

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**“USO DE XANTANA EM SUBSTITUIÇÃO AO ALGINATO EM MEMBRANAS  
COACERVADAS DE QUITOSANA PROJETADAS PARA A CICATRIZAÇÃO DE  
LESÕES DE PELE”**

Itiara Gonçalves Veiga

Autora

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Orientadora

*Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.*

Campinas – São Paulo

Abril de 2009

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

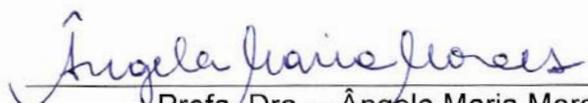
V533u Veiga, Itiara Gonçalves  
Uso de xantana em substituição ao alginato em  
membranas coacervadas de quitosana projetadas para a  
cicatrização de lesões de pele / Itiara Gonçalves Veiga. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

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

Título em Inglês: Use of xanthan to replace the alginate in chitosan  
membranes designed for the healing of skin lesions  
Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Xanthan, Biopolymers, Membranes,  
Lesion therapy  
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos  
Titulação: Mestre em Engenharia Química  
Banca examinadora: Marisa Masumi Beppu, Pedro de Oliva Neto  
Data da defesa: 28/04/2009  
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

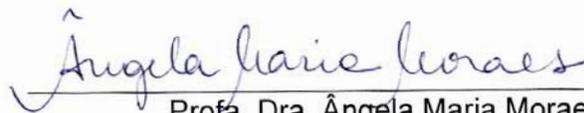
Dissertação de Mestrado ou defendida por Itiara Gonçalves Veiga e aprovada em  
28 de abril de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. – Ângela Maria Moraes

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Química.

  
Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

## AGRADECIMENTOS

Eterna gratidão a Deus que me protege e acompanha todos os dias da minha vida.

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

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

Ao Eugênio, pelo carinho, compreensão e companheirismo mesmo nos momentos mais turbulentos, não se deixando abalar.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação, em especial a Alan, Anayla, Gisele, Iara, Igor, Juliana, Lucimara e Maria Cristiane pela amizade, auxílio e momentos inesquecíveis que proporcionaram sendo parte fundamental ao longo do mestrado.

Às amigas Caroline e Cátia por estarem sempre dispostas a ouvir e aconselhar, não importando a distância que nos separa.

Aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos Dr. Everson Alves Miranda e Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

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

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

A CAPES pelo apoio financeiro.

"A vida de um indivíduo só faz sentido se ajuda a tornar  
a vida das demais criaturas mais nobres e mais bela."  
(Albert Einstein)

## RESUMO

O corpo humano é recoberto por aproximadamente 2 m<sup>2</sup> de pele e, lesões cutâneas, além de causarem danos físicos, mecânicos e térmicos, podem também afetar as funções fisiológicas de outros tecidos. As membranas desenvolvidas para o tratamento de lesões podem ser constituídas por vários tipos de polímeros, sendo a quitosana um dos mais estudados. Polissacarídeos negativamente carregados como alginato, pectina, carragena e xantana são capazes de formar complexos polieletrólitos (PEC) com a quitosana. Uma das técnicas de preparação de membranas contendo simultaneamente quitosana e poliânion envolve a produção de coacervados das matérias-primas. Membranas de quitosana e alginato foram já detalhadamente estudadas para uso em lesões de pele. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologia escalonável de preparação de membranas de quitosana-xantana (em substituição ao alginato), estudando-se o efeito do uso de diferentes vazões e relações mássicas durante a preparação do PEC e da reticulação térmica nas propriedades das membranas obtidas. Outros poliânions foram também testados, mas a xantana apresentou as características mais adequadas. As membranas de quitosana-xantana foram caracterizadas quanto à morfologia, à espessura, à capacidade de drenagem de água, à resistência mecânica, à capacidade máxima de absorção de diferentes soluções aquosas e à sua perda de massa quando nelas estocadas. Membranas capazes de absorver até 40 g de H<sub>2</sub>O, 12 g de solução salina, 5 g de fluido corpóreo simulado e 5 g de soro sanguíneo por grama de amostra foram obtidas, com perda de massa máxima nas mesmas soluções de até 12%. Capacidade de drenagem de água de até 6 Kg/m<sup>2</sup>.dia e resistência à tração de até 5,5 MPa foram verificadas. Dentre as membranas de quitosana-xantana obtidas, as preparadas a partir de soluções de quitosana e xantana de mesma concentração (0,25%) misturadas a uma vazão de 300 mL/h mostraram-se as mais promissoras para serem utilizadas em lesões de pele. A reticulação térmica das membranas não ocasionou diferença significativa nas características mecânicas.

**Palavras-chave:** quitosana, xantana, membranas, terapia de lesões.

## ABSTRACT

The human body is covered by approximately 2 m<sup>2</sup> of skin and, skin lesions, in addition to causing physical, mechanical and thermal damage, may also affect the physiological functions of other tissues. The membranes developed to treat lesions can be constituted by several types of polymers, being chitosan one of the most studied. Negatively charged polysaccharides such as alginate, pectin, carrageenan and xanthan are capable to form polyelectrolytes complexes (PEC) with chitosan. Techniques used for the preparation of membranes containing simultaneously chitosan and polyanion involves the production of coacervates from the raw materials. Chitosan-alginate membranes have been studied in detail for the use in skin lesions. In this context, this work aimed the development of a scalable methodology to prepare chitosan-xanthan membranes, in which xanthan replaces alginate. The effects of using different flow rates and mass ratios during the PEC preparation and of the use of thermal crosslinking on membrane properties was evaluated. Other polyanions were also tested, but xanthan presented the most adequate characteristics. The chitosan-xanthan membranes were characterized regarding to morphology, thickness, water drainage ability, tensile strength and strain at break, maximum uptake capacity of different aqueous solutions and percentage of mass loss when stored in the same media. Membranes capable of absorbing up to 40 g of H<sub>2</sub>O, 12 g of saline solution, 5 g of simulated body fluid and 5 g of blood serum per gram of sample were obtained, with maximum mass loss in the same solutions equal to 12%. Water drainage ability up to 6 Kg/m<sup>2</sup>.day and tensile strength up to 5,5 MPa were observed. The chitosan-xanthan membranes obtained from solutions of the same concentrations of chitosan and xanthan (0.25%) mixed at a flow rate of 300 mL/h presented the most promising characteristics to be used as dressings for skin lesions. The thermal crosslinking did not cause significant difference in their mechanical characteristics.

**Keywords:** chitosan, xanthan, membranes, lesion therapy.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
Índice de Figuras .....	xii
Índice de Tabelas .....	xv
NOMECLATURA .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivos .....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1. Estrutura da pele e lesões dérmicas .....	5
2.1.1. Tratamento de lesões de pele .....	5
2.2. Características dos biopolímeros constituintes de biomateriais e de dispositivos de liberação controlada .....	7
2.2.1. Quitosana .....	8
2.2.2. Alginato .....	12
2.2.3. Xantana .....	13
2.2.4. Pectina .....	15
2.2.5. Carragena .....	16
2.3. Formação de hidrogéis e complexos polieletrólitos contendo quitosana .....	18
2.3.1. Membranas de quitosana-alginato .....	19
2.3.2. Outros complexos formados entre quitosana e poliânions naturais .....	21
2.3.3. Métodos de reforço mecânico das membranas .....	25
2.4. Considerações finais .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
3.1. Materiais .....	27
3.2. Métodos .....	28
3.2.1. Preparação das membranas .....	28
3.2.1.1. Membranas constituídas de quitosana e alginato .....	28
3.2.1.2. Membranas constituídas de quitosana e pectina .....	30
3.2.1.3. Membranas constituídas de quitosana e carragena .....	31
3.2.1.4. Membranas constituídas de quitosana e xantana .....	31

3.2.1.4.1. Ensaio para o estabelecimento de condições experimentais adequadas de preparação das membranas de quitosana e xantana .....	31
3.2.1.4.2. Avaliação do efeito da vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana nas características das membranas .....	33
3.2.1.4.3. Análise do efeito da variação das relações mássicas quitosana/xantana nas características das membranas .....	33
3.2.1.4.4. Estudo do efeito da reticulação térmica nas características das membranas de quitosana e xantana.....	34
3.2.2. Caracterização das membranas.....	34
3.2.2.1. Aspecto das membranas .....	35
3.2.2.2. Morfologia da superfície e secção transversal das membranas..	35
3.2.2.3. Espessura das membranas.....	35
3.2.2.4. Perfil de hidratação das membranas.....	35
3.2.2.5. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas .....	36
3.2.2.6. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas .....	37
3.2.2.7. Avaliação da capacidade de drenagem de água através das membranas.....	37
3.2.2.8. Avaliação das propriedades mecânicas.....	38
3.2.3. Análise estatística .....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Seleção do poliânion para a substituição do alginato .....	40
4.1.1. Membranas compostas por quitosana e pectina .....	40
4.1.2. Preparação das membranas compostas por quitosana e carragena.	42
4.1.3. Membranas compostas por quitosana e xantana .....	43
4.1.4. Estabelecimento de condições experimentais apropriadas de preparação das membranas de quitosana e xantana .....	43
4.1.5. Efeito da vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana nas características das membranas.....	45
4.1.5.1. Espessura das membranas no estado seco .....	45
4.1.5.2. Efeito no aspecto e na morfologia das membranas .....	46
4.1.5.3. Perfil de hidratação das membranas.....	48
4.1.5.4. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas .....	50

4.1.5.5.	Perda de massa durante exposição a soluções aquosas .....	51
4.1.5.6.	Capacidade de drenagem de água das membranas .....	52
4.1.5.7.	Propriedades mecânicas das membranas .....	53
4.1.6.	Efeito da variação das relações mássicas quitosana/xantana nas características das membranas .....	53
4.1.6.1.	Espessura das membranas no estado seco .....	54
4.1.6.2.	Efeito na morfologia das membranas.....	54
4.1.6.3.	Perfil de hidratação das membranas.....	56
4.1.6.4.	Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas .....	58
4.1.6.5.	Perda de massa durante exposição a soluções aquosas .....	59
4.1.6.6.	Capacidade de drenagem de água das membranas .....	60
4.1.6.7.	Propriedades mecânicas das membranas .....	60
4.1.7.	Efeito da reticulação térmica nas características das membranas de quitosana e xantana.....	61
4.1.7.1.	Espessura das membranas no estado seco .....	61
4.1.7.2.	Efeito no aspecto e na morfologia das membranas .....	62
4.1.7.3.	Perfil de hidratação das membranas.....	64
4.1.7.4.	Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas .....	66
4.1.7.5.	Perda de massa durante exposição a soluções aquosas .....	67
4.1.7.6.	Capacidade de drenagem de água das membranas .....	68
4.1.7.7.	Propriedades mecânicas das membranas .....	69
5.	DISCUSSÃO.....	70
6.	CONCLUSÕES.....	80
6.1.	Sugestões para trabalhos futuros .....	80
7.	REFERÊNCIAS .....	82
	ANEXO I.....	91

## Índice de Figuras

Figura 2.1: Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana (baseada em Kumar, 2000). .....	8
Figura 2.2: Fórmula estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de $\alpha$ -L-guluronato e M, os copolímeros de $\alpha$ -D-manuronato. ....	12
Figura 2.3: Estrutura da xantana (García-Ochoa <i>et al.</i> , 2000). ....	13
Figura 2.4: (a) Segmento repetitivo na molécula de pectina e grupos funcionais carboxila (b); éster (c); amida (d) na cadeia de pectina (Sriamornsak, 2003). ....	16
Figura 2.5: Fórmulas estruturais de kappa (A), iota (B) e lambda (C) carragenas (Shchipunov, 2003). ....	17
Figura 2.6: Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato de sódio e de quitosana (Rodrigues 2008). ....	21
Figura 2.7: Representação esquemática da interação de quitosana e xantana para formação do hidrogel (Chellat <i>et al.</i> , 2000) .....	23
Figura 3.1: Sistema utilizado na preparação das membranas. ....	29
Figura 3.2: Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas. ....	38
Figura 3.3: Parte útil dos corpos de após a fixação nos cabeçotes do equipamento. ....	39
Figura 4.1: Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 1A (a) e 2A (b): a) membrana composta de quitosana a 0,25% e pectina a 0,25% (m/v); b) membrana composta de quitosana a 0,5% (m/v) e pectina a 1% (m/v). ....	41
Figura 4.2: Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 3A (a) e 4A (b): a) membrana composta de quitosana 0,25% (m/v) e pectina a 0,5% (m/v); b) membrana composta de quitosana a 0,25% (m/v) e pectina a 0,5% (m/v) sem presença de acetona. ....	42
Figura 4.3: Aspecto da membrana preparada com quitosana a 0,5% (m/v) e carragena a 0,5% (m/v). ....	42
Figura 4.4: Aspecto da membrana preparada com quitosana 0,5% (m/v) e xantana a 0,5% (m/v). ....	43

Figura 4.5: Aspecto das membranas preparada com quitosana a 0,25% (m/v) e xantana a 0,25% (m/v): a) ensaio 1B - amostra desaerada a vácuo por 2h; b) ensaio 2B – reticulação pela adição de $\text{CaCl}_2$ ; c) ensaio 3B – reticulação pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	44
Figura 4.6: Aspecto dos coacervados poliméricos de quitosana-xantana antes da secagem: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.....	46
Figura 4.7: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas preparadas em diferentes vazões: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.....	47
Figura 4.8: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas preparadas em diferentes vazões: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.....	48
Figura 4.9: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.....	49
Figura 4.10: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas preparadas em diferentes relações mássicas quitosana:xantana: (a) ensaio 1D – 0,25Q:0,25X; (b) ensaio 3D – 0,375Q:0,25X e (c) ensaio 4D – 0,375Q:0,375X.....	55
Figura 4.11: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas preparadas em diferentes relações mássicas quitosana:xantana: (a) ensaio 1D – 0,25Q:0,25X; (b) ensaio 3D – 0,375Q:0,25X e (c) ensaio 4D – 0,375Q:0,375X.....	56
Figura 4.11: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana com variadas massas totais e razão Q:X: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.....	57
Figura 4.13: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas tratadas termicamente: (a) ensaio 1E – sem tratamento; (b) ensaio 2E – 30 min; (c) ensaio 3E – 60 min; (d) ensaio 4E – 90 min e (e) ensaio 5E – 120 min.....	63
Figura 4.14: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas tratadas termicamente: (a) ensaio 1E – sem tratamento; (b) ensaio 2E – 30 min; (c) ensaio 3E – 60 min; (d) ensaio 4E – 90 min e (e) ensaio 5E – 120 min.....	64
Figura 4.15: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana sem e com tratamento térmico: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.....	65

Figura 5.1: Valores das propriedades das membranas produzidas com diferentes vazões de adição da solução de quitosana.....	70
Figura 5.2: Valores das propriedades das membranas produzidas com diferentes relações mássicas e concentrações dos polímeros (quitosana:xantana). .....	71
Figura 5.3: Valores das propriedades das membranas tratadas com diferentes períodos de reticulação térmica.....	71

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Principais aplicações da quitina e da quitosana (Dallan, 2005). .....	9
Tabela 2.2: Principais propriedades das membranas de quitosana-alginato produzidas por Rodrigues (2008) .....	20
Tabela 2.3: Polieletrólitos que podem formar complexos com a quitosana (adaptada de Berger <i>et al.</i> , 2004b). .....	22
Tabela 3.1: Propriedades dos polímeros utilizados na produção de membranas segundo dados da literatura. ....	27
Tabela 3.2: Concentrações das soluções de quitosana (Q) e pectina (P) para preparação das membranas. ....	30
Tabela 3.3: Modificações no procedimento de obtenção das membranas quitosana-xantana. ....	32
Tabela 3.4: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da vazão de adição da solução de quitosana na de xantana. ....	33
Tabela 3.5: Relações mássicas e concentrações das soluções de quitosana e xantana utilizadas nos ensaios. ....	34
Tabela 3.6: Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl (Kokubo <i>et al.</i> , 1990). O pH da solução final foi ajustado para 7,4. ....	36
Tabela 4.1: Valores das espessuras das membranas obtidos com diferentes taxas de adição da solução de quitosana à solução de xantana. ....	45
Tabela 4.2: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_w$ ) em 24 h de absorção de soluções aquosas .....	50
Tabela 4.3: Valores obtidos para a perda de massa das membranas em água por 40 dias a 4°C. ....	51
Tabela 4.4: Valores obtidos para a capacidade média de drenagem de água das membranas preparadas em diferentes vazões. ....	52
Tabela 4.5: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas produzidas com diferentes vazões. ....	53

Tabela 4.6: Valores de espessura das membranas preparadas com diferentes relações mássicas.....	54
Tabela 4.7: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_w$ ) de absorção de soluções aquosas em 24 h. ....	58
Tabela 4.8: Valores obtidos para a perda de massa em soluções aquosas das membranas por 40 dias a 4°C.....	59
Tabela 4.9: Valores obtidos para a capacidade média de drenagem de água das membranas preparadas em diferentes relações mássicas. ....	60
Tabela 4.10: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas produzidas com diferentes relações mássicas.....	61
Tabela 4.11: Valores das espessuras das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.....	62
Tabela 4.12: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_w$ ) de absorção de soluções aquosas por 24 h a 37°C por amostras tratadas termicamente por diferentes períodos.....	66
Tabela 4.13: Valores obtidos para a perda de massa em água a 4°C por 40 dias das membranas tratadas termicamente.....	67
Tabela 4.14: Valores obtidos para a capacidade máxima média de drenagem de água das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.....	68
Tabela 4.15: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.....	69

**NOMECLATURA**

A = Área

ASTM = *American National Standards Institute*

$C_i$  = Grau de intumescimento

$C_w$  = Capacidade máxima de absorção

FCS = Fluido corpóreo simulado

FDA = *Food and Drug Administration*

GD = Grau de desacetilação

HDL = *High Density Lipoproteins*

LDL = *Low Density Lipoproteins*

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

$M_{\text{final}}$  = Massa seca final

$M_{\text{inicial}}$  = Massa seca inicial

$M_p$  = Perda de massa

$M_s$  = Massa seca

$M_u$  = Massa úmida final

$M_{ui}$  = Massa úmida no tempo i

PBS = "*Phosphate buffered saline*"

PEC = Complexo polieletrólito

SFB = Soro fetal bovino

SS = Solução salina

t = Tempo

TD = Taxa de drenagem

TRIS = tris-hidroxi-metil-aminometano

## 1. INTRODUÇÃO

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele também é caracterizada como um mecanismo de defesa, impedindo a entrada de agentes infecciosos, regulando a temperatura corpórea, a entrada e saída de eletrólitos, além de armazenar uma grande quantidade de terminações nervosas. Assim, qualquer lesão a esse órgão pode ocasionar apreciável desequilíbrio fisiológico, além de representar uma porta de entrada para organismos patogênicos e oportunistas.

Os danos à pele podem ser classificados como lesões sem perda de tecido (em cirurgia), e com perda de tecido. Nessa segunda classificação estão incluídas queimaduras e lesões causadas por trauma, abrasão ou eventos secundários em doenças crônicas, como úlceras diabéticas ou lesões de pressão, e locais como fontes de enxertos de pele. As lesões também podem ser classificadas pelas camadas envolvidas. As superficiais envolvem só a epiderme, lesões de profundidade parciais envolvem comumente epiderme e derme, e de alta profundidade envolvem a gordura subcutânea ou tecido mais interno. Embora haja restauração contínua do tecido depois de um dano, infecções, perda de fluidos e outras complicações aumentam o tempo de recuperação, representando um desafio clínico a ser superado (Paul e Sharma, 2004).

Dependendo da extensão da lesão, como por exemplo, em queimaduras de segundo e terceiro grau, uma intervenção cirúrgica pode ser necessária. Várias tecnologias estão já disponíveis para acelerar a regeneração da pele lesada ou fornecer substitutos temporários para a recomposição da lesão. O uso de curativos na área danificada, assim como o implante de células, ou ainda uma combinação de ambas as técnicas, vêm sendo estudados para melhorar a cicatrização das lesões. Vários destes dispositivos desenvolvidos estão incluídos na categoria de biomateriais (Hench, 1998).

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material não viável empregado em dispositivos médicos que interagem com sistemas biológicos (Williams, 1987). Tal conceito vem sendo expandido nos últimos anos, por exemplo, com relação ao tipo de interação com sistemas biológicos, compreendendo materiais capazes não somente de tratar distúrbios em um órgão ou em uma dada função do corpo, mas também de estimular ou substituir qualquer tecido (incluindo, portanto, materiais bioativos). Além disso, tal dispositivo deve apresentar características adequadas quanto à porosidade, resistência à tensão, flexibilidade e elasticidade, além de ser biocompatível, sendo

desejável em alguns casos que o material seja também biodegradável e bioabsorvível (Chow e Khor, 2000).

Com relação a queimaduras, por exemplo, de acordo com Pankhurst e Pochkhanawala (2002), um curativo ideal deve: proteger a lesão de danos físicos e de microrganismos; ser confortável e durável; não ser tóxico, aderente e irritante; permitir trocas gasosas e manter umidade adequada na ferida; ser compatível com agentes terapêuticos tópicos, além de permitir atividade máxima da cicatrização sem retardar ou inibir qualquer estágio do processo. Entretanto, para selecionar o tipo de curativo a ser usado, diversos fatores devem ser levados em conta, tais como o grau da queimadura (que determina a quantidade de exsudato produzido), local e a extensão da mesma, o custo do curativo, além da própria habilidade do profissional da saúde e do paciente em lidar com o curativo.

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

A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes encontrado na natureza. Esse material fibroso pode ser encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos, nas paredes celulares dos fungos e plânctons. Comercialmente, a quitina é obtida de fontes como carapaças de caranguejos e camarões, sendo considerada como resíduo da indústria da pesca. Pela desacetilação alcalina da quitina é possível se obter a quitosana que, por ser solúvel em ácidos fracos, é mais acessível para modificações e reações químicas. Tanto a quitina quanto a quitosana têm demonstrado serem úteis como materiais para curativos e veículo de drogas, aumentando as possibilidades de serem utilizadas na Engenharia de Tecidos (Khor e Lim, 2003; Freier *et al.*, 2005).

Além disso, a quitosana é conhecidamente um agente antimicrobiano que atua sobre fungos, bactérias e apresenta até mesmo atividade antiviral (Rabea *et al.*, 2003), podendo ser utilizada em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões causadas por

microrganismos. No tratamento de feridas ou queimaduras, diversos estudos demonstraram a eficiência da quitina e da quitosana para acelerar a cicatrização (Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Clasen *et al.*, 2006; Craveiro e Craveiro, 2000; Niekraszewicz, 2005; Wittaya-areekul e Praharn, 2006). Outra estratégia também muito utilizada é a inclusão de agentes antimicrobianos nos curativos à base de quitina e quitosana (Lee *et al.*, 2000, Mi *et al.*, 2001, Mi *et al.*, 2002), que apresentam eficiência em absorver o exsudato do ferimento e impedir contaminações por bactérias comumente encontradas em regiões lesadas.

Devido às características econômicas do Brasil, a busca por curativos temporários compostos de matérias-primas acessíveis é de grande relevância, pois possibilitaria ampliar sua utilização nos tratamentos de lesões de pele. E, certamente, seu uso resultaria na contribuição para o aumento da qualidade de vida dos pacientes, pois possibilitaria a regeneração dos tecidos lesados mais rápida e eficientemente, reduzindo o período de internação hospitalar.

Neste contexto, a utilização de membranas compostas de quitosana e alginato como curativos vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa. O alginato se mostra promissor por ser um polissacarídeo natural extraído de algas, comumente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia. É um biomaterial relativamente inerte, biocompatível, biodegradável e forma um gel de elevada porosidade, com boas propriedades mucoadesivas, possibilitando sua aplicação na produção de vários dispositivos biomédicos (Qin, 2004).

Como alternativa para a substituição do alginato tem-se a xantana, um heteropolissacarídeo obtido por fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris*, utilizada em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. É um polímero atóxico, estável em amplas faixas de pH e temperatura, capaz de formar gel na presença de quitosana, muito elástico e com alta resistência de ruptura (Martínez-Ruvalcaba *et al.*, 2007). Na indústria de alimentos, a xantana vem substituindo gradativamente polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas. A preferência por biopolímeros microbianos se deve às suas propriedades funcionais, somadas às vantagens de sua produção ser independente de condições climáticas (García-Ochoa *et al.*, 2000; Kim e Yoo, 2006).

Frente a isto, é de relevância a avaliação do potencial de utilização de membranas constituídas por quitosana e poliânions como a xantana, a pectina e a carragena em substituição ao alginato, como dispositivos para a terapia de lesões de

pele. Para tanto, o desenvolvimento de metodologia reprodutível e escalonável de preparação das mesmas também se mostra de grande importância, uma vez que a literatura consultada aponta que membranas preparadas pela complexação de quitosana e outros 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), dificultando a preparação em larga escala. Rodrigues (2008) estabeleceu condições experimentais de preparação passíveis de escalonamento que conduzem a membranas de quitosana-alginato com características reprodutíveis e adequadas para a aplicação como curativos. A metodologia desenvolvida foi utilizada como base para a realização dos estudos aqui propostos.

O desenvolvimento deste trabalho dará, portanto, continuidade aos estudos da equipe nesta área, que vem avaliando processos de otimização de composição de membranas de quitosana e alginato contendo ou não plastificante, além de fármacos, para emprego na área de curativos para queimaduras.

## 1.1. Objetivos

O presente estudo teve por objetivo contribuir para os trabalhos realizados no ramo de obtenção de membranas a serem utilizadas em cicatrização de lesões de pele, tendo-se por meta a obtenção de membranas constituídas por quitosana associada a poliânions, principalmente à xantana, em substituição ao alginato. Para isto, propôs-se:

- A produção de membranas de quitosana, xantana, pectina e carragena coacervadas através de metodologia passível de escalonamento.
- A determinação das condições experimentais importantes no processo de obtenção das membranas de quitosana e xantana;
- A avaliação dos efeitos da reticulação térmica nas características de membranas de quitosana e xantana;
- A caracterização das membranas quanto à morfologia, à espessura, à capacidade de drenagem de água, à resistência mecânica, à capacidade máxima de absorção de diferentes soluções aquosas e à sua perda de massa quando nelas estocadas;

- A comparação das características das membranas obtidas neste trabalho com a de membranas de quitosana contendo alginato preparadas por procedimentos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Estrutura da pele e lesões dérmicas**

A pele é constituída por duas camadas histologicamente distintas: epiderme e derme. A epiderme é constituída por um tecido epitelial do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, onde as células se multiplicam na camada basal e migram no curso de sua diferenciação para as camadas superiores. Nestas camadas, elas acumulam filamentos de queratina, morrem e passam a ser consideradas “escamas” dessa proteína, formando uma camada morta e acelular, a camada córnea. Essa região é renovada a cada seis semanas. A derme por sua vez, é composta por um tecido conjuntivo de natureza frouxa próximo ao epitélio e denso em sua porção mais profunda. No tecido conjuntivo da derme existe uma gama de fibras colágenas e elásticas, além de glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Separando a derme da epiderme existe uma lâmina basal composta sobretudo de colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos ricos em sulfato de heparan (Junqueira e Carneiro, 2004).

As numerosas e variadas funções da pele dependem da manutenção de sua integridade. Quando ocorre uma lesão, uma seqüência de eventos se inicia, com o objetivo de promover sua rápida regeneração, sendo que o processo de cicatrização de feridas depende, até mesmo, dentre outros fatores, do tamanho e da gravidade da lesão (Van de Graaff, 2003).

#### ***2.1.1. Tratamento de lesões de pele***

Vários fatores afetam a cicatrização de feridas de pele, tais como: causa da lesão, estado nutricional do paciente, nível de manutenção da função das áreas afetadas, cuidados específicos com a área lesada, doenças associadas (diabetes mellitus e insuficiência vascular), além da atitude positiva e cooperação do paciente. Dependendo

do tipo de lesão, redução do edema, prevenção de infecção da ferida e analgesia adequada também contribuem para a recuperação do paciente. O tratamento da ferida deve, além promover a cicatrização, não permitir maior perda de tecido, prevenir infecções, promover ótimas condições caso cirurgia seja necessária, além de ser o mais indolor possível e ser aceitável para a necessidade do paciente.

No caso de queimaduras, por exemplo, o tratamento depende do tipo de lesão. Inicialmente, a limpeza da ferida deve ser realizada. Muitos autores, como Pankhurst e Pochkhanawala (2002), mencionam a utilização do tratamento por banhos aos pacientes, que pode ser feito em unidades especiais ou com esponjas impregnadas com anti-sépticos. No entanto, as desvantagens da hidroterapia incluem o risco de auto-contaminação e desbalanço eletrolítico (Konop, 1991), além da perda de calor e sódio pelo paciente, em adição à dor e ansiedade associada com a exposição prolongada à água (Carrougher, 1998). Alguns métodos para tornar esse procedimento menos inadequado incluem a utilização de água a temperatura ambiente, assepsia rápida e utilização prévia de analgésicos. O debridamento da ferida deve ser efetuado quando partes de tecido necrosado estão presentes, principalmente em queimaduras de terceiro e segundo grau. Existem diferentes mecanismos utilizados para esse procedimento, entre eles o autolítico, no qual a utilização de curativos úmidos como hidrogéis ou hidrocolóides pode facilitar o debridamento; o cirúrgico; o enzimático, tais como os que requerem fibrinolisinases; o mecânico, com a utilização de fricção, realizada com gaze ou esponja úmidas, podendo danificar o novo epitélio; além do biológico, com a utilização da larva de *Lucilia sericata*. Normalmente, o debridamento cirúrgico é feito quase que imediatamente após o atendimento do paciente, uma vez que após 7 a 10 dias, o processo inflamatório encontra-se no ápice, com o fluxo sanguíneo em seu maior nível, sendo maior o risco de hemorragias em procedimentos cirúrgicos (Williams, 2002). Após o procedimento cirúrgico, faz-se necessário o recobrimento da área danificada. Tal recobrimento tem as funções de manter a umidade do local, a temperatura corpórea do paciente e diminuir as chances de contaminação do local afetado.

Uma alternativa é a substituição do tecido lesado por pele transplantada, visto que o tecido ideal para o recobrimento dérmico é a pele autóloga (do próprio paciente). Porém, esse método pode não ser o mais adequado em função da eventual falta de um ponto de coleta de pele a ser enxertada ou a morbidade que a retirada desse tecido pode causar. Assim, como a pele de origem alógena (obtida de cadáveres), apresenta muitas das características mencionadas acima, é considerada para a substituição de pele quando um tecido autólogo não está disponível. Entretanto, o transplante de pele de

origem heterógena (de outro doador) é muito mais complexo do que transplantes de órgãos internos. Como a pele representa a interface do organismo com o ambiente externo, células que nela vivem são especializadas na resposta imunológica e, portanto, promovem a rejeição de tecidos heterólogos. Assim, a pele alógena constitui-se em um substrato de recobrimento apenas temporário, sendo rejeitada após uma a duas semanas. Além disso, esse método traz o risco de infecção por vírus com os da hepatite ou a AIDS para o indivíduo receptor (Phillips, 1993).

Abordagens nas quais o transplante autólogo é efetuado e dispositivos para acelerar a recuperação da região doadora são empregados são também de grande interesse na terapia integrada de pacientes com queimaduras extensas que requeiram transplantes de grande quantidade de pele. O recobrimento da área doadora pode ser feito por curativos que vão desempenhar o papel de estimuladores do processo de cicatrização, protetores contra possíveis infecções oportunistas, dreno do exsudato do ferimento, permitindo a realização de trocas gasosas com o ambiente. Os curativos comumente empregados nestes casos são trocados diariamente.

Em algumas situações, é de interesse que o curativo possa ser absorvido pelo organismo durante a recuperação do tecido, evitando, portanto, sua retirada ou troca e, possivelmente, danos ao tecido recuperado, ainda sensível. Para ser considerado como um biomaterial de uso temporário, um curativo deve ser degradado concomitantemente à regeneração de uma lesão de pele, o que pode ocorrer no período de um mês aproximadamente (Rodrigues, 2008).

## **2.2. Características dos biopolímeros constituintes de biomateriais e de dispositivos de liberação controlada**

A Engenharia de Tecidos enfoca a reparação e regeneração de lesões, utilizando polímeros como sistemas de suporte que servem para apoiar, reforçar e em alguns casos, organizar a regeneração tecidual (Madhally e Matthew, 1999). Recentemente, alguns dos principais esforços na biologia molecular têm sido aplicados para a compreensão da cicatrização de feridas, e no desenvolvimento de processos regenerativos. A principal consideração no desenvolvimento de uma estratégia para promover reparação e regeneração tecidual é identificar as possíveis fontes de células doadoras e os mecanismos envolvidos no processo (Metcalf e Ferguson, 2007).

Biopolímeros são frequentemente empregados no desenvolvimento de avançadas terapias de lesões de pele, tanto agudas como crônicas, sendo um dos grandes desafios nesta área a produção de biomateriais que apresentem formas e arranjos internos pré-definidos, e contenham ou não poros, dependendo da função desejada, contribuindo assim, para direcionar o crescimento tecidual (Metcalf e Ferguson, 2007).

Dentre os polímeros de origem biológica biocompatíveis considerados de relevância na constituição de biomateriais e de outros dispositivos úteis nas áreas médicas, farmacêuticas e odontológicas, incluindo também sistemas para a liberação de fármacos e materiais com aplicações na área de alimentos, destacam-se a quitosana, o alginato, a xantana, a pectina e a carragena, que são abordados a seguir.

### 2.2.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, um dos mais abundantes materiais orgânicos naturais, sendo superado apenas pela celulose na quantidade produzida anualmente por biossíntese. Trata-se de um importante componente do exoesqueleto de animais, especialmente em crustáceos, moluscos e insetos. É também o principal polímero fibrilar constituinte da parede celular de alguns fungos (Khor e Lim, 2003). A Figura 2.1 apresenta as estruturas da quitina e da quitosana.

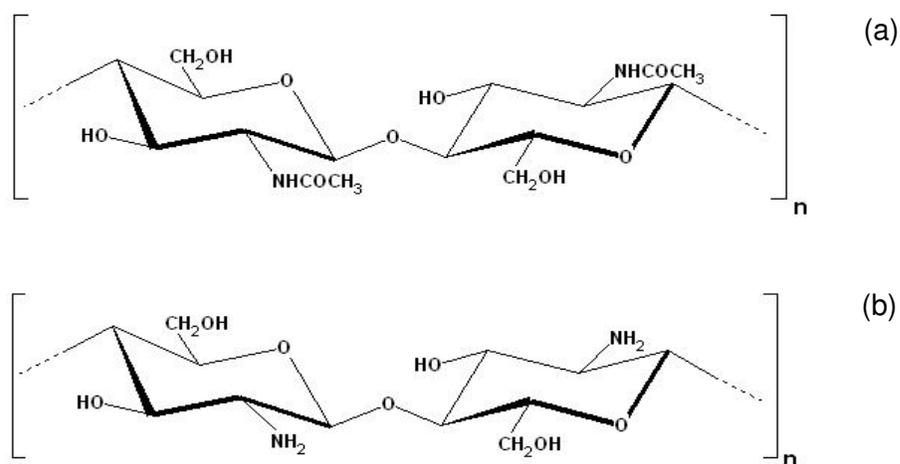


Figura 2.1: Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana (baseada em Kumar, 2000).

A quitosana é obtida pela desacetilação alcalina da quitina e é constituída pela seqüência linear de carboidratos monoméricos  $\beta$ -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) (Wittaya-areekul e Prahsarn, 2006). O grau de acetilação, uma das importantes características variáveis deste material, refere-se à proporção de unidades de N-acetil-D-glucosamina em relação ao número total de monômeros. O nome quitosana é aplicado às cadeias que apresentam grau de desacetilação maior que 50%. A quitosana possui, geralmente, grau de desacetilação (G.D.) entre 70 a 95%, com massa molar de  $10^4$  a  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. O grau de desacetilação é um parâmetro estrutural que influencia propriedades físico-químicas como a massa molar, o alongamento e a tensão na ruptura (Chatelet *et al.*, 2001). A Tabela 2.1 apresenta as principais aplicações da quitosana e da quitina em diversas áreas.

Tabela 2.1: Principais aplicações da quitina e da quitosana (Dallan, 2005).

<b>Área Industrial</b>	<b>Área de Saúde e Nutrição</b>
Purificação de água residual de indústrias	Agentes absorvedores de gorduras
Estabilizante de gorduras em alimentos	Redução do colesterol LDL
Estabilizantes de aromas	Auxiliares do colesterol HDL
Meios de troca iônica	Regeneração de pele
Aditivos de cosméticos e xampus	Antiácido
Adsorventes na remoção de metais pesados	Auxiliar no controle na pressão arterial
Proteção contra o ataque bacteriano 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
	Bactericida/antiviral
	Inibidor da formação de placa dentária
	Auxiliar na absorção de cálcio
	Membranas artificiais

Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade e atoxicidade, a quitosana tem sido muito estudada em diversas aplicações na área de biomateriais (Kumar, 2000; Niekraszewicz, 2005). Este composto possui também propriedades bacteriostáticas e fungistáticas, capacidade de ativação de macrófagos, estimulação de migração e proliferação celular, além de promover orientação para a reorganização da histo-arquitetura celular (Paul e Sharma, 2004; Clasen *et al.*, 2006)

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, formando uma solução de polieletrólito viscosa. Suas soluções são propensas a formar fibras, filmes e revestimentos, e possuem boa miscibilidade com outros polímeros, formando complexos e quelatos. A presença de grupos ativos, principalmente aminas, na molécula da quitosana permite que esta seja modificada quimicamente para diferentes aplicações (Niekraszewicz, 2005).

Em decorrência de suas propriedades, a quitosana pode ser utilizada de diversas formas, como gel, membranas, esponjas e em solução. Suas aplicações médicas englobam lentes de contato, cápsulas, sistemas de liberação controlada de fármacos e curativos (Niekraszewicz, 2005; Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b).

Em diversos casos relatados na literatura enfocando testes clínicos feitos em condições normais feitos com o intuito de avaliar biomateriais constituídos de quitosana não foram relatadas reações inflamatórias ou alérgicas após o implante, a injeção, a aplicação tópica ou a ingestão por humanos (Muzzarelli, 1995). A quitosana é também um polímero bioativo, agindo como agente hemostático com propriedades antitrombogênicas (Hoeskstra *et al.*, 1998). Este composto também estimula o sistema imune do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas (Rabea *et al.*, 2003), além de possuir propriedades curativas de feridas e favorecer a regeneração de tecidos moles (Muzzarelli, 1993) e duros (Muzzarelli *et al.*, 1994, Hidaka *et al.*, 1999).

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 (Mi *et al.* 2001). Na forma de membranas densas, a quitosana mostrou ter influência em todos os estágios de cicatrização tecidual em experimentos com modelos animais, afetando vários mecanismos, como coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem (Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Niekraszewicz, 2005). Além disso,

lesões tratadas com quitina e quitosana em vários animais apresentaram diminuição no tempo de tratamento, com formação mínima de cicatrizes (Paul e Sharma, 2004).

Dallan (2005) realizou um estudo sobre membranas densas de quitosana para uso potencial no tratamento de queimaduras, bem como a substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol e a influência da técnica de esterilização nas características das membranas produzidas. A utilização de quitina e glicerol permite a obtenção de membranas com capacidade de absorção de líquidos e propriedades mecânicas inferiores às observadas para as membranas formadas exclusivamente por quitosana, reduzindo também a cristalinidade do material. Nenhuma das composições produzidas mostrou-se favorável à adesão de células Vero em suas superfícies. As células Vero, isoladas do rim de macaco-verde africano, consistem em fibroblastos aderentes e são comumente utilizadas na análise de citotoxicidade de biomateriais projetados para cicatrização ou reconstituição de tecidos lesados (Moraes *et al.*, 2008). A utilização de óxido de etileno mostrou-se como a técnica de esterilização mais apropriada em termos de manutenção das características iniciais dos biomateriais. Os resultados obtidos indicaram que a maioria das composições apresentou características adequadas para utilização como curativos temporários não biodegradáveis, sendo as membranas compostas somente por quitosana aquelas que mostraram os resultados mais promissores de uso para esta finalidade.

Membranas densas constituídas unicamente de quitosana apresentam algumas desvantagens quando utilizadas em lesões úmidas, devido à permeabilidade insuficiente ao exsudato e ao oxigênio e à baixa flexibilidade no estado seco, o que causa dificuldades na aplicação (Clasen *et al.*, 2006). Devido a estes fatos, a associação da quitosana com outros polímeros, como o alginato, a xantana, a pectina e a carragena, é de grande interesse na área biomédica. Dumitriu e Chornet (1998) descrevem a formação de membranas de quitosana complexada com alginato, carboximetilquitina, heparina e poli(ácido acrílico).

Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) relatam a preparação de produtos contendo quitosana e diversos poliânions naturais como carboximetilcelulose, alginato, sulfato de dextrana, heparina, carboximetildextrana, carragena, pectina, colágeno e xantana. Neste estudo, os autores avaliaram as propriedades viscoelásticas do hidrogel quitosana-xantana, verificando que a concentração dos polímeros e o meio de dispersão tem influência na formação do hidrogel.

### 2.2.2. Alginato

Os alginatos são polissacarídeos naturais lineares que, na presença de cátions multivalentes, têm a capacidade de formar géis. São compostos por duas diferentes unidades repetitivas, (1,4)- $\alpha$ -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- $\beta$ -D-manuronato (unidade M), conforme apresentado na Figura 2.2, em variadas proporções e arranjos seqüenciais. São utilizados tradicionalmente como agentes gelificantes e espessantes, sendo amplamente aplicados na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, cosmética, no setor agrícola e na indústria de química fina. Os alginatos comerciais podem ser extraídos de diversos tipos de algas, mas 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 (Hou *et al.*, 2006; Qin, 2004).

As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes com os blocos homopoliméricos dos resíduos do guluronato, os blocos G. Dentre os cátions divalentes utilizados, destacam-se o magnésio, o cálcio, o estrôncio e o bário, sendo mais comumente empregado o cálcio. Os íons  $\text{Ca}^{++}$  localizam-se nas cavidades eletronegativas, e as interações iônicas entre os blocos de guluronato e os íons  $\text{Ca}^{++}$  causam a formação de um gel termoestável resistente (Rodrigues, 2004).

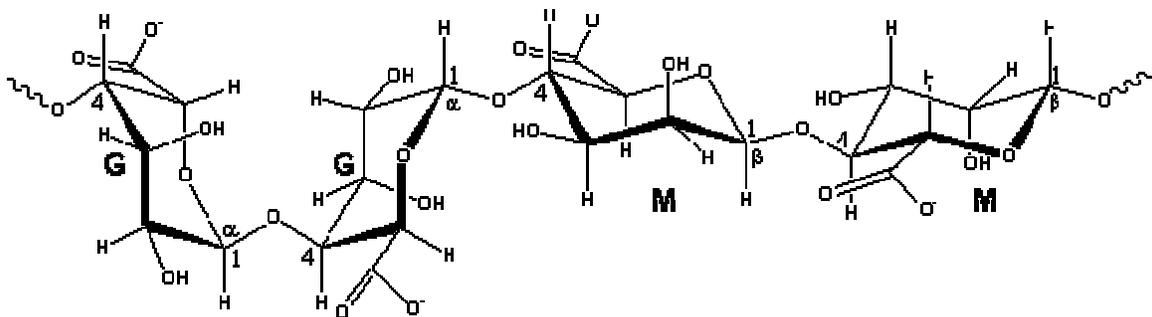


Figura 2.2: Fórmula estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de  $\alpha$ -L-guluronato e M, os copolímeros de  $\alpha$ -D-manuronato.

A capacidade de gelificação dos alginatos auxilia na remoção dos curativos preparados a partir deste composto, por não aderirem ao leito da lesão, diminuindo 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 nervosos e acelerar o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxerto (Paul e Sharma, 2004).

Por volta da década de 80, as fibras de alginato começaram a ser amplamente utilizadas na produção de curativos, por este composto ser não-tóxico e seguro para ser utilizado na superfície de feridas e em suas cavidades. Também quando o alginato de cálcio insolúvel é colocado em contato com feridas com exsudato, parte dos íons cálcio são trocados pelos íons sódio dos fluidos corpóreos, podendo estes íons cálcio atuar como agentes hemostáticos. Além disso, 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).

### 2.2.3. Xantana

A xantana é um heteropolissacarídeo obtido por fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris*, possuindo massa molar em torno de  $2 \times 10^6$  Da, podendo chegar a  $50 \times 10^6$  Da (Rosalam e England, 2006). Sua estrutura primária consiste em unidades que se repetem de um pentassacarídeo formado por duas moléculas de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico, além de grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de  $\beta$ -D-glicose com ligações nas posições 1 e 4, como mostra a Figura 2.3 (García-Ochoa *et al.*, 2000).

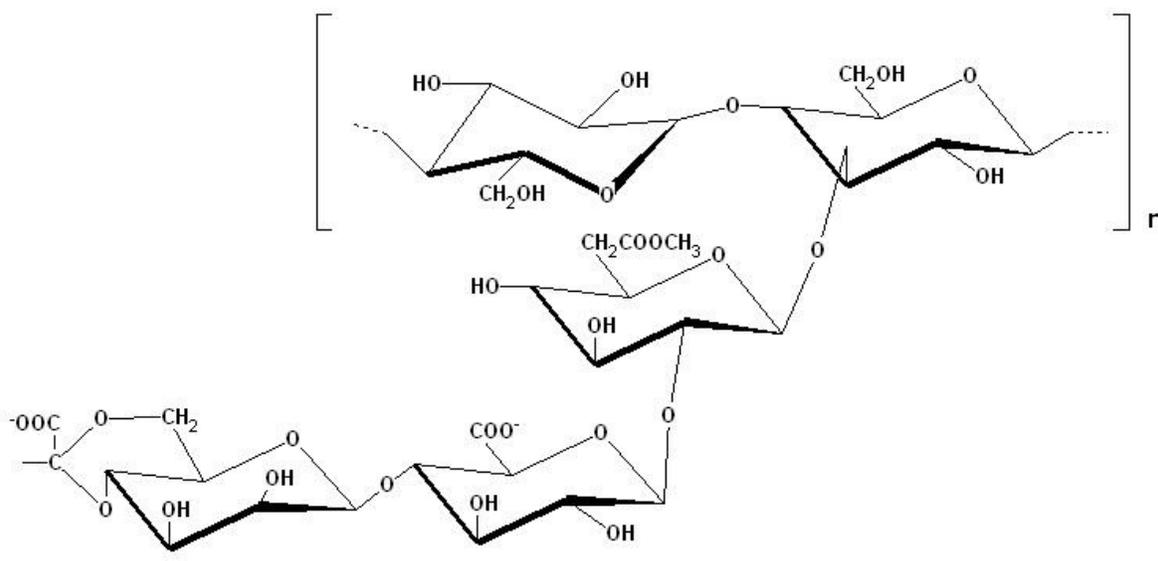


Figura 2.3: Estrutura da xantana (García-Ochoa *et al.*, 2000).

A xantana é um produto atóxico que não promove sensibilização e não causa irritação na pele e nos olhos, tendo sido aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em 1969 como aditivo em alimentos (García-Ochoa *et al.*, 2000). No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871 da Legislação Brasileira de Alimentos (Lima *et al.*, 2001). É permitido o uso como espessante na composição de medicamentos, mas não há ainda legislação sobre a utilização da xantana para uso interno (implantes).

Suas aplicações são diversas, principalmente como espessante em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos, em função de sua capacidade de estabilização de emulsões, estabilidade térmica, compatibilidade com ingredientes alimentícios e propriedades reológicas pseudoplásticas (García-Ochoa *et al.*, 2000; Kim e Yoo, 2006).

Dentre as propriedades da xantana, destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05-1%) devido à sua estrutura ramificada e sua alta massa molar, bem como estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH (Mesomo, 2007; García-Ochoa, *et al.*, 2000).

As soluções de xantana apresentam comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se altera na faixa de temperatura entre 4º e 93ºC, em pH variando de 1 a 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio em água entre 0,05% e 1%. Há compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes e conservantes (Lima *et al.*, 2001). Estas características em conjunto a tornam muito versátil.

Alterações nas condições de fermentação utilizadas para obtenção da xantana podem influenciar sua massa molar, o que resulta em certa dificuldade na manutenção de uniformidade na produção deste polissacarídeo. Porém, a xantana vem substituindo gradativamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais (como plantas) na indústria de alimentos. A preferência por biopolímeros microbianos se deve à similaridade de suas propriedades funcionais em relação a compostos equivalentes, somada às vantagens de sua produção ser independente de condições climáticas (García-Ochoa *et al.*, 2000).

Há relatos na literatura sobre o uso de xantana na produção de dispositivos para a liberação controlada de fármacos (Andreopoulos e Tarantili, 2001; Vendruscolo *et al.*, 2005). Andreopoulos e Tarantili (2001) descreveram o estudo de liberação controlada de ácido salicílico utilizando matrizes preparadas com xantana e este fármaco em proporções de 1, 2 e 5%. Estas matrizes foram expostas à água destilada a 37°C e a liberação do medicamento ocorreu dentro das primeiras 10 horas após a imersão, sendo independente da concentração inicial de ácido salicílico na matriz de xantana.

Vendruscolo *et al.* (2005) descreveram a preparação de comprimidos utilizando-se somente xantana e também a este composto associado à galactomana extraída de sementes de *Mimosa scrabella* como matrizes para liberação controlada de teofilina. A liberação do fármaco *in vitro* foi avaliada por 8 horas em solução tampão a 37°C e 100 rpm. Foi observada uma diminuição na liberação da teofilina com o aumento da concentração dos polímeros, sendo que todas as formulações contendo 25% ou mais de xantana demonstraram excessiva retenção do fármaco, enquanto que aquelas contendo a mistura xantana-galactomana a 8% de xantana apresentaram o perfil de dissolução mais adequado, liberando cerca de 90% do fármaco em 8 h.

Não há dados na literatura sobre o uso de membranas compostas de xantana, isolada ou complexada a outros polímeros, para uso como curativos, tornando a proposta deste trabalho inédita e pertinente.

#### **2.2.4. Pectina**

A pectina é um polissacarídeo extraído da parede celular de algumas plantas e do albedo de frutas cítricas. É composta de segmentos galacturônicos metilados separados por resíduos de ramnose, conforme indicado na Figura 2.4, sendo usualmente classificada quanto ao grau de esterificação como de baixa esterificação quando menor que 50% e como de alta esterificação quando maior que 50% (Hiorth *et al.*, 2005; Ghaffari *et al.*, 2007).

A capacidade de formação de gel depende do grau de esterificação. Pectinas muito esterificadas formam gel na presença de, por exemplo, açúcar como co-soluto, e esta gelificação ocorre, provavelmente, por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Pectinas com baixa esterificação formam gel na presença de íons divalentes como o cálcio, que são capazes de formar pontes entre dois grupos carboxílicos

pertencentes a cadeias diferentes de pectina próximas fisicamente (Hiorth *et al.*, 2005; Chang e Lin, 2000).

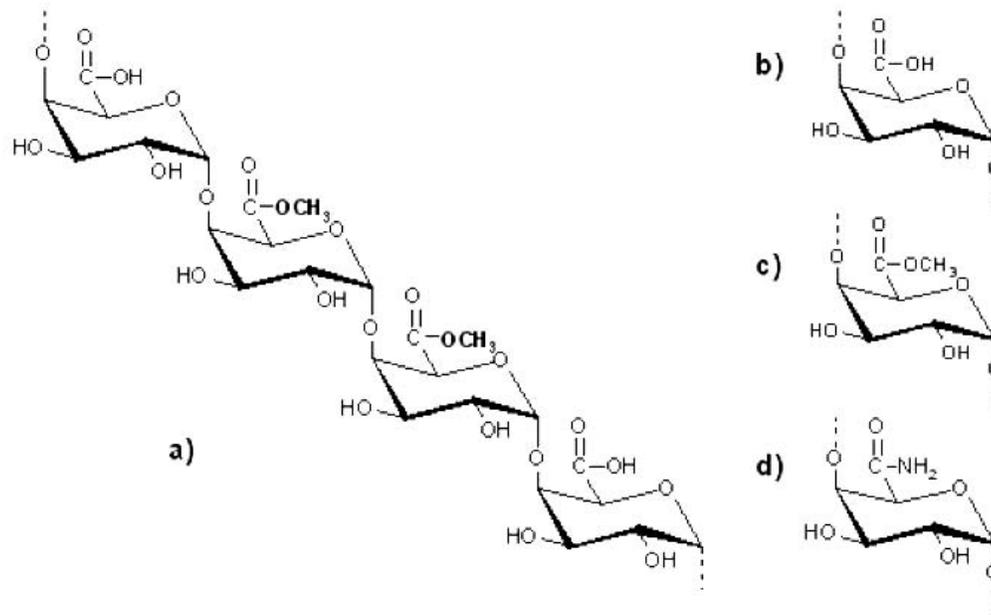


Figura 2.4: (a) Segmento repetitivo na molécula de pectina e grupos funcionais carboxila (b); éster (c); amida (d) na cadeia de pectina (Sriamornsak, 2003).

Na indústria farmacêutica, a complexação de pectina e cálcio foi já investigada em várias formulações diferentes para administração de medicamentos destinados ao cólon. Esta combinação tem sido relatada na literatura para comprimidos revestidos, esferas de hidrogel e filmes de recobrimento para cobertura de lesões de pele, este último já disponível comercialmente (Hiorth *et al.*, 2005; Ghaffari *et al.*, 2007).

### 2.2.5. Carragena

Carragenas são polissacarídeos de alta massa molar extraídos de alguns tipos de algas vermelhas, sendo formados por poligalactanos, que são polímeros sulfatados de moléculas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose. Em função do conteúdo e distribuição dos grupos de ésteres sulfatados, as carragenas podem ser classificadas em iota, kappa e lambda. A carragena atua como emulsificante, gelificante, estabilizante e possui a capacidade de manter partículas em suspensão. O uso de carragenas é indicado para

formulação de medicações e em diversos produtos alimentícios de baixo teor calórico (Granada *et al.*, 2005; Pedroso e Demiate, 2008). A Figura 2.5 ilustra a fórmula estrutural dos tipos diferentes de carragena.

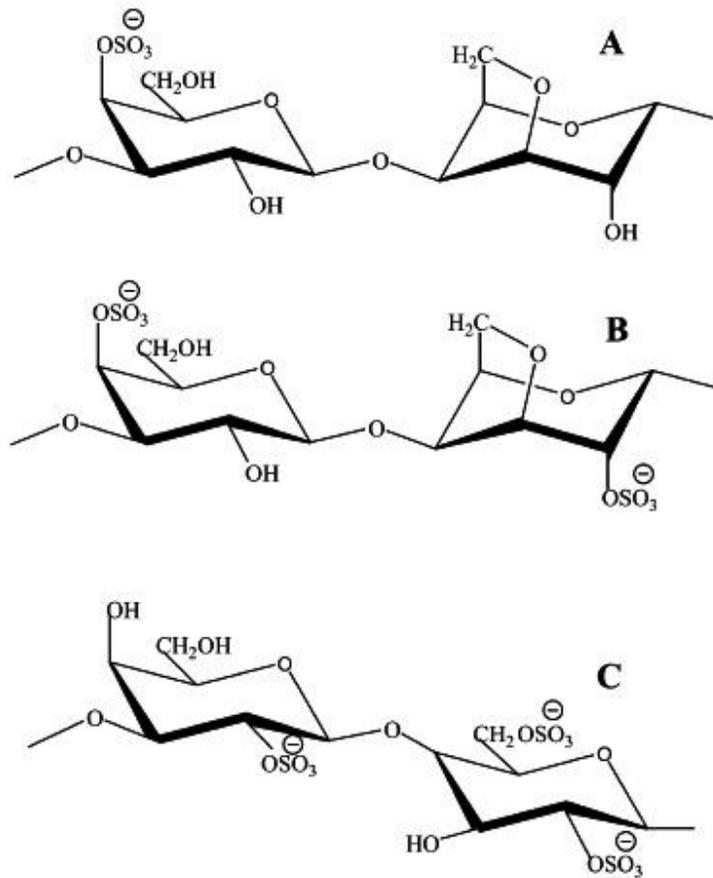


Figura 2.5: Fórmulas estruturais de kappa (A), iota (B) e lambda (C) carragenas (Shchipunov, 2003).

O uso de carragena em materiais biocompatíveis vem sendo estudado devido a sua capacidade de gelificação, estabilidade em variados solventes e atoxicidade. Şem e Avcı (2005) relatam a obtenção de um hidrogel composto de κ-carragena e poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) por radiação para uso no tratamento de lesões de pele. Os autores verificaram que o hidrogel formado pôde absorver o fluido de forma eficaz, apresentando elevada elasticidade, além de ser agradável ao toque e indolor durante a remoção. O material também apresentou boa resistência mecânica e transparência, permitindo a observação do processo de cicatrização.

### 2.3. Formação de hidrogéis e complexos polieletrólitos contendo quitosana

Conforme já mencionado, vários polímeros estão sendo estudados para a obtenção de hidrogéis com aplicação nas áreas de farmácia, medicina e biotecnologia, particularmente para o tratamento de feridas e como membranas, matrizes (ou outros dispositivos) para a liberação controlada de fármacos. Essas aplicações são factíveis devido às características apresentadas por estes compostos, como capacidade de intumescimento, permeabilidade a solutos e adequado desempenho *in vivo* (Khurma *et al.*, 2006).

O termo hidrogel tem diferentes definições e diversos métodos de classificação são encontrados na literatura, dependendo da natureza e da estrutura do sistema. Basicamente, os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que intumescem em meio aquoso e retêm uma grande quantidade de água em sua estrutura sem se dissolver (Horn, 2008). Um dos métodos de classificação fundamenta-se nos tipos de redes formadas: redes entrelaçadas, redes covalentemente ligadas e redes formadas por interações secundárias, que inclui todos os casos intermediários (Berger *et al.*, 2004a). 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).

A quitosana, em função de apresentar seus grupos amino carregados positivamente em pH inferior a 6,5, tem a capacidade de interagir com materiais negativamente carregados, como enzimas, células, polissacarídeos, ácidos nucléicos, entre outros (Argin-Soysal *et al.*, 2009). Os hidrogéis de quitosana são classificados como químicos e físicos. Os químicos são formados por ligações covalentes irreversíveis, e os hidrogéis físicos são formados por vários tipos de ligações reversíveis, como as interações iônicas nos hidrogéis ligados ionicamente e nos complexos polieletrólitos (PECs) formados com moléculas aniônicas de alta massa molar. Devido à natureza das interações serem as mesmas nos hidrogéis ligados ionicamente e nos PECs, não há uma divisão precisa entre tais estruturas. Assim, consideram-se hidrogéis ligados ionicamente aqueles nos quais a quitosana se liga a um íon, e como PECs, quando a quitosana interage com outros polímeros (Berger *et al.*, 2004a; Rodrigues, 2008).

Os PECs são, então, formados pela interação de polímeros com cargas opostas ligados, principalmente, por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, mas também por interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ou pela combinação destas. A formação

destes complexos pode afetar fortemente algumas das propriedades dos polímeros isolados, como solubilidade, reologia, condutividade elétrica, propriedades mecânicas e permeabilidade, além de modificar a turbidez das soluções (Lee *et al.*, 1999).

A formação dos PECs pode variar conforme as condições de reação, como pH, força iônica, concentrações dos compostos envolvidos, relações mássicas e temperatura, modificando sua estrutura final (Dumitriu e Chornet, 1998). Durante a complexação, os polieletrólitos podem formar coacervados ou formar um hidrogel mais ou menos compacto. Contudo, se as interações iônicas forem muito fortes, pode ocorrer precipitação, dificultando ou mesmo impedindo a formação de hidrogéis (Berger *et al.*, 2004b).

Uma grande variedade de polímeros capazes de formar hidrogéis e PECs tem sido apontada como possíveis candidatos para recobrimento de tecidos lesados ou para utilização em diversas aplicações biomédicas, estando os hidrogéis de quitosana e poliânions diversos dentre os mais estudados para a preparação de membranas para fins terapêuticos (Rodrigues, 2008; Paul e Sharma, 2004; Mao *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2000; Muzzarelli *et al.*, 1988).

### **2.3.1. Membranas de quitosana-alginato**

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 lavagem, moldagem e secagem após suspensão em solução aquosa de cloreto de cálcio. Rodrigues (2008) adaptou adicionalmente esta técnica, estabelecendo condições de processo enfocando concentrações dos polímeros, taxa de agitação, taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato, método de desaeração, secagem e esterilização. Com estas condições estabelecidas, foi possível a produção de membranas quitosana-alginato homogêneas e flexíveis, garantindo reprodutibilidade e possibilitando o escalonamento do processo. A Tabela 2.2 resume as principais propriedades das membranas compostas por quitosana e alginato produzidas por Rodrigues (2008).

Os PECs formados por quitosana e alginato são geralmente redes biocompatíveis que exibem características de intumescimento particulares. A rede polimérica pode ser caracterizada como um micro ambiente hidrofílico com alta quantidade de água e alta densidade de cargas elétricas (Rodrigues, 2008).

Tabela 2.2: Principais propriedades das membranas de quitosana-alginato produzidas por Rodrigues (2008).

Propriedade	Valores médios $\pm$ desvio padrão
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	77,86 $\pm$ 17,76
Capacidade máx. de absorção de água (g/g)	19,19 $\pm$ 0,61
Capacidade máx. de absorção de solução salina 0,9% (g/g)	10,59 $\pm$ 1,54
Capacidade máx. de absorção de fluido corpóreo simulado (g/g)	4,88 $\pm$ 1,85
Capacidade máx. de absorção de soro fetal bovino (g/g)	5,37 $\pm$ 0,37
Perda de massa em água (%)	20,70 $\pm$ 3,63
Perda de massa em solução salina 0,9% (%)	3,27 $\pm$ 0,49
Perda de massa em fluido corpóreo simulado(%)	2,40 $\pm$ 1,33
Perda de massa em soro fetal bovino (%)	2,96 $\pm$ 2,34
Capacidade de drenagem (g/m <sup>2</sup> .dia)	13.559 $\pm$ 1.119
Resistência à tração (MPa)	27,70 $\pm$ 2,87
Alongamento na ruptura (%)	8,42 $\pm$ 2,82
Permeabilidade ao vapor d'água (g/m <sup>2</sup> dia)	2.556 a 2.832
Permeação à bactérias ( <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> )	nula

A formação destes complexos ocorre devido à natureza catiônica da quitosana em solução, que permite a produção de complexos com espécies aniônicas como o alginato (Paul e Sharma, 2004; Wang *et al.*, 2002 e 2001; Yan *et al.*, 2000), conforme ilustrado na Figura 2.6. As principais interações envolvidas neste processo são as forças de atração eletrostática (entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxil do alginato), as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas.

Para preparar coacervados para a formação de filmes homogêneos, a taxa de reação entre os dois polímeros deve ser suficientemente baixa para evitar a formação de membranas interfásicas, de modo que a reação entre eles possa ser o mais completa possível. A adição de um solvente orgânico miscível em água (como acetona ou etanol) à

solução de quitosana causa redução da taxa de coacervação, já que a quitosana assume conformações menos estendidas, o que diminui a velocidade da reação entre os dois polímeros (Yan *et al.*, 2000).

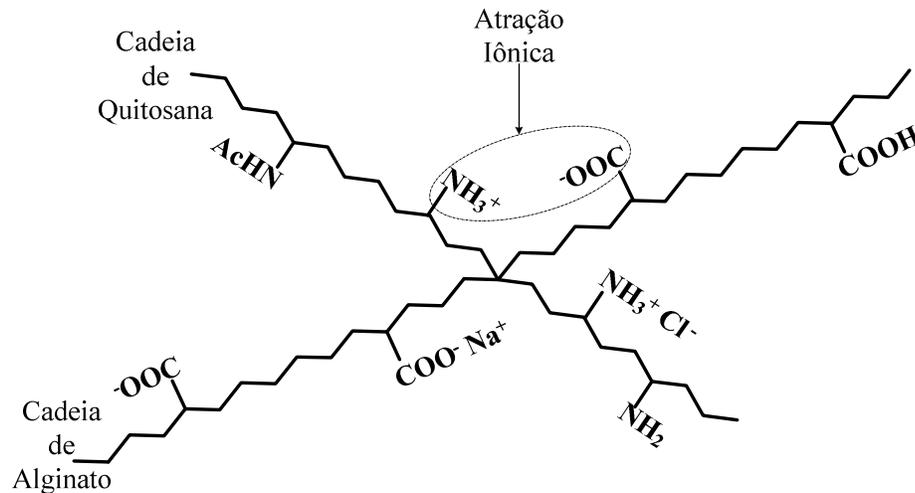


Figura 2.6: Representação esquemática da formação dos complexos polieletrólitos (PEC), entre as cadeias de alginato de sódio e de quitosana (Rodrigues 2008).

Os complexos polieletrólitos podem ser reforçados através da adição de íons, induzindo a formação de sistemas ligados ionicamente, como por exemplo pelo íon  $\text{Ca}^{++}$ , que pode ser adicionado em complexos contendo alginato ou pectina (Berger *et al.*, 2004b).

Visto que é factível a formação de membranas compostas de quitosana e alginato para utilização em lesões de pele, a possibilidade de substituição deste último por poliânions como pectina, carragena e xantana, a fim de se obter membranas semelhantes ou com características específicas para diferentes aplicações é discutida nos itens que se seguem.

### **2.3.2. Outros complexos formados entre quitosana e poliânions naturais**

A obtenção de um complexo polieletrólito contendo quitosana requer o uso de polímeros do tipo poliânions e a reação é geralmente realizada em solução aquosa, favorecendo assim o aspecto de biocompatibilidade do produto final. Os poliânions mais comumente usados são polissacarídeos contendo grupos carboxílicos, tais como alginato,

pectina, carboximetilcelulose, dextrana, heparina, ácido hialurônico e carragena, assim como algumas proteínas e polímeros sintéticos (Berger *et al.*, 2004b; Dumitriu e Chornet, 1998). A Tabela 2.3 apresenta os tipos de complexos formados quando a quitosana é colocada em contato com variados poliânions.

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 <sup>-</sup>	Hidrogel, micropartículas com Ca <sup>2+</sup>
	Carragena	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Carboximetil-celulose	-COO <sup>-</sup>	Precipitado, hidrogel com Al <sup>3+</sup>
	Dextrana	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Precipitado, hidrogel com NaCl
	Heparina	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Precipitado
	Ácido hialurônico	-COO <sup>-</sup>	Precipitado
	Pectina	-COO <sup>-</sup>	Hidrogel, filme, micropartículas com Ca <sup>2+</sup>
	Xantana	-COO <sup>-</sup>	Hidrogel
Proteínas	Colágeno	-COO <sup>-</sup>	Precipitado, filmes
Polímeros Sintéticos	Ácido poli-acrílico	-COO <sup>-</sup>	Precipitado
	Ácido polifosfórico	-OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Micropartículas
	Polifosfato	-OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Micropartículas
	Poli(L-lactato)	-OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Matrizes porosas

Alguns complexos polieletrólitos foram estudados para aplicações médicas e farmacêuticas, em diversas formas de apresentação (como hidrogéis, cápsulas, tabletes, filmes e partículas) com o intuito de avaliar sua aplicabilidade. São discutidos a seguir alguns estudos realizados com poliânions empregados no desenvolvimento deste trabalho.

Chellat *et al.* (2000) avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de tabletes de quitosana-xantana e verificaram que *in vitro* não houve efeito citotóxico significativo,

mas *in vivo* (implantação subcutânea em ratos), o material apresentou reação inflamatória significativa, mas não reação necrótica. Os autores observaram também que os produtos da degradação das amostras não mostraram citotoxicidade. A Figura 2.7 ilustra a interação entre quitosana e xantana na formação do hidrogel. Não foram localizados outros estudos específicos sobre biocompatibilidade do complexo (quitosana-xantana). Entretanto, Uekama *et al.* (1995) estudaram o uso de supositórios compostos de  $\alpha$ -ciclodextrina em combinação com xantana para liberação controlada de morfina, observando considerável redução de irritação da mucosa retal.

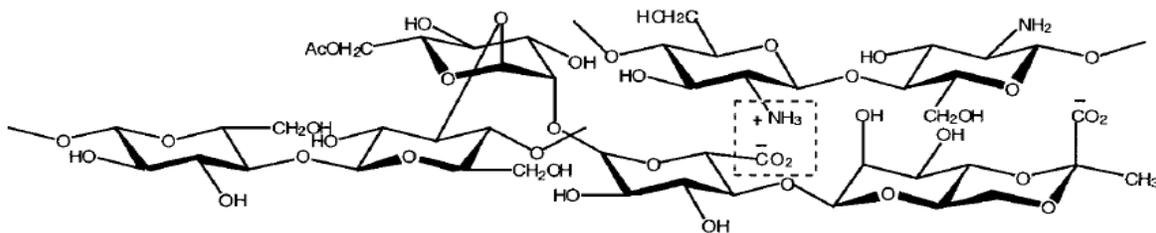


Figura 2.7: Representação esquemática da interação de quitosana e xantana para formação do hidrogel (Chellat *et al.*, 2000).

Magnin *et al.* (2003) utilizaram um hidrogel composto de quitosana e xantana para imobilização de três enzimas (endopeptidase, serinoprotease e lipase), no qual as proteínas mantiveram sua atividade catalítica. Mais recentemente, as condições de complexação xantana-quitosana foram estudadas por Argin-Soysal *et al.* (2009), que avaliaram o efeito da concentração dos polímeros e do pH da solução de quitosana no grau de entumescimento de cápsulas. Não houve formação de hidrogel estável em soluções de xantana com concentração menor que 0,5% (m/v) e o aumento das concentrações de ambas as soluções ocasionou diminuição no grau de entumescimento das cápsulas. Os melhores resultados ocorreram em pH 5,5 e concentração de 0,7% (m/v).

Ghaffari *et al.* (2007) estudaram o potencial uso de filmes contendo quitosana e pectina como sistemas de liberação controlada de teofilina. A razão mássica ótima entre os polímeros para formação do complexo foi de 2:1 pectina:quitosana (m/m). O material obtido apresentou capacidade de entumescimento prematura quando em contato com o meio intestinal simulado. Macleod *et al.* (1999) avaliaram o potencial de filmes de pectina, quitosana e hidroxipropil metilcelulose como sistema de revestimento para comprimidos, observando um comportamento bimodal na liberação de medicamentos. Uma formulação adequada do filme é capaz de produzir sistemas que liberam o fármaco a diferentes taxas, dependendo da forma de dosagem no trato gastrointestinal.

Tomida *et al.* (1994) sugerem que dispositivos de  $\kappa$ -carragena/quitosana, na forma de cápsulas, podem liberar teofilina de forma controlada. Os autores observaram que o pH e a força iônica do meio influem na taxa de liberação do fármaco, assim como a espessura e a composição da cápsula. Tapia *et al.* (2004) compararam a possibilidade de uso de misturas de quitosana/carragena e quitosana/alginato na forma de comprimidos como sistemas de liberação controlada de fármacos, usando hidrocloreto de diltiazem como modelo de fármaco. Neste estudo, o sistema quitosana/alginato alcançou melhores resultados quando em baixas concentrações de polímeros, visto que nestas condições o fármaco permeou mais facilmente a matriz polimérica. No caso do sistema quitosana/carragena, a liberação do fármaco foi controlada pela capacidade da carragena de promover a entrada de água na matriz. Piyakulawat *et al.* (2007) observaram que partículas de gel compostas de quitosana e  $\kappa$ -carragena são capazes de liberar, de maneira controlada, diclofenaco de sódio em condições simuladas do trato gastrointestinal. A taxa de liberação do fármaco foi controlada pelo mecanismo de dissolução do diclofenaco de sódio no meio e da difusão deste através do hidrogel.

Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) avaliaram o comportamento reológico do hidrogel composto de quitosana e xantana utilizando modelos matemáticos aplicáveis para géis fracos. Os resultados mostraram que a estrutura e as propriedades finais destes hidrogéis são afetados por variados fatores (tais como a concentração e a natureza do meio de dispersão do hidrogel), e que as interações entre estes fatores devem ser consideradas para a preparação de complexos com propriedades pré-estabelecidas.

Frente a estes estudos, considerou-se a aplicação de pectina, carragena e xantana como poliânions para a produção de membranas coacervadas de quitosana, com base no protocolo experimental proposto por Rodrigues (2008), a fim de se obter curativos adequados, que apresentassem alta capacidade de drenagem e absorção de fluidos, além de características adequadas quanto à resistência mecânica.

As membranas quitosana-alginato produzidas por Rodrigues (2008) apresentam valores de resistência à tração (máximo de 31 MPa) adequados para o uso em curativos, já que segundo Wang *et al.* (2002), a resistência à tração da pele normal varia de 2,5 a 16 MPa. Entretanto, o alongamento máximo na ruptura destas membranas (de 8,4%) é baixo em comparação com a elasticidade da pele normal, que é de aproximadamente 70% (Hansen e Jemec, 2002). Por haver inadequação quanto a esse aspecto, deve-se idealmente melhorar esta propriedade em novos procedimentos, dispondo-se das estratégias discutidas a seguir.

### **2.3.3. Métodos de reforço mecânico das membranas**

O uso de agentes plastificantes nas membranas poliméricas é uma alternativa para aumentar a adequação mecânica das membranas, sendo geralmente empregado para superar a fragilidade dos filmes poliméricos. Esta característica é inerente à estrutura primária e às forças intermoleculares que ocorrem em polímeros naturais. Plastificantes agem através da redução das forças intermoleculares, suavizando a rigidez da estrutura do filme e aumentando a mobilidade das cadeias biopoliméricas, melhorando assim as propriedades mecânicas. O agentes plastificantes mais utilizados são glicerol, sorbitol, eritrol, ácido láctico e polietilenoglicol. O glicerol é indicado para melhorar a flexibilidade e elasticidade dos filmes. Entretanto, em membranas de quitosana, a adição de glicerol não melhorou as propriedades mecânicas do material, possivelmente porque este composto foi solubilizado durante as etapas de imersão em água incluídas no procedimento experimental (Dallan *et al.*, 2007). Polietilenoglicol aplicado em filmes de quitosana em concentrações entre 0,25% e 0,5% resulta na redução da resistência à tração do filme, mas aumenta o alongamento na ruptura (Srinivasa *et al.*, 2007).

A melhoria das propriedades mecânicas pode ser também obtida pela reticulação covalente das membranas, utilizando, por exemplo, glutaraldeído, que liga entre si grupos amino presentes na quitosana. Entretanto, este método tem a desvantagem de que resíduos de glutaraldeído não envolvidos na reticulação devem ser removidos, pois apresentam atividade citotóxica (Adekogbe e Ghanem, 2005).

Outra alternativa para melhoria das características mecânicas é a reticulação térmica, aplicada em substituição à reticulação iônica. Esta técnica foi empregada por Bernabé *et al.* (2005), que reticularam membranas de quitosana e pectina, expondo-as à temperatura de 120°C em atmosfera de nitrogênio. Este tratamento converte as ligações iônicas formadas entre os grupamentos amino da quitosana e carboxila da pectina em ligações amídicas. Apesar dos autores não terem caracterizado as membranas quanto à resistência mecânica, hipoteticamente esta propriedade seria melhorada em decorrência da formação de ligações covalentes com maior energia de ligação que as ligações iônicas, sem a desvantagem da presença de glutaraldeído residual. Esta abordagem pode, a princípio, ser usada no processamento de membranas de quitosana-xantana, dada a similaridade das ligações efetuadas entre a quitosana e a pectina.

## 2.4. Considerações finais

Com base na revisão da literatura realizada, e com o propósito de obter membranas a serem utilizadas em processos de regeneração de pele lesada por queimaduras, propôs-se o trabalho em questão, utilizando-se a xantana e outros poliânions como substituintes do alginato em membranas compostas à base de quitosana. Tal escolha é fundamentada nos fatores descritos a seguir.

Os PECs formados por quitosana e alginato são geralmente redes biocompatíveis que exibem características de intumescimento particulares, caracterizados como um micro ambiente hidrofílico com alta quantidade de água e alta densidade de cargas elétricas. 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, a xantana, a pectina e a carragena (Paul e Sharma, 2004; Martínez-Ruvalcaba *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2000). Devido à compatibilidade destes polissacarídeos com os tecidos animais, as membranas produzidas potencialmente apresentariam características cicatrizantes, podendo ser utilizadas em substituição à gaze e ao algodão.

Neste contexto, foi proposta a substituição do alginato por outro poliânion, a fim de se obter membranas de quitosana coacervadas adequadas ao tratamento de lesões, sem diminuir as vantagens alcançadas com o uso do alginato. Para tanto, foram avaliados três polissacarídeos, pectina, carragena e xantana. As condições de preparação das membranas foram estabelecidas visando a possibilidade de ampliação de escala produtiva.

A xantana foi mais detalhadamente avaliada, visto que, por ser um produto obtido por processo fermentativo, apresenta características potencialmente menos variáveis que a pectina e a carragena, obtidas por extração de frutos cítricos e algas, respectivamente.

Visto que as membranas contendo alginato mostraram resistência mecânica inferior à recomendável para curativos, a reticulação térmica foi proposta. Este tratamento converte as ligações iônicas formadas entre os grupamentos amino da quitosana e carboxila da xantana em ligações amídicas, melhorando hipoteticamente a resistência mecânica em decorrência da formação de ligações covalentes.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana no mínimo 85% desacetilada e alginato de sódio de baixa viscosidade da Sigma Chemical Co.; ácido acético glacial e acetona da Synth; cloreto de cálcio di-hidratado, sulfato de amônio e hidróxido de sódio da Merck. Xantana tipo Keltrol® F, pectina GENU® tipo 121 67% esterificada e  $\kappa$ -carragena GENULACTA® tipo LF-120, todas de grau alimentício, doadas pela CPKelco Brasil S/A (certificados de análise no Anexo I). As propriedades dos polímeros utilizados, de acordo com análise de literatura pertinente, estão apresentadas na Tabela 3.1. A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore.

Tabela 3.1: Propriedades dos polímeros utilizados na produção de membranas segundo dados da literatura.

Polímero	Massa Molar (Da)	pKa	N° grupos substituídos
	$3 \cdot 10^5 - 10^6$	6,5 – 6,8	
Quitosana	(Madihally e Matthew, 1999)	(Madihally e Matthew, 1999)	>85% desacetilada
	$1 - 60 \cdot 10^4$	3.38 – 3.65	
Alginato	(Xu <i>et al.</i> , 2007)	(Xu <i>et al.</i> , 2007)	-
	$2 - 50 \cdot 10^6$	2,87	
Xantana	(Rosalam e England, 2006)	(Rodd <i>et al.</i> , 2001)	-
	$5 - 15 \cdot 10^4$	3.55 – 4.10	
Pectina	(CPKelco)	(Ghaffari <i>et al.</i> , 2007)	67% esterificada
	$1 - 5 \cdot 10^5$	4,2	
Carragena	(Tapia <i>et al.</i> , 2004)	(Tapia <i>et al.</i> , 2004)	-

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação das membranas

Foram preparadas membranas de quitosana associada a pectina, carragena e xantana, visando à seleção do melhor poliânion para substituir o alginato. Amostras produzidas a partir de quitosana e alginato foram também obtidas para comparação.

#### 3.2.1.1. Membranas constituídas de quitosana e alginato

As membranas contendo quitosana e alginato foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Rodrigues (2008), empregando-se o sistema descrito na Figura 3.1. Uma alíquota de 90 mL de solução ácida de quitosana e acetona (45 mL de solução de quitosana a 1% m/v em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v misturada com 45 mL de acetona) foi colocada em uma seringa de vidro Arti-glass e gotejada com uma bomba de infusão Samtronic modelo 670 T a uma vazão de 40 mL/h, em 90 mL de solução aquosa de alginato a 0,5% (m/v) disposta em um reator de vidro Pyrex encamisado com diâmetro interno de 6 cm e capacidade de 200 mL. A temperatura foi mantida, durante todo o processo, a 25°C utilizando-se um banho termostático Quimis modelo 214 M2. O sistema foi mantido sob agitação constante de 100 rpm através de agitador mecânico Quimis modelo 251 D com hélice do tipo pás inclinadas com raio de 2,1 cm durante o gotejamento. A mistura obtida foi agitada por 10 minutos a 1000 rpm. Em seguida, adicionou-se 8,4 mL de NaOH a 1 M sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos, visando ajustar o pH para o valor de 5,28 (pH no qual a quitosana apresenta-se protonada e o alginato, desprotonado). Por fim, 1,8 mL de CaCl<sub>2</sub> a 2% foi adicionado ao sistema sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos, para formar um complexo termoestável resistente com os íons Ca<sup>++</sup>. Todas as etapas foram realizadas em sequência, sem intervalos uma após a outra.

A mistura polimérica obtida foi desaerada em bomba de vácuo Quimis modelo Q-355B por 90 minutos. Após a desaeração, a amostra foi transferida para uma 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 favorecer a obtenção de membranas homogêneas. Retirou-se a membrana da placa para remoção das rebarbas formadas durante a secagem. Posteriormente foi feita sua imersão em 150 mL de  $\text{CaCl}_2$  a 2% por 1 h para reticular as cadeias de alginato que ainda se encontravam livres. Para retirada do  $\text{CaCl}_2$  em excesso foram feitas mais duas imersões em 200 mL de água deionizada por 1 h cada. A secagem final foi realizada em temperatura ambiente por 24 h e as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente.

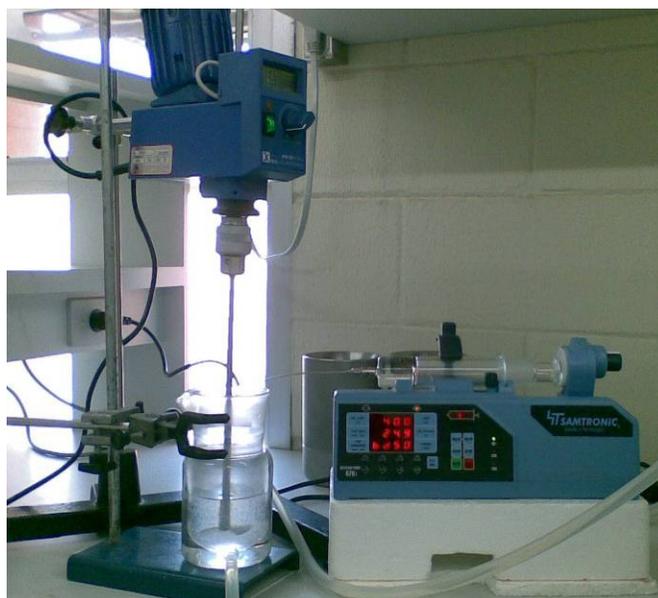


Figura 3.1: Sistema utilizado na preparação das membranas.

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 horas, pressão de 0,5 kgf/cm<sup>2</sup>, 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 horas, conforme recomendação da empresa. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens apropriadas constituídas por uma face plástica e outra de papel, fornecidas pela própria empresa de esterilização, sendo tais embalagens seladas a quente.

### 3.2.1.2. Membranas constituídas de quitosana e pectina

As membranas contendo quitosana e pectina foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Bernabé *et al.* (2005) adaptado baseando-se no trabalho de Rodrigues (2008). Neste procedimento utilizaram-se diferentes concentrações de quitosana (com ou sem acetona na solução) e de pectina em substituição ao alginato. Na Tabela 3.2 são apresentadas as concentrações das soluções dos polímeros utilizadas para a preparação das membranas. O volume de cada solução empregada foi de 90 mL.

Tabela 3.2: Concentrações das soluções de quitosana (Q) e pectina (P) para preparação das membranas.

Ensaio	Solução de quitosana	Solução de pectina	Rel. mássica Q:P
1A	Quitosana a 1% em ácido acético a 2% e acetona 1:1 v/v	Pectina a 0,5% m/v em água deionizada	1:1
2A	Quitosana a 2% em ácido acético a 2% e acetona 1:1 v/v	Pectina a 2% m/v em água deionizada	1:2
3A	Quitosana a 1% em ácido acético a 2% e acetona 1:1 v/v	Pectina a 1% m/v em água deionizada	1:2
4A	Quitosana a 0,5% em ácido acético a 2%	Pectina a 1% m/v em água deionizada	1:2

Durante a neutralização da mistura, o pH foi ajustado para 5,5 que, conforme Bernabé *et al.* (2005), é o pH em que ocorre a complexação dos polímeros. Após a etapa de mistura, o complexo foi então desaerado, seco e tratado com CaCl<sub>2</sub> e água nas condições já mencionadas, sendo as membranas produzidas também esterilizadas com óxido de etileno.

### 3.2.1.3. Membranas constituídas de quitosana e carragena

As membranas contendo quitosana e carragena foram preparadas de acordo com o procedimento proposto por Tapia *et al.* (2004) e adaptado baseando-se no trabalho de Rodrigues (2008). Neste procedimento, 90 mL de solução ácida de quitosana (quitosana 1% m/v em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) e 90 mL de solução aquosa de carragena a 1% foram aquecidos em banho termostático a 75 °C. Ambas as soluções foram misturadas sob agitação constante de 200 rpm em agitador mecânico até que atingissem a temperatura ambiente. A mistura ficou sob descanso por 2 h para formação do complexo e, em seguida, foi transferida para uma placa de Petri de poliestireno de 15 cm e seca conforme as condições já estabelecidas. Esta membrana foi tratada apenas com imersões de água para retirada do ácido acético residual e seca posteriormente em estufa a 37 °C. A esterilização foi feita com óxido de etileno.

### 3.2.1.4. Membranas constituídas de quitosana e xantana

#### 3.2.1.4.1. Ensaio para o estabelecimento de condições experimentais adequadas de preparação das membranas de quitosana e xantana

As membranas contendo quitosana e xantana foram preparadas inicialmente com base na metodologia proposta por Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) e também adaptada com base no trabalho de Rodrigues (2008). Neste procedimento, 90 mL de solução ácida de quitosana (quitosana a 1% m/v em solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) foram adicionados manualmente em 90 mL de solução aquosa de xantana a 1% m/v sob agitação constante de 1000 rpm em agitador mecânico em reator de vidro Pyrex à temperatura de 25 °C. O procedimento proposto por Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) não utiliza solventes orgânicos na reação, em vista disto, não utilizou-se acetona nos ensaios preliminares.

A mistura polimérica obtida foi desaerada em bomba de vácuo por 90 minutos. Em seguida, foi transferida para uma placa de Petri de poliestireno de 15 cm e seca a 37 °C em estufa com circulação de ar, por 20 h, sendo que nas primeiras duas horas de secagem a placa foi girada em sentido horário de 1 em 1 h em um ângulo de 90° para

obtenção de membranas homogêneas. Após a secagem, as membranas foram imersas em água destilada para retirada do ácido acético residual e secas novamente em estufa a 37°C por 24h. Posteriormente, as membranas foram esterilizadas com óxido de etileno.

Com o intuito de se determinar as condições de processo mais apropriados para a preparação das membranas contendo quitosana e xantana, vários ensaios suplementares foram realizados, conforme descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Modificações no procedimento de obtenção das membranas quitosana-xantana.

Ensaio	Modificação do procedimento	Objetivo
1B	Desaeração a vácuo em kitassato por 2 h	Diminuir a formação de bolhas de ar durante a secagem
2B	Adição de 1,8 mL de $\text{CaCl}_2$ a 2% m/v sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos após a homogeneização	Reticular as carboxilas livres residuais das cadeias de xantana
3B	Adição de 1,8 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 2% m/v sob agitação de 1000 rpm por 10 minutos após a homogeneização	Reticular as aminas livres remanescentes das cadeias de quitosana
4B	Adição de acetona na solução de quitosana (solução de quitosana 1% e acetona 1:1)	Reduzir a taxa de reação entre os polieletrólitos para a obtenção de coacervados mais homogêneos

Nestes ensaios foram utilizados 90 mL das soluções de quitosana a 0,5% m/v (em ácido acético 2% v/v) e xantana a 0,5%, agitação constante de 1000 rpm e adição manual da solução de quitosana à de xantana. Após, a mistura foi desaerada a vácuo em kitassato por 90 minutos e seca a 37°C. Em seguida as membranas foram tratadas com imersões de água destilada e esterilizadas com óxido de etileno.

#### 3.2.1.4.2. Avaliação do efeito da vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana nas características das membranas

Após a avaliação dos resultados obtidos nos ensaios preliminares anteriormente descritos, este experimento foi realizado controlando-se a vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana em diferentes valores, avaliando-se o efeito desta variável nas propriedades das membranas. Os ensaios deste experimento foram baseados nas condições experimentais propostas no ensaio preliminar 1B. As vazões de adição da solução de quitosana estão listadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da vazão de adição da solução de quitosana na de xantana.

Ensaio	Vazão (mL/h)	Tempo total de adição (min)
1C	40	135
2C	80	67,5
3C	120	45
4C	200	827
5C	300	0,3

#### 3.2.1.4.3. Análise do efeito da variação das relações mássicas quitosana/xantana nas características das membranas

Os ensaios deste experimento foram baseados nas condições experimentais propostas no ensaio 5C, variando-se as relações mássicas dos polímeros e suas concentrações de 0,25% a 0,75% (m/v), mantendo-se o volume utilizado nos ensaios anteriores (de 90 mL) para cada solução polimérica. Na Tabela 3.5 estão apresentadas as relações e concentrações de quitosana e xantana empregadas neste estudo.

Tabela 3.5: Relações mássicas e concentrações das soluções de quitosana e xantana utilizadas nos ensaios.

Ensaio	Relação mássica (quitosana:xantana)	Concentração da solução aquosa de quitosana (% m/v)	Concentração da solução aquosa de xantana (% m/v)
1D	2:2	0,50	0,50
2D	3:1	0,75	0,25
3D	3:2	0,75	0,50
4D	3:3	0,75	0,75

#### 3.2.1.4.4. Estudo do efeito da reticulação térmica nas características das membranas de quitosana e xantana

Com o intuito de melhorar as características mecânicas das membranas, um estudo utilizando reticulação térmica, similarmente ao relatado por Bernabé *et al.* (2005), foi realizado.

O procedimento de preparo das membranas foi o mesmo descrito anteriormente para o ensaio 1D. A etapa de reticulação térmica foi realizada anteriormente à esterilização. O processo de reticulação foi feito em estufa a 120°C em atmosfera de nitrogênio com tempos de exposição de 30 até 120 minutos, variando-se os períodos em passos de 30 minutos, para a obtenção de membranas com diferentes graus de reticulação.

### **3.2.2. Caracterização das membranas**

As membranas de quitosana e xantana foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir, com base no trabalho de Rodrigues (2008).

### 3.2.2.1. *Aspecto das membranas*

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu, registrando-se suas características por fotografia digital.

### 3.2.2.2. *Morfologia da superfície e 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 cm<sup>2</sup> com auxílio de um molde de vidro. As amostras foram liofilizadas, criofaturadas com nitrogênio líquido, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies.

### 3.2.2.3. *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.

### 3.2.2.4. *Perfil de hidratação das membranas*

O perfil de hidratação foi determinado através do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água. As membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 2 x 1 cm<sup>2</sup>. Estes foram pesados em balança analítica Quimis (massa seca) e, posteriormente, hidratados com 5 mL de água deionizada em tubos fechados por períodos variando de 1 minuto a 24 h em estufa Nova Ética modelo 410, a 37°C. Após a hidratação, o excesso de água foi removido com a ajuda de papel de filtro, e os corpos de prova foram novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa úmida. Para cada período, o grau de intumescimento,  $C_i$ , foi determinado em triplicata através da Equação 1.

$$C_i = \frac{(M_{ui} - M_s)}{M_s} \quad (\text{Equação 1})$$

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

### 3.2.2.5. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas

A capacidade máxima das membranas secas de absorver água, fluido corpóreo simulado (FCS), soro fetal bovino (SFB) e solução salina 0,9% (SS) foi determinada empregando-se corpos de prova retangulares de  $6 \times 1 \text{ cm}^2$ , em triplicata. Estes foram pesados em balança analítica Quimis para determinação da massa seca e posteriormente hidratados com 5 mL das soluções aquosas acima descritas por 24 h em estufa com circulação de ar a  $37^\circ\text{C}$ . 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 2:

$$C_w = \frac{(M_u - M_s)}{M_s} \quad (\text{Equação 2})$$

onde  $M_u$  refere-se à massa úmida final e  $M_s$  refere-se à massa seca das membranas.

A composição do fluido corpóreo simulado encontra-se descrita na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl (Kokubo *et al.*, 1990). O pH da solução final foi ajustado para 7,4.

Íons	Concentração (mM)
$\text{Na}^+$	142,0
$\text{K}^+$	5,0
$\text{Ca}^{2+}$	2,5
$\text{Mg}^{2+}$	1,5
$\text{Cl}^-$	148,8
$\text{HCO}_3^-$	4,2
$\text{HPO}_4^{2-}$	1,0
$\text{SO}_4^{2-}$	0,5

### 3.2.2.6. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Neste ensaio, as membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 6 x 1 cm<sup>2</sup>, em triplicata. As amostras foram pesadas em balança analítica (massa seca inicial) e posteriormente expostas a 5 mL de água deionizada, fluido corpóreo simulado (FCS), soro fetal bovino (SFB) ou solução salina 0,9% (SS) por 24 h a 37°C e por 40 dias a 4°C. Após este período, os corpos de prova foram retirados e secos por 24 h a 37°C em estufa com circulação de ar, 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 3:

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

onde  $M_{\text{inicial}}$  refere-se à massa seca inicial e  $M_{\text{final}}$  refere-se à massa seca final após o período de estocagem.

### 3.2.2.7. Avaliação da capacidade de drenagem de água através das membranas

As membranas foram hidratadas em água deionizada a 37°C por 2 h, e cortadas em amostras circulares de cerca de 2,0 cm de diâmetro. As amostras foram dispostas no interior de tampas plásticas de 2,0 cm de diâmetro com vão circular na parte superior de 1,2 cm de diâmetro. Sobre as membranas foram colocados anéis de vedação para evitar vazamentos e, em seguida as tampas com as membranas foram acopladas a tubos plásticos de centrífuga (TPP) contendo 7 mL de água deionizada. Em um suporte de metal, os tubos foram colocados invertidos para que a água ficasse diretamente em contato com as membranas e os seus fundos cônicos foram perfurados com agulhas para equalização da pressão, conforme indicado na Figura 3.2. As amostras foram incubadas por 72 h a 37°C em um dessecador contendo sílica-gel ativada por 2 h a 120°C. Os tubos foram pesados em períodos pré-estabelecidos para avaliar a quantidade de água drenada pelas membranas.

A determinação da capacidade de drenagem das membranas foi realizada para verificar o seu potencial uso como curativos em lesões com alta liberação de exsudato.

Para esta aplicação em particular, seriam esperados valores de 3.400 a 5.200 g/m<sup>2</sup>.dia (Behar *et al.*, 1985).

A taxa de drenagem foi determinada através da Equação 4. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$TD = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}})}{A \cdot t} \quad (\text{Equação 4})$$

onde  $M_{\text{inicial}}$  refere-se à massa inicial de todo o aparato,  $M_{\text{final}}$  refere-se à massa final após o período de drenagem,  $A$  é a área de contato da membrana com a água e  $t$  o tempo decorrido em dias.



Figura 3.2: Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas.

#### 3.2.2.8. Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas referentes à resistência à tração e alongamento na ruptura 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 cm<sup>2</sup>.

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 Figura 3.3 ilustra a parte útil dos corpos de prova utilizados neste ensaio, após a fixação nos cabeçotes do equipamento. Os ensaios foram realizados com oito a dez corpos de prova para cada tipo de membrana, utilizando-se apenas os cinco resultados mais próximos entre si, visto que ocorrem muitas rupturas prematuras no material em decorrência da presença de bolhas não detectáveis a olho nu e a eventuais problemas de dispersão pouco homogênea dos coacervados nas amostras.

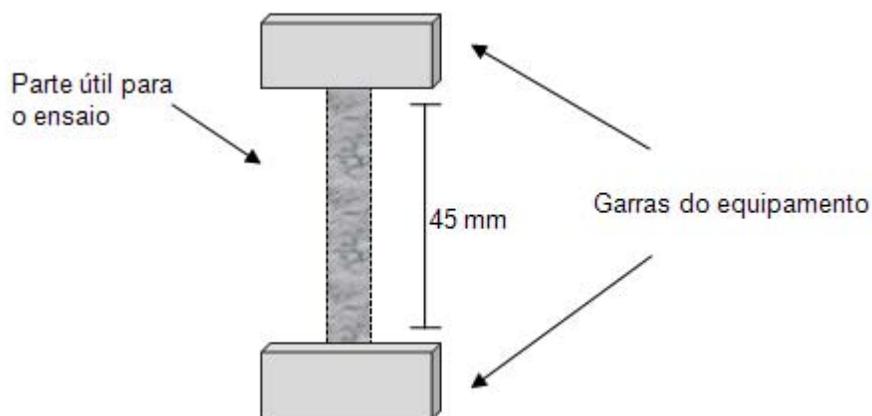


Figura 3.3: Parte útil dos corpos de após a fixação nos cabeçotes do equipamento.

### 3.2.3. *Análise estatística*

Para a análise dos dados referentes às propriedades das membranas produzidas foi utilizada a análise de variância seguida do teste de Tukey para comparação das médias. O nível de significância utilizado foi de 5%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com exceção dos ensaios mecânicos que tiveram cinco repetições.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa *Statistica 7.0*.

## 4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho, enfocando a seleção e preparação de membranas de quitosana-poliânions, principalmente xantana, e sua caracterização.

### 4.1. Seleção do poliânion para a substituição do alginato

Conforme mencionado anteriormente, foram preparadas membranas com quitosana associada a três poliânions diferentes (pectina, carragena e xantana) com o intuito de substituir o alginato. Os resultados estão apresentados a seguir.

#### 4.1.1. Membranas compostas por quitosana e pectina

As membranas contendo quitosana e pectina foram preparadas com base no procedimento proposto por Bernabé *et al.* (2005), como já mencionado anteriormente. Em vista do pouco detalhamento do procedimento e do protocolo estabelecido pelos autores, uma metodologia alternativa foi necessária para a preparação destas membranas.

Inicialmente, promoveu-se a mistura das soluções de quitosana e pectina nas mesmas condições experimentais das membranas quitosana-alginato (ensaio 1A - quitosana a 1% m/v e acetona 1:1 v/v; pectina a 0,5% m/v). Neste ensaio, os coacervados se formaram no início da mistura pectina/quitosana, prendendo-se à hélice do sistema de agitação, mas posteriormente estes se desfizeram e deram lugar a flocos em suspensão. Após a secagem, a membrana se mostrou quebradiça e aderida à placa de poliestireno. Durante as imersões em água deionizada, mais de 50% de sua massa inicial se solubilizou, provavelmente devido à não complexação dos polímeros, havendo supostamente solubilização da pectina, mas não da quitosana (Figura 4.1a).

No estudo realizado por Bernabé *et al.* (2005), a concentração das soluções de quitosana e pectina é maior que a utilizada no ensaio 1A. Assim, realizou-se o ensaio 2A, com o aumento das concentrações de quitosana em solução ácida para 2% (m/v), adicionando-se acetona 1:1 (v/v), e de pectina em solução aquosa para 2% (m/v). A

mistura obtida apresentou alta viscosidade e aparentemente ocorreu formação de complexo polieletrólítico. Após a secagem, a membrana ficou heterogênea, com áreas com aglomerados, e espessura final elevada para a aplicação desejada (Figura 4.1b).

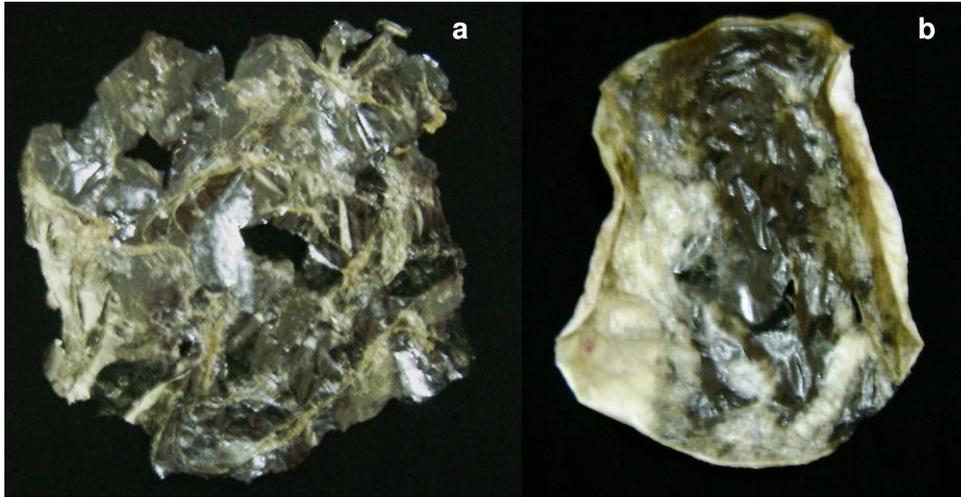


Figura 4.1: Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 1A (a) e 2A (b): a) membrana composta de quitosana a 0,25% e pectina a 0,25% (m/v); b) membrana composta de quitosana a 0,5% (m/v) e pectina a 1% (m/v).

Macleod *et al.* (1999) observaram adequada formação de complexo polieletrólito quando a razão quitosana:pectina está entre 1:2 e 1:3 (m/m). O ensaio 3A foi realizado então, com as considerações anteriores, mantendo a relação mássica em 1:2 quitosana:pectina, mas reduzindo a concentração dos polímeros (quitosana 1% m/v e acetona 1:1 v/v e pectina a 1% m/v). Este ensaio resultou em uma membrana fina e ainda sofrendo perda de massa durante as imersões em água (Figura 4.2a). Assim, o ensaio 4A foi realizado nas mesmas condições anteriores, mas sem adição de acetona, para verificar se o solvente estaria dificultando a coacervação dos polímeros. A membrana gerada foi muito parecida com a do ensaio 3A, mas durante as lavagens, perdeu menos massa (Figura 4.2b). Embora a perda de massa tenha sido menor, a membrana apresentou falhas de continuidade em sua estrutura, de forma que o uso da pectina foi descontinuado.

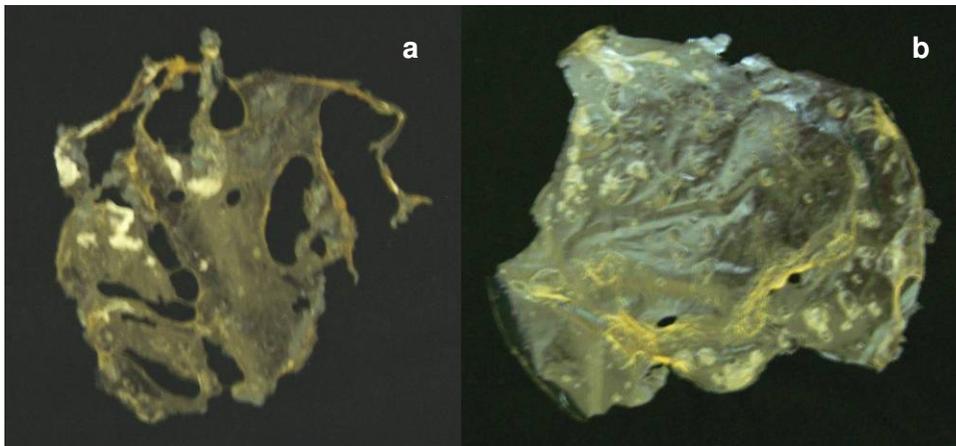


Figura 4.2: Aspecto das membranas obtidas nos ensaios 3A (a) e 4A (b): a) membrana composta de quitosana 0,25% (m/v) e pectina a 0,5% (m/v); b) membrana composta de quitosana a 0,25% (m/v) e pectina a 0,5% (m/v) sem presença de acetona.

#### **4.1.2. Preparação das membranas compostas por quitosana e carragena**

Neste ensaio apenas um procedimento foi testado e a membrana formada não apresentou aspecto uniforme. Após a lavagem, a amostra perdeu massa e tornou-se quebradiça, sugerindo a não coacervação dos polímeros. Nos ensaios subseqüentes não se adotou o uso de carragena. Na Figura 4.3 pode-se observar o aspecto da membrana, com zonas de separação de fase dos polímeros bem distintas.



Figura 4.3: Aspecto da membrana preparada com quitosana a 0,5% (m/v) e carragena a 0,5% (m/v).

#### **4.1.3. Membranas compostas por quitosana e xantana**

Inicialmente, testou-se apenas um procedimento sem adição de acetona conforme o procedimento relatado por Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007). A membrana formada mostrou-se uniforme, apenas apresentando muitas bolhas de ar. Observou-se que os polímeros, nas concentrações testadas (1% m/v de cada), formaram uma membrana com espessura elevada, sugerindo que menores concentrações poderiam ser empregadas com sucesso (Figuras 4.4). Com base nestes resultados, a xantana foi então selecionada para substituir o alginato e ensaios para o estabelecimento de condições experimentais adequadas para a produção das membranas foram realizados e estão descritos a seguir.

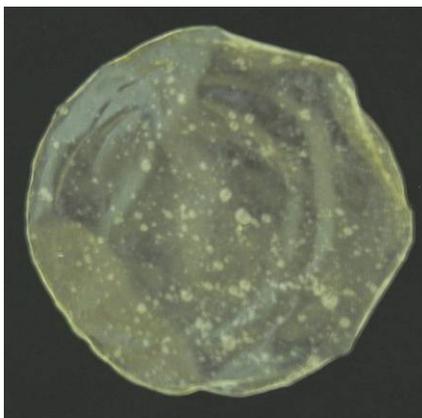


Figura 4.4: Aspecto da membrana preparada com quitosana 0,5% (m/v) e xantana a 0,5% (m/v).

#### **4.1.4. Estabelecimento de condições experimentais apropriadas de preparação das membranas de quitosana e xantana**

Primeiramente foram reduzidas as concentrações dos polímeros, como sugerido no item anterior, e aumentou-se o tempo de desaeração para 2 h (ensaio 1B). A membrana formada, mostrada na Figura 4.5a, apresentou menor quantidade de bolhas e espessura no valor desejável (70  $\mu\text{m}$ ).

Frente a esse resultado, verificou-se o comportamento do complexo quando empregado um sal reticulante como  $\text{CaCl}_2$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ensaios 2B e 3B, respectivamente). No ensaio 2B as membranas se romperam durante a imersão em água,

e aderiram à placa de poliestireno durante a secagem final, provavelmente devido à menor complexação dos polímeros quando em contato com os íons fornecidos pelo  $\text{CaCl}_2$  (Figura 4.5 b). Já no ensaio 3B a membrana teve redução de tamanho e absorveu pouca água durante as imersões, levando a crer que o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  provavelmente promoveu a interação das cadeias de quitosana ou até mesmo a precipitação destas. Com isso há diminuição da disponibilidade de grupos poliméricos para hidratação, tornando a membrana menos apropriada para seu objetivo (Figura 4.5 c).

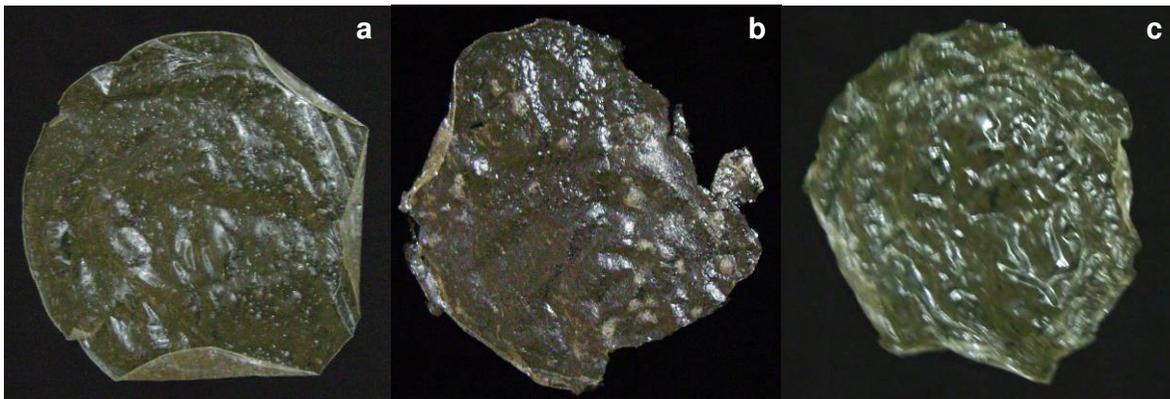


Figura 4.5: Aspecto das membranas preparada com quitosana a 0,25% (m/v) e xantana a 0,25% (m/v): a) ensaio 1B - amostra desaerada a vácuo por 2h; b) ensaio 2B – reticulação pela adição de  $\text{CaCl}_2$ ; c) ensaio 3B – reticulação pela adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Para verificar se a taxa de reação entre os polieletrólitos poderia ser diminuída para que a membrana se tornasse mais homogênea, foi misturada acetona à solução de quitosana na proporção 1:1. As membranas formadas com esse procedimento ficaram semelhantes às membranas que não continham acetona, mas ao serem feitas as imersões em água, houve perda de massa e rompimento ao manuseá-las. As amostras adquiriram consistência de gel e não foi possível secá-las novamente. Este comportamento deu-se, provavelmente, pela redução excessiva da taxa de reação entre os polieletrólitos, o que era esperado, mas não a ponto de prejudicar a formação da membrana. Com isto, as próximas membranas produzidas não tiveram acetona em sua formulação.

#### 4.1.5. Efeito da vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana nas características das membranas

Nestes ensaios foi variada a vazão de adição da solução de quitosana na solução de xantana de 40 a 300 mL/h, avaliando-se os efeitos nas características das membranas. Os resultados obtidos são apresentados nos itens que se seguem, exceto para o ensaio 1C, que resultou em membranas frágeis, que se dissolveram durante as imersões e não puderam ser então caracterizadas.

##### 4.1.5.1. Espessura das membranas no estado seco

Os valores referentes à espessura das membranas secas encontram-se listados na Tabela 4.1. As espessuras médias variaram de cerca de 99 a 165  $\mu\text{m}$ , sendo considerada uma variação apreciável para este processo. Em cada ensaio, todo o complexo obtido foi transferido para uma única placa de Petri para a secagem e, como as mesmas massas de todos os polímeros forem empregadas nos ensaios, variações tão elevadas na espessura das membranas não eram esperadas, devendo 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 obtidos com diferentes taxas de adição da solução de quitosana à solução de xantana.

Ensaio	Vazão (mL/h)	Espessura média ( $\mu\text{m}$ )
1C	40	-
2C	80	164,29 $\pm$ 35,24 <sup>a</sup>
3C	120	165,00 $\pm$ 33,22 <sup>a</sup>
4C	200	122,86 $\pm$ 30,99 <sup>b</sup>
5C	300	99,29 $\pm$ 19,79 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

#### 4.1.5.2. Efeito no aspecto e na morfologia das membranas

Inicialmente, analisou-se o aspecto dos coacervados (apresentados na Figura 4.6) antes da secagem para uma melhor compreensão dos resultados obtidos. Observa-se que com o aumento da vazão de adição ocorre a formação de um hidrogel mais viscoso, provavelmente por uma maior distensão das cadeias dos polímeros. Conforme a vazão é diminuída, os coacervados tendem a ficar mais compactos, parecendo, inclusive, que há menor concentração polimérica.

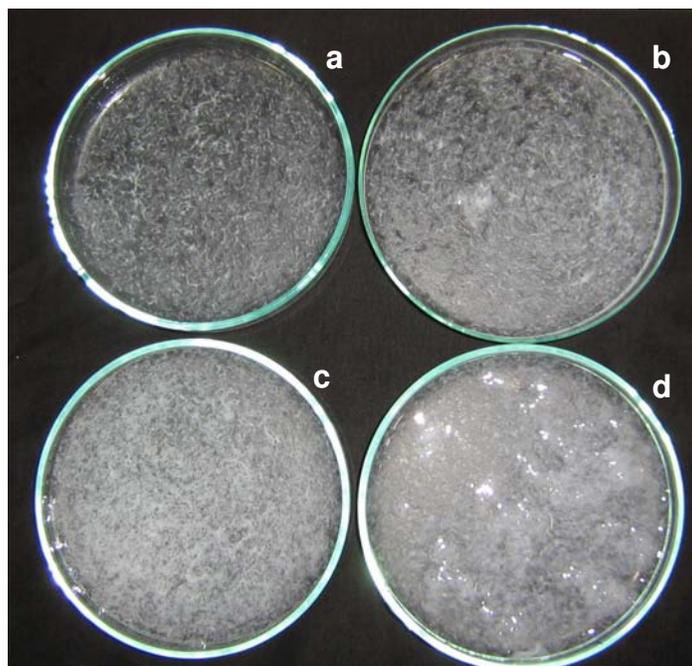


Figura 4.6: Aspecto dos coacervados poliméricos de quitosana-xantana antes da secagem: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.

A análise por MEV da morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi avaliada visando auxiliar na compreensão das possíveis razões para o seu comportamento. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.7 e 4.8.

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 perpendiculares às amostras. Menor rugosidade foi observada para as membranas preparadas na condição de menor vazão, provavelmente em função da maior compactação das fibras poliméricas. Já a maior

rugosidade foi encontrada no ensaio 3C, onde observa-se com detalhe a formação de fibras poliméricas superficiais.

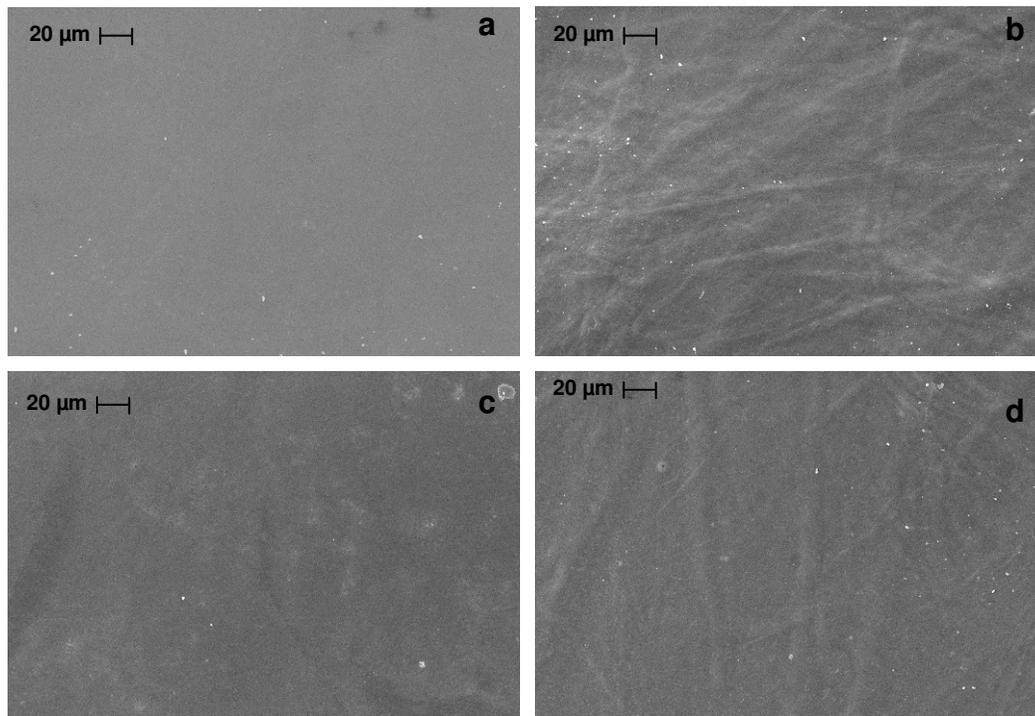


Figura 4.7: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas preparadas em diferentes vazões: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.

As secções transversais apresentadas na Figura 4.8 mostraram diferenças expressivas na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, sendo que a amostra menos compactada (referente ao ensaio 4C) apresentou múltiplas lamelas. Os coacervados obtidos nos ensaios 3C e 5C apresentaram organização semelhante, mostrando que mesmo em diferentes taxas de adição da quitosana, a conformação dos polímeros atinge uma distribuição maior de lamelas (ensaio 4C, 200 mL/h) e volta a diminuir. A amostra do ensaio 2C apresentou uma estrutura mais compacta que as outras amostras, provavelmente por ter uma coacervação mais lenta devido à menor vazão, formando fibras mais longas e conseqüentemente, membranas mais compactadas. Os resultados obtidos na espessura destas membranas diferem dos observados nas microscopias, provavelmente por estas serem feitas em uma pequena amostra da membrana ( $2 \text{ cm}^2$ ) não sendo necessariamente representativo de toda a

extensão, enquanto a espessura é mensurada em diversos pontos da membrana íntegra (176,7 cm<sup>2</sup>).

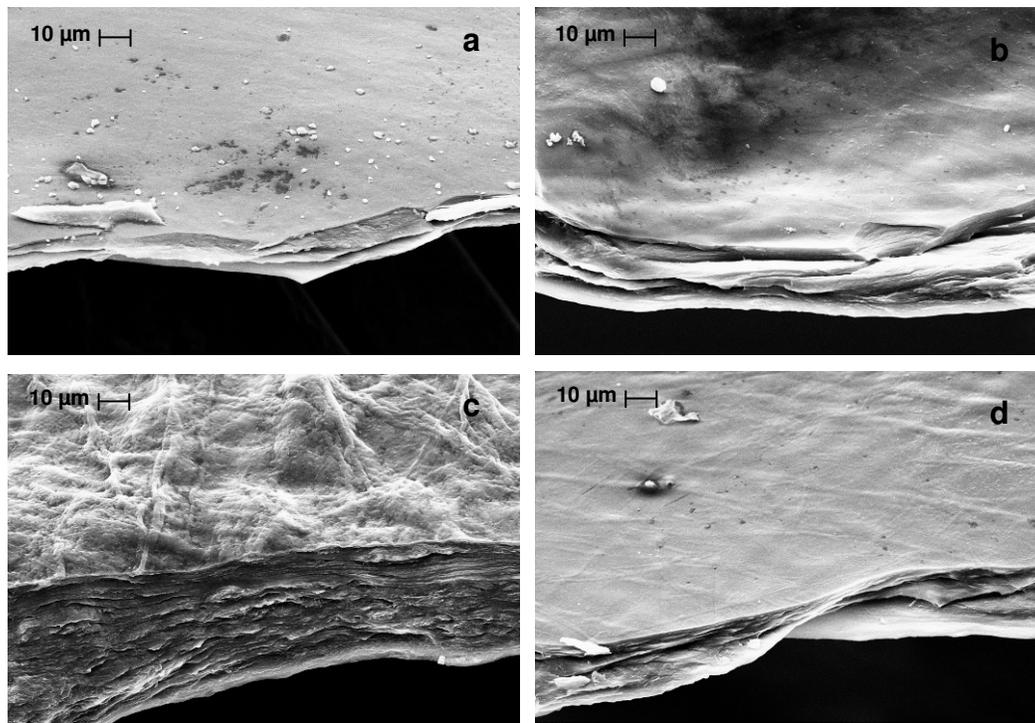


Figura 4.8: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas preparadas em diferentes vazões: (a) ensaio 2C – 80 mL/h; (b) ensaio 3C – 120 mL/h; (c) ensaio 4C – 200 mL/h e (d) ensaio 5C – 300 mL/h.

#### 4.1.5.3. Perfil de hidratação das membranas

A hidratação das membranas de quitosana e xantana ao longo de 24 h a 37°C foi monitorada em diferentes períodos, e os valores de absorção de água obtidos são apresentados na Figura 4.9.

Os resultados mostram que as membranas absorveram quantidades crescentes de água durante boa parte do ensaio, sendo as taxas de absorção mais significativas nas primeiras horas de contato. Após 12h, observou-se um aumento apreciável na absorção das amostras com vazão de 80 e 300 mL/h.

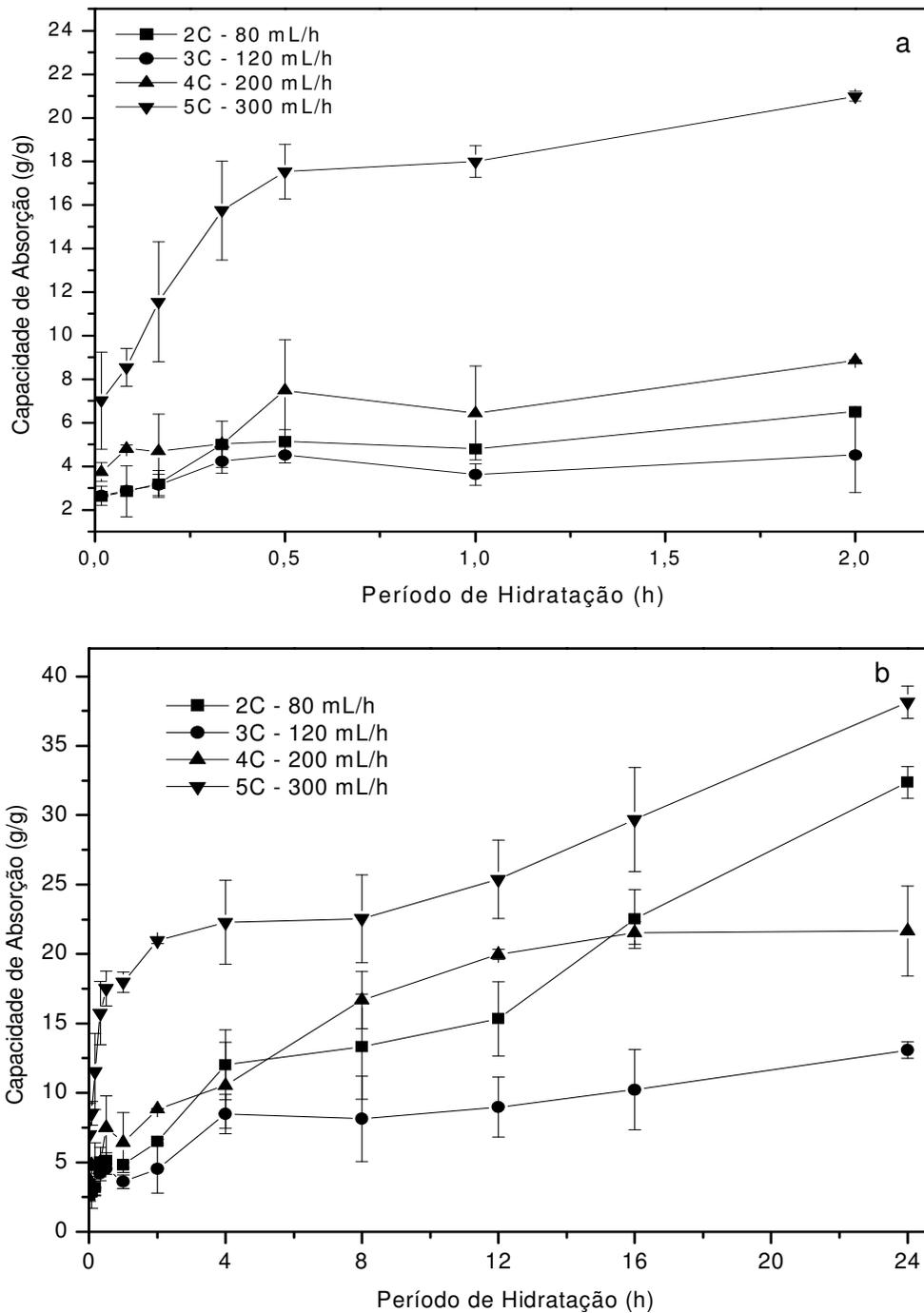


Figura 4.9: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.

#### 4.1.5.4. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água, soro fetal bovino, fluido corpóreo simulado e solução de NaCl a 0,9% dos corpos de prova com dimensões de 6 x 1 cm<sup>2</sup> preparados em distintas condições de vazão de mistura de solução de quitosana à de xantana a 37°C por 24 h estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_W$ ) em 24 h de absorção de soluções aquosas.

Ensaio	Vazão (mL/h)	$C_{W\text{ água}}$ (g/g)	$C_{W\text{ SS}}$ (g/g)	$C_{W\text{ FCS}}$ (g/g)	$C_{W\text{ SFB}}$ (g/g)
1C	40	-	-	-	-
2C	80	35,21 ± 0,97 <sup>a</sup>	6,24 ± 0,55 <sup>e</sup>	4,82 ± 0,52 <sup>g</sup>	5,4 ± 0,22 <sup>i</sup>
3C	120	15,95 ± 0,26 <sup>b</sup>	5,28 ± 1,55 <sup>e</sup>	5,63 ± 1,92 <sup>g</sup>	5,07 ± 0,13 <sup>i</sup>
4C	200	21,26 ± 0,87 <sup>c</sup>	12,51 ± 0,95 <sup>f</sup>	7,59 ± 2,53 <sup>g</sup>	7,87 ± 0,32 <sup>ij</sup>
5C	300	38,27 ± 0,07 <sup>d</sup>	14,99 ± 1,64 <sup>f</sup>	12,34 ± 1,21 <sup>h</sup>	10,36 ± 1,94 <sup>j</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

Todas as membranas preparadas apresentaram capacidades elevadas de absorção de água, variando de 15,95 a 38,27 g H<sub>2</sub>O/g membrana seca, valores estes superiores aos encontrados por Rodrigues (2008), que variaram de 11,1 a 19,2 g H<sub>2</sub>O/g membrana seca para amostras de quitosana-alginato.

Em solução salina, solvente que seria potencialmente empregado para a hidratação das membranas antes de seu uso *in vivo*, novamente as membranas obtidas no ensaio 5C apresentaram absorção quase duas vezes maior que as membranas dos ensaios 2C e 3C.

Os resultados obtidos para a solução de FCS mostraram que a amostra produzida com vazão de 300 mL/h absorveu 12,34 g de FCS/g de membrana seca, muito superior às outras amostras. A solução de fluido corpóreo simulado é composta de

diversos sais, assim como o SFB, e pode-se verificar que ocorre concordância entre os resultados obtidos com estes meios aquosos.

Nos ensaios realizados em presença de SFB, as membranas obtidas nos ensaios 3C e 2C (5,07 e 5,4 g SFB/g membrana seca, respectivamente) apresentaram absorções muito semelhantes, enquanto que as amostras 5C apresentaram absorção quase duas vezes maior que as das amostras restantes (10,36 g SFB/g membrana seca). Estes ensaios mostraram que as membranas de quitosana e xantana preparadas com vazão de adição de solução de quitosana de 300 mL/h possuem grande capacidade de absorção de solventes, destacando-se dos demais ensaios, podendo esta variar cerca de 10 a 38 g solvente/g membrana seca.

#### 4.1.5.5. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Os resultados obtidos para a perda de massa das membranas em diferentes soluções aquosas estão listados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores obtidos para a perda de massa das membranas em água por 40 dias a 4°C.

Ensaio	Vazão (mL/h)	Água (%)	SS (%)	FCS (%)	SFB (%)
1C	40	-	-	-	-
2C	80	9,92 ± 0,40 <sup>a</sup>	4,21 ± 0,94 <sup>d</sup>	3,32 ± 0,55 <sup>e</sup>	4,74 ± 1,26 <sup>g,h</sup>
3C	120	2,69 ± 1,02 <sup>b</sup>	3,56 ± 1,54 <sup>d</sup>	3,10 ± 0,30 <sup>e</sup>	1,90 ± 0,12 <sup>g</sup>
4C	200	5,25 ± 1,00 <sup>b,c</sup>	3,65 ± 0,18 <sup>d</sup>	12,93 ± 1,91 <sup>f</sup>	8,86 ± 0,58 <sup>i</sup>
5C	300	6,63 ± 1,01 <sup>a,c</sup>	3,04 ± 0,36 <sup>d</sup>	4,09 ± 2,18 <sup>e</sup>	7,63 ± 0,87 <sup>h,i</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

As amostras do ensaio 2C resultaram na maior perda de massa em água, o que pode ser devido à sua conformação menos complexada que das membranas dos demais ensaios. O ensaio 4C teve disparidade dos demais nos fluidos FCS e SFB, provavelmente

pela presença de íons mais complexos no caso do FCS e do SFB e proteínas somente no caso de SFB que podem ter desestabilizado mais o PEC destas amostras que as demais.

#### 4.1.5.6. Capacidade de drenagem de água das membranas

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade das membranas de quitosana e xantana no tratamento de lesões que liberam exsudato, estas foram colocadas em contato direto com a água em uma das faces, para 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.

Tabela 4.4: Valores obtidos para a capacidade média de drenagem de água das membranas preparadas em diferentes vazões.

Ensaio	Vazão (mL/h)	Taxa de drenagem (g/m <sup>2</sup> .dia)
1C	40	-
2C	80	3.354,63 ± 189,75 <sup>a,b</sup>
3C	120	3.180,00 ± 208,85 <sup>a</sup>
4C	200	3.482,84 ± 158,11 <sup>b</sup>
5C	300	3.967,23 ± 134,30 <sup>d</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Avaliando-se os resultados encontrados, observa-se que a capacidade de drenagem aumenta gradativamente nos ensaios 3C, 4C e 5C e, conseqüentemente, com o aumento da vazão ocorrido. O ensaio 2C não se enquadra nesse comportamento, possuindo uma taxa de permeação maior que o ensaio 3C, o que pode ser uma conseqüência da reestruturação da membrana após absorção de água e possível perda de moléculas poliméricas livres durante o experimento, tornando a membrana mais permeável.

#### 4.1.5.7. Propriedades mecânicas das membranas

Os resultados referentes à resistência à tração e ao alongamento na ruptura das membranas secas estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas produzidas com diferentes vazões.

Ensaio	Vazão (mL/h)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1C	40	-	-
2C	80	2,24 ± 1,14 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,93 <sup>c</sup>
3C	120	4,74 ± 0,95 <sup>b</sup>	1,60 ± 0,60 <sup>c,d</sup>
4C	200	5,11 ± 1,33 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,71 <sup>d</sup>
5C	300	5,39 ± 1,35 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,58 <sup>c,d</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança. Média de cinco repetições.

Foram obtidos neste experimento valores de resistência à tração entre 2,24 e 5,39 MPa e de alongamento na ruptura entre 1,20 e 2,54%, sendo que as membranas obtidas no ensaio 5C apresentaram os melhores resultados para resistência à tração e as membranas do ensaio 2C os menores valores de resistência à tração, porém melhor comportamento quanto ao alongamento na ruptura.

#### 4.1.6. Efeito da variação das relações mássicas quitosana/xantana nas características das membranas

Nestes ensaios variou-se a relação mássica e a concentração das soluções poliméricas, conforme indicado na Tabela 3.4. Nestes ensaios utilizou-se uma vazão de adição da solução de quitosana na de xantana de 300 mL/h, visto ser a que conduziu à membranas mais adequadas para a finalidade proposta.

O ensaio 2D resultou em membranas frágeis, que se fragmentaram e/ou dissolveram durante os procedimentos de caracterização. Argin-Soysal *et al.* (2009),

utilizando soluções de quitosana de concentração 0,7% e 1% e solução de xantana abaixo de 0,5% não obtiveram um hidrogel estável, confirmando o resultado encontrado no ensaio 2D.

#### 4.1.6.1. Espessura das membranas no estado seco

Os valores encontrados para a espessura das membranas secas encontram-se listados na Tabela 4.6. A média das espessuras variou de 137 a 200  $\mu\text{m}$ , correspondendo às diferentes massas de polímeros contidas em cada membrana.

Tabela 4.6: Valores de espessura das membranas preparadas com diferentes relações mássicas.

Ensaio	Concentração de quitosana (% m/v)	Concentração de xantana (% m/v)	Massa total de polímeros nas membranas (g)	Espessura média ( $\mu\text{m}$ )
1D	0,25	0,25	0,90	137,29 $\pm$ 15,67 <sup>a</sup>
2D	0,375	0,125	0,90	-
3D	0,375	0,25	1,125	159,00 $\pm$ 47,76 <sup>a,b</sup>
4D	0,375	0,375	1,35	200,14 $\pm$ 45,23 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

#### 4.1.6.2. Efeito na morfologia das membranas

Os resultados da análise por MEV da morfologia da superfície e da secção transversal das membranas são apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11.

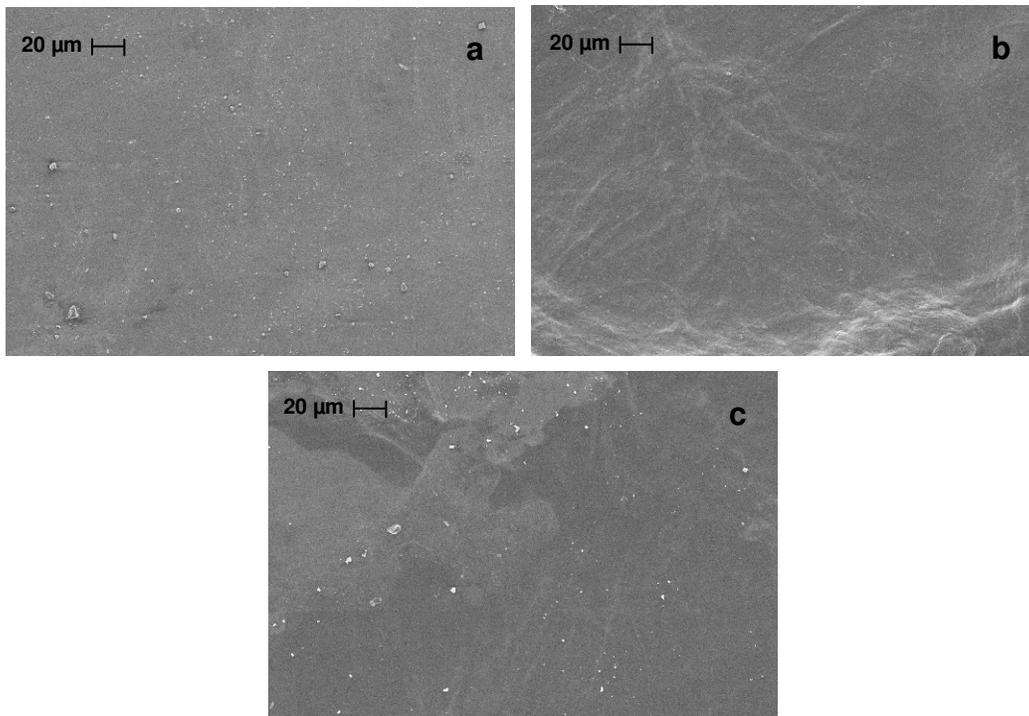


Figura 4.10: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas preparadas em diferentes relações mássicas quitosana:xantana: (a) ensaio 1D – 0,25Q:0,25X; (b) ensaio 3D – 0,375Q:0,25X e (c) ensaio 4D – 0,375Q:0,375X.

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 perpendiculares às amostras. As membranas não apresentaram diferenças visualmente perceptíveis em suas superfícies.

As secções transversais não mostraram diferenças significativas na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, observando-se a presença de múltiplas lamelas em todas as amostras analisadas. Portanto as diferentes concentrações de polímeros aparentemente não causaram uma modificação na conformação do PEC obtido.

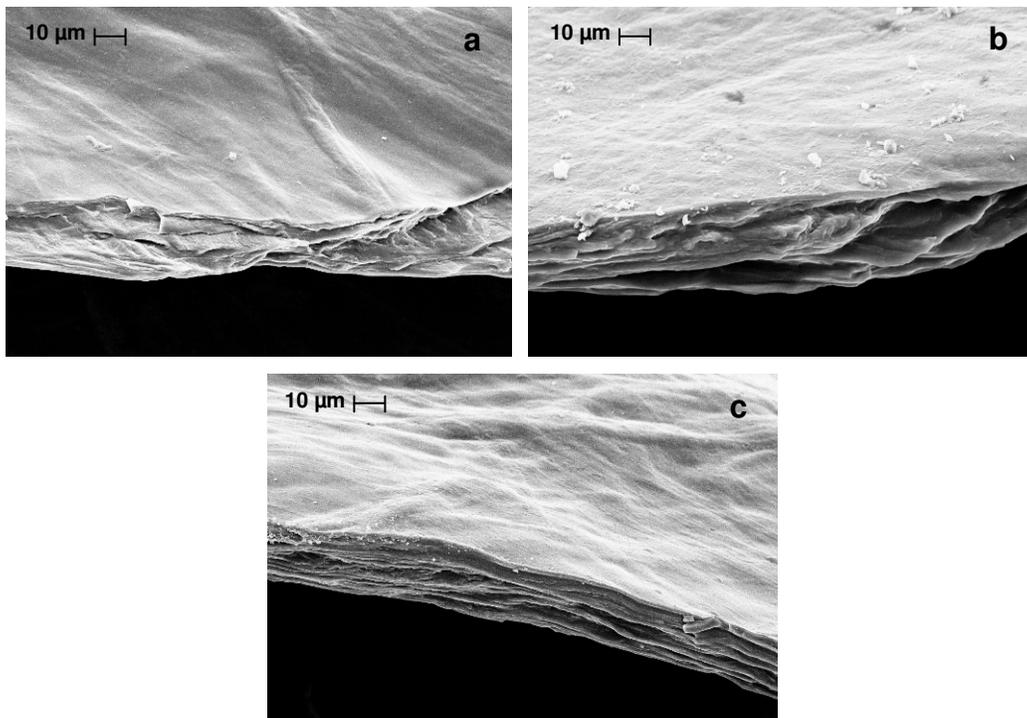


Figura 4.11: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas preparadas em diferentes relações mássicas quitosana:xantana: (a) ensaio 1D – 0,25Q:0,25X; (b) ensaio 3D – 0,375Q:0,25X e (c) ensaio 4D – 0,375Q:0,375X.

#### 4.1.6.3. Perfil de hidratação das membranas

A hidratação gradativa das membranas de quitosana e xantana ao longo de 24 h a 37°C foi avaliada e os resultados estão apresentados na Figura 4.12.

Verifica-se que as membranas absorveram grandes quantidades de água durante as primeiras e as últimas horas de contato (exceto para a preparação 3D). As amostras do ensaio 3D, que continham mais quitosana que xantana, estabilizaram sua hidratação por volta de 4 h, tendo variações discretas no período restante, e enquanto que as demais amostras preparadas com diferentes concentrações poliméricas entre si, mas com as mesmas relações mássicas apresentaram comportamento semelhante.

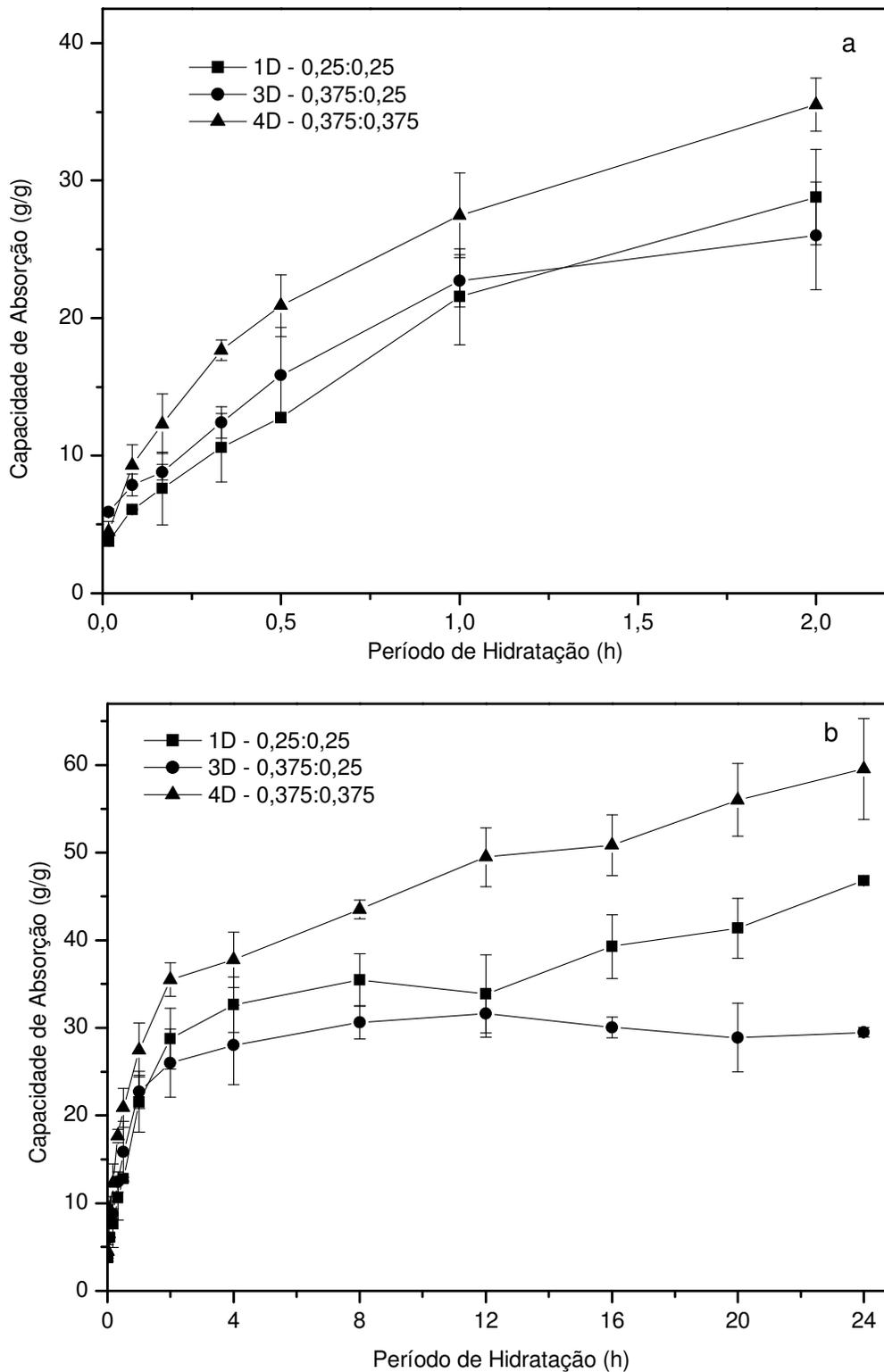


Figura 4.11: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana com variadas massas totais e razão Q:X: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.

#### 4.1.6.4. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água, solução de NaCl a 0,9%, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino das amostras com dimensões de 6 x 1 cm<sup>2</sup> preparadas com diferentes concentrações de polímeros, mantidas a 37°C por 24 h estão listados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_W$ ) de absorção de soluções aquosas em 24 h.

Ensaio	Concentração dos polímeros Q:X (%:%)	$C_W$ água (g/g)	$C_W$ SS (g/g)	$C_W$ FCS (g/g)	$C_W$ SFB (g/g)
1D	0,25:0,25	40,16 ± 2,37 <sup>a</sup>	7,97 ± 1,13 <sup>c</sup>	3,50 ± 1,02 <sup>e</sup>	3,48 ± 0,59 <sup>f</sup>
2D	0,375:0,125	-	-	-	-
3D	0,375:0,25	24,22 ± 1,73 <sup>a</sup>	8,68 ± 2,45 <sup>c,d</sup>	3,59 ± 0,78 <sup>e</sup>	3,50 ± 0,66 <sup>f</sup>
4D	0,375:0,375	61,23 ± 12,24 <sup>b</sup>	13,08 ± 1,83 <sup>d</sup>	5,20 ± 0,86 <sup>e</sup>	4,55 ± 1,17 <sup>f</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

As membranas apresentaram capacidades elevadas de absorção de água, variando de 24,22 a 61,23 g H<sub>2</sub>O/g membrana seca. Observou-se que ao elevar somente a concentração de quitosana na membrana, a capacidade de absorção diminui. O mesmo foi observado por Algin-Soysal *et al.* (2009) em géis de quitosana-xantana.

Em solução salina a capacidade de absorção aumentou conforme a concentração polimérica total foi elevada. As membranas do ensaio 4D apresentaram capacidade duas vezes maior que as do ensaio 1D, em que a diferença na concentração de polímeros é 50% maior.

Os resultados obtidos para a solução de FCS mostraram que as amostras não tiveram diferença significativa em suas médias, mas observa-se um ligeiro aumento na absorção conforme aumenta a concentração de polímero, e maior ainda quando se

umenta apenas a concentração de xantana. O mesmo foi observado nos ensaios realizados em presença de SFB, que assim como o FCS, é composto de diversos sais, além de proteínas.

#### 4.1.6.5. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Os valores médios de perda de massa das membranas, preparadas com distintas concentrações poliméricas, em diferentes soluções aquosas estão listados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Valores obtidos para a perda de massa em soluções aquosas das membranas por 40 dias a 4 °C.

Ensaio	Concentração dos polímeros Q:X (%:%)	Água (%)	SS (%)	FCS (%)	SFB (%)
1D	0,25:0,25	12,63 ± 1,57 <sup>a</sup>	3,98 ± 1,00 <sup>b</sup>	6,16 ± 1,40 <sup>c</sup>	9,15 ± 3,17 <sup>d</sup>
2D	0,375:0,125	-	-	-	-
3D	0,375:0,25	11,36 ± 0,56 <sup>a</sup>	4,83 ± 2,27 <sup>b</sup>	6,40 ± 1,46 <sup>c</sup>	7,39 ± 1,15 <sup>d,e</sup>
4D	0,375:0,375	12,56 ± 1,74 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,21 <sup>b</sup>	5,23 ± 1,15 <sup>c</sup>	5,12 ± 0,98 <sup>e</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

As amostras estocadas em água apresentaram perda em torno de 12% e não foi observada diferença significativa entre elas. O mesmo ocorreu com as membranas estocadas em solução salina e fluido corpóreo simulado, que tiveram perda de massa muito próximas. Já as amostras estocadas em soro fetal bovino apresentaram uma diminuição da perda de massa conforme a concentração total de polímero da membrana foi elevada, indicando que membranas mais espessas permitem menor premeação dos sais e das proteínas do meio e, portanto, sofrem menos os efeitos de desestabilização associados a sua presença.

#### 4.1.6.6. Capacidade de drenagem de água das membranas

Os valores referentes à capacidade de drenagem das membranas com diferentes concentrações poliméricas podem ser visualizados na Tabela 4.9. Os ensaios foram realizados durante 3 dias para a obtenção de resultados representativos de um maior período da lesão com o potencial curativo.

Tabela 4.9: Valores obtidos para a capacidade média de drenagem de água das membranas preparadas em diferentes relações mássicas.

Ensaio	Concentração dos polímeros	Taxa de drenagem (g/m <sup>2</sup> .dia)
	Q:X (%.%)	
1D	0,25:0,25	6374,16 ± 218,06 <sup>a</sup>
2D	0,375:0,125	-
3D	0,375:0,25	5901,11 ± 469,41 <sup>a</sup>
4D	0,375:0,375	3433,62 ± 315,23 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Observa-se que a capacidade de drenagem não difere significativamente quando se aumenta apenas a concentração de quitosana, mas diminui quando se aumenta a concentração de xantana nas membranas. Isto se deve, provavelmente, ao aumento da espessura das membranas, que dificultaria a permeação da água, diminuindo a taxa de drenagem.

#### 4.1.6.7. Propriedades mecânicas das membranas

Os resultados referentes à resistência à tração e ao alongamento na ruptura das membranas secas estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas produzidas com diferentes relações mássicas.

Ensaio	Concentração dos polímeros Q:X (%:%)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1D	0,25:0,25	5,08 ± 0,85 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,62 <sup>c</sup>
2D	0,375:0,125	-	-
3D	0,375:0,25	2,48 ± 0,98 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,97 <sup>c</sup>
4D	0,375:0,375	2,65 ± 0,26 <sup>b</sup>	2,22 ± 0,61 <sup>c</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança. Média de cinco repetições.

Observou-se que os valores obtidos para o alongamento na ruptura não diferiram significativamente com a modificação das concentrações dos polímeros. A resistência à tração diminuiu conforme se aumentou a concentração de quitosana e manteve-se igual ao se aumentar somente a concentração de xantana.

#### **4.1.7. Efeito da reticulação térmica nas características das membranas de quitosana e xantana**

Nestes ensaios foi realizada uma etapa adicional de preparação, consistindo na reticulação térmica a 120 °C em atmosfera de oxigênio com períodos de exposição de 30 a 120 min, avaliando-se seu efeito nas características das membranas, efeitos estes discutidos a seguir. O ensaio 1E não passou pela etapa de tratamento térmico e foi utilizado como um controle para comparação com os demais.

##### **4.1.7.1. Espessura das membranas no estado seco**

Os valores referentes à espessura das membranas secas encontram-se listados na Tabela 4.11. Observou-se que as amostras com tempos menores de tratamento térmico tiveram um aumento na espessura em comparação com as amostras controle e com exposição por maiores períodos.

Tabela 4.11: Valores das espessuras das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.

Ensaio	Tempo de Tratamento (min)	Espessura média ( $\mu\text{m}$ )
1E	-	124,80 $\pm$ 7,50 <sup>a,b</sup>
2E	30	140,40 $\pm$ 5,50 <sup>a,c</sup>
3E	60	144,80 $\pm$ 11,73 <sup>c</sup>
4E	90	127,00 $\pm$ 8,37 <sup>a,b,c</sup>
5E	120	119,40 $\pm$ 12,46 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

#### 4.1.7.2. *Efeito no aspecto e na morfologia das membranas*

As amostras termicamente tratadas apresentaram uma coloração amarelada, diferindo-se das amostras controle, que são levemente esbranquiçadas. Não foi observada diferença nesta coloração ao longo dos períodos utilizados (30 a 120 min) e aparentemente esta foi a única alteração visível.

A análise por MEV da morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi avaliada visando auxiliar na compreensão das possíveis razões para o comportamento destas nos testes subseqüentes. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.13 e 4.14.

As micrografias de superfície apresentaram superfícies onduladas, com elevações distribuídas uniformemente ao longo de sua extensão. Não se observa intensa diferença entre as amostras tratadas, mas comparando-se com a amostra que não sofreu tratamento térmico, verifica-se a presença de regiões mais escuras e ondulações mais marcantes que provavelmente se formaram por ação do calor.

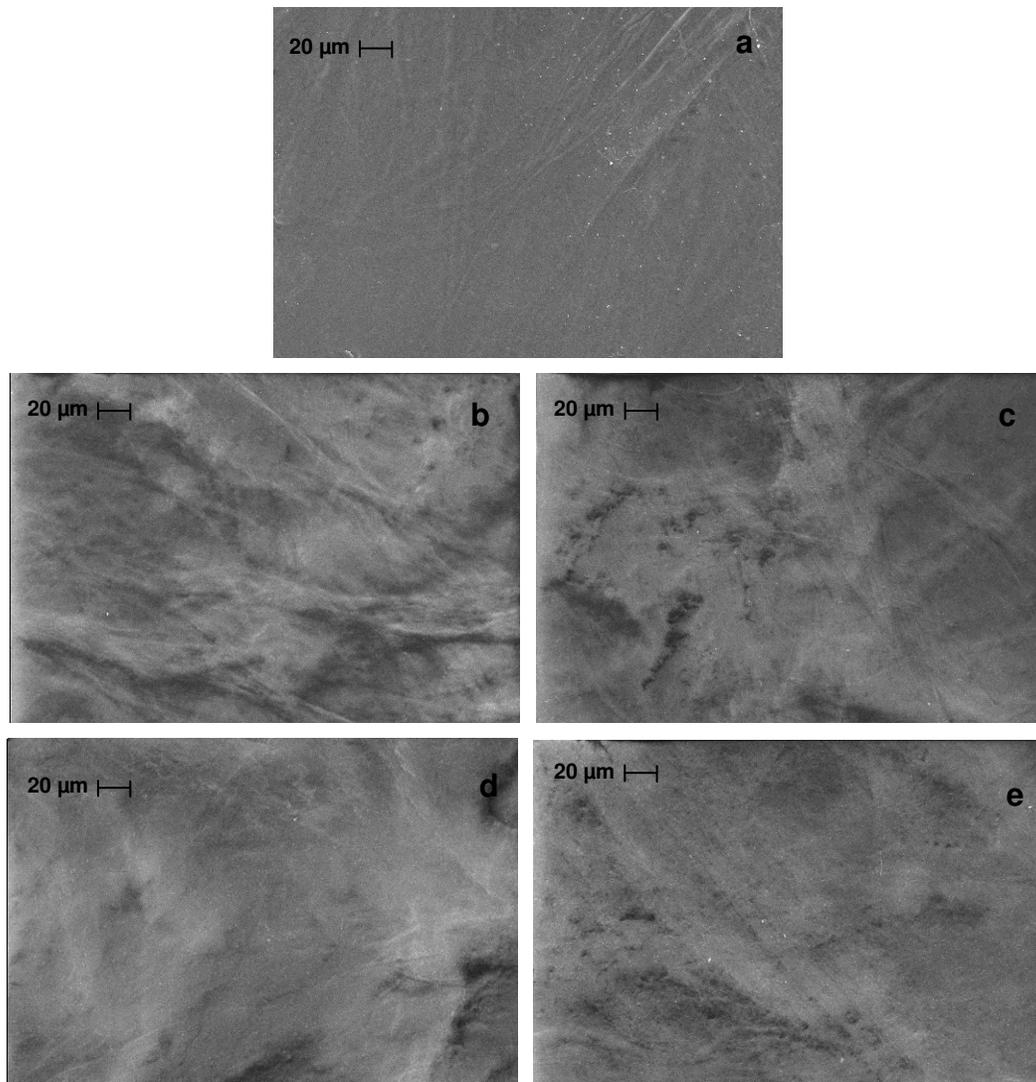


Figura 4.13: Morfologia de superfície (aumento de 1000X) das membranas tratadas termicamente: (a) ensaio 1E – sem tratamento; (b) ensaio 2E – 30 min; (c) ensaio 3E – 60 min; (d) ensaio 4E – 90 min e (e) ensaio 5E – 120 min.

As secções transversais não mostraram diferenças expressivas na compactação dos polímeros ao longo da espessura das membranas, mas observa-se que as lamelas nas membranas que não sofreram tratamento térmico estão mais visivelmente distintas. Já as amostras expostas ao calor, talvez pela dificuldade de realizar a fratura em nitrogênio líquido (a amostra teve que ser dobrada algumas vezes até que a ruptura ocorresse, diferentemente das amostras anteriores), apresentaram lamelas não tão distintas e suas bordas levemente dobradas para o interior da membrana. A Figura 4.15e apresenta a membrana que sofreu o maior tempo de tratamento e pode-se observar que

sua estrutura está mais compactada que as demais, provavelmente devido ao maior período de exposição ao calor

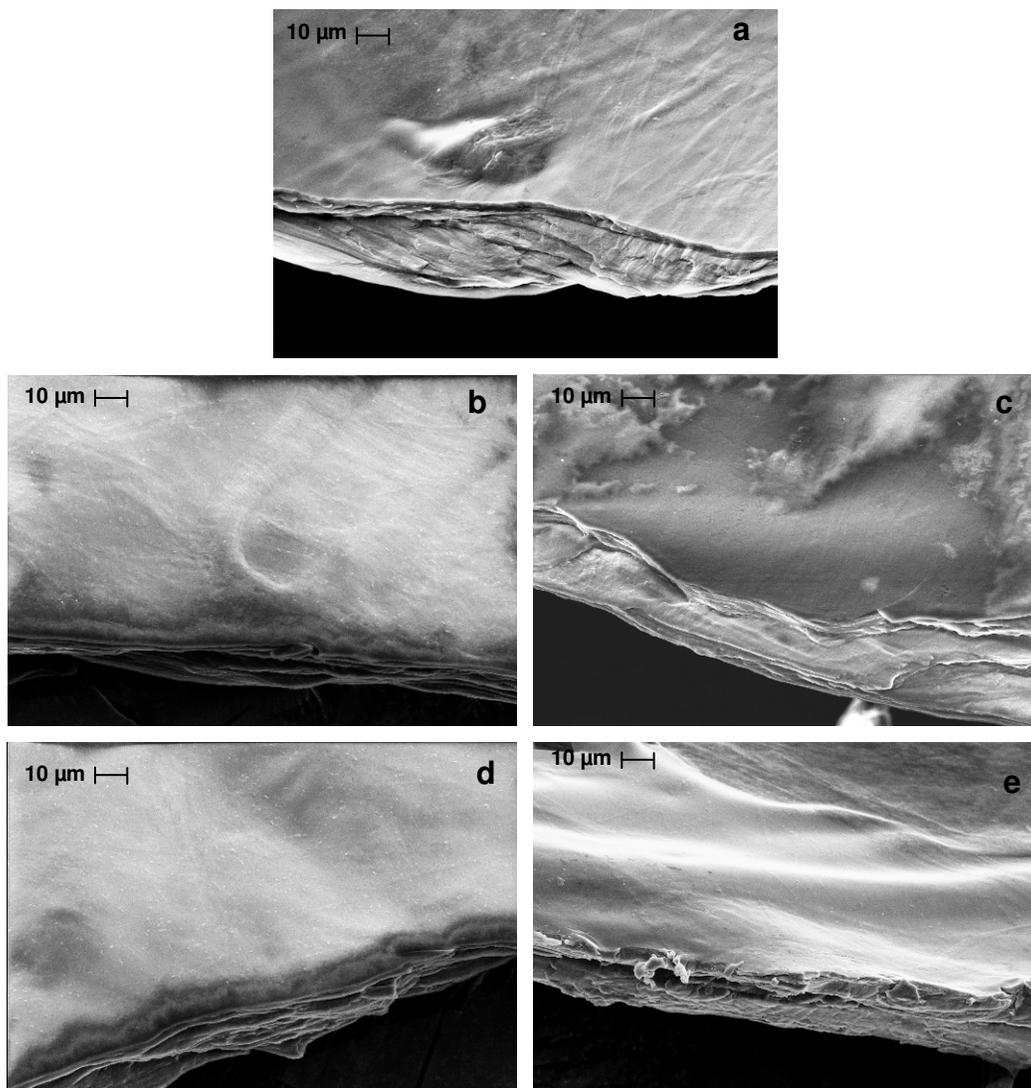


Figura 4.14: Secção transversal (aumento de 2000X) das membranas tratadas termicamente: (a) ensaio 1E – sem tratamento; (b) ensaio 2E – 30 min; (c) ensaio 3E – 60 min; (d) ensaio 4E – 90 min e (e) ensaio 5E – 120 min.

#### 4.1.7.3. Perfil de hidratação das membranas

Os resultados da hidratação gradativa das membranas de quitosana e xantana ao longo de 24 h a 37°C são apresentados na Figura 4.15. A amostra controle teve seus resultados divididos por 5 para uma comparação gráfica mais efetiva.

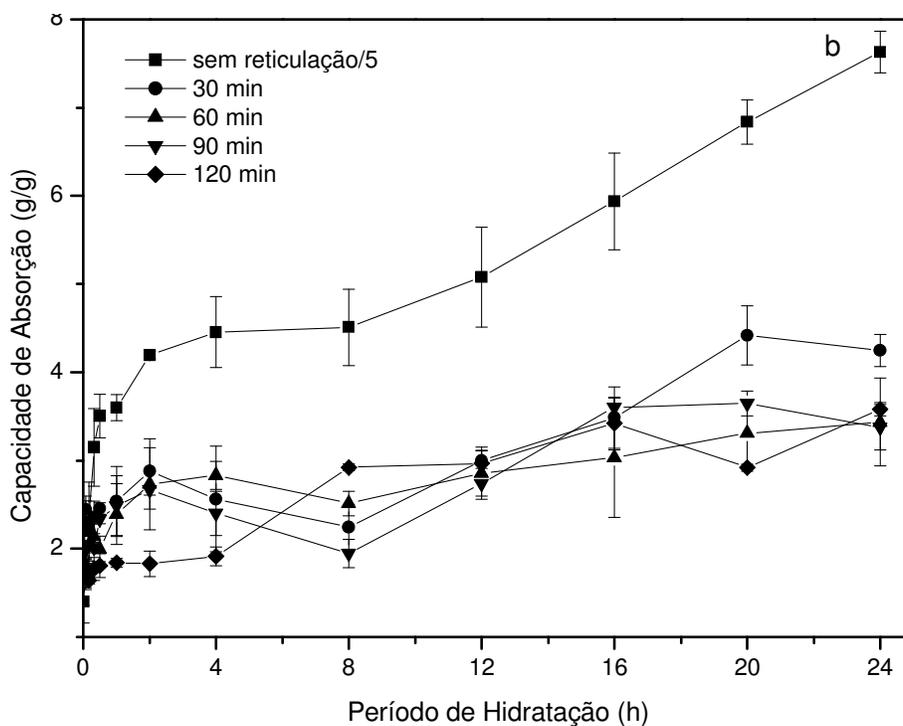
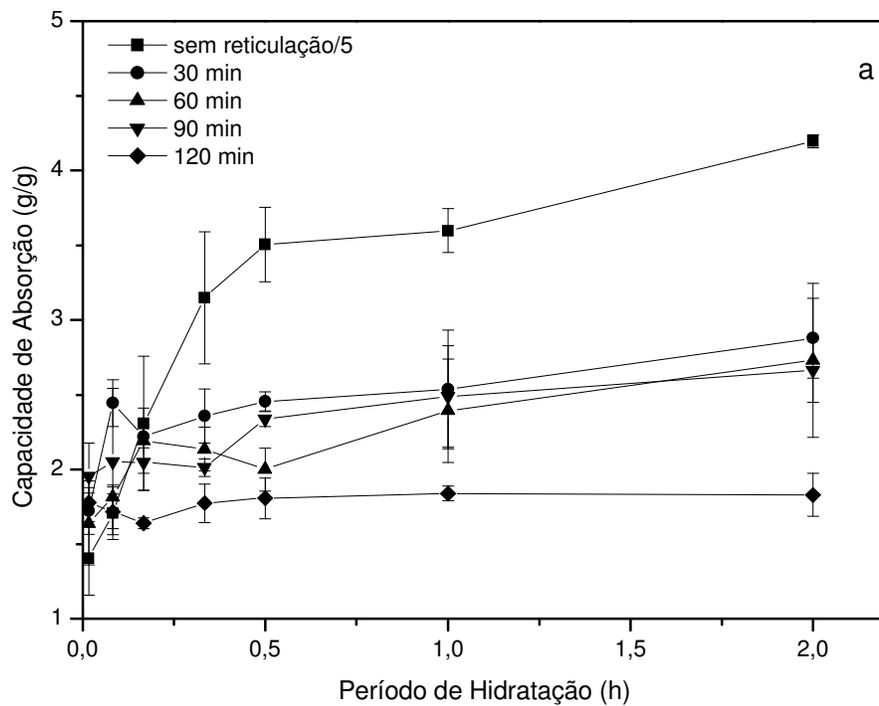


Figura 4.15: Comportamento observado para o perfil de hidratação das membranas de quitosana-xantana sem e com tratamento térmico: (a) nas primeiras 2 h de hidratação e (b) durante 24 h.

Observa-se que as membranas que foram reticuladas termicamente absorveram quantidades menores de água (até 10 vezes menores) que as amostras não tratadas e os

diferentes tempos de reticulação não interferiram significativamente nos perfis das membranas após as 4 horas iniciais.

#### 4.1.7.4. Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de água, soro fetal bovino, fluido corpóreo simulado e solução de NaCl a 0,9% das membranas estão listados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Valores obtidos para a capacidade máxima média ( $C_W$ ) de absorção de soluções aquosas por 24 h a 37°C por amostras tratadas termicamente por diferentes períodos.

Ensaio	Tempo de Tratamento (min)	$C_{W \text{ água}}$ (g/g)	$C_{W \text{ SS}}$ (g/g)	$C_{W \text{ FCS}}$ (g/g)	$C_{W \text{ SFB}}$ (g/g)
1E	-	39,54 ± 2,19 <sup>a</sup>	11,52 ± 0,49 <sup>c</sup>	5,74 ± 0,74 <sup>e</sup>	5,78 ± 0,57 <sup>g</sup>
2E	30	3,66 ± 0,59 <sup>b</sup>	2,93 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,40 ± 0,46 <sup>f</sup>	2,79 ± 0,35 <sup>h</sup>
3E	60	3,02 ± 0,22 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,24 <sup>d</sup>	3,48 ± 0,33 <sup>f</sup>	2,88 ± 0,14 <sup>h</sup>
4E	90	3,07 ± 0,48 <sup>b</sup>	3,04 ± 0,18 <sup>d</sup>	3,48 ± 0,31 <sup>f</sup>	2,90 ± 0,23 <sup>h</sup>
5E	120	3,47 ± 0,62 <sup>b</sup>	2,95 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,43 ± 0,17 <sup>f</sup>	2,91 ± 0,32 <sup>h</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

Como observado anteriormente no perfil de hidratação, as membranas que não sofreram tratamento térmico tiveram sua capacidade de absorção bem elevadas em comparação às de amostras reticuladas. O mesmo foi observado para as demais soluções empregadas, nas quais não houve diferença significativa de comportamento em função dos diferentes tempos de exposição ao calor, apenas em relação às amostras não reticuladas. Observou-se também que, diferentemente de todas as membranas testadas anteriormente, as membranas tratadas apresentaram capacidade máxima de absorção muito próximas nas diferentes soluções, o que indica que o aumento da força iônica e da

osmolalidade, assim como a presença de proteínas nestas soluções não interferiu na capacidade de absorção.

Frente a isso, considera-se que as membranas tratadas termicamente não teriam uso indicado como curativos para lesões apresentando grande liberação de exsudato.

#### 4.1.7.5. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Os valores obtidos para a variável-resposta perda de massa das membranas em diferentes soluções de base aquosa estão listados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Valores obtidos para a perda de massa em água a 4°C por 40 dias das membranas tratadas termicamente.

Ensaio	Tempo de Tratamento (min)	Água (%)	SS (%)	FCS (%)	SFB (%)
1E	-	9,76 ± 1,22 <sup>a</sup>	3,69 ± 0,75 <sup>c</sup>	6,97 ± 1,04 <sup>e</sup>	6,76 ± 1,13 <sup>g</sup>
2E	30	11,62 ± 0,87 <sup>a,b</sup>	7,96 ± 0,47 <sup>d</sup>	11,66 ± 0,21 <sup>f</sup>	9,69 ± 1,46 <sup>g,h</sup>
3E	60	13,07 ± 0,26 <sup>b</sup>	7,169 ± 0,93 <sup>d</sup>	10,16 ± 1,76 <sup>f</sup>	8,72 ± 0,96 <sup>g,h</sup>
4E	90	9,75 ± 0,88 <sup>a</sup>	8,36 ± 1,78 <sup>d</sup>	11,13 ± 0,79 <sup>f</sup>	10,64 ± 0,49 <sup>h</sup>
5E	120	10,51 ± 0,34 <sup>a</sup>	8,34 ± 1,84 <sup>d</sup>	9,59 ± 1,35 <sup>e,f</sup>	8,80 ± 1,19 <sup>g,h</sup>

SS - Solução salina; FCS - Fluido corpóreo simulado; SFB - Soro fetal bovino.

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa.

As perdas de massa em água das amostras tratadas termicamente por distintos períodos foram semelhantes entre si e também similares à da amostra não tratada. Assim, a exposição térmico empregada não causou efeito positivo ou negativo nesta característica.

Em solução salina e FCS, a perda de massa das membranas reticuladas foi maior que a das membranas sem reticulação. Esse aumento na perda de massa também foi observado em soro fetal bovino, porém mais discreto que nas soluções anteriores.

#### 4.1.7.6. Capacidade de drenagem de água das membranas

Os valores referentes à capacidade de drenagem das membranas podem ser visualizados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Valores obtidos para a capacidade máxima média de drenagem de água das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.

Ensaio	Tempo de Tratamento (min)	Taxa de drenagem (g/m <sup>2</sup> .dia)
1E	-	4.589,11 ± 264,10 <sup>a</sup>
2E	30	2.426,89 ± 293,35 <sup>b</sup>
3E	60	2.343,70 ± 325,50 <sup>b</sup>
4E	90	2.203,19 ± 240,00 <sup>b</sup>
5E	120	1.443,00 ± 385,55 <sup>c</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Avaliando-se os resultados encontrados, observa-se que a capacidade de drenagem diminui gradativamente conforme aumenta o tempo de reticulação das membranas. Um fator que pode ter ocasionado esta diminuição é a menor capacidade das membranas reticuladas termicamente de se hidratarem, dificultando assim a passagem de água de uma face à outra. Através das microscopias apresentadas anteriormente observou-se que a compactação das membranas do ensaio 5E era maior do que nos demais ensaios, o que pode ter ocasionado a diminuição da taxa de drenagem neste caso quando comparado com as demais membranas.

O ideal para um curativo é que sua taxa de drenagem esteja entre 3.400 a 5.200 g/m<sup>2</sup>.dia dependendo do tipo da lesão (Behar *et al.*, 1985), e neste contexto, as membranas reticuladas não são indicadas para feridas com produção de grandes quantidades de exsudato.

#### 4.1.7.7. Propriedades mecânicas das membranas

Os resultados referentes à resistência à tração e ao alongamento na ruptura das membranas secas estão apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Valores obtidos para a resistência à tração e para o alongamento na ruptura das membranas com diferentes períodos de tratamento térmico.

Ensaio	Tempo de Tratamento (min)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1E	-	5,32 ± 1,11 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,43 <sup>c</sup>
2E	30	6,08 ± 0,68 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,34 <sup>c</sup>
3E	60	3,52 ± 0,43 <sup>b</sup>	2,57 ± 0,54 <sup>c</sup>
4E	90	5,68 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,71 <sup>c</sup>
5E	120	3,46 ± 0,83 <sup>b</sup>	2,57 ± 0,69 <sup>c</sup>

Letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança. Média de cinco repetições.

Foram obtidos neste experimento valores de resistência à tração entre 3,46 e 6,08 MPa e de alongamento na ruptura entre 2,18 e 2,76%, sendo que as membranas, reticuladas ou não, não apresentaram diferença significativa no alongamento durante a ruptura, e em alguns casos, na resistência à tração. As amostras dos ensaios com 60 e 120 min de reticulação apresentaram as menores resistências à tração, enquanto que as amostras com reticulação de 30 e 90 min mostraram resistência semelhante às membranas não reticuladas.

## 5. DISCUSSÃO

As membranas preparadas empregando quitosana e xantana apresentaram, em geral, propriedades adequadas para uso como curativos dérmicos. Nas Figuras 5.1 a 5.3 são apresentados, de forma comparativa, os resultados obtidos nos estudos enfocando a influência da vazão de mistura dos polímeros, das concentrações poliméricas e do tratamento térmico nas características das membranas preparadas.

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 100 e 200  $\mu\text{m}$  podem ser considerados adequados para tal utilização. Neste contexto, todas as membranas obtidas neste trabalho apresentaram potencial para serem utilizadas como curativos.

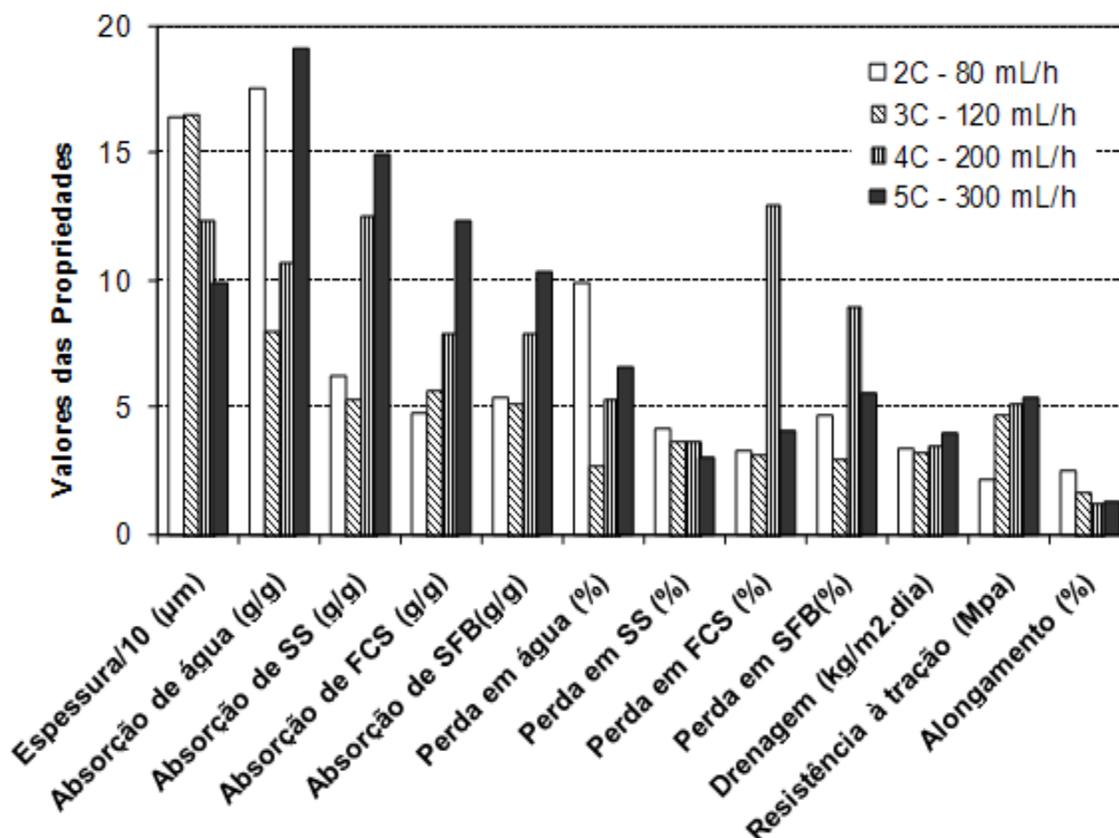


Figura 5.1: Valores das propriedades das membranas produzidas com diferentes vazões de adição da solução de quitosana.

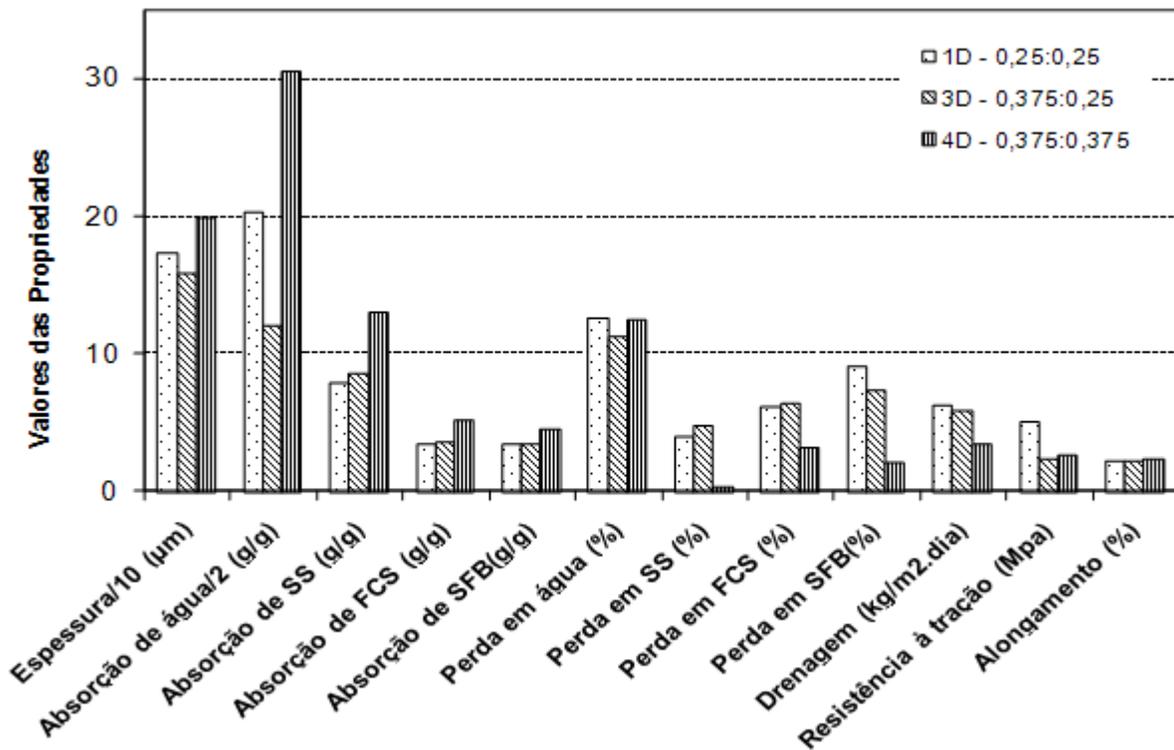


Figura 5.2: Valores das propriedades das membranas produzidas com diferentes relações mássicas e concentrações dos polímeros (quitosana:xantana).

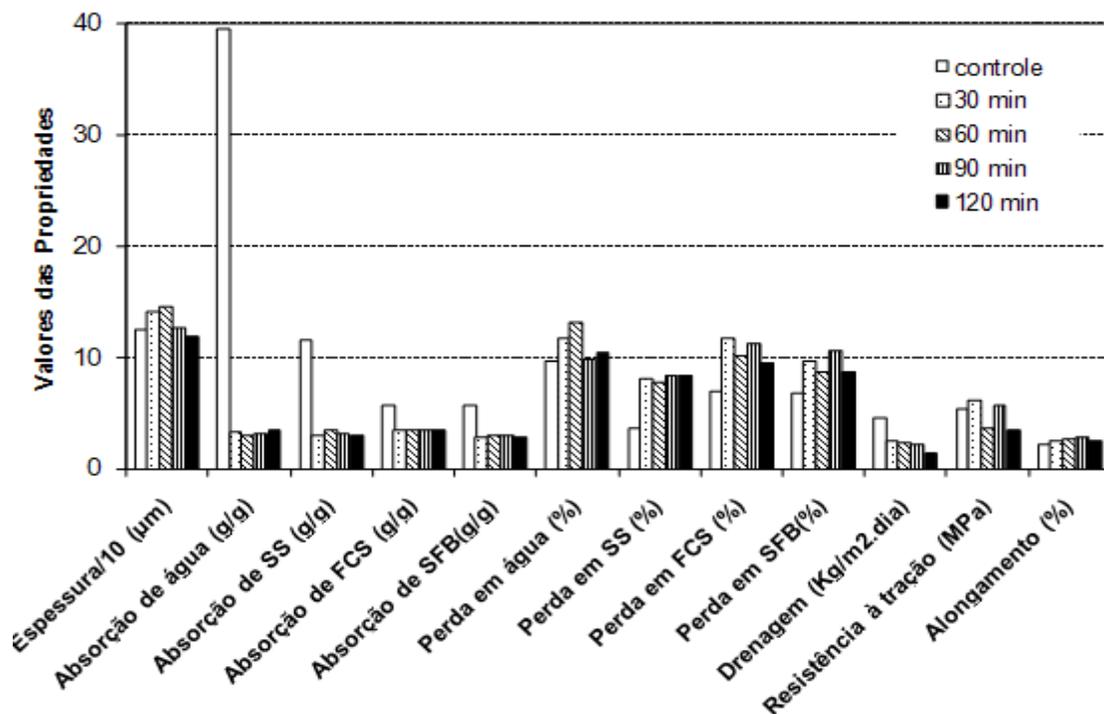


Figura 5.3: Valores das propriedades das membranas submetidas a diferentes períodos de tratamento térmico.

Como não há dados de membranas compostas de quitosana e xantana publicados na literatura, não é possível comparar diretamente os resultados obtidos com os de membranas semelhantes. No entanto, pode-se comparar com membranas de quitosana e outros poliânions, como de quitosana e alginato, cujas espessuras variaram de 65,71 a 80,00  $\mu\text{m}$  (Rodrigues, 2008). Deve-se considerar, entretanto, que há diferenças nas condições de preparo das membranas e no poliânion empregado em sua preparação. Já que as massas de polímeros utilizadas neste trabalho são semelhantes às empregadas por Rodrigues (2008), supõe-se que a diferença nas espessuras deva-se ao tipo de coacervação e ao empacotamento dos agregados obtidos quando usa-se xantana em substituição ao alginato e à ausência de acetona como cosolvente durante a coacervação, o que pode ter provocado a expansão da estrutura. Observou-se que a espessura aumentou ao elevar-se a concentração das soluções poliméricas, o que era esperado, visto que as membranas possuem a mesma área, mas maior massa.

As amostras que foram tratadas termicamente por períodos de tempo menores tiveram um aumento na espessura em comparação com as amostras sem reticulação e com exposição por maiores períodos. Segundo Dallon (2005), a faixa de temperatura de 60 a 125°C proporciona perda de água ainda contida na estrutura de membranas de quitosana e, o mesmo é descrito para xantana pura (Soares *et al.*, 2005). Este comportamento quanto à espessura pode ser atribuído à expansão das cadeias dos polímeros por ação do calor e vaporização da água e, após um tempo maior de exposição a altas temperaturas, as cadeias sofrem um novo arranjo devido a evaporação, aproximando-se e diminuindo assim, sua espessura.

Uma importante característica de curativos é a capacidade de absorver o exsudato liberado pela lesão sem causar ressecamento no leito da ferida. Em virtude deste requerimento, estudos sobre perfil de hidratação, capacidade máxima de absorção de soluções aquosas e capacidade de drenagem de água são de grande relevância para a seleção de metodologias de produção de membranas destinadas a lesões de pele.

Na análise do perfil de hidratação das membranas em 24 h verificou-se que a absorção de água ocorre durante todo o período de exposição, sendo a taxa de absorção maior nas primeiras horas de contato. Observou-se também que a absorção de água aumentou conforme se elevou as vazões de mistura das soluções poliméricas, com exceção das amostras do ensaio com 80 mL/h. Esse aumento na absorção deve-se a estruturação da matriz polimérica, que apresentando uma coacervação maior são capazes de absorver maiores quantidades de água do que matrizes menos coacervadas.

Verificou-se que as amostras referentes a 80 e 300 mL/h de vazão de adição da solução de quitosana tiveram aumento apreciável de hidratação a partir de 12 h de exposição à água. 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 complexos polieletrólitos durante a absorção de água é mantida pela reticulação das cadeias. Entretanto, em valores de pH ácidos (como o pH da água deionizada utilizada no ensaio, próximo de 5,1 ou básicos, estas ligações podem ser rompidas, resultando na desintegração dos complexos e na dissolução parcial das membranas. A verificação de que a membrana obtida na vazão de 40 mL/h voltou ao formato de hidrogel durante o tratamento com água imediatamente após a primeira etapa de secagem, impossibilitando sua caracterização, e o fato de que as condições de preparação das membranas do ensaio, utilizando vazão de 80 mL/h, não diferirem demasiadamente das empregadas neste ensaio, permitindo supor que o comportamento de absorção observado deve-se à provável dissolução de suas cadeias.

Rodrigues (2008) verificou um comportamento similar de aumento de absorção em 12 h e atribuiu-o à discreta protonação das aminas em meio ácido, à repulsão dos grupos amino residuais nos PECs, causando a expansão da estrutura polimérica, que facilita a penetração e a absorção de água. Assim, a presença de grupos amino protonados nos filmes aumenta a capacidade de absorção de água. Todos estes fatores podem atuar contribuindo para que maiores valores de absorção do solvente sejam obtidos. Observou-se, também, que membranas contendo maiores concentrações de quitosana em relação à xantana apresentaram uma hidratação linear após 4 h de ensaio. Este fato está relacionado a uma menor disponibilidade das cadeias de xantana na estrutura por presença de cadeia de quitosana em maior quantidade, diminuindo a capacidade de absorção de água.

O comportamento das membranas de mesma relação mássica, mas com diferentes concentrações de polímeros, foi semelhante no decorrer do ensaio, verificando que o PEC não sofre modificações nestas condições. O tratamento térmico causou uma modificação no perfil de hidratação das membranas, diminuindo significativamente a quantidade de água absorvida durante o ensaio. Este resultado era esperado, visto que as ligações iônicas seriam, teoricamente, substituídas total ou parcialmente por ligações amídicas, tornando a membrana insolúvel e com menos capacidade de absorção de água. Bernabé *et al.* (2005), observaram relação inversa entre o tempo de exposição ao calor e o grau de entumescimento máximo das membranas, o mesmo não foi observado nas membranas quitosana-xantana, na qual o perfil das membranas tratadas com

diferentes tempos foi muito próximo, mas em comparação com membranas sem reticulação, a hidratação foi até 10 vezes menor. Uma hipótese é que a amidação ocorre nos primeiros minutos de exposição ao calor, não diferindo nas demais amostras mesmo com períodos maiores de tratamento térmico.

Nas análises de capacidade máxima de absorção de soluções aquosas em 24h observou-se que as membranas de quitosana-xantana apresentaram alta absorção de água, em torno de 39 g de água/g membrana, muito superior à descrita por Rodrigues (2008) para membranas de quitosana-alginato (19 g água/g membrana seca). Aumentando-se a concentração dos polímeros (de 0,25% para 0,375% para ambos) houve aumento da absorção de água, sugerindo relação direta e linear entre a concentração polimérica e a capacidade de absorção de água, como era esperado. Em solução salina a absorção é menor em comparação à água, devido à presença de íons em solução, que competem com esta pelas hidroxilas da cadeia polimérica. As amostras produzidas com 300 mL/h foram as que apresentaram maior absorção desta solução e esta absorção aumentou conforme a concentração polimérica total foi elevada. As membranas com 50% a mais de polímeros em sua estrutura absorveram até duas vezes mais que as demais. As capacidades de absorção de SFB e FCS foram semelhantes (5 a 14 g solvente/g membrana seca), aumentando conforme se elevou a vazão de mistura das soluções poliméricas e, mesmo discretamente, a concentração de polímeros, principalmente em relação ao aumento de xantana. Verifica-se que 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 em relação à da água, provavelmente pela competitividade dos íons e proteínas pelas hidroxilas presentes nas cadeias poliméricas, diminuindo sua disponibilidade para hidratação. Rodrigues (2008) verificou capacidades de absorção destas soluções em 24 h semelhantes nas membranas quitosana-alginato. Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) reportou comportamento semelhantes de hidrogéis de quitosana-xantana em tampão PBS pH 7,0 e solução salina por 90 min, relacionando-o a interações entre os íons e as cargas presentes na cadeia dos polímeros.

As membranas que passaram pelo tratamento térmico apresentaram capacidade de absorção de soluções aquosas inferior quando comparadas às membranas dos ensaios anteriores. As membranas tratadas com diferentes períodos de reticulação não diferiram estatisticamente entre si. Isto pode ser devido à redução da mobilidade das cadeias pela formação de ligações amídicas, ou pela perda de água na estrutura (a

presença de água pode causar efeito plastificante, diminuindo a rigidez das cadeias) durante a exposição a altas temperaturas. Estes fatores podem dificultar a entrada de água, íons e outros compostos no interior do PEC. Conforme já menciona, Bernabé *et al.* (2005) observaram que membranas reticuladas apresentavam menores capacidades de absorção de água, quando comparadas às que não sofreram reticulação térmica, e que esta diminuição está diretamente relacionada ao período de exposição. Nas membranas deste trabalho não foi verificada nenhuma relação entre a capacidade máxima de absorção de soluções aquosas e o tempo de reticulação das amostras, sugerindo que as alterações ocorridas durante o tratamento térmico ocorram nos primeiros minutos de exposição. Estas características permitem concluir que o tratamento térmico torna as membranas não adequadas para uso em curativos para lesões com liberação elevada de exsudato.

Segundo Behar *et al.* (1985), a média diária de perda natural de líquido pelo corpo através da pele saudável é de  $240 \text{ g/m}^2 \cdot \text{dia}$ , sendo que as superfícies lesadas têm fluxo muito superior a esta média, podendo atingir de  $3.400$  a  $5.200 \text{ g/m}^2 \cdot \text{dia}$  dependendo do tipo da lesão. Neste contexto, a avaliação da capacidade de drenagem das membranas de quitosana e xantana é necessária, principalmente para verificar seu potencial como curativo em lesões que apresentem alta liberação de exsudato. No presente trabalho observou-se que o aumento na vazão de mistura das soluções causou elevação na capacidade de drenagem, devendo-se, provavelmente, à organização interna da estrutura das membranas, em lamelas com espaçamentos diferentes entre si (Figura 4.7), que facilita a permeação das moléculas de água até a outra face da membrana. Outro fator importante para esse aumento é a absorção de água pelas membranas, que causa um espaçamento maior entre as lamelas, observando-se, em geral, que as capacidades de absorção e de drenagem apresentam uma relação direta.

Membranas que receberam tratamento térmico absorveram menos água que as demais e tiveram um decréscimo significativo na permeação. Para esta propriedade foi possível estabelecer uma relação com o aumento do tempo de exposição ao calor e a capacidade de drenagem, que pode ser conseqüência da compactação aumentada, verificada nas microscopias, diminuindo os espaços livres para a passagem da água. Verificou-se também que o aumento da espessura, quando há aumento da concentração polimérica, resulta em diminuição da capacidade de drenagem devido à dificuldade de difusão da água na matriz polimérica.

Rodrigues (2008) encontrou, para membranas de quitosana-alginato, capacidade de drenagem de 13.599 g/m<sup>2</sup>.dia, bem superior aos valores encontrados para membranas de quitosana-xantana. Entretanto uma capacidade de drenagem muito maior que a requerida pode ocasionar desidratação excessiva no leito da lesão, uma desvantagem que as membranas de quitosana-xantana não possuem, estando sua capacidade (3.500 a 5.900 Kg/m<sup>2</sup>.dia) dentro da faixa esperada para curativos.

A perda de massa das membranas quando estocadas em solução é medida para avaliar a estabilidade do complexo formado e prever perdas que podem ocorrer quando de seu contato com o leito da lesão. Foi utilizado um período de 40 dias, muito superior ao tempo de uso de um curativo (24 a 48 h) devido à temperatura escolhida (4 °C) ser menor que 37 °C. Em contato com soluções aquosas, as membranas, compostas de coacervados interligados de quitosana e xantana, podem apresentar dissolução paulatina de moléculas poliméricas não complexadas entre si. Os coacervados, na forma de fibras são pouco solúveis nos solventes aquosos, e assim, a perda de massa verificada neste ensaio deve-se principalmente à dissolução da xantana não ligada aos coacervados, visto que a quitosana é pouco solúvel nos meios aquosos testados. Supõe-se também que a perda mássica seja relacionada à facilidade com que a água é capaz de se deslocar através da membrana, estando, desta forma, relacionada com a capacidade de absorção e formação estável de PEC. Esta hipótese é verificada nas membranas com diferentes vazões de mistura, nas quais se observou que quanto maior a capacidade de absorção, maior é a perda de massa (3 a 6%). Observou-se que nas membranas preparadas na vazão de 80 mL/h, a perda de massa foi maior que nas demais (9%), o que pode ser resultado da instabilidade do complexo, causando um aparecimento de espaços vazios maiores e conseqüentemente maior absorção de solvente. Verificou-se que o aumento da concentração de polímeros na membrana não ocasionou diferenças na perda de massa em água, SS e FCS. Já em SFB houve uma diminuição da perda de massa quando se aumentou a concentração polimérica. Esta diferença pode estar relacionada à presença de proteínas e à alta osmolalidade deste meio aquoso, que pode desestabilizar mais facilmente o complexo polieletrólito menos concentrado.

O emprego de tratamento térmico não afetou de maneira significativa a perda de massa em água, mas aumentou esta variável resposta nas demais soluções. Tal efeito não era esperado, uma vez que as membranas absorveram menores quantidades de solução, como verificado anteriormente, e que as ligações entre os polímeros deveriam estar mais estáveis, dificultando assim a solubilização das cadeias de xantana. Bernabé *et al.* (2005) demonstram que após o tratamento térmico, a formação de ligações

amídicas torna as membranas de quitosana-pectina mais estáveis, não havendo solubilização destas em soluções ácidas e básicas. Entretanto, este comportamento não ocorreu com as membranas de quitosana-xantana, mesmo havendo similaridade entre os poliânions xantana e pectina, já que as amostras avaliadas apresentaram perda em condições não extremas de pH. Era esperado que, com a modificação das ligações no PEC e a menor capacidade de hidratação destas membranas, a perda de massa fosse menor em relação às amostras não reticuladas. Supõe-se que as cadeias que possuem propensão de se soltar da estrutura da membrana não sofrem modificação durante o tratamento térmico ou ainda que ocorra a desestabilização do complexo, proporcionando maior perda.

Os valores obtidos foram, em geral, menores que os descritos por Rodrigues (2008) para membranas de quitosana e alginato, que relata perdas de massa em água entre 20,1 e 25,5% e perdas semelhantes a este trabalho nos demais meios aquosos, durante o processo de imersão das mesmas nas diferentes soluções.

Uma das desvantagens do uso de polímeros naturais é a menor resistência mecânica quando comparados a polímeros sintéticos. Segundo Wang *et al.* (2002), a resistência à tração da pele normal varia de 2,5 a 16 MPa. Por este motivo a caracterização quanto a este aspecto é fundamental para avaliar complexos naturais para uso como componentes de curativos.

Nas análises das propriedades mecânicas das membranas de quitosana-xantana observou-se que a quanto maior a vazão de mistura das soluções poliméricas, maior era a resistência à tração (2,2 a 5,4 MPa), não havendo modificações significativas quanto ao alongamento na ruptura. Estes resultados podem ser potencialmente atribuídos às diferentes formas de empacotamento dos coacervados poliméricos decorrentes das distintas condições de preparação empregadas, resultando, provavelmente, no ensaio de menor vazão em fibras mais compactadas e densas e no ensaio de maior vazão, em fibras mais distendidas e melhor distribuídas como observado na Figura 4.6. Outra hipótese é que, ao diminuirmos a vazão de adição, o tempo de reação aumenta, e conseqüentemente o tempo de exposição a alta agitação (1000 rpm). Isto pode causar uma fragmentação das fibras do complexo polimérico, causando o aspecto observado nas imagens dos coacervados.

Verificou-se que a resistência à tração diminui conforme se aumenta a concentração de quitosana, e mantém-se igual ao se aumentar somente a concentração de xantana. Isto pode decorrer do fato que o aumento da concentração de cadeias em

solução (já que o volume final da mistura é o mesmo) pode diminuir o número de ligações ordenadas entre os polímeros e a organização das zonas cristalinas, aumentando a formação de zonas amorfas e diminuindo a resistência do material à tração. Membranas reticuladas termicamente não apresentaram diferença significativa das não reticuladas quanto às características mecânicas. Uma hipótese para este fato é a possível hidrólise das ligações amídicas, reação esta favorecida por altas temperaturas (Morrison e Boyd, 1974).

Os valores de resistência à tração e de alongamento na ruptura obtidos neste trabalho foram muito inferiores aos valores encontrados por Rodrigues (2008), de 6,86 a 31,14 MPa e 3,97 a 8,42%, respectivamente. Esta comparação é dificultada pelas diferenças nas condições de preparo das membranas e na composição das mesmas, entretanto indica que a xantana, neste aspecto, é um biopolímero menos apropriado que o alginato para a confecção de membranas coacervadas à base de quitosana.

Verificou-se então, que as membranas produzidas com vazão de mistura de 300 mL/h, utilizando as mesmas concentrações dos dois polissacarídeos (0,25:0,25%) foram as mais adequadas para uso como curativos dérmicos. A reticulação térmica não resultou em melhora significativa nas propriedades mecânicas destas membranas, reduzindo, entretanto, sua capacidade de absorção de fluidos e aumentando sua perda de massa. Estas características podem tornar estas membranas uma alternativa para implantes biodegradáveis.

A produção de membranas contendo quitosana e pectina resultou em membranas com características pouco adequadas para o uso em curativos, o que pode ser atribuído às características da pectina empregada, que possuía grau de esterificação de cerca de 67%. Segundo Marudova *et al.* (2004), que realizaram um estudo sobre a formação do gel quitosana-pectina, este poliânion com grau de esterificação em torno de 70% não forma gel, mesmo na concentração de 5% de pectina, por não possuir uma quantidade significativa de grupos negativamente carregados para a coacervação do PEC.

As membranas à base de carragena e quitosana apresentaram resultados não adequados para este trabalho, uma vez que não houve coacervação efetiva entre as cadeias de carragena e as de quitosana. Este fato pode ter ocorrido pelo tipo de carragena utilizada (kappa), que apresentava poucos grupos negativamente carregados. Outro fator determinante é foi o pH utilizado durante o processo de produção (em torno de 3,5), que não considerou a condição mais apropriada (acima de 4,2) para a

desprotonação dos grupos sulfonados da  $\kappa$ -carragena de forma que estes pudessem interagir eletrostaticamente de forma mais efetiva com os grupos amino da quitosana.

Supostamente, o uso tanto de pectina quanto de carragena com propriedades distintas dos materiais empregados no desenvolvimento deste trabalho poderia resultar em membranas com características que viessem mais ao encontro da finalidade almejada.

## 6. CONCLUSÕES

A substituição de alginato por xantana em membranas coacervadas de quitosana foi alcançada, possibilitando o uso de um poliânion com qualidade independente de condições climáticas para uso em curativos.

Os resultados obtidos para as membranas de quitosana-xantana indicaram que membranas com capacidade de absorção de água de até 40 g de H<sub>2</sub>O, 12 g de solução salina, 5 g de fluido corpóreo simulado e 5 g de soro sanguíneo por grama de membrana seca, com perda de massa máxima nas mesmas soluções de até 12%, capacidade de drenagem de até 6 Kg/m<sup>2</sup>.dia, resistência à tração até 6 MPa e alongamento na ruptura em torno de 2,5% podem ser obtidas. Dentre as membranas produzidas, as que apresentaram propriedades mais adequadas a seu objetivo foram as preparadas com relação mássica entre os polímeros de 2:2 (quitosana:xantana) na concentração de 0,25% (m/v), adicionando a solução de quitosana a vazão de 300 mL/h para formação do PEC.

A comparação das características determinadas para estas membranas e as compostas por quitosana e alginato indicou que a utilização de xantana promoveu um aumento na capacidade de absorção de solventes e permeação de água pelas membranas. Porém, observou-se que as membranas quitosana-xantana apresentaram uma diminuição no desempenho referente às propriedades mecânicas.

A etapa adicional de reticulação térmica não resultou em melhoria nas propriedades mecânicas, mas reduziu a capacidade máxima de absorção e aumentou a perda de massa em meios aquosos, podendo ser de interesse em dispositivos para outras aplicações.

Nas condições testadas, as membranas produzidas pela complexação de quitosana-pectina e quitosana-carragena não resultaram em amostras com características apropriadas para uso como curativos. No caso da pectina, observou-se fragmentação das membranas, enquanto que as amostras contendo carragena não apresentaram coacervação adequada.

### 6.1. Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se a continuação do presente estudo enfocando os seguintes aspectos:

1. Avaliação de estratégias alternativas, como o uso de plastificantes ou outros polímeros em conjunto, para o aumento da resistência mecânica das membranas

quitosana-xantana, a fim de se melhorar essas características, buscando um curativo mais adequado;

2. Realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a biocompatibilidade das membranas;
3. Avaliação do uso destas membranas como sistemas de liberação controlada de fármacos.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 7241-7250, 2005.
2. 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.
3. Andreopoulos, A.G. e Tarantili, P. A. Xanthan gum as a Carrier for controlled release of drugs. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 16, p. 34-46, 2001.
4. American Society for Testing and Materials ASTM D882-95a: *Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*, 1995.
5. Argin-Soysal, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. L. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 202–209, 2009.
6. 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.
7. 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).
8. 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).
9. 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.
10. Carrougher, G. Burn wound assessment and topical treatment. In: Carrougher, G. *Burn care and therapy*, Mosby, Missouri, pp.133-165, 1998.

11. Chang, K. L. B.; Lin, J. Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p. 163-169, 2000.
12. Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v. 22, p. 261-268, 2001.
13. Chellat, F.; Tabrizian, M.; Dumitriu, S.; Chornet, E.; Magny, P.; Rivard, C. H.; Yahia, L. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan poluionic complex. *Journal Biomedical Material Research*, v. 51, p. 107-116, 2000(a).
14. Chow, K.S.; Khor, E. Novel fabrication of open-pore chitin matrixes. *Biomacromolecules*, v. 1, p. 61-67, 2000.
15. Clasen, C.; Wilhelms, T.; Kulicke, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3210-3222, 2006.
16. Craveiro, A.A.; Craveiro, A.C., Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. Patente brasileira, PI 9805480-5A, 2000.
17. 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.
18. Dallan, P. R. M.; Moreira, P. L.; Petinari, L.; Malmonge, S. M.; Beppu, M. M.; Genari, S. C.; Moraes, A. M. Effects of Chitosan Solution Concentration and Incorporation of Chitin and Glycerol on Dense Chitosan Membrane Properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80 (2), p. 394-405, 2007.
19. Dumitriu, S.; Chornet, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complex. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 223-246, 1998.
20. Freier, T., Koh, H.S., Kazazian, K. & Shoichet, M.S., Controlling cell adhesion and degradation os chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials*, v. 26, p. 5872-5878, 2005.
21. García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biothechnology Advances*, v. 18, p. 549-579, 2000.
22. Ghaffari, A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K.; Rafiee-Tehrani, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for

- sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 175–186, 2007.
23. Granada, G. G.; Zambiasi, R. C.; Mendonça, C. R. B.; Silva, E. Caracterização física, química, microbiológica e sensorial de Geléias *light* de abacaxi. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25(4), p. 629-635, 2005.
  24. Hansen, B.; Jemec, G. B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. *Archives of Dermatology*, v. 138(7), p. 909-1011, 2002.
  25. Hayashi, T., Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science*, v. 19, p.663-702, 1994.
  26. Hench, L.L., Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, p. 1419-1423, 1998.
  27. Hidaka, Y.; Ito, M.; Mori, K.; Yagasaki, H.; Kafrawy, A. H., Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 46, p. 418-423, 1999.
  28. Hiorth, M.; Kjøniksen, A. L.; Knudsen, K. D.; Sande, S. A.; Nyström, B. Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1718–1728, 2005.
  29. Hoekstra, A.; Struszczyk, H.; Kivekas, O. Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites. *Biomaterials*, v. 3, p. 105-108, 1998.
  30. Horn, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
  31. 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.
  32. Junqueira, L. C.; Carneiro, J., *Histologia Básica*, 10ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004).
  33. Khor, E.; Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, p. 2339-2349, 2003.

34. Khurma, J. R.; Rohindra, D. R.; Nand, A. V. Synthesis and properties of hydrogels based on chitosan and poly(vinyl alcohol) crosslinked by genipin. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 43, p. 749-758, 2006.
35. Kim, C.; Yoo, B. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 120–128, 2006.
36. 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.
37. Konop, D., General local treatment. In: Trofino, R., Nursing care of the Burn-injured patient, FA Davis, Philadelphia, p. 42-67, 1991.
38. Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1–27, 2000.
39. 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.
40. Lee, Y.M.; Kim, S.S.; Park, M.H.; Song, K.W.; Sung, Y.K.; Kang, I.K., b-Chitin-based wound dressing containg sulfurdiazine. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 11, p. 817-823, 2000.
41. Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Ed. Edgard Blucher, V. 3, 2001.
42. 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.
43. Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133-1142, 1999.
44. Magnin, D.; Dumitriu, S.; Chornet, E. Immobilization of enzymes into a polyionic hydrogel: chitoxan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 18, p. 355-373, 2003.

45. 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.
46. Martínez-Ruvalcaba, A.; Chornet, E.; Rodrigue, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 586-595, 2007.
47. Marudova, M.; MacDougall, A. J.; Ring, S. G. Pectin–chitosan interactions and gel formation. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 1933–1939, 2004.
48. Mesomo, M. C. Produção de xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, 2007.
49. Metcalfe, A. D.; Ferguson, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 4, p. 413–437, 2007.
50. 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.
51. Mi, F.W.; Wu, Y.B.; Shyu, S.S.; Schoung, Y.B.; Tsai, Y.H.; Hao, J.Y., Control of wound infecctions using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *Jounal of Biomedicine Materials Research*, v. 59, p. 438-449, 2002.
52. 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.
53. Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica. Ed. Roca, São Paulo, 2008.
54. Morrison, R. T.; Boyd, R.N. *Organic chemistry*, Allyn and Bacon, Inc., 3<sup>rd</sup> Ed., 1974.
55. Muzzarelli, R.; Baldassarre, V.; Ferrara, P.; Biagini, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, v. 9, p. 247-252, 1988.

56. Muzzarelli, R.; Mattioli-Belmonte, M.; Tietz, C.; Biagini, R.; Ferioli, G.; Brunelli, M.A.; Fini, M.; Giardino, R.; Ilari, P.; Biagini, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, v. 15, p. 1075-1081, 1994.
57. Muzzarelli, R. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydrate Polymers*, v. 20, p. 7-16, 1993.
58. Muzzarelli, R. Chitin and the human body. In: First International Conference of the European Chitin Society. *Advances in Chitin Science*. Brest, p. 448-461, 1995.
59. Niekraszewicz, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13(6), p. 16-18, 2005.
60. Pankhurst, S. e Pochkhanawala, T. Wound Care. In: Bousfield, B., *Burn Trauma Management & Nursing Care*, Whurr Publishers, London, p. 81-108, 2002.
61. Paul, W.; Sharma, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 18-23, 2004.
62. Pedroso, R. A., Demiate, I. M. Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28(1), p. 24-31, 2008.
63. Phillips T.J., Biologic skin substitutes. *Journal of Dermatology Surgical Oncology*, v. 19, p. 794-800, 1993.
64. Piyakulawat, P.; Praphairaksit, N.; Chantarasiri, N.; Muangsin, N. Preparation and evaluation of chitosan/carrageenan beads for controlled release of sodium diclofenac. *AAPS PharmSciTech*, v. 8(4), Article 97, 2007.
65. Qin, Y. Absorption Characteristics of Alginate Wound Dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, p. 953-957, 2004
66. 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.
67. Rabea, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smagghe, G. & Steubaut, W., Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1457-1465, 2003.
68. Rodd A. B.; Dunstan D. E.; Ross-Murphy S. B.; Boger D. V. Dependence of linear viscoelastic critical strain and stress values on extent of gelation for a thermally activated gelling system. *Rheologica acta*, vol. 40, p. 23-29, 2001.

69. Rodrigues, A. P. Produção e caracterização de micropartículas 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.
70. Rodrigues, A.P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, julho de 2008.
71. Rosalam, S.; England, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and microbial Technology*, v. 39, p. 197-207, 2006.
72. Şem, M.; Avci, E. N. Radiation synthesis of poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-κ-carrageenan hydrogels and their use in wound dressing applications. I. Preliminary laboratory tests. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 74A, p. 187-196, 2005.
73. Shchipunov, Y. A. Sol-gel-derived biomaterials of silica and carrageenans. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 268, p. 68-76, 2003.
74. Soares, R.M.D.; Lima, A.M.F.; Oliveira, R.V.B.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. *Polymer Degradation and Stability*, v. 90, p. 449-454, 2005.
75. Sriamornsak, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutica Uses : A Review. *Silpakorn University International Journal*, v. 3 (1-2), p. 206-228, 2003.
76. 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, 2007.
77. Tapia, C.; Escobar, Z.; Costa, E.; Sapag-Hagar, J.; Valenzuela, F.; Basualto, C.; Gai, M. N.; Yazdani-Pedram, M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixture of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 65-75, 2004.

78. Tomida, H.; Nakamura, C.; Kiryu, S. A novel method for the preparation of controlled-release theophylline capsules coated with a polyelectrolyte complex of  $\kappa$ -carrageenan and chitosan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 42, p. 979-981, 1994.
79. Uekama, K.; Kondo, T.; Nakamura, K.; Irie, T.; Arakawa, K.; Shibuya, M.; Tanaka, J. Modification of retal absorption of morphine from hollow-type suppositories with a combination of  $\alpha$ -cyclodextrin and viscosity-enhancing polysaccharide. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 84 (1), p. 15-20, 1995.
80. Van de Graaff K.M. Anatomia Humana. 6ª edição, São Paulo: Manole, 2003.
81. Vendruscolo, C. W.; Andrezza, I. F.; Ganter, J. L. M. S.; Ferrero, C.; Bresolin, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 296, p. 1-11, 2005.
82. Xu, Y.; Zhan, C.; Fan, L.; Wang, L.; Zheng, H. Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 336 (2), p. 329-337, 2007
83. Wang, L.; Khor, E.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate- $\text{CaCl}_2$  system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
84. 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.
85. Williams, D.F. *Definitions in biomaterial. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*. Chester: Elsevier, 1987.
86. Williams, W. Pathophysiology of the burn wound. In: Herndon, D., Total Burn Care, Saunders, London, p. 514-521, 2002.
87. Wittaya-areekul, S. e Prahsarn, C. Development and in vitro evaluation of chitosan–polysaccharides composite wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 123–128, 2006.
88. Yamaura, M. A química das quitosanas. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/qv\\_quitosanas](http://www.crq4.org.br/qv_quitosanas)>. Acesso em: junho de 2008.

89. 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.
90. Yosof, N.L.B.M., Lim, L.Y. & Khor, E., Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 4, p. 59-68, 2001.

## ANEXO I

## Certificado de Análise da Xantana



1-800-535-2687

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Ship to:		Date: February 07, 2008	
		Order Number:	
		Shipped From:	
		Customer Order:	
		Customer Code:	
		Delivery:	
		Date Shipped:	
Sold to:(If different from Ship to)		Bill Of Lading:	
		Packaging:	
		Pick Quantity: 0.00	
Product Name: KELTROL F		Manufacturing Date: Nov 04, 2007	
Product Description: XANTHAN GUM		Re-evaluation Date: Nov 02, 2009	
Material Number: 10040695		Lot: 7J1238A	
Characteristic	Test Result	Specification	Test Method
Particle Size, % thru 80 mesh (180 $\mu$ m)	100	Not less than 100	KTM146
Particle Size, % thru 200 mesh (75 $\mu$ m)	100	Not less than 92	KTM146
Loss on Drying, %	8	6 - 14	KTM003
Powder Color, %	90	Not less than 82	KTM006
Viscosity (1% KCl solution),cP	1480	1200 - 1600	KTM017
pH (1% Solution)	6.0	For Information Only	KTM005
pH (0.25% solution, STW)	5.6	For Information Only	KTM005
Isopropyl Alcohol (NMT 500 ppm for EC)	313	Not more than 750	KTM520
Bacteria (Viable Mesophilic), cfu/g	< 100	Not more than 2000	KTM800
Yeast, cfu/g	< 50	Not more than 100	KTM803
Mold, cfu/g	< 50	Not more than 100	KTM803
Coliform	Negative	Negative by MPN	KTM801
The Company guarantees that, at the time of shipment, the lot of product meets specification # 101-X and conforms to the requirement of the current edition of the Food Chemical Codex (FCC) and defined in the current EC Directives. Where a guaranteed parameter has been tested on this lot, the result is shown below.			
E. coli	Absent	Absent in 25g	KTM802
Salmonella spp.	Absent	Absent in 25g	KTM804
Signature: 		Material was produced in:	
DANIEL BRONSON - QC LAB MANAGER		SAN DIEGO , CALIFORNIA UNITED STATES	

## Certificado de Análise da Pectina



CP Kelco Brazil S/A  
 Avenida Araras, 799  
 Vila Glória  
 Brazil  
 tel: + 55 19 3404 4600 fax: + 55 19 3451 1948

### Certificado de Análise

Destinatário:	Data:		
Destinatário (caso seja diferente da entrega)			
Tipo de Produto: Pectina GENU® 121 SLOW SET 25kg Saco Nro. Material: 112280 Lote: L74062 Nro. do material do cliente: Descrição do material do cliente:			
Característica	Resultado	Especificação	Método de Análise
Data de Manufatura	13 Nov, 2007		
Data de Validade	12 Nov, 2008		
HM-SAG, grau USA-SAG	150	145 - 155	0101001
Grau de Esterificação, %	67	Típico 58	0006010
pH em solução 1%	3.5	2.9 - 3.6	0006041
Umidade, %	5.3	Não mais que 12.0	0006042
<p>A informação deste certificado se aplica ao lote mencionado. Observe que dígitos adicionais após o número do lote podem estar incluídos na embalagem. Estes números são apenas para uso interno.          Cada lote está de acordo com a especificação do produto, método de análise e outras características conforme mencionado na Informação do Produto.          O produto é garantido por 36 meses de vida útil para pureza e especificação de identidade. O limite de garantia de performance do produto está indicado na data de validade mostrado na embalagem, Certificado de Análise e ou Informação do Produto.</p>			
Assinatura: ANTONIO R PAULA - QC MANAGER		Material foi produzido em: LIMEIRA , BRASIL	

## Certificado de Análise da Carragena



### CERTIFICATE OF ANALYSIS

Ship to:	Date: July 11, 2007		
Sold to:(If different from Ship to)			
<b>Product Name:</b> GENULACTA® carrageenan type LF-120 <b>Material Number:</b> 121437 <span style="float: right;"><b>Lot:</b> C72852</span> <b>Customer Material Number:</b> <b>Customer Material Description:</b>			
Characteristic	Test Result	Specification	Test Method
Date of manufacture	Jun 05, 2007		
Best Before	Jun 04, 2008		
Loss on drying, %	4.4	Not more than 12.0	0006048
Yeast and Mould, CFU/g	3	Not more than 200	0800002
Aerobic plate count, CFU/g	40	Not more than 5000	0800001
Chokolata milk viscosity, 100p	31	23 - 33	0303111
pH (1% solution)	10.1	8.0 - 11.0	0006049
<p>The information/data reported on this certificate applies to the lot/batch mentioned. Note that additional digits after the lot/batch number maybe included on the package. This number is for internal use only.  Each lot of product complies with product specification, test methods and other characteristics as mentioned in the Product Data Sheet.  Product guaranteed through 36 months "shelf-life" for purity and identity specifications.  Limited guaranty for product performance as stated by the "Best Before" date shown on the package, CoA, and/or Product Data Sheet.</p>			
<b>Signature:</b> ROSARIO DANGIN - QC MANAGER <i>R. Dangin</i>		<b>Material was produced in:</b> CEBU , PHILIPPINES	

## Certificado de Análise da Quitosana

## Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

**Product Name** Chitosan from crab shells,  
≥75% (deacetylated)

**Product Number** C3646

**Product Brand** SIGMA

**CAS Number** 9012-76-4

TEST	SPECIFICATION	LOT 075K0013 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO TAN POWDER AND FLAKES	LIGHT TAN
SOLUBILITY	HAZY FAINT YELLOW SOLUTION AT 50 MG PLUS 5 ML OF 1 M ACETIC ACID	CONFORMS
DEACETYLATION	MINIMUM 75%	98%
QC RELEASE DATE		AUGUST 2005



Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA

## Certificado de Análise do Alginato

## Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

**Product Name** Alginic acid sodium salt from brown algae,  
Low viscosity

**Product Number** A2158

**Product Brand** SIGMA

**CAS Number** 9005-38-3

TEST	SPECIFICATION	LOT 076K0143 RESULTS
APPEARANCE	OFF-WHITE TO LIGHT TAN POWDER	OFF-WHITE POWDER
SOLUBILITY	HAZY FAINT YELLOW SOLUTION AT 100 MG PLUS 10 ML OF WATER	CONFORMS
BROOKFIELD VISCOSITY	APPROX. 250 CPS (2% IN WATER AT 25 DEG CENTRIGRADE)	281 CPS (SUPPLIER TEST RESULT)
RECOMMENDED RETEST	2 YEARS	AUGUST 2010 EXTENDED FROM AUGUS' 2008
QC RELEASE DATE		AUGUST 2008



Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA