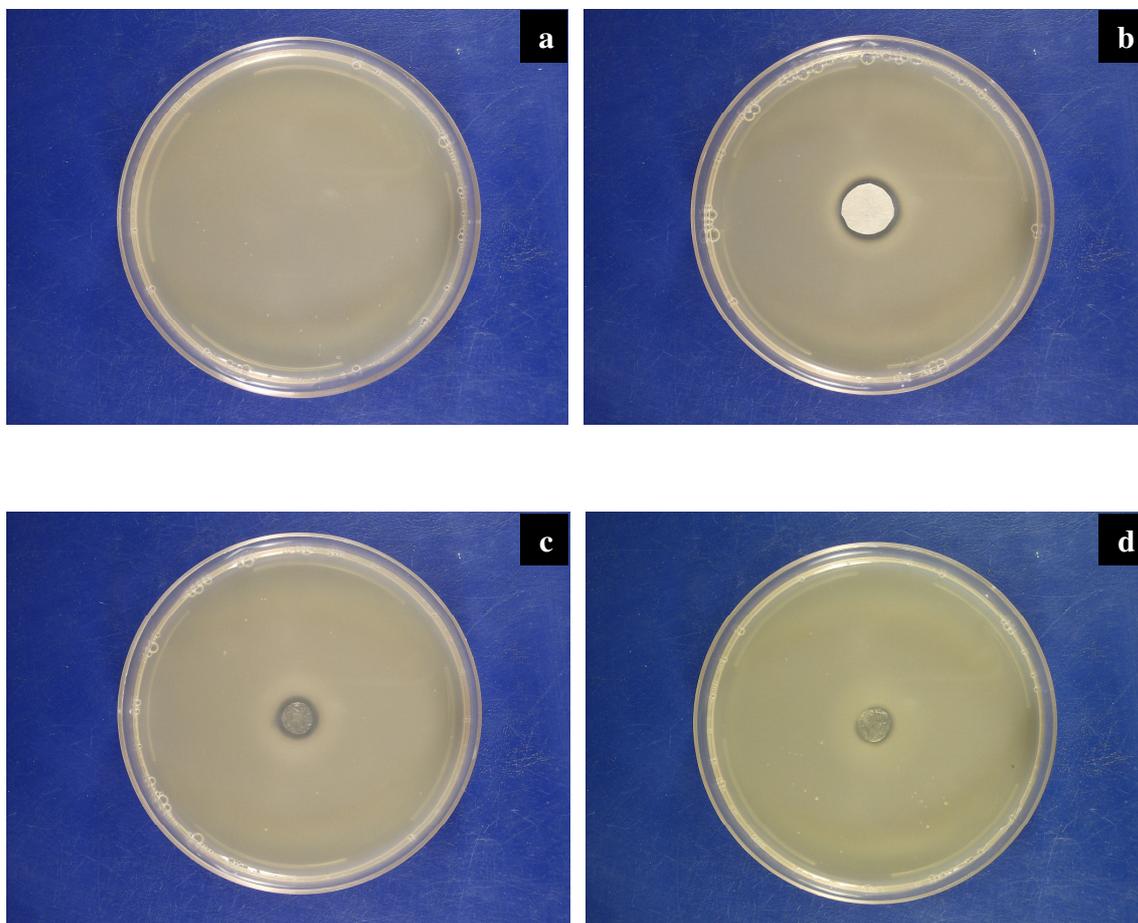


Figura IIIB- a) Placa do controle da cultura de *Staphylococcus aureus*; b) papel de filtro embebido em solução 2 (C=2,20 mg de bacitracina/mL de PBS); c) membrana exposta à solução 2 por 24h; d) membrana exposta à solução 2 por 24 h, lavada por 30 minutos em água deionizada após a incorporação.

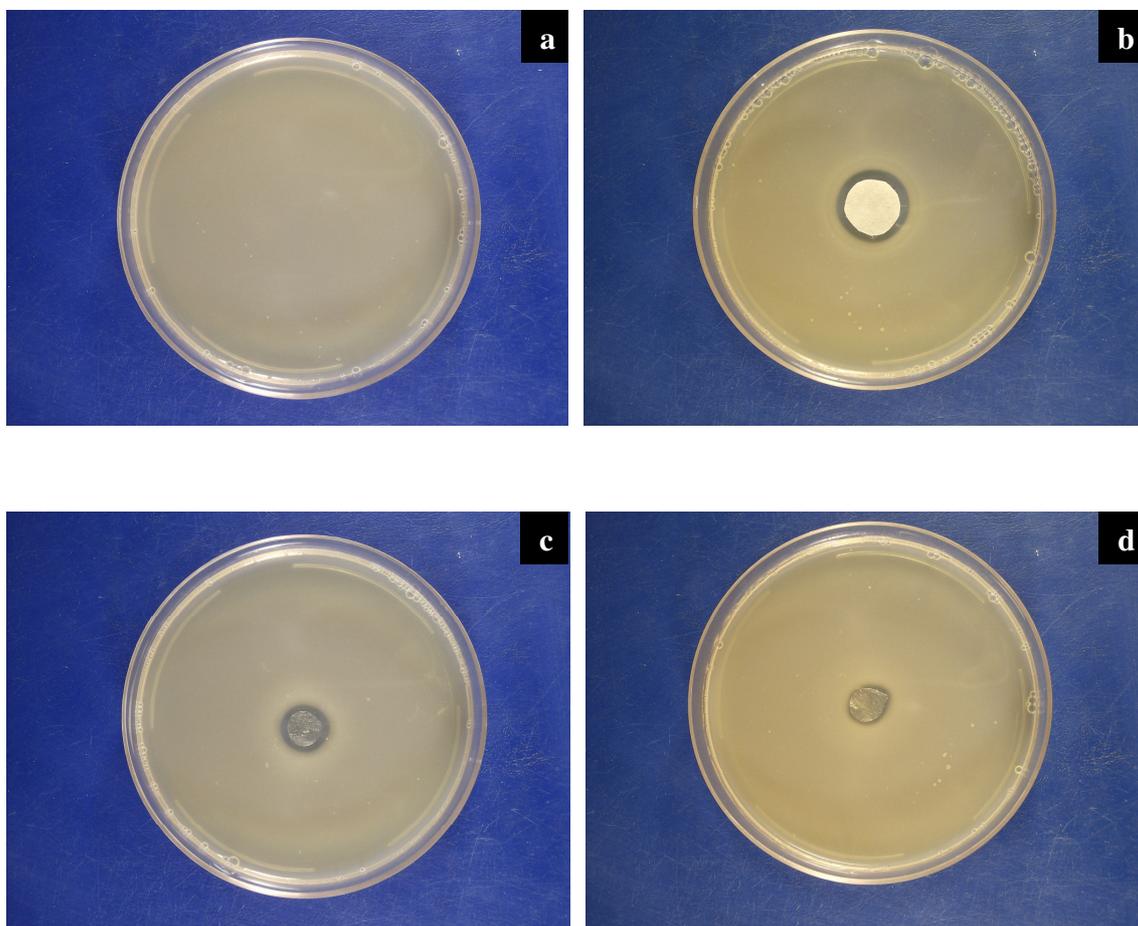


Figura IIIC - a) Placa do controle da cultura de *Staphylococcus aureus*; b) papel de filtro embebido em solução 3 (C=1,61 mg de bacitracina/mL de água deionizada); c) membrana exposta a solução 3 por 24h; d) membrana exposta solução 3 por 24 h, lavada por 30 minutos em água deionizada após a retirada da solução de incorporação.