



ANA CLAUDIA RUEDA NERY BARBOZA

**LIBERAÇÃO SUSTENTADA DO ANTISSEPTICO CLOREXIDINA EM
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ALGINATO**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ANA CLAUDIA RUEDA NERY BARBOZA

**LIBERAÇÃO SUSTENTADA DO ANTISSÉPTICO CLOREXIDINA EM
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ALGINATO**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ANA
CLAUDIA RUEDA NERY BARBOZA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. FRANCISCO BENEDITO
TEIXEIRA PESSINE.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

B234L Barboza, Ana Claudia Rueda Nery, 1973-
Liberação sustentada do antisséptico clorexidina em micropartículas de quitosana e alginato / Ana Claudia Rueda Nery Barboza. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Liberação sustentada. 2. Clorexidina. 3. Quitosana. 4. Alginato. 5. Micropartículas. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Sustained release of the antiseptic chlorhexidine from microparticles composed of chitosan and alginate

Palavras-chave em inglês:

Sustained release

Chlorhexidine

Chitosan

Alginate

Biopolymer microparticles

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Francisco Benedito Teixeira Pessine [Orientador]

Roberta Tarkany Basting Höfling

Sergio Akinobu Yoshioka

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Pedro Luiz Onófrío Volpe

Data de defesa: 28-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Química

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

- ∞ aos cientistas do passado, que construíram as bases do conhecimento atual;
- ∞ aos cientistas do presente, responsáveis por solucionar os desafios tecnológicos, sociais e éticos de nosso tempo;
- ∞ aos cientistas do futuro, que formularão novas perguntas.

*"O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem o que são."
Aristóteles, -384 a -322*

AGRADECIMENTOS

- Empresa 3M, pelo apoio científico e financeiro a esta pesquisa através de um *Discover Grant*, e por permitir que eu dedicasse 15 % de meu tempo ao doutorado enquanto fiz parte de seu quadro de colaboradores.
- Cientista Matthew Scholz (3M USA), cujas ideias foram fonte de inspiração.
- Empresa Dow Chemical, minha empregadora atual, por permitir que eu continuasse dedicando parte de meu tempo de trabalho à conclusão do doutorado.
- Reconhecimento a essas duas empresas pelo incentivo à formação continuada de seu time técnico-científico, valorizando Ciência, Tecnologia e Inovação para o desenvolvimento social, organizacional e pessoal.
- Prof. Francisco Benedito Teixeira Pessine pela orientação da pesquisa e pela compreensão, paciência e apoio de minha situação de doutoranda em tempo parcial, sem nunca duvidar que eu seria capaz de concluir o processo de doutoramento dessa forma.
- Colegas do Laboratório: Milene Martins, Adriana Calderini, Débora Simoni, Victor Baldin, Guilherme Alexandrino, Simone Gomes, Marcelo Sousa, Andreza Almeida, Letícia Paifer, Luciana Guedes, Francieli Crivelaro, pela diversas discussões, as mais variadas ajudas e também pelos momentos de descontração e risadas, tão necessários...
- MSc. e doutoranda Francieli Crivelaro pelo desenho das estruturas químicas.
- MSc. e doutoranda Letícia Paifer pelo intercâmbio de ideias e artigos e pela ajuda nas etapas finais deste trabalho. Sua inteligência, bom humor e alegria de viver a Química nunca serão esquecidos!
- Dra. Milene Martins, por todo o apoio, amizade, orientação, ideias e discussões. Milene, sem você esse trabalho não teria tomado os rumos que tomou!
- Filósofa, graduanda em Farmácia e aluna de iniciação científica Viviane Beraldo pela dedicação, esforço e paciência. Vivi, não sei como teria sido sem sua colaboração!
- Dra. Seisse Gabriela Gandolfi Sanches, a Amida a quem eu sempre pude recorrer quando precisava ouvir que sim, no final tudo daria certo.
- Cientista, marido e companheiro de caminhada Marco Antonio Barboza pelo apoio, pelas idas ao laboratório retirar amostras nos horários mais difíceis, e pela visão crítica e questionadora.
- Filhas queridas Miriam e Alice Rueda Nery Barboza, por haverem cedido parte de nosso tempo em conjunto para que eu me ausentasse em corpo ou mente. E também pela companhia para ir aos laboratórios nos dias e horários mais exóticos...
- Todo o meu amor e gratidão à minha família, pelo apoio recebido para chegar à conclusão deste trabalho! Meus queridos tios, irmãos, cunhadas, sogros, avós, mãe e pai que sempre apoiaram meu amor pelos estudos, e aos sobrinhos Tainá, Cristina, Rafaela, João e Gabriel, raios de luz e de alegria ao longo da vida.
- Àqueles que se motivarem a verificar na prática o mérito e aplicabilidade desta contribuição.

- Caio Nakavaki pelo apoio com materiais e compras.
- Técnicos do IQ Ricardo Pereira, Fabiana Amorim, Márcia Antonelli, Cláudia Martelli, Daniel Razzo, Anderson Pedrosa e Gustavo Shimamoto, pela realização ou apoio com cromatografia líquida de alto desempenho, análises termogravimétricas, espectrofotometrias de infravermelho e ultravioleta, microscopias eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear.
- Funcionários da Coordenadoria de Pós-Graduação do IQ Izabel Calasso, Gabriela Lima e Miguel Morel pelos diversos apoios ao longo do processo.
- Prof. Maria Isabel Felisberti, coordenadora da CPG durante a maior parte de meu tempo de doutorado, pela orientação construtiva em momento de crise.
- Prof. Angélica Zaninelli Schreiber e Luzia Lyra, do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela avaliação de eficácia antimicrobiana dos sistemas desenvolvidos.
- Prof. Celso Aparecido Bertran e Dra. Maria de Fátima Brito Souza Sundin, do Instituto de Química da Unicamp, pela utilização do equipamento Malvern Mastersizer 2000 para medidas de distribuição de diâmetro de partículas.
- Prof. Maria Helena Andrade Santana e Gilson Martins, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela utilização do equipamento Horiba LA-900 para medidas de distribuição de diâmetro de partículas na primeira etapa da pesquisa.
- Prof. Carlos Ferreira Grosso, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela orientação inicial sobre preparação de micropartículas complexas de quitosana/alginato.
- Prof. Henrique Toma e MSc. Liz Zanchetta D'Agostino, da Faculdade de Engenharia de Minas da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura com dispositivo de emissão de campo.
- Prof. Telma Teixeira Franco e Dr. Fernando Frederico, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela realização das análises de Cromatografia de Permeação em Gel de quitosana e alginato.
- Prof. Pedro Corbi, pela disponibilidade e pela tentativa de dissolução das amostras de quitosana em água deuterada levemente acidificada por ácido clorídrico deuterado.
- Prof. Nelson Eduardo Durán Caballero, do Instituto de Química da Unicamp, pela utilização do equipamento Malvern ZetaSizer 3000HS para medidas de distribuição de diâmetro de partículas na fase inicial da pesquisa.

CURRICULUM VITAE – Ana Claudia Rueda Nery Barboza

Química, brasileira, casada.

Nascimento: 22/12/1973, em Campinas/SP

Registro no Conselho Regional de Química, 4ª Região: 04139046

Experiência Profissional

Dow Química América Latina

Gerente Sr. de Pesquisa e Desenvolvimento de Aditivos Químicos para o Mercado da Construção. Início em maio de 2011.

3M do Brasil Ltda.

- **Especialista em Processos de Propriedade Intelectual, Relacionamento com Universidades e Parcerias em P&D (Inovação Aberta).** Março de 2010 a maio de 2011.
- **Gerente de Pesquisa Corporativa.** Março a dezembro de 2010.
- **Gerente de Pesquisa, Desenvolvimento e Serviço Técnico de Produtos para a Saúde.** Abril de 2006 a fevereiro de 2010.
- **Gerente do Sistema de Gestão da Qualidade de Produtos para a Saúde.** Junho de 2006 a março de 2008.
- **Especialista Sr. de Desenvolvimento de Produtos para a Saúde.** Janeiro a março de 2006.
- **Six Sigma Black Belt**, especialista em introdução de novos produtos utilizando *Design for Six Sigma*. Novembro de 2003 a dezembro de 2005.
- **Química de Desenvolvimento de Produtos.** Fevereiro de 2000 a outubro de 2003
- **Trainee de Otimização de Processos.** Fevereiro de 1998 a janeiro de 2000

Unilever Brasil Ltda.

- **Analista de Desenvolvimento de Processos. Novembro de 1997 a janeiro de 1998.**

Escolas Follow Me e New Center Idiomas

- **Professora de Inglês. Janeiro de 1993 a junho de 1996.**

IBM Brasil – Indústria, Máquinas e Serviços Ltda.

- **Estagiária do Centro de Tecnologia. Janeiro a dezembro de 1992.**

Formação Acadêmica

Doutora em Ciências – Físico-Química. Universidade Estadual de Campinas, 2009 – 2013.

Tese: “Liberação sustentada do antisséptico clorexidina em micropartículas de quitosana e alginato”.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Mestre em Físico-Química. Universidade Estadual de Campinas, 1998 – 2002.

Dissertação: “Polipropileno carregado com microesferas ocas de vidro”, apresentada em 28 de novembro de 2002.

Orientador: Prof. Dr. Marco-Aurélio De Paoli.

Bacharel em Química. Universidade Estadual de Campinas, 1992 – 1997.

Técnica em Química. Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antonio Prado”, 1989 – 1992.

Produção Científica

Patentes Depositadas

- **Flexible Cleaning Article**

Agent: 3M Innovative Properties Company - St. Paul, MN, US

Inventors: Paula Olhe, Ana Claudia Rueda Nery Barboza, Luis E. A. Langbeck, Patrícia Guerreiro

Applicaton: WO 2007/117966; **Publication Date:** October 18, 2007

- **Scouring web and method of making. Applicaton** US20070079462; **Publication Date:** April 12, 2007

Agent: 3M Innovative Properties Company - St. Paul, MN, US

Inventors: Thomas E. Haskett, Ana Claudia Rueda Nery Barboza, Jeffrey M. Mailand

▪ **Photoluminescent non-slip tape. Applicaton** WO 03/054099; **Publication Date:** July 3, 2003
Agent: 3M Innovative Properties Company - St. Paul, MN, US

Inventors: Ana Claudia Rueda Nery Barboza, Simone R. Ribeiro, José A. Pattaro, Carlos Borromeu de Souza, Marcos R. Nery, Rinaldo Zamara, Luis E. A. Langbeck

Publicações

- De Paoli, M.-A.; Barboza, A.C.R.N.; “Polipropileno carregado com microesferas ocas de vidro (Glass Bubbles™): obtenção de espuma sintática”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Carlos, v. 12, n. 2, p. 130-137, 2002.
- Barboza, A.C.R.N.; Cruz, C.V.M.S.; Graziani, M.B.; Lorenzetti, M.C.F.; Sabadini, E.; “Aquecimento em forno de microondas / Desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais”; *Química Nova*, v. 24, n. 6, p. 901-904, 2001.

Trabalhos apresentados em congressos

- Oliveira, M.F.F.; Fraga, J.B.; Barboza, A.C.R.N. Avaliação de desempenho de Emulsões Acrílicas para Membranas Impermeabilizantes Cimentícias. 13º Simpósio Brasileiro de Impermeabilização, 2013, São Paulo, SP, Brasil.
- Freire, A.P.A.F.; Barboza, A.C.R.N.; Breckwoldt, J.; Scharlemann, S.; Soares, H.; Martins, W.C.. utilização de éteres de celulose em formulações brasileiras de argamassa de revestimento – avaliação do efeito em propriedades físico-químicas da argamassa e em suas características em aplicação. X Simpósio Brasileiro de Tecnologia das Argamassas, 2013, Fortaleza, CE, Brasil.
- Barboza, A.C.R.N.; Pessine, F.B.T. Biopolymer microparticles of chitosan and alginate for sustained release of the antiseptic chlorhexidine. South American Symposium on Microencapsulation, 2012, Limeira, SP, Brasil.
- Abreu, C. F.; Tassinari, A. R.; Barboza, A. C. R. N.; Ruppert, H. C.; Benesh, D. L.; Neto, R.C.; Silva, N.; Nour, E. A.; Pereira, J. L. Comparison of Dehydratable Film and Various Conventional Methods for Evaluation of Drinking Water. International Association for Food Protection Annual Meeting, 2010, Anaheim, CA, USA.
- Barboza, A. C. R. N.; Pessine, F. B. T. Micropartículas de quitosana reticuladas com trifosfato de sódio: distribuição de tamanhos. In: 33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindoia, SP, Brasil.
- De Paoli, M.-A.; Barboza, A. C. R. N. Thermal properties of propylene composites with hollow glass microspheres: a photothermal study. In: 14th Conference of Thermal Engineering and Thermogrammetry, 2005, Budapest, Hungria.
- De Paoli, M.-A.; Barboza, A. C. R. N.. Polypropylene/hollow glass microspheres composites with improved interfacial interactions. In: 2nd International Conference on Polymer Modification, Degradation and Stabilization, 2002, Budapest, Hungria. **Premiado entre os cinco melhores da conferência.**
- De Paoli, M.-A.; Barboza, A. C. R. N.. Polypropylene/hollow glass microspheres composites prepared in a single screw extruder. In: 18th Annual Meeting of Polymer Processing Society, 2002, Guimarães, Portugal.
- De Paoli, M.-A.; Barboza, A. C. R. N.. Polipropileno carregado com microesferas ocas de vidro (Glass Bubbles™) obtenção de espuma sintática. In: IX International Macromolecular Colloquium/6o. Congresso Brasileiro de Polímeros, 2001, Gramado, RS, Brasil.
- Oliveira, J.E.; Nery, A.C.R.; Barboza, M.A.; Guimarães, P.F.V.; “Síntese e Degradação de Ozônio”. In: 33ª Reunião Anual para o Progresso da Ciência, Concurso Cientistas do Amanhã, 1990, Porto Alegre, RS, Brasil.

Iniciação científica

“Avaliação da capacidade cicatrizante da aplicação tópica de extrato etanólico de própolis (EEP) em ferimentos epidermais”. Instituição financiadora: FAPESP – Processo 94/6286/0

Orientadoras: Profa. Dra. Alba R. M. S. Brito, Instituto de Biologia da Unicamp, e Dra. Maria C. M. Ribeiro, Instituto de Química da Unicamp. Dezembro de 1994 a julho de 1997

Línguas

Inglês fluente, Espanhol avançado, Alemão básico

RESUMO

O objetivo foi deste trabalho foi obter, caracterizar e avaliar suspensões aquosas de micropartículas poliméricas bioadesivas para liberação sustentada do antisséptico digluconato de clorexidina (CHG), trabalhando somente em meio aquoso e com substâncias reconhecidamente biocompatíveis e de baixa toxicidade, para potencial aplicação na cavidade bucal.

As micropartículas foram obtidas por complexação dos polieletrólitos quitosana e alginato de sódio, com auxílio de íons cálcio, e da clorexidina. O método de obtenção desenvolvido permitiu obter suspensões com distribuição de diâmetros de partículas adequada e boa estabilidade.

Através de delineamento experimental fatorial, avaliou-se o efeito dos principais componentes da suspensão sobre o diâmetro médio das micropartículas e sobre a incorporação de CHG.

A liberação de CHG em meio simulador da cavidade oral (saliva artificial) ocorreu de forma gradual e sustentada por até sete dias, indicando existência de interação entre o ativo, de natureza catiônica, e as terminações aniônicas do biopolímero alginato. A cinética de liberação de sistemas onde tais interações ocorrem é complexa e sua compreensão envolve diversos fenômenos físico-químicos, que se procurou identificar e discutir.

Realizou-se, de forma simplificada, a modelagem da cinética de liberação através do modelo matemático semiempírico de Peppas-Korsmeyer, o que também indicou a combinação de diferentes fenômenos influenciadores da liberação.

Testes preliminares de eficácia antimicrobiana indicaram que a clorexidina do sistema de liberação sustentada manteve sua eficácia sobre os microrganismos padrão avaliados em comparação com a clorexidina livre.

ABSTRACT

The objective of this project was to obtain, characterize and evaluate aqueous suspensions of bioadhesive polymeric microparticles for sustained release of the antiseptic chlorhexidine digluconate (CHG), working in aqueous media and with substances recognized as biocompatible and of low toxicity, for potential application to the oral cavity.

Microparticles were obtained by complexation of the polyelectrolytes chitosan and sodium alginate, with pre-gelation by calcium ions, and CHG. The method of obtention developed resulted in suspensions with adequate particle size distribution and good stability.

Through factorial experimental design, the effect of main suspension components on the median particle diameter and CHG incorporation was evaluated.

Chlorhexidine release in oral cavity simulating media (artificial saliva) occurred gradually and sustained for up to seven days, indicating the presence of interactions between the cationic active substance, and the anionic moieties of the alginate biopolymer. The release kinetics where those interactions occur is somewhat complex and its understanding involves various physicochemical phenomena that we tried to identify and discuss.

Simplified modeling of the release kinetics through the Peppas-Korsmeyer semi-empirical mathematical model was done, also indicating the combination of various release-influencing phenomena.

Preliminary microbiological tests indicated that sustained-release CHG kept its efficacy against standard microorganisms evaluated in comparison to free CHG.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	xxv
Lista de tabelas.....	xxvii
Lista de figuras.....	xxix
Motivação do estudo e objetivos.....	1
1.1. Motivação.....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo geral.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
2. Introdução.....	5
2.1. Periodontologia.....	7
2.1.1. A crescente importância da saúde bucal na saúde global do indivíduo.....	7
2.1.2. Doenças periondontais.....	7
2.1.3. Tratamento de periodontites.....	9
2.2. Pneumonia associada a ventilação mecânica.....	12
2.3. Quitosana.....	14
2.4. Alginato.....	16
2.5. Clorexidina.....	19
2.6. Liberação sustentada de substâncias ativas.....	22
2.6.1. Físico-química da liberação sustentada.....	25
2.6.1.1. Aspectos cinéticos.....	25
2.6.1.2. Aspectos termodinâmicos.....	33
2.7. Biopolímeros como carreadores de fármacos e outras substâncias ativas.....	37
2.7.1. Nano e micropartículas de quitosana.....	39
2.7.2. Nano e micropartículas de alginato.....	40
2.8. Complexos polieletrólitos.....	41

2.8.1. Complexos polieletrólitos de quitosana e alginato.....	42
2.9. Sistemas bioadesivos.....	44
2.9.1. Mucosa oral.....	44
2.9.2. O fenômeno de bioadesão/mucoadesão.....	45
2.9.3. Teorias que fundamentam a bioadesão.....	46
2.9.4. Sistemas bioadesivos para liberação sustentada tópica na cavidade oral.....	51
2.9.4.1. Sistemas bioadesivos para liberação sustentada de clorexidina.....	54
2.9.5. Técnicas instrumentais utilizadas em pesquisa e desenvolvimento sistemas bioadesivos de liberação sustentada.....	56
3. Experimental.....	63
3.1. Materiais.....	65
3.1.1. Reagentes.....	65
3.1.2. Preparo de soluções.....	65
3.1.2.1. Quitosana (QTS).....	65
3.1.2.2. Alginato (ALG).....	65
3.1.2.3. Digluconato de clorexidina (CHG).....	65
3.1.2.4. Cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	65
3.1.2.5. Fase móvel para Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de quitosana.....	65
3.1.2.6. Fase móvel para Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de alginato.....	66
3.1.2.7. Fase móvel e diluente para Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).....	66
3.1.2.8. Saliva artificial (s.a.).....	66
3.1.3. Membrana de diálise.....	66
3.2. Caracterização das substâncias utilizadas.....	66
3.2.1. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR).....	66
3.2.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	67
3.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA).....	67

3.2.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	67
3.2.4.1. Quitosana.....	67
3.2.4.2. Alginato.....	67
3.2.5. Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN ¹³ C).....	68
3.2.5.1. Quitosana.....	68
3.2.5.2. Alginato.....	68
3.3. Metodologia de quantificação de clorexidina.....	68
3.4. Preparação de suspensão de micropartículas (MPs) de quitosana (QTS) e alginato (ALG) contendo clorexidina (CHG).....	69
3.4.1. Avaliação de métodos de obtenção e agitação.....	69
3.4.2. Influência dos componentes da suspensão.....	70
3.5. Caracterização das suspensões de micropartículas.....	72
3.5.1. Distribuição de diâmetros.....	72
3.5.2. Estabilidade.....	72
3.5.3. Carregamento de ativo e eficiência de incorporação.....	72
3.5.4. Perfis de liberação.....	73
3.5.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	74
3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura com dispositivo de emissão de campo (MEV-FEG).....	74
3.6. Avaliação da eficácia antimicrobiana.....	74
3.6.1. Preparo da solução estoque.....	75
3.6.2. Preparo da placa para diluição.....	75
3.6.3. Meio de cultura.....	75
3.6.4. Cepas padrão.....	75
3.6.5. Preparo do inóculo.....	75
3.6.6. Execução do teste.....	75
3.6.7. Leitura dos testes de Concentração Inibitória Mínima.....	76
3.6.8. Testes de Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	77
4. Resultados e discussão.....	79
4.1. Caracterização das substâncias utilizadas.....	81
4.1.1. Espectros de absorção no infravermelho.....	81

4.1.1.1. Quitosana.....	81
4.1.1.2. Alginato.....	83
4.1.1.3. Clorexidina.....	83
4.1.2. Espectro de absorção de clorexidina na região do UV-vis.....	84
4.1.3. Curvas termogravimétricas.....	85
4.1.3.1. Quitosana.....	85
4.1.3.2. Alginato.....	86
4.1.4. Curvas calorimétricas.....	87
4.1.4.1. Quitosana.....	87
4.1.4.2. Alginato.....	87
4.1.5. Massa molar.....	88
4.1.5.1. Parâmetros de massa molar de quitosana.....	88
4.1.5.2. Parâmetros de massa molar de alginato.....	89
4.1.6. Grau de desacetilação de quitosana.....	90
4.1.7. Composição monomérica do alginato (razão M/G).....	94
4.2. Quantificação de clorexidina (CHG).....	97
4.3. Obtenção de micropartículas do complexo polieletrólito (PEC) de quitosana e alginato com CHG incorporada.....	99
4.3.1. Escolha do método de preparação.....	103
4.3.1.1. Distribuição de diâmetros de partículas (PSD).....	103
4.3.2. Estabilidade das suspensões.....	106
4.3.3. Análise Morfológica.....	107
4.3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	107
4.3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG).....	108
4.3.4. Influência dos componentes da suspensão.....	110
4.3.4.1. Distribuição de diâmetros de partículas.....	114
4.3.4.2. Carregamento de ativo e eficiência de incorporação.....	115
4.3.5. Perfis de liberação.....	117
4.3.6. Aspectos físico-químicos da liberação de CHG.....	120

4.3.7. Avaliação da eficácia antimicrobiana.....	129
4.3.7.1. Concentração Inibitória Mínima.....	129
4.3.7.2. Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	132
5. Conclusões.....	135
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	139
7. Referências bibliográficas.....	143
8. Anexos.....	159
8.1. Resultados de Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) de Quitosana (QTS).....	161
8.2. Resultados de Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) de Alginato de Sódio (ALG).....	167
8.3. Espectros de RMN ¹³ C de quitosana (QTS) com indicação dos deslocamentos químicos.....	169
8.4. Espectros de RMN ¹³ C de alginato (ALG) com indicação dos deslocamentos químicos.....	170
8.5 Curvas de ajuste ao modelo de Peppas-Korsmeyer linearizado de 60% da massa total de CHG liberada.....	174
8.6. Imagens de placas de cultura indicando o crescimento das cepas padrão utilizadas.....	177

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM.....	Microscopia de Força Anatômica
ALG.....	Alginato
AAP.....	Academia Americana de Periodontologia
BDDS.....	Sistemas Bioadesivos de Liberação Sustentada
BSA.....	Albumina do Soro Bovino
CAP.....	Ftalato de Acetato de Celulose
CFM.....	Concentração Fungicida Mínima
CFU.....	Unidades Formadoras de Colônias
CHD.....	Diacetato de Clorexidina
CHG.....	Diclugonato de Clorexidina
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
CMC.....	Carboximetilcelulose Sódica
CN.....	Controle Negativo
CP.....	Controle Positivo
CPC.....	Cloreto de Cetilpiridínio
CP/MAS.....	Polarização Cruzada com Rotação em Torno do Ângulo Mágico
CT.....	Cloridrato de Tetraciclina
D.....	Diâmetro Mediano
DDS.....	Dispositivo de Liberação de Fármaco
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
DSC.....	Calorimetria Diferencial de Varredura
EC.....	Etilcelulose
EDS.....	Espectroscopia de Raio-X com Dispersão de Energia
EE.....	Eudragit E PO
EI %.....	Eficiência de Incorporação
EL.....	Eudragit L100-55
EP.....	Extrato de Própolis
FTIR.....	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho
G.....	Guluronato
GA.....	Grau de Acetilação
GD.....	Grau de Desacetilação
GPC.....	Cromatografia de Permeação em Gel
HA.....	Hialunorato de Sódio
HEP.....	Heparina
HPCL.....	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HPMC.....	Hidroxipropilmetilcelulose
ICP.....	Plasma Indutivamente Acoplado
ITC.....	Calorimetria de Titulação Isotérmica de Alta Sensibilidade
M.....	Manuronato
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV-FEG.....	Microscopia Eletrônica de Varredura com Dispositivo de Emissão de Campo
MOPS.....	Ácido Morfilenopropanosulfônico
MP.....	Micropartículas
MTDSC.....	Calorimetria Diferencial de Varredura com Temperatura Moderada
Oct.....	Dicloridrato de Octenidina
Ola.....	Difloreto de Diamina
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
PAA.....	Ácido Poliacrílico
PC%.....	Percentual de Carregamento
PDI.....	Índice de Polidispersividade
PEC.....	Complexos Polieletrólitos
PEL.....	Polieletrólitos
PLA.....	Poli(L,D-lactato)
PLGA.....	Polímero Biodegradável poli(D,L-lactato-co-glicolato)
PVA.....	Álcool Polivinílico
QTS.....	Quitossana
RMN ¹³ C.....	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
SA.....	Saliva Artificial
SEC.....	Cromatografia por Exclusão de Tamanhos
SRP.....	<i>Scaling and Root Planning</i>
TGA.....	Análise Termogravimétrica
TPP.....	Trifosfato de Sódio
UTI.....	Unidade de Terapia Intensiva
VAP.....	<i>Ventilator-Associator Pneumonia</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies microbianas associadas a várias formas clínicas de periodontites.....	8
Tabela 2: Delineamento experimental fatorial 22 para obter suspensões demicropartículas de quitosana/alginato, variando métodos de obtenção e agitação.....	70
Tabela 3: Descrição dos experimentos variando métodos de obtenção e agitação para obter suspensões aquosas de micropartículas de quitosana e alginato.....	70
Tabela 4: Delineamento experimental fatorial 23, com ponto central, para obter suspensões de MPs, variando a massa de CHG adicionada, a razão entre as massas de QTS e de ALG e razão entre as massas de CaCl ₂ e ALG.....	71
Tabela 5: Experimentos realizados a partir do delineamento experimental descrito na Tabela 4.....	71
Tabela 6: Bandas de referência para quitosana.....	82
Tabela 7: Bandas de referência para alginato de sódio.....	83
Tabela 8: Bandas de referência para digluconato de clorexidina.....	84
Tabela 9: Parâmetros médios de massa molar das amostras de QTS obtidas por análise de GPC.....	89
Tabela 10: Parâmetros médios de massa molar das amostras de ALG obtidas por análise de GPC.....	90
Tabela 11: Deslocamentos químicos (em ppm) dos átomos de ¹³ C das quitosanas analisadas, de acordo com a numeração representada na Figura 22.....	92
Tabela 12: Grau de desacetilação (GD) de QTS calculado de acordo com Heux <i>et al.</i> (2000) e GD informado pelo fabricante (Cognis).....	94
Tabela 13: Deslocamentos químicos e intensidades relativas de sinais dos átomos de ¹³ C do alginato, de acordo com a numeração representada na Figura 24 e com a notação indicada na Figura 23.....	96

Tabela 14: Mediana da distribuição de diâmetros das MP complexas QTS/ALG.....	104
Tabela 15: Eficiência de Incorporação (EI%), Carregamento (PC%) e Diâmetro mediano (D) das MP obtidas com o delineamento experimental fatorial 2 ³ , ponto central em duplicata.....	111
Tabela 16: Estimativa de efeito dos fatores sobre os resultados, ajuste de modelo linear. <i>R</i> ² indica o ajuste dos dados ao modelo.....	113
Tabela 17: Expoentes difusionais <i>n</i> e mecanismos de liberação de sistemas de liberação sustentada com diferentes geometrias.....	126
Tabela 18. Dados de ajuste dos perfis de liberação obtidos ao modelo de Peppas-Korsmeyer linearizado.....	126
Tabela 19: Resultados de concentração inibitória mínima de crescimento das cepas padrão avaliadas, para determinação da sensibilidade frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina.....	132
Tabela 20: Resultados de CFM das cepas padrão avaliadas frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de algumas utilizadas em Periodontologia; nome comum e número CAS.....	12
Figura 2: Estrutura química de quitina e quitosana, copolímeros de N-acetil e amino açúcares.....	14
Figura 3: Representação de cadeia do polissacarídeo alginato com os monômeros manuronato (M) e guluronato (G) em bloco.....	17
Figura 4: Representação do modelo da “caixa de ovos”, responsável pela formação de géis termoreversíveis através da interação entre alginato e cálcio.....	18
Figura 5: Fórmula estrutural de digluconato de clorexidina.....	20
Figura 6: Representação do mecanismo de ação antimicrobiana da clorexidina.....	22
Figura 7: Sistema de classificação de sistemas governados primariamente por difusão. As estrelas representam moléculas individuais da substância ativa e os círculos pretos, seus agregados amorfos ou cristalitos.....	27
Figura 8: Representação esquemática de um DDS intumescendo, contendo atividissolvido e disperso.....	31
Figura 9: Representação esquemática de cadeia de glicoproteína, principal componente das mucinas.....	44
Figura 10: Representação esquemática da interpenetração entre cadeias do bioadesivo e da camada de muco.....	51
Figura 11: Esquema de preparo da placa de microtitulação para teste de eficácia antimicrobiana.....	76
Figura 12: Representação da leitura de CIM para antifúngicos que produzem 100% de inibição de crescimento – aparência semelhante à do controle negativo (CN) em relação à do controle positivo (CP).....	76
Figura 12a: Representação da leitura de CFM para antifúngicos que produzem 100% de inibição de crescimento.....	77

Figura 13: Espectro, na região do infravermelho, de quitosana QTS “S”.....	81
Figura 14: Espectro, na região do infravermelho, de alginato.....	83
Figura 15: Espectro, na região do infravermelho, de digluconato de clorexidina.....	84
Figura 16: Espectro de absorção de digluconato de clorexidina na região do UV-Vis.....	85
Figura 17: Curva da análise termogravimétrica de quitosana “S”.....	86
Figura 18: Curva da análise termogravimétrica (TGA) de alginato.....	86
Figura 19: Curva calorimétrica de quitosana “S”, obtida por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	88
Figura 20: Curva calorimétrica de alginato, obtida por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	88
Figura 21: Espectros de RMN13C obtidos para quitosanas, e valores de integração de áreas dos picos. a) QTS “S”; b) QTS “M”; c) QTS “L”.....	91
Figura 22: Identificação dos átomos de carbono conforme sua posição relativa no anel glucopiranosídeo dos monômeros que compõem as cadeias de quitosana.....	92
Figura 23: Espectro de RMN13C do alginato. Os espectros com indicações dos deslocamentos químicos estão no Anexo 8.4.....	95
Figura 24: Identificação dos átomos de carbono conforme sua posição relativa nos anéis dos monômeros uronato que compõem as cadeias de alginato. a) β -D-manuronato, M1-M6 b) α -L-guluronato, G1-G6.....	95
Figura 25: Cromatograma de HPLC de clorexidina, injeção de 50 μ L de solução a 50 ppm (2,5 μ g).....	98
Figura 26: Curva analítica de CHG em HPLC em função das áreas de sinal do pico de saída acompanhado em 254 nm.....	99
Figura 27: Esquema ilustrativo da formação de complexos polieletrólitos (PEC).....	100
Figura 28: Modelos estruturais de complexos polieletrólitos: “escada” e “ovos mexidos”.....	102

Figura 29: Imagens de suspensão de micropartículas tipicamente obtida neste trabalho.....	102
Figura 30: Distribuição volumétrica de diâmetros das MP QTS/ALG. 2A representa a curva média de cinco repetições dessa combinação de métodos de obtenção e agitação (N = 5).....	104
Figura 31: Distribuições de diâmetros das MP em termos de frequência numérica e volumétrica.....	105
Figura 32: Distribuições volumétricas das MP obtidas pela combinação do método de obtenção 2 e de agitação A ao longo do tempo.....	106
Figura 33: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra A220313, diluída 1:50 e depositada a) sobre <i>stub</i> metálico; b) sobre vidro....	108
Figura 34: Imagens de MEV ambiental de MP complexas de QTS/ALG, com adição de CHG. Amostra A160312 a) diluição 1:10; b) diluição 1:2.....	109
Figura 35: Distribuições de diâmetros de MP obtidas com o delineamento experimental para determinar a influência dos componentes e de razões entre eles, sobre o diâmetro mediano.....	115
Figura 36: Perfis de liberação de CHG a 35oC de MP obtidas nos Experimentos 0, 1, 3, 4 e 5, em saliva artificial.....	118
Figura 37: Difusão de CHG livre em saliva artificial a 35°C.....	120
Figura 38: Representação esquemática do sistema modelado matematicamente utilizando a teoria do equilíbrio de Donnan.....	122
Figura 39: Sistema de leitura da placa de microtitulação com auxílio de espelho.....	130
Figura 40: Crescimento fúngico dentro dos pocinhos da placa de leitura.....	131
Figura 41: Placas de experimento de CFM realizadas para os três microrganismos avaliados.....	134

1. MOTIVAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS

1.1. Motivação

O projeto escolhido para o desenvolvimento desta Tese baseia-se no conhecimento de situações clínicas nos campos da Odontologia, mais especificamente da Periodontologia, e da Medicina, no cuidado de pacientes críticos, que dependem de ventilação mecânica, em unidades de terapia intensiva (UTIs) (WIENER-KRONISH, 2008; GASTMEIER *et al.*, 2004).

Essas situações e publicações associadas evidenciaram a importância de desenvolver, ou aprimorar, sistemas bioadesivos de liberação sustentada, para uso tópico bucal, de substâncias antissépticas de reconhecida eficácia (TAMILVANAN *et al.*, 2008). Poderia ser garantida, assim, igual ou maior eficácia antimicrobiana que pela aplicação de antissépticos em formulações convencionais (na ausência de sistema de liberação sustentada).

O conhecimento obtido neste estudo pode levar a novos métodos de prevenção ou tratamento de enfermidades causadas por colonização da boca e vias respiratórias por bactérias, fungos ou outros microrganismos, como doenças periodontais, estomatites e infecções nosocomiais (hospitalares) como a pneumonia associada ao uso de sistemas de ventilação mecânica em pacientes.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Obter, caracterizar e avaliar suspensões aquosas de micropartículas poliméricas bioadesivas para liberação sustentada de digluconato de clorexidina (CHG) com substâncias reconhecidamente biocompatíveis e de baixa toxicidade, para potencial aplicação na cavidade bucal.

1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as formulações obtidas em relação à morfologia, distribuição de diâmetros, estabilidade.
- Avaliar a eficiência de carregamento de CHG nas micropartículas.
- Acompanhar a cinética de liberação do ativo das formulações obtidas e correlacioná-la aos modelos de liberação propostos na literatura.
- Avaliar a eficácia antimicrobiana utilizando testes *in vitro*.
- Discutir os fundamentos físico-químicos envolvidos.

Cabe ressaltar o caráter original desta pesquisa: desde a concepção do projeto há alguns anos, até as pesquisas bibliográficas recentes, não se identificou na literatura a existência de sistema aquoso de liberação sustentada de clorexidina com a característica de ser obtido somente com substâncias reconhecidamente biocompatíveis e de baixa toxidez.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Periodontologia

2.1.1. A crescente importância da saúde bucal na saúde global do indivíduo

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), “Saúde Bucal é o estado de ausência de dores crônicas bucais e faciais, câncer oral e de garganta, feridas bucais, defeitos congênitos tais como fendas de lábio e palato, doenças periodontais ou gengivais, deterioração e perdas dentais, e outras doenças e desordens que afetem a cavidade oral.” (WHO, 2010).

Doenças orais compartilham fatores de risco com as principais classes de doenças crônicas: doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias, *stress* e diabetes. Tais fatores incluem dieta inadequada, uso de tabaco, uso excessivo de álcool. Além deles, a higiene oral de baixa qualidade também é um forte fator de risco das doenças bucais (WHO, 2010; PETERSEN, OGAWA, 2005). Por esse motivo, as ações da OMS para promoção da saúde bucal são executadas de maneira integrada com ações de prevenção de doenças crônicas e promoção à saúde (OMS; SHEIHAM, 2005; PETERSEN, 2003).

2.1.2. Doenças periodontais

De acordo com a OMS, as doenças orais mais comuns são as periodontais e cárie. Estima-se que de 60 a 90% das crianças em idade escolar no planeta tenham cárie e que de 5 a 20% (com variações geográficas importantes) dos adultos a partir da meia-idade apresentem doenças periodontais severas, que podem levar a perdas de dentes e outras complicações (OMS).

Doenças periodontais são infecções determinadas pela colonização de grupos de microrganismos específicos da microbiota subgengival que, associados a fatores predisponentes, podem assumir diferentes padrões de evolução e de manifestações clínicas em seus diferentes estágios; seu principal e mais brando sintoma é o sangramento; em situações limite, levam à formação de bolsas de

infecção subgengivais (abscessos) e à destruição dos tecidos de suporte dos dentes, causando sua perda (APPEL, REUS; 2005).

Há duas formas básicas de doenças periodontais: as gengivites, caracterizadas por manifestações inflamatórias na gengiva marginal, desencadeadas pelo acúmulo de biofilme supragengival, e as periodontites, que se caracterizam por inflamações dos tecidos de sustentação dos dentes e perda de inserção do tecido conjuntivo, provocadas pelo biofilme subgengival (APPEL, REUS, 2005).

De acordo com a Academia Americana de Periodontologia (AAP), as periodontites associadas a biofilme são classificadas, de acordo com sua condição, em: periodontites crônicas, periodontite aguda (agressiva), periodontite associada à doença sistêmica e periodontite necrosante (AAP, *apud* SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000).

A microbiota associada às periodontites é complexa e variada, composta principalmente de bactérias Gram negativas anaeróbicas. Estudos demonstraram que as várias formas clínicas de periodontites estão associadas a diferentes microbiotas, conforme exemplificado na Tabela 1 (SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000).

Tabela 1: Espécies microbianas associadas a várias formas clínicas de periodontites (SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000, pp. 84)

<i>Espécie</i>	<i>Periodontite juvenil</i>	<i>Periodontite precoce</i>	<i>Periodontite adulta</i>	<i>Periodontite refratária (resistente)</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+++	++	++	+ a +++
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	±	+++	+++	++
<i>Prevotella intermedia</i>	++	+++	+++	+++
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	++	+++	++
<i>Eikenella corrodens</i>			+++	
<i>Bacteroides forsythus</i>	±	++	+++	++

±, isolada ocasionalmente; +, positivo em < 10% dos pacientes; ++, positivo em < 50% dos pacientes; +++, positivo em > 50% dos pacientes.

2.1.3. Tratamento das periodontites

Prega o provérbio popular que “prevenir é melhor que remediar” (MAGLIOLI). Nesse sentido, programas governamentais, de organizações não governamentais e privados de incentivo a boas práticas de cuidados e manutenção da saúde, e de prevenção de doenças específicas, em todas as áreas, são necessários, pois trazem claros benefícios sociais e econômicos (PETERSEN, OGAWA; 2005).

Tradicionalmente, o tratamento da periodontite consiste em eliminar mecanicamente, através de raspagem e alisamento radicular (SRP, *Scaling and Root Planing*), a maior parcela possível de bactérias patogênicas, juntamente com a estrutura de biofilme, ou cálculo subgengival. No entanto, a eficácia desse procedimento é variável, em função da habilidade do profissional e da existência de regiões de difícil acesso nas bolsas periodontais, devido a sua profundidade ou geometria tortuosa. Tais dificuldades conduziram à prática de associar agentes antimicrobianos ao tratamento mecânico; mais comumente, antibióticos de uso tópico e sistêmico têm sido aplicados, ou ainda substâncias antissépticas (APPEL, REUS, 2005; SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000; HAFFAJEE *et al.*, 2007; VAN WINKELHOFF, WINKEL, 2009; BONITO *et al.*, 2005).

O uso de antibióticos sistêmicos traz consigo desvantagens, como a dificuldade em se chegar a, e manter, a concentração local adequada pelo tempo necessário, levando à prescrição de doses altas, as quais geram efeitos colaterais como hipersensibilidade e intolerância gastrointestinal e o desenvolvimento de resistência bacteriana. O uso de antibióticos de uso tópico ameniza ou resolve alguns desses problemas (SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000).

Os principais antibióticos usados no tratamento de doenças periodontais, sistemicamente ou em regime de liberação sustentada, são tetraciclina, doxiciclina e minociclina, metronidazol (e também sua combinação com amoxicilina), clindamicina, ofloxacina (SCHWACH-ABDELLAOUI *et al.*, 2000; HAFFAJEE *et al.*, 2007; VAN WINKELHOFF *et al.*, 1996; HERRERA *et al.*, 2002; BONITO *et al.*, 2005). Além desses, foram avaliados em menor número de estudos augmentina,

azitromicina, clindamicina e outros de menor relevância, dos quais a azitromicina apresentou resultados mais promissores (HAFFAJEE *et al.*, 2007).

O uso de antibióticos sistêmicos associados à SRP tem seus defensores e críticos, é prática corrente na periodontologia e necessita de pesquisas adicionais que indiquem com maior precisão em quais situações deve ou não ser aplicado, principalmente em relação às condições clínicas gerais do paciente, tipo de doença periodontal (crônica, agressiva, etc.) e tipos de microrganismos presentes na infecção, além de melhor elucidação de qual antibiótico apresenta maior potencial de sucesso em cada uma dessas situações (HAFFAJEE *et al.*, 2007; VAN WINKELHOFF, WINKEL, 2009; HAFFAJEE *et al.*, 2003; VAN WINKELHOFF *et al.*, 1996; HERRERA *et al.*, 2002; BONITO *et al.*, 2005).

No que concerne ao uso de substâncias antissépticas de uso tópico é grande sua variedade na pesquisa e na clínica; notavelmente, predomina a aplicação e o estudo dos sais de clorexidina, principalmente digluconato (CHG) e diacetato (CHD) e dos compostos quaternários de amônio, como cloreto de cetilpiridínio (CPC), cloreto de benzalcônio e brometo de hexadeciltrimetilamônio. Ambas as classes de substâncias vêm sendo estudadas desde a década de 1950 e existe literatura volumosa a respeito (BONESVOLL, GJERMO, 1978; HUGO, LONGWORTH, 1964; BONESVOLL *et al.*, 1974; ELEY, 1999). Todavia, tal assunto parece não se esgotar e publicações mais recentes dão mostra da pesquisa que ainda ocorre nesse campo.

Cosyn *et al.* (2006) analisaram os benefícios clínicos, ao longo de nove meses, da combinação de procedimento SRP e aplicação subgengival de verniz contendo clorexidina em voluntários com periodontite crônica (grupo teste), em comparação com pacientes nos quais se aplicou apenas SRP (grupo controle). Seus resultados mostraram que em todos os pontos de controle – após 1, 3, 6 e 9 meses – ambos os procedimentos mostraram reduções significativas ($P < 0,001$) na profundidade das bolsas periodontais em comparação com os dados basais desses mesmos pacientes, tomados antes do início do tratamento. Ao final do acompanhamento, após 9 meses, houve redução total de 1,19mm para o grupo controle e de 1,81mm

para o grupo teste; a terapia combinada apresentou também maior redução da profundidade das bolsas no caso específico de dentes multiradiculares com bolsas inicialmente consideradas profundas (1,06 mm, $P = 0,009$). O percentual de bolsas periodontais com redução maior ou igual a 2 mm ao final de nove meses foi 32% para o grupo controle e 51% para o grupo teste ($P < 0,001$). Houve também ganhos significativos de adesão dental em ambos os casos ($P < 0,001$) em relação ao início do tratamento, com ganhos adicionais nos casos de bolsas inicialmente médias (0,29 mm, $P = 0,038$) e profundas (0,54 mm, $P = 0,048$). Verificou-se também tendência na redução da necessidade de tratamento cirúrgico após a terapia combinada ($P = 0,076$). Os dados indicam o benefício clínico da terapia combinada sobre o procedimento SRP realizado isoladamente.

Decker *et al.* (2003) investigaram o efeito de três substâncias antissépticas e de uma com propriedade antiadesiva, sobre células planctônicas e também sobre sua agregação e aderência sobre lâminas de vidro recobertas com esmalte, de *Streptococcus sanguinis*: digluconato de clorhexidina a 0,1% (CHG), difluoreto de diamina a 0,13% (Ola), dicloridrato de octenidina a 0,1% (Oct) e quitosana a 0,5 mg.mL⁻¹ (QTS). Verificou-se que a atividade bactericida e de antiadesividade seguiram ambas a ordem: Oct > Ola > CHG > QTS > NaCl (controle). Os autores indicam que seus resultados foram coerentes aos obtidos em estudos anteriores.

McBain *et al.* (2003) submeteram ecossistemas microbianos gerados a partir de saliva humana, e também culturas bacterianas puras, a uma solução etanólica de triclosan durante 5 dias, com os seguintes resultados: diminuições consideráveis nas contagens de microrganismos gram-negativos e anaeróbicos totais; diminuições transientes de *streptococci* e *actinomyces*; aumento na proporção de *lactobacilli*; inibição de *Porphyromonas sp.* e *Selenomonas infelix*. Nos estudos de culturas puras, verificou-se susceptibilidade alta a triclosan por *Neisseria subflava*, *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*. Adicionalmente, avaliou-se possível alteração de concentração inibitória mínima (CIM) dos bactericidas triclosan, clorexidina, eritromicina, penicilina V e vancomicina sobre a

população de microrganismos após 5 dias de exposição ao triclosan, não tendo sido verificadas mudanças significativas que pudessem indicar o desenvolvimento de resistência a essa substância.

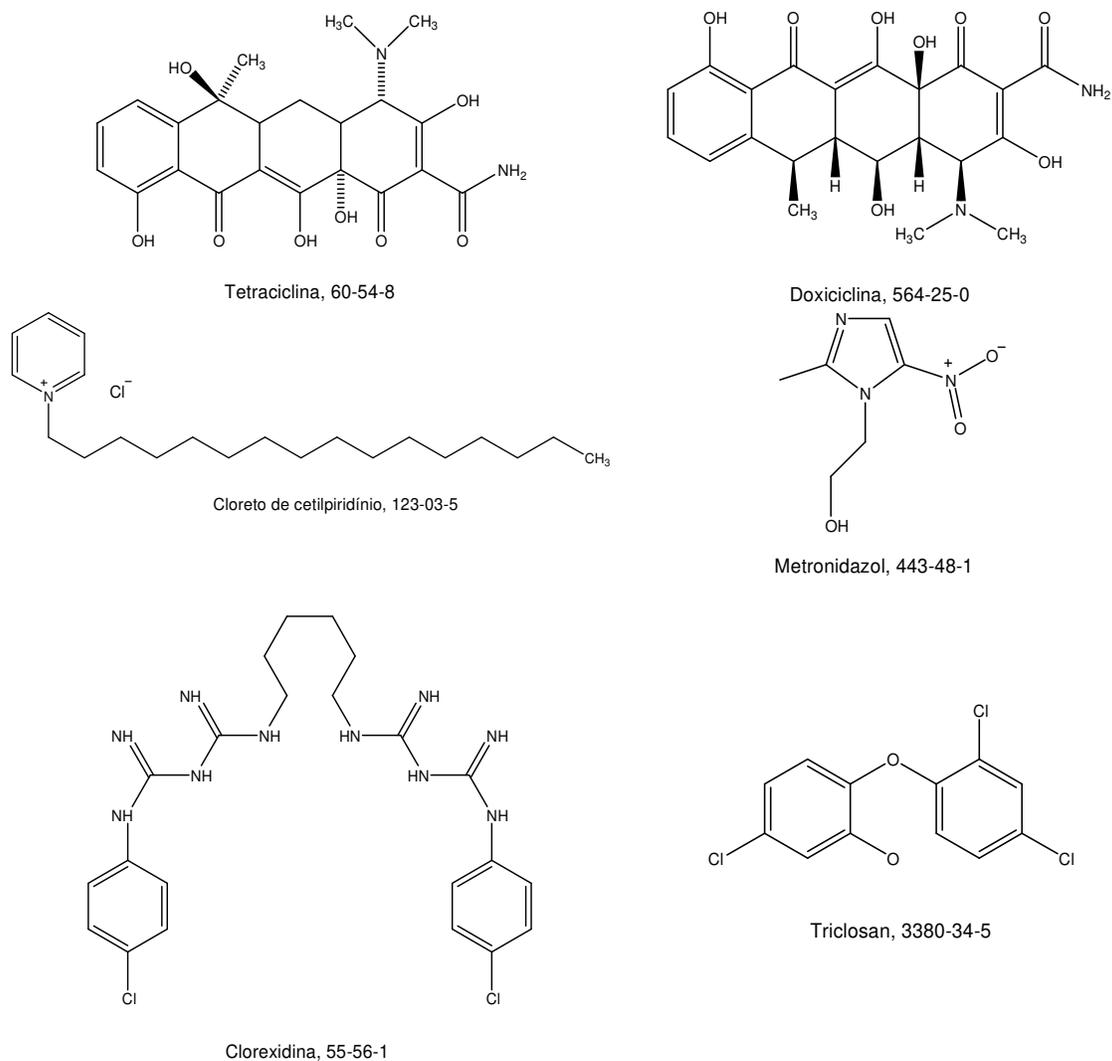


Figura 1: Estruturas de algumas substâncias utilizadas em Periodontologia; nome comum e número CAS.

2.2. Pneumonia associada à ventilação mecânica

A correlação entre populações de microrganismos residentes na cavidade oral, muitos dos quais geralmente associadas a biofilme ou doenças periodontais, e o desenvolvimento de quadros de pneumonia em situações de baixa imunidade, presença de outras doenças, internação ou institucionalização de um paciente, é

bastante conhecida, especialmente na ausência de bons hábitos de higiene oral (BARAHNI-MOUGEOT *et al.*, 2007; PAJU, SCANNAPIECO, 2007; WIENER-KRONISH, DORR, 2008).

Quando um paciente entra em regime de ventilação mecânica, utilizando um respirador orofaríngeo, esses microrganismos, ou ainda outros adquiridos pelos pacientes no ambiente hospitalar, podem colonizar tais dispositivos e migrar ao longo deles para as vias respiratórias inferiores. Esse fenômeno contribui significativamente para o estabelecimento de quadros de pneumonia associada ao uso desses sistemas (VAP, *Ventilator-Associated Pneumonia*) (PAJU, SCANNAPIECO, 2007; BERDAL *et al.*, 2007; WIENER-KRONISH, DORR, 2008).

Infecções nosocomiais são aquelas desenvolvidas por um paciente a partir de 48 horas de seu período de internação, ou até 48 horas depois da alta, cujos microrganismos causadores não estão relacionados à patologia primária que levou o paciente à internação e/ou cirurgia. VAP é a segunda infecção nosocomial mais frequente, mas a que apresenta as taxas mais altas de mortalidade. Além disso, prolonga o tempo de internação e responde por grande parte (estima-se que até 50%) dos antibióticos inespecíficos ministrados em UTIs, contribuindo também para o aumento do desenvolvimento de cepas de microrganismos resistentes (KOEMAN, 2001; PAJU, SCANNAPIECO, 2007; WIENER-KRONISH, DORR, 2008). As diretrizes internacionais atuais propõem a adoção de uma série de procedimentos conjuntos como a forma mais eficaz de prevenção de VAP (CDC 2003; SBPT, 2007; SHEA, 2008; IHI, 2012). Medidas usualmente recomendadas são:

- Elevação da cabeceira do leito entre 30 e 45°.
- Interrupção diária da sedação e avaliação diária da prontidão para extubação (desmame).
- Profilaxia de doença de úlcera péptica.
- Profilaxia de trombose venosa profunda (a menos que contraindicado).
- Aplicação diária de clorexidina na cavidade oral.

A adoção da prática de aplicação oral tópica diária de clorexidina 0,12% em período pré-operatório (especialmente para cirurgias cardíacas), e durante a estada na UTI, foi a medida mais recente a ser incluída em tais diretrizes, devido ao acúmulo de evidência favorável que se deu nos últimos anos (DERISO *et al.*, 1996; HOUSTON *et al.*, 2002; KOEMAN *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2007; BERALDO, ANDRADE, 2008; MUNRO *et al.*, 2009; IHI, 2012). No entanto, apesar de simples, tal procedimento pode encontrar resistência, por parte dos profissionais envolvidos, de ser realizado adequadamente, especialmente no caso de pacientes com respiradores orofaríngeos, que dificulta muito o acesso a algumas regiões da boca do paciente (KOEMAN *et al.*, 2006; PAJU, SCANNAPIECO, 2007).

2.3. Quitosana

Quitosana (QTS) é um copolímero polissacarídeo, resultante da desacetilação química ou enzimática de 50% ou mais dos grupos acetamido da quitina, a qual é majoritariamente composta por $\alpha(1,4)$ -acetoamido-2-desoxi- β -D-glicopirranose (Figura 2). A constante de equilíbrio de dissociação (pK_a) dos grupos amino da forma desacetilada é 6,2 (PARK *et al.*, 1983).

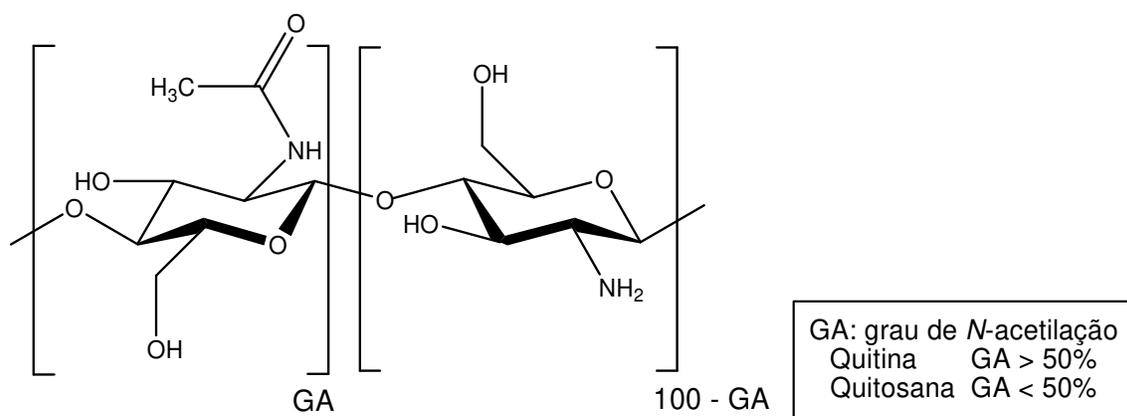


Figura 2: Estrutura química de quitina e quitosana, copolímeros de N-acetil e amino açúcares. Quitina ocorre majoritariamente na forma acetilada, enquanto quitosana apresenta 50% ou mais de suas unidades monoméricas na forma desacetilada ([http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs/special issues/chitin-chitosan](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs/special_issues/chitin-chitosan). Acesso em 20/7/2013).

Quitina é o segundo biomaterial de maior ocorrência natural, após a celulose. Ocorre no exoesqueleto de invertebrados marinhos, como artrópodes e moluscos, e também é componente de membranas celulares de fungos e leveduras. Quitosana é a versão mais processável da quitina, devido a sua solubilidade em soluções ácidas diluídas. Pode apresentar diferentes arranjos cristalinos, massas molares médias e grau de desacetilação, dependendo de sua origem e processo de obtenção. Uma série de derivados químicos, como glutamato, cloridrato e muitos outros podem ser obtidos a partir dela e vem sendo empregada industrialmente em tratamentos agrícolas, têxteis, de papel e efluentes, bem como em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (HUDSON, JENKINS, 1964).

QTS é compatível com tecidos vivos, não causa reações alérgicas ou rejeições. Seus produtos de biodegradação (aminossacarídeos) são inofensivos e absorvíveis pelo organismo humano. Além da solubilidade em solução aquosa ácida, que a princípio elimina a necessidade de utilização de solventes orgânicos para obtenção de micro/nanopartículas, hidrogels e outros, a protonação dos grupos amino possibilita também sua reticulação por poliânions, o que a torna um material muito versátil (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Outras propriedades importantes são: habilidade de absorver metais tóxicos, como chumbo, cádmio, mercúrio, etc., apresenta atividade antimicrobiana, bioadesividade e habilidade de facilitar a permeação transdérmica pelo mecanismo de abertura das junções intercelulares (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2005).

Sogias *et al.* (2008) realizaram experimentos para avaliar a interação entre duas QTS com graus de desacetilação diferentes e mucina gástrica de porco (modelo para testes de mucoadesividade *in vitro*) em meios com diferentes pH e na presença de NaCl, uréia e etanol, evidenciando a componente dos grupos amino primários, da atração eletrostática, de ligações de hidrogênio e de efeitos hidrofóbicos nas interações mucoadesivas. Demonstraram, assim, sua

complexidade e também que a componente de atração eletrostática pareceu ser a mais relevante.

As características antimicrobianas de quitosana foram evidenciadas em alguns estudos. Por exemplo, İkinici *et al.*(2002) avaliaram o efeito *in vitro* de géis e filmes de QTS com diferentes graus de desacetilação e massas molares, com e sem adição de clorexidina (CHG) a 0,1 e 0,2%, sobre culturas de *Porphyromonas gingivalis* isoladas de biofilme subgingival de um paciente com periodontite. Os resultados mostraram que tanto QTS quanto suas combinações com CHG exerceram atividade antimicrobiana e que o efeito de QTS de alta massa molar foi notadamente maior. Não se verificou diferença significativa entre os efeitos obtidos com as duas concentrações de CHG avaliadas, indicando a possibilidade de aplicação de concentração mais baixa quando em combinação com QTS.

2.4. Alginato

Alginato (ALG) é um polissacarídeo na forma de copolímero em bloco, hidrossolúvel, geralmente extraído de algas marinhas marrons, mas também obtido por processo biotecnológico a partir de bactérias especializadas. Suas unidades monoméricas são os sais dos ácidos manurônico e gulurônico, (1,4) β -D-manuronato e (1,4) α -L-guluronato (Figura 3). Sua composição química depende da espécie e estrutura da alga de origem, sendo os blocos, respectivamente representados por M e G. Os blocos oligoméricos alternantes (GG)_n, (MM)_n e (GM)_n, em diferentes proporções, distribuições e comprimentos, determinam as propriedades físicas e químicas do material em nível macroscópico. Os blocos (GG)_n fornecem ao polímero sua capacidade de formação de gel, enquanto que (MM)_n e (GM)_n provêm flexibilidade às cadeias (FMC). A constante de dissociação do grupo carboxila (pK_a) é, respectivamente para os grupos M e G, 3,5 e 3,8 (SMIDSRØD *et al.*, 1969; SANTAGAPITA *et al.*, 2012).

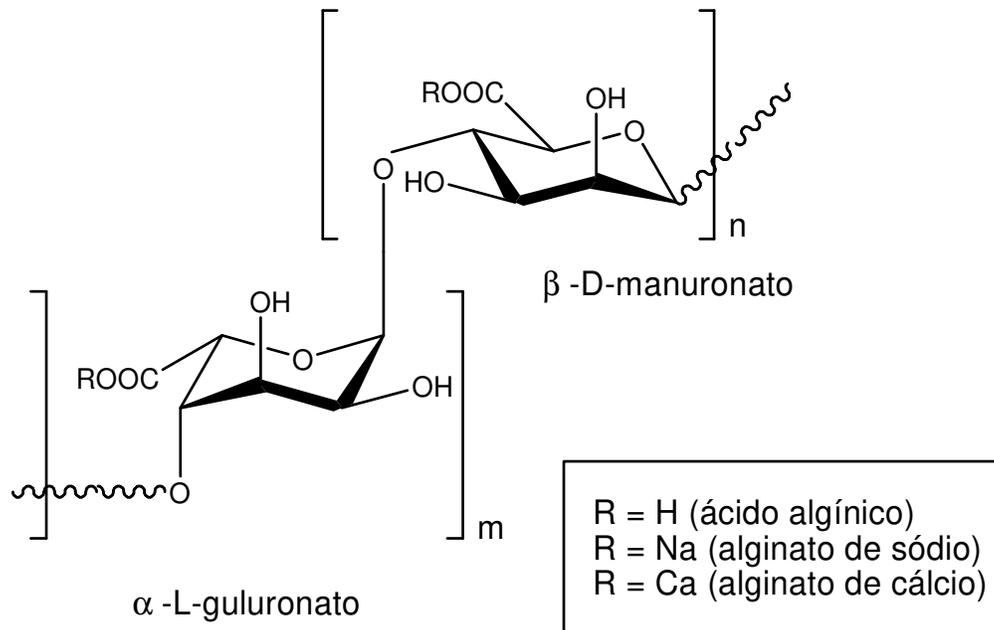


Figura 3: Representação de cadeia do polissacarídeo alginato com os monômeros manuronato (M) e guluronato (G) em bloco (<http://www.google.com/patents/WO2004078063A2?cl=en>. Acesso em 20/7/2013).

Soluções de alginato apresentam comportamento pseudoplástico ou seja, sua viscosidade diminui conforme aumenta sua agitação ou cisalhamento. São também suscetíveis à temperatura, em uma relação inversa entre viscosidade e temperatura (FMC).

Além da boa solubilidade em água, a principal característica dos alginatos é sua capacidade de formação de gel, principalmente com íons cálcio (Ca^{2+}). Os blocos de monômeros guluronato interagem com Ca^{2+} , formando os pontos de reticulação do gel, enquanto os blocos de manuronato permanecem primordialmente livres, sendo responsáveis por sua flexibilidade e alta capacidade de retenção de água (FMC, GRANT *et al.*, 1973).

Grant *et al.* (1973) propuseram o famoso modelo da “caixa de ovos”, até hoje utilizado para explicar as interações entre bio-polissacarídeos, como alginatos e pectinas, e íons positivos divalentes como cálcio e estrôncio (Sr^{2+}). Utilizando medidas de dicroísmo circular, reforçaram o fato, sabido, que as interações que

ocorrem são específicas com os monômeros guluronato e galacturonato (este último presente nas pectinas), chegando a ocorrer com intensidade bem menor com manuronato e apenas em concentrações muito altas de Ca^{2+} ou Sr^{2+} . A partir dessas medidas, e usando o critério de que ligações ótimas Ca – O se dão em distâncias de 2,6 a 2,7 Å, realizaram modelagem computacional para avaliar quais seriam as conformações possíveis de serem assumidas pelos dois monômeros avaliados, e quais delas favoreceriam as interações entre cadeias e cátions, bem como o conseqüente agrupamento bi- ou tri-dimensional de cadeias, chamadas de interações cooperativas.

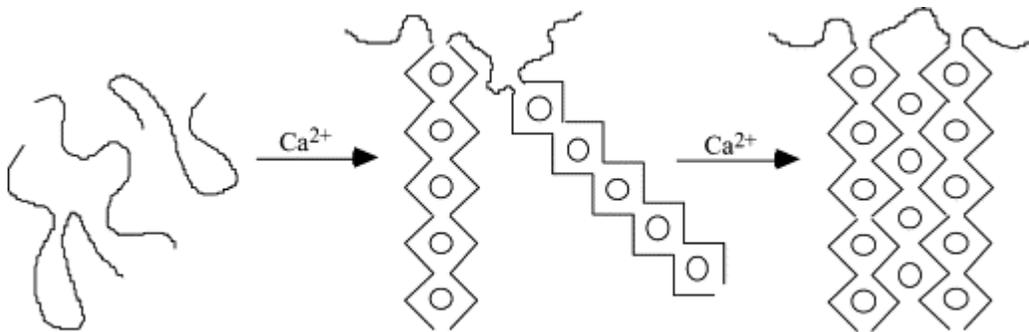


Figura 4: Representação do modelo da “caixa de ovos”, responsável por formação de géis termoirreversíveis através da interação de cadeias de alginato com íons cálcio (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401002548>. Acesso em 21/7/2010).

O modelo da caixa de ovos (Figura 4) é bi-dimensional, mas os autores indicam que, no caso do guluronato, de forma análoga podem ser formadas estruturas com simetria de espiral tri-dimensional (GRANT *et al.*, 1973).

Desde então, muitas pesquisas e trabalhos de modelagem vêm sendo realizados para aprofundar esse modelo. Braccini *et al.* (2001) avaliaram as bases moleculares responsáveis pela força e estereoespecificidade das interações dos íons Ca^{2+} com alginato e pectina através de um trabalho de modelagem que leva em conta o pareamento entre cálcio e os grupos poliuronato na formação de dímeros. Foram encontradas diferenças significativas a nível de interações entre cadeias, indicando que o modelo da caixa de ovos se confirma para os grupos

guluronato do alginato, mas que no caso da pectina sua contribuição entrópica não é tão importante. O estudo corrobora também que a formação da caixa de ovos se dá em dois estágios: inicialmente a formação de dímeros através de interações fortes com Ca^{2+} , seguida de interações eletrostáticas, mais fracas, entre os dímeros.

Fang *et al.* (2007), através da adição gradual de pequenas quantidades de íons cálcio a soluções diluídas de alginatos com diferentes massas molares e relações M/G, buscaram detalhar o processo de ligação desses íons ao alginato e elucidar a rota de associação entre cadeias, utilizando as técnicas de calorimetria de titulação isotérmica de alta sensibilidade (ITC), potenciometria cálcio-seletiva e viscosimetria relativa. Constataram que a ligação de Ca^{2+} ao alginato envolve três etapas distintas e sequenciais, ao longo do aumento da concentração do íon: monocomplexação, dimerização e associação lateral, e que o modo como a terceira etapa ocorre depende da massa molar do alginato. Concluíram também que a etapa de dimerização e a de associação lateral são termodinamicamente equivalentes e que a ligação de Ca^{2+} a alginatos com diferentes conteúdos de G é controlada pelo balanço entalpia/entropia (FANG *et al.*, 2007).

Posteriormente, Fang *et al.* (2008) compararam duas pectinas, de baixo e alto conteúdo de metoxila, com alginato utilizando a mesma metodologia e demonstraram que a interação entre Ca^{2+} e pectina ocorre sem etapas acentuadas e que as associações entre cadeias para formação da estrutura da caixa de ovos são desprezíveis.

2.5. Clorexidina

Digluconato de clorexidina (CHG, Figura 5) é uma substância da família das bisbiguanidas. Possui fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10} \cdot 2(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7)$, massa molar 897,8 g e nome químico N,N"-Bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecanodiimidamida di-d-gluconato. Seu número CAS é 18472-51-0. É um líquido claro e incolor, solúvel em água em concentração de até 50% (m/V),

disponível comercialmente em solução aquosa a 20% (m/V). É sensível à luz e sofre degradação se aquecido acima de 100°C (The Merck Index).

Seus dados toxicológicos são: LD50 (oral) 2 g/kg, (subcutânea) 3320 mg/kg, (intravenosa) 24,2 mg/kg – considerada veneno por rota intravenosa. Pode causar dermatite de contato (ASH, ASH, 2008).

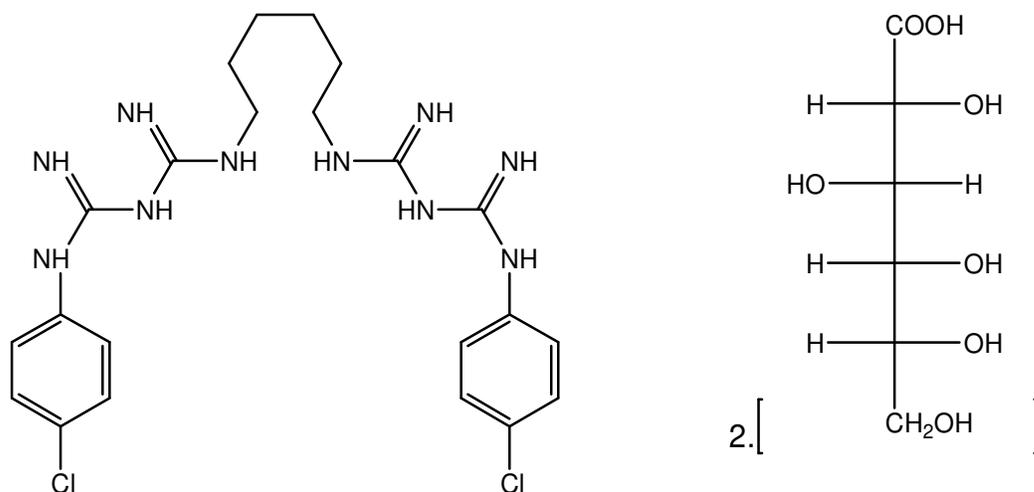


Figura 5: Fórmula estrutural de digluconato de clorexidina.

O uso de 15 mL de CHG a 0,12% duas vezes ao dia no tratamento profilático de pacientes em pós operatório cardíaco reduziu a taxa de infecção nosocomial respiratória em 69%. Para o tratamento de periodontite, comprimidos periodontais de CHG (PerioChip^(R), 2,5 mg de CHG) são indicados para colocação na parte mais profunda das bolsas periodontais (pontos de infecção); devido a sua biodegradabilidade os comprimidos não precisam ser removidos. Até oito deles podem ser aplicados ao mesmo tempo no caso da existência de vários pontos de infecção. Um novo comprimido pode ser colocado em cada bolsa periodontal a cada três meses. Outros regimes se aplicam ao tratamento de gengivite, úlceras aftosas, tratamento profilático de pacientes queimados, enxágue pré-operatório da pele, cuidado de pontos de inserção de catéteres, desinfecção das mãos de profissionais envolvidos em cirurgias e enxágue profilático da mucosa bucal em pacientes imunodeprimidos (MICROMEDEX; PERIOCHIP^(R)).

Bonesvoll e Gjermo, em suas publicações na década de 1970, realizaram comparações interessantes entre a clorexidina e os íons quaternários de amônio, relacionando suas similaridades de estrutura química aos efeitos sobre acúmulo de biofilme e retenção salivar: a forte carga positiva existente nessas substâncias, associada à presença de átomos de nitrogênio, causando forte afinidade por vários grupos aniônicos; a existência de porções polares e apolares na estrutura das moléculas; a grande flexibilidade de suas cadeias. Além disso, discutem, citando estudos anteriores, possíveis fundamentos físicoquímicos e farmacocinéticos dos resultados obtidos em sua pesquisa, publicada em 1978, de substantividade, entendida como a retenção dessas substâncias na cavidade oral; concentração salivar em até 24 horas; e efeito inibidor de biofilme após o enxágue bucal com essas substâncias. Apesar do percentual inicial de clorexidina ter ficado abaixo dos percentuais de retenção dos quaternários de amônio, sua concentração salivar ao longo do período de 24 horas manteve-se mais alta, bem como a inibição de biofilme. A discussão dos efeitos observados fundamenta-se em maior ligação da clorexidina, devido a sua dupla carga positiva, às proteínas salivares, através de seus sítios fosfato, possibilitando a formação de um reservatório de CHG na cavidade oral e sua liberação gradual para a saliva, ao deslocamento de íons cálcio desses sítios de ligação, impedindo dessa forma o acúmulo de biofilme, fenômeno em que tais íons têm papel reconhecido (BONESVOLL, GJERMO, 1978; BONESVOLL *et al.*, 1974).

Discute-se também que essa capacidade de as moléculas se ligarem a tais sítios das membranas celulares produzem seu efeito bactericida e bacteriostático de alto espectro de ação: após a interação com os fosfolipídios das membranas celulares, os compostos causam desbalanço de sua permeabilidade, seu rompimento e extravazamento de material citoplásmico, levando à morte celular. Tal mecanismo de efeito é também o motivo do não desenvolvimento de resistência microbiana a substâncias antissépticas (BONESVOLL *et al.*, 1974; HUGO, LONGWORTH, 1964; DENTON, 1991).

A eficácia antifúngica e fungicida de CHG 0,2% e de produtos comerciais a 0,12% sobre fungos patogênicos, de cepas padrão como também isolados clínicos, principalmente de espécies de *Candida*, foi reportada em comparação à de outras substâncias (GIULIANA *et al.*, 1997; GIULIANA *et al.*, 1999; MEILLER *et al.*, 2001).

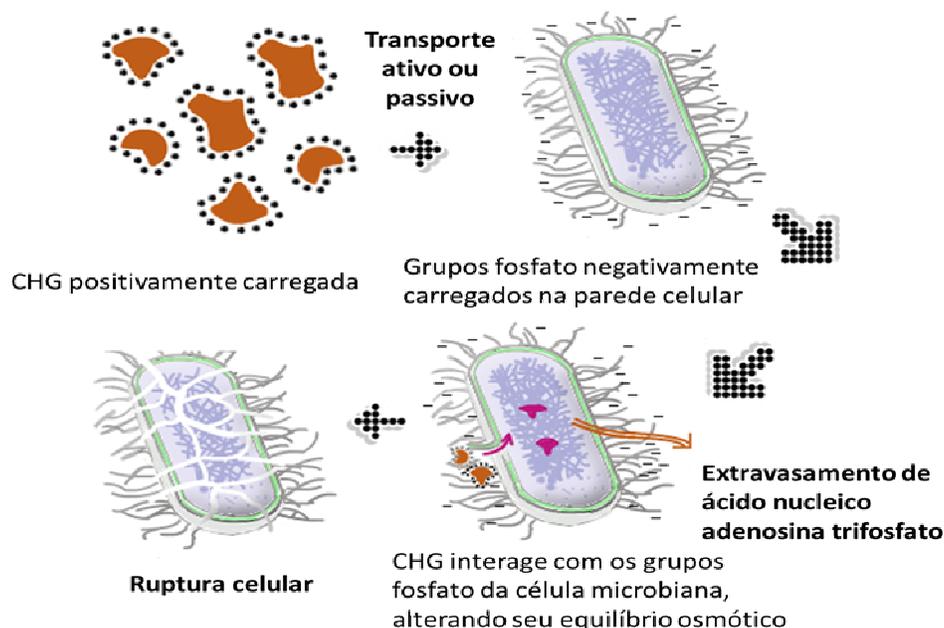


Figura 6: Representação do mecanismo de ação antimicrobiana da clorexidina (<http://www.icd.org.in/article.asp?issn=0972-0707;year=2010;volume=13;issue=4;spage=256;epage=264;aulast=Kandaswamy#ref54>. Acesso em 29/7/2013).

2.6. Liberação sustentada de substâncias ativas

A obtenção de um sistema ou dispositivo de liberação de fármaco (DDS) pode ser entendida por: processamento de um agente bioativo em um produto final, tal que esse produto final exiba liberação modificada desse ativo em um sítio recipiente. Os ativos podem ser substâncias farmacêuticas para uso em humanos ou animais, agentes cosméticos ou substâncias biocidas, incluindo pesticidas, herbicidas, fungicidas ou parasiticidas (ENGLISH *et al.*, 1999).

Sistemas de liberação modificada consistem de ao menos dois componentes principais, ativo e veículo. O desenvolvimento de determinado sistema deve levar em conta a aplicação-fim, de maneira a escolher materiais e planejar propriedades que lhe sejam adequados. Por aplicação-fim entende-se: desordem fisiológica alvo do tratamento; substância ativa (fármaco) de escolha; ambiente onde ocorrerá a liberação e absorção do ativo (bucal local, bucal transmucosal, oral/trato gastrointestinal inferior, dérmica, nasal, ocular, retal, vaginal). A partir de tais requisitos, poderão ser avaliadas opções condizentes de sistemas carreadores / veículos.

Os materiais utilizados como veículos são geralmente poliméricos; outros, como ceras e lipídios, também são usados. São vários os fatores físico-químicos que alteram a liberação de um ativo em seu carreador: pH local do sítio recipiente; natureza hidrofílica ou hidrofóbica do agente ativo; solubilidade do ativo no ambiente da liberação; solubilidade do ativo no veículo; permeabilidade do veículo à água; permeabilidade do veículo ao ativo; bioestabilidade do veículo, entre outras. Há situações em que a liberação modificada é inclusive a tecnologia viabilizadora de determinado produto. Por exemplo, em casos em que o ativo é instável ou tóxico na ausência do DDS (ENGLISH *et al.*, 1999).

Nas últimas décadas a pesquisa, desenvolvimento e aplicação de sistemas de liberação modificada de substâncias antissépticas ou antibióticas para aplicação em tratamentos bucais foram intensos; tal abordagem traz diversas vantagens e também desafios e possíveis desvantagens, conforme sumarizado por Schwach-Abdellaoui *et al.* (2000):

Principais vantagens de sistemas de liberação modificada de aplicação tópica:

- Manutenção dos níveis de ativo na faixa terapêutica desejada;
- Redução ou eliminação de efeitos adversos;
- Proteção à degradação de ativos com meias-vidas curtas;
- Maior adesão dos pacientes ao tratamento;

- Eliminação de desconforto ao paciente em comparação à administração convencional;
- Melhor administração do ativo em regiões geográficas com baixa supervisão médica.

Potenciais desvantagens:

- Toxicidade ou falta de biocompatibilidade do material carreador;
- Dor causada pela presença de implantes;
- Produção de subprodutos tóxicos em caso de polímeros biodegradáveis;
- Necessidade de procedimento cirúrgico para implantação do dispositivo em locais de difícil acesso;
- Custo das formulações contendo ativo-polímero.

Chien (1985) descreveu dispositivos de liberação modificada pertencentes a diversas categorias, a partir de uma abordagem física, ou estrutural, dos DDS, citando exemplos de cada uma delas comercialmente disponíveis à época. Classificou DDS em duas grandes categorias: controlados por processo de difusão e por processo de ativação; ambas possuem diversas subdivisões.

Devido ao fato de que o aumento do contato entre um dispositivo de liberação e a camada absorvente aumenta a eficácia do produto, muito tem sido pesquisado nos últimos 30 anos a respeito de sistemas bioadesivos de liberação sustentada (BDDS). O termo bioadesão (ou mucoadesão) refere-se à adesão entre duas substâncias biológicas, ou ainda entre um material biológico, como celular, secreções extracelulares, muco, matriz extracelular, e outros, e um substrato artificial, como metais, cerâmicas, polímeros, etc. Formas comuns de BDDS utilizadas em pesquisas incluem tabletes, pós, géis, *patches*, lipossomas e microesferas (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999).

2.6.1 Físico-química da liberação sustentada

2.6.1.1. Aspectos cinéticos

A liberação de ativos de DDS poliméricos pode ser modelada por mecanismos de difusão dinâmicos ou no estado estacionário, seguindo a lei de Fick. A modelagem matemática da cinética de liberação de DDS permite prever a velocidade de liberação do ativo, bem como seus mecanismos físicos de transporte (NARASIMHAN *et al.*, 1999).

Narasimhan *et al.* (1999) propuseram uma classificação dos DDS, do ponto de vista da modelagem matemática dos fenômenos e mecanismos de transporte envolvidos, em quatro categorias: regidos por difusão; regidos por intumescimento; osmoticamente; regidos quimicamente.

A maioria das formulações poliméricas de liberação de ativos tem como ponto de partida as equações básicas de Fick para difusão unidimensional (Equações 1 e 2):

Equação 1

$$j_i = -D_{ip} \frac{dc_i}{dx}$$

Equação 2

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ip} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2}$$

Nessas equações, c_i e j_i são, respectivamente, a concentração e o fluxo de massa de um ativo I; x e t são a posição e o tempo de liberação e D_{ip} é o coeficiente de difusão do ativo no polímero P.

Além da aproximação relativa à difusão unidimensional, o uso de tais equações pressupõe também que D_{ip} é independente da concentração do ativo, e o fluxo j_i refere-se à velocidade do sistema (NARASIMHAN *et al.*, 1999).

Siepmann e Siepmann (2008) detalham e discutem os modelos matemáticos que buscam analisar quantitativamente os sistemas DDS existentes na literatura, a partir do trabalho pioneiro de Higuchi publicado em 1961, distinguindo-os entre: empíricos/semiempíricos, nos quais o tratamento matemático é predominantemente descritivo, e que não possuem base forte em fenômenos físico-químico-biológicos, e os mecanisticamente realistas, que partem de fenômenos reais, como difusão, dissolução, intumescimento, erosão, precipitação e degradação. Tal abordagem permite determinar parâmetros específicos do sistema e chegar à determinação de seus mecanismos basais.

Na busca de acuracidade, tais modelos tornam-se mais complexos, do ponto de vista matemático, à medida que levam em consideração maior número de informações sobre o sistema; para evitar complexidade excessiva, é importante portanto a definição de quais são os fatores e fenômenos predominantes em cada sistema.

Os conceitos a seguir baseiam-se em Siepmann e Siepmann, 2008, e Narasimhan *et al.*, 1999.

Sistemas regidos por difusão

Sistemas regidos por difusão, de acordo com as leis básicas de Fick, podem ainda ser categorizados em: sistemas reservatório, nos quais a matriz contendo o ativo está envolta em uma barreira à difusão do ativo, geralmente uma membrana polimérica, e sistemas monolíticos, nos quais não existe tal barreira. Ambas as classes de sistemas possuem ainda dois sub-grupos, dependendo se a concentração inicial de ativo está acima ou abaixo de seu limite de solubilidade na matriz do DDS.

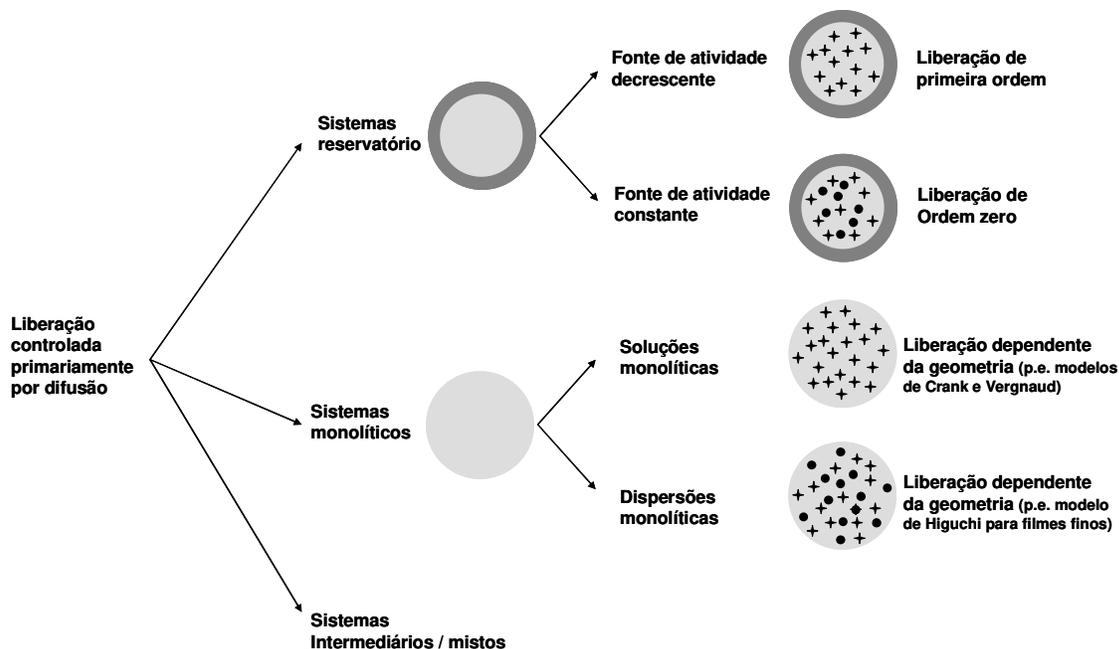


Figura 7: Sistema de classificação de sistemas governados primariamente por difusão. As estrelas representam moléculas individuais da substância ativa e os círculos pretos, seus agregados amorfos ou cristalitos. (SIEPMANN, SIEPMANN, 2008, pp 331).

No caso de um sistema reservatório no qual a concentração inicial do ativo está abaixo de seu limite de saturação na matriz, as moléculas liberadas não são repostas e sua concentração vai decrescendo ao longo do tempo, ou seja, a atividade varia com o tempo. Caso as outras principais condições do sistema não se alterem, ou seja, a membrana não se dissolva nem intumesça, e o meio externo permaneça na condição de um reservatório infinito de solvente, esse sistema apresentará cinética de liberação de primeira ordem, independente de sua geometria:

Equação 3

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{ADKc_t}{l} = \frac{ADK}{l} \frac{M_0 - M_t}{V}$$

Na equação 3, M_t denota a quantidade acumulada de ativo liberada no tempo t ; c_t é a concentração de ativo no meio de liberação no tempo t ; M_0 é a quantidade

inicial de ativo no reservatório; V é o volume do reservatório; A é a área superficial total do dispositivo; L é a espessura da membrana; K é o coeficiente de partição do ativo entre membrana e reservatório; D é o coeficiente de difusão do ativo na membrana.

Em casos em que a concentração inicial de ativo é maior que sua solubilidade na matriz do reservatório, o ativo liberado é repostado, mantendo a concentração de saturação na matriz e em sua interface com a membrana, em situação de atividade constante. Se as outras condições do sistema se mantiverem constantes, o resultado será cinética de liberação de ordem zero, independente da geometria do sistema:

Equação 4

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{AJ_{lim}}{l} = \frac{ADKc_s}{l}$$

Na equação 4, dM_t/dt denota a velocidade de liberação no estado estacionário no tempo t ; J_{lim} é o fluxo limitante da membrana; c_s é a solubilidade do ativo na matriz; outras notações como na equação anterior.

Desvios dessas condições “ideais” comumente ocorrem devido a rachaduras da membrana devido a altas pressões hidrostáticas geradas no reservatório, ou ainda devido a seu intumescimento ou dissolução parcial ou total. A introdução de tais ocorrências em modelos matemáticos é complexa.

Sistemas monolíticos são fortemente dependentes da geometria do sistema. Soluções monolíticas têm concentração de ativo abaixo do limite de saturação, enquanto dispersões monolíticas têm moléculas de ativo dissolvidas convivendo com seus agregados ou cristalitos.

A descrição de dispersões monolíticas é bastante complexa em geometrias diferentes da de filmes finos sem efeitos de borda. Foi para este caso mais simples que Higuchi desenvolveu sua famosa relação entre a quantidade de ativo liberada e a raiz quadrada do tempo, utilizando como ponto de partida

experimental um filme fino de unguento com ativo em concentração muito maior que sua solubilidade na matriz:

Equação 5

$$\frac{M_t}{A} = [D(2c_0 - c_s)c_s t]^{1/2}$$

Na equação 5, c_0 é a concentração inicial de ativo no DDS; outras notações como na equação anterior.

O modelo de Higuchi pode ser considerado de pseudoestado estacionário, devido à condição $c_0 \gg c_s$; nos casos de filmes finos com efeitos de bordas insignificantes, nos quais as moléculas de ativo tenham dimensões bem menores que as do filme, e não haja alteração física na matriz polimérica ou variação dos coeficientes de difusividade, a concordância dos resultados experimentais com esse modelo é altíssima.

A relação de Higuchi tem sido utilizada como embasamento à cinética de liberação de dispositivos que não atendem a todos os requisitos a partir dos quais foi desenvolvida. É importante notar que não necessariamente sistemas que apresentem uma relação entre a quantidade de ativo liberada e $t^{1/2}$ seguem os mesmos mecanismos de liberação do sistema de Higuchi: a sobreposição de outros fenômenos físico-químicos, como intumescimento e variações de coeficiente de difusão em função de tempo ou posição, pode levar a essa mesma relação. Um desses casos é o da cinética de dispersões monolíticas em filmes finos nos momentos iniciais da liberação.

Soluções monolíticas têm sua cinética de liberação descrita por relações matemáticas específicas para diferentes geometrias, como: filmes finos com efeitos de borda desprezíveis; formas esféricas; cilindros; essas relações sempre assumem que a liberação de ativo se dá principalmente pela difusão de suas moléculas através da matriz do DDS e que não ocorrem alterações significativas

na matriz durante o período de liberação em porosidade, intumescimento e coeficiente de difusão.

Sistemas controlados por intumescimento da matriz

Em sistemas em que o intumescimento do polímero é fator importante, por exemplo, em tabletes de hidroxipropilmetilcelulose, a transição das macromoléculas do estado vítreo, onde as cadeias tem pouca mobilidade, para o estado de cadeias relaxadas tem que ser levada em conta no modelo. Quando o polímero é colocado em contato com a água, a movimentação de suas moléculas em direção ao interior da matriz depende das interações termodinâmicas que ocorrem entre ambos. Fenômenos concorrentes resultam dessas interações:

- O comprimento do caminho de difusão aumenta, diminuindo o gradiente de concentração do ativo, que é a força motriz da difusão; dele pode resultar diminuição da velocidade de liberação.
- Com a entrada das moléculas de água, a mobilidade das macromoléculas aumenta, possibilitando maior movimentação das moléculas do ativo e potencialmente aumentando a difusão, praticamente para a mesma ordem de magnitude de uma solução aquosa. A partir de determinada concentração de água, ocorre relaxação macromolecular ou transição vítrea.

Esses fenômenos ocorrem nas chamadas fronteiras móveis: de intumescimento, que separa a matriz intumescida e a matriz íntegra; de difusão, que separa a região que contém ativo dissolvido e disperso da que contém apenas ativo dissolvido; de erosão, na qual polímeros solúveis em água se dissolvem totalmente no meio aquoso.

Modelos matemáticos mecanisticamente realistas levam em conta, simultaneamente, entrada de água na matriz polimérica, saída de ativo e intumescimento do polímero, bem como seu aumento em função do tempo; além disso, consideram que esses fenômenos ocorrem nas três dimensões.

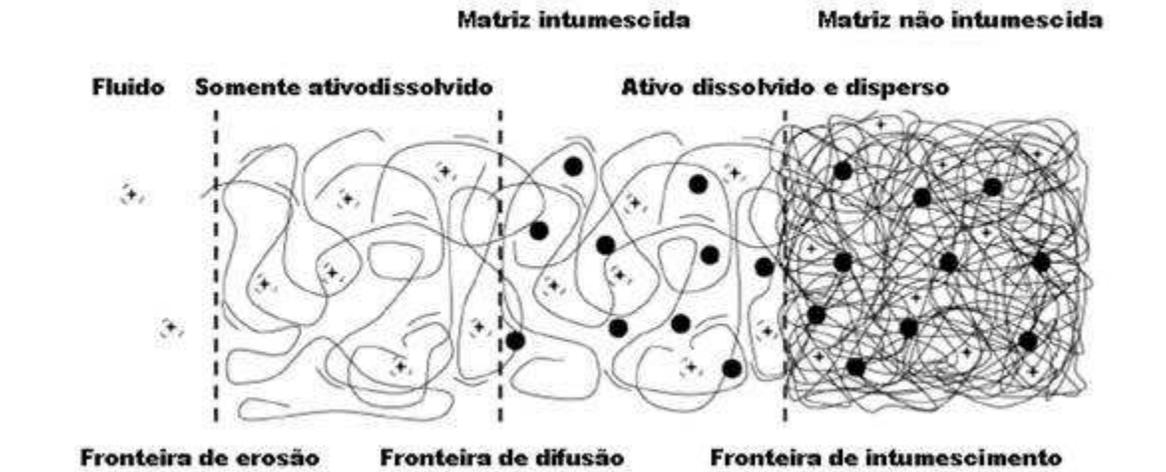


Figura 8: Representação esquemática de um DDS intumescendo, contendo ativo dissolvido e disperso (estrelas e círculos, respectivamente), exibindo as fronteiras móveis de intumescimento, de difusão e de erosão (SIEPMANN, SIEPMANN, 2008, pp. 334).

Sistemas nos quais ocorre adicionalmente dissolução da matriz

Sistemas controlados por dissolução apresentam a característica, adicional ao intumescimento do polímero e difusão do ativo, de que as cadeias lentamente se desenovelam até que a matriz se dissolve completamente. Tal mecanismo tem possibilidade de ocorrer apenas em polímeros não reticulados.

Os parâmetros adicionais levados em conta no desenvolvimento de um modelo que inclua a dissolução são: fração volumétrica de polímero na transição vítrea, a fração volumétrica de polímero no desenovelamento das cadeias e o coeficiente de transferência de massa na dissolução.

Sistemas controlados por erosão/degradação da matriz

Tais sistemas têm o efeito de perda de massa da matriz, seja por dissolução total das cadeias no meio de liberação (erosão), ou ainda pela quebra de ligações das cadeias poliméricas por hidrólise simples ou de ação enzimática ou microbiológica (degradação). Quando tais fenômenos ocorrem com velocidade

maior que a difusão do ativo, devem ser aplicados modelos matemáticos que levem em conta a mudança de geometria do DDS.

Como a quebra de cadeias é randômica, é possível aplicar simulações de Monte Carlo para prever a degradação polimérica, permitindo descrever quantitativamente a liberação de ativo através de degradação (NARASIMHAN *et al.*, 1999; SIEPMANN, SIEPMANN, 2008).

Crowley *et al.* (2004) utilizaram o modelo de difusão de Higuchi, a Teoria de Percolação e a Teoria do Volume Livre de Polímeros aos dados de dissolução de tabletes de etilcelulose como veículo do fármaco hidrossolúvel guaifenesina, que tem propriedades expectorantes. Altos valores de R^2 (coeficiente de correlação) indicaram forte concordância dos dados experimentais com o modelo de Higuchi na cinética de liberação do fármaco em tabletes, principalmente para os preparados com etilcelulose de granulometria mais fina, compressão com forças de compactação maiores ou fusão. Nesses casos, o mecanismo de liberação pode ser classificado como difusão pura. Observou-se que o mecanismo de liberação do fármaco, nos tabletes preparados com etilcelulose de granulometria maior, ou forças de compressão mais baixas, consistiu em uma combinação de difusão, erosão e relaxação polimérica. Em alguns casos, ao final dos testes os tabletes haviam se desfeito completamente.

Young *et al.* (2005) estudaram as propriedades de sólidos extrudados a quente, na forma de tabletes e de *pellets* cilíndricos, contendo o fármaco teofilina, um broncodilatador, o polímero acrílico Acryl-EZE[®] e um agente gelificante – Methocel K4M Premium, ou Carbopol 974P. O mecanismo de liberação do ativo foi estudado com base no modelo de Korsmeyer-Peppas, com o qual houve ótima concordância dos dados experimentais ($R^2 > 0,99$):

Equação 6

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n$$

Na equação 6, M_t é a quantidade de ativo liberado no tempo t , e M_∞ , a quantidade liberada em tempo infinito; a é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do DDS e n é o expoente. Para filmes finos, perfis de liberação com $n = 0,5$ correspondem a mecanismo Fickiano; quando $n = 1$, a velocidade de liberação é de ordem zero, governada por intumescimento. No caso de geometrias cilíndricas, foram determinados os valores de $n = 0,45$ para difusão fickiana, $n = 0,89$ para ordem zero. Em ambos os casos, valores intermediários indicam sobreposição dos dois mecanismos, comportamento conhecido como não Fickiano ou anômalo (SIEPMANN, SIEPMANN, 2008; YOUNG *et al.*, 2005).

Os dados utilizados por Young *et al.* na determinação de n situaram-se na faixa de $M_t/M_\infty \leq 0,6$. Através do cálculo de n para os diferentes sistemas, foi possível verificar diferenças de mecanismo de liberação em função do pH nos sistemas sem agentes passíveis de intumescimento; em pH 1, ocorreu difusão de primeira ordem, enquanto em pH 6,8, ocorreu difusão de ordem zero, mostrando a dependência da solubilidade do ativo pelo pH. A presença de agentes passíveis de intumescimento levou o sistema a apresentar comportamentos anômalos, indicando sobreposição entre mecanismos de difusão e de erosão das cadeias (YOUNG *et al.*, 2005; NARASIMHAN *et al.*, 1999).

2.6.1.2. Aspectos termodinâmicos

Bem menos explorados na literatura da liberação sustentada de ativos são seus aspectos termodinâmicos fundamentais. No entanto, os modelos de cinética de liberação previamente apresentados e discutidos neste trabalho levam em conta diversos fenômenos moleculares, tais como relaxação molecular e transições de fase, de fundamentação termodinâmica. Polishchuk e Zaikov abordam conjuntamente questões cinéticas e termodinâmicas com o que chamam de teoria de transporte multicomponente. Polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos recebem tratamentos teóricos distintos (POLISHCHUK, ZAIKOV, 1997).

Sistemas de liberação modificada são geralmente compostos por polímeros ao menos parcialmente hidrofílicos. Estudos de sorção e solubilidade de água nesses polímeros são importantes, entre outras razões, para determinação da estabilidade e do tempo de vida de sistemas de liberação. Devido à forte interação entre moléculas de água e cadeias poliméricas altamente polares, é intensa a sorção de água nos instantes iniciais de interação; as isotermas de adsorção são de forma “S” de Langmuir (ATKINS, 1994):

Equação 7

$$\theta = \frac{Kp}{1 + Kp} \text{ com } K=k_a/k_d$$

Na equação 7, θ é a razão entre os sítios de interação ocupados e disponíveis; k_a é a constante de adsorção e k_d a constante de dessorção; p é a pressão de vapor do líquido.

Quando, por ocorrência de degradação de cadeias, a hidrofiliicidade da matriz diminui, as isotermas se alteram, passando a obedecer à linearidade das matrizes hidrofóbicas, segundo a lei de Henry (Atkins, 1994):

Equação 8

$$p_B = x_B K_B$$

Na equação 8, x_B é a fração molar do soluto (nesse caso a água) e K_B é a constante com unidade de pressão obtida experimentalmente para o caso quando $x_B = 0$.

A termodinâmica do fenômeno de sorção de moléculas de água em polímeros hidrofílicos está em estreito contato com a do fenômeno de difusão. Polishchuk e Zaikov transcrevem um parágrafo de N.A. Peppas, um importante contribuinte nessa área, em 1994:

“Entender os mecanismos de sorção e difusão de água em polímeros amorfos é de particular importância para nossa habilidade de interpretar fenômenos de transporte em alimentos. Transporte penetrante em polímeros vítreos ou elastoméricos pode ser classificado como Fickiano e Não-Fickiano (anômalo), de Caso II (ordem zero) ou super Caso II, dependendo da atividade termodinâmica e temperatura do sistema. Parâmetros estruturais que influenciam o mecanismo de transporte são massa molar, grau de reticulação, grau de ramificação e seus coeficientes de expansão térmicos e em solvente. Os mecanismos de transporte de água podem ser determinados por várias técnicas experimentais, a mais simples das quais é a gravimetria. Em estudos gravimétricos, a quantidade de água absorvida no polímero é correlacionada ao tempo de acordo com a equação $M_t/M_\infty=kt^n$. Se o expoente n é 0,5 (para sistemas planares), a difusão é Fickiana. Comportamento não-Fickiano é observado para $0,5 < n < 1,0$, com um limite de transporte Caso II para $n=1,0$. Transportes não-Fickiano e Caso II são indicativos do acoplamento de mecanismos de difusão e relaxação. Relaxação é relacionada à transição entre o estado vítreo e o viscoelástico. A maioria dos mecanismos de relaxação são indicativos de tensões formadas no polímero durante o intumescimento. Essas observações se traduzem em conseqüências importantes para o transporte de água em alimentos, à medida em que o mecanismo de transporte de água pode influenciar o desempenho de produtos alimentícios em seu processamento e uso.” (POLISHCHUK, ZAIKOV, 1997).

Utilizando relações de tensão-deformação de polímeros vítreos e modelo de equações de Maxwell, é calculado o tempo de relaxação do polímero, τ , e mostrado o acoplamento entre fenômenos mecânicos e cinéticos, que levam ao comportamento anômalo (não-Fickiano). O número de sorção de Deborah, De , consiste da razão entre o tempo de relaxação característico do material na região vítrea e o tempo de difusão característico na região intumescida, ν_D (POLISHCHUK, ZAIKOV, 1997):

Equação 9

$$De = \frac{\tau}{V_D}$$

Mikos e Peppas (1988) propuseram um método para calcular o parâmetro de interação de Flory, χ , entre um dado copolímero e água, para biomateriais. O método baseou-se nas interações termodinâmicas de segmentos de cadeia e moléculas de solvente e foi validado para um hidrogel de uso biomédico importante, poly(2-hidroxietilmetacrilato co-ácido metacrílico). Partiram da relação estabelecida na teoria de Flory-Huggins entre χ e a entalpia de mistura ΔH_m :

Equação 10

$$\Delta H_m = kT\chi n_1 v_2$$

Na equação 10, k é a constante de Boltzmann; T é a temperatura absoluta; n_1 é o número de moléculas de solvente; v_2 é a fração volumétrica do polímero.

χ leva em conta a não idealidade de soluções poliméricas e é importante no cálculo de outros parâmetros termodinâmicos (MIKOS, PEPPAS, 1988).

Peppas e Brannon-Peppas utilizaram cálculos de coeficiente de partição, de tamanho de retículo líquido e de parâmetros de interação de Flory para diluições infinitas, para verificar a viabilidade de preparar sistemas de liberação sustentada de substâncias tipicamente utilizadas como fragrâncias, com vários copolímeros e na presença de fluido circundante. A partir desses cálculos e simulações, encontraram pares fragrância-polímero que poderiam permitir o adequado desenvolvimento de produtos perfumados de longa duração (PEPPAS, BRANNON-PEPPAS, 1996).

Tse *et al.* (1999) utilizaram os parâmetros e o modelo de contribuição de grupos químicos, descritos por Bogdanic e Fredslund (1994), e calcularam o

carregamento de moléculas com diferentes hidrofobicidades em micropartículas poliméricas, incluindo no modelo a dissolução dos ativos também nas micelas de tensoativos utilizados na preparação das emulsões solvente orgânico/água.

De maneira semelhante, Kouskoumvekaki e Abildskov basearam-se em modelos de equilíbrio termodinâmico e energia livre de Gibbs, partindo da equação de estado de Flory, e modelos de contribuição de grupos químicos para modelar as não idealidades de cada fase envolvida, para calcular o carregamento de uma substância ativa em microesferas poliméricas, obtidas por evaporação de solvente de uma emulsão aquosa. O modelo matemático desenvolvido foi comparado a quatro casos cujos dados experimentais estavam disponíveis na literatura e também para análise de escolhas de polímero, meio reacional e solvente orgânico no desenvolvimento de sistemas de liberação a partir das propriedades finais desejadas (KOUSKOUMVEKAKI, ABDILSKOV, 2006; BOGDANIC, FREDENSLUND, 1994).

Chien investigou a liberação de uma progestina para uso veterinário a partir de uma matriz de silicone e, através de detalhado embasamento teórico, identificou dois estágios de liberação: um regido por difusão hidrodinâmica e outro, de estado estacionário, regido por alterações na matriz. Verifica-se que a liberação é linear em relação ao tempo no primeiro estágio e possui correlação com $t^{1/2}$ no segundo estágio. O modelo matemático permitiu calcular os termos energéticos dos estágios e etapas descritas. Os estudos revelaram que a liberação do ativo nesse DDS requer três etapas ativadas: dissociação das moléculas de ativo de seu retículo cristalino; dissolução de moléculas de ativo no meio de eluição e difusão das moléculas do ativo pela matriz polimérica ou na solução (CHIEN, 1976).

2.7. Biopolímeros como carreadores de fármacos e outras substâncias ativas

A busca por matrizes poliméricas para liberação modificada de substâncias ativas passa por requisitos de seleção relacionados à natureza das cadeias poliméricas, de seu processo de polimerização ou processamento macroscópico,

ou ainda com seu comportamento no organismo hospedeiro. Tais fatores podem ser agrupados nas três categorias a seguir (KUMAR *et al.*, 1964; ENGLISH *et al.*, 1999):

- **Segurança:** impurezas tóxicas ou potencialmente perigosas, como monômeros residuais, iniciadores, catalisadores e outros devem ser separados antes do uso do polímero; polímeros de origem natural ou biotecnológica precisam também passar por purificação para eliminar microrganismos e substâncias orgânicas como enzimas e toxinas, por exemplo. Da mesma forma, aditivos necessários precisam ser escolhidos com base em critérios toxicológicos e de acordo com a regulamentação aplicável.
- **Propriedades físicas:** de acordo com o tipo de aplicação em desenvolvimento, o polímero da matriz do DDS deve apresentar as características necessárias de elasticidade, compactabilidade e resistências à tração, alongamento, rasgamento, fadiga e intumescimento.
- **Biocompatibilidade:** o polímero não deve causar irritação aos tecidos no local de ação do DDS. Possíveis subprodutos da biodegradação ou erosão precisam, da mesma forma que a matriz polimérica original, apresentar biocompatibilidade e toxicidade aceitáveis (KUMAR *et al.*, 1964).

Nessa perspectiva, a utilização de polímeros de origem natural (biopolímeros) mostra-se como opção atraente pois, além de sua grande variedade e versatilidade, parte-se do pressuposto que tais materiais e seus produtos de degradação têm maior probabilidade de biocompatibilidade e segurança. Ainda assim, os requisitos acima devem ser avaliados de forma criteriosa também para esses biopolímeros. Por exemplo, do ponto de vista de pureza, geralmente esses materiais exigem cuidados em sua purificação para remover enzimas e toxinas. Além disso, a adequação de suas propriedades físico-químicas originais à aplicação visada nem sempre é direta, exigindo por vezes a realização de modificação química *a posteriori*.

No entanto, com o desenvolvimento de processos biotecnológicos cada vez mais sofisticados, a interface entre polímeros naturais e sintéticos torna-se cada

vez mais difusa, sendo possível a síntese ou modificação de biopolímeros mais adequados à sua aplicação final, eliminando as deficiências dos materiais extraídos diretamente de biomassa, como é o caso da quitina, pectinas e de boa parte dos alginatos, extraídos de algas marinhas.

2.7.1. Nano e micropartículas de quitosana

O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de substâncias farmacologicamente ativas utilizando quitosana tem sido extensivamente descrito na literatura científica e de patentes. Verifica-se que praticamente qualquer técnica de obtenção de micro ou nanopartículas, sólidas ou ocas, pode ser utilizada com quitosana. Uma importante classificação de parte dessas técnicas está relacionada ao método utilizado na reticulação das partículas, que pode ser classificada em reticulação iônica ou covalente (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; KO *et al.*, 2002; SINHA *et al.*, 2004).

A reticulação iônica caracteriza-se pela utilização de poliânions, dos quais o mais antigo e largamente utilizado é o trifosfato de sódio (TPP), que mantém as cadeias poliméricas unidas através da interação de suas cargas negativas com os grupos amino positivamente carregados das cadeias de quitosana, gerando tanto interações intra quanto intermoleculares (BODMEIER *et al.*, 1989). Essa técnica de obtenção de partículas é também conhecida como coacervação simples (MI *et al.*, 1999).

Relatam-se também estudos realizados com reticulação utilizando outros sistemas iônicos, como por exemplo sulfato de cobre (CuSO₄) (KOFUJI *et al.*, 2005). A utilização da reticulação iônica continua sendo relatada em artigos mais recentes (SRINATHA *et al.*, 2008; ALBERTINI *et al.*, 2005), bem como seu uso em combinação com a reticulação covalente (MI *et al.*, 2003).

A reticulação covalente de quitosana pode ser obtida através de vários agentes, como formaldeído (CORRIGAN *et al.*, 2006), glutaraldeído (AGNIHOTRI, AMINABHAVI, 2004) e outros. O uso de glutaraldeído com essa finalidade é o mais relatado em estudos e publicações científicas, por ser menos tóxico que o

formaldeído e por permitir alto grau de controle das características finais do sistema, como distribuição de tamanho de partículas e cinética de liberação da substância ativa. É, porém, conhecido no meio da saúde o fato de que glutaraldeído é substância tóxica e seu uso como desinfetante vem sendo bastante combatido em aplicações nas quais há exposição direta de trabalhadores e pacientes a essa substância. Há, porém, relatos de defesa ao uso do glutaraldeído em baixas concentrações (AGNIHOTRI, AMINABHAVI, 2004). Sua aplicação como substância reticulante em sistemas de uso biológico ou farmacêutico deve, pois, ser avaliada criteriosamente, levando em conta tanto os dados toxicológicos, bem como sua concentração de uso em finalidades específicas.

Mais recentemente, vêm surgindo trabalhos apresentando alternativas ao uso do glutaraldeído, adotando substâncias reconhecidamente atóxicas e que apresentem mecanismo semelhante de reação com as cadeias de quitosana. Dentre essas substâncias, destaca-se o uso do gliceraldeído, um metabólito participante de diversos processos bioquímicos. O gliceraldeído é bastante utilizado em aplicações alimentícias. Sua utilização como reticulante de quitosana foi inicialmente relatada por Conti *et al.* em duas publicações de 1998. Desde então, outras aplicações vêm sendo desenvolvidas com sucesso (SASHIWA, AHIGEMASA, 1999; MODENA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005; TIERA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

2.7.2. Nano e micropartículas de alginato

De forma geral, alginatos apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta capacidade de sorção de água. Além dessas, a principal característica funcional dos alginatos – sua capacidade de formação de gel através da reticulação por cátions, principalmente cálcio – permite obter partículas de diferentes tamanhos (desde pérolas de vários milímetros até nanopartículas) e a possibilidade de modular seu diâmetro médio, polidispersividade e propriedades físico-químicas através do controle de variáveis simples de processo e materiais, geralmente em condições brandas e de fácil reprodução. Isso também levou a sua

extensa utilização em pesquisas para preparar micropartículas com finalidades estéticas e funcionais nas indústrias cosmética e alimentícia, para liberação sustentada de substâncias ativas, imobilização de células, bactérias e proteínas, não só com objetivo de liberação sustentada, mas também como técnica de imuno isolamento (MURTAZA *et al.*, 2011). Coppi *et al.* (2002) imobilizaram a proteína do soro bovino (BSA), utilizada como modelo em muitos estudos, em micropartículas de alginato de sódio reticuladas *a posteriori* por íons cálcio e recobertas por quitosana, com objetivo de permitir administração oral e proteger a proteína do baixo pH estomacal e de ataque enzimático em todo o trato gastrointestinal, bem como de aumentar sua absorção pela rota transcelular na mucosa intestinal, efeito no qual a quitosana tem reconhecido papel. Os resultados do sistema *in vitro* de liberação demonstraram forte dependência do pH do meio, visto que o *burst* (ponto no qual um percentual importante do fármaco encapsulado é liberado em um curto intervalo) de liberação ocorreu logo após sua mudança de pH 3,0 para pH 7,4.

Möbus *et al.* (2012) desenvolveram, pela técnica de *spray-drying* e posterior reticulação por íons zinco (Zn^{2+}), micropartículas de alginato com diâmetros e porosidade adequada para administração pulmonar controlada de drogas proteicas, utilizando também a proteína modelo BSA. Essa aplicação possui exigências bastante específicas em relação ao diâmetro geométrico e aerodinâmico das partículas utilizadas, devido aos eficientes mecanismos de expulsão de particulados e de captura por macrófagos no pulmão. A utilização do cátion Zn^{2+} se justificou pelo fato deste já haver demonstrado um efeito de estabilização de proteínas quando complexado a elas.

2.8. Complexos polieletrólitos

Complexos polieletrólitos (PEC) são formados em solução por interações eletrostáticas fortes entre pelo menos dois polieletrólitos (PEL) carregados, entre eles, diversos biopolímeros incluindo quitosana e alginato. Em forças iônicas baixas, a complexação é direcionada pela entropia, sendo liberados os contraíons das cadeias polieletrólíticas; dependendo da natureza e composição do

polieletrólito; interações secundárias, como ligações de hidrogênio, podem também ocorrer e favorecer o processo (SCHATZ *et al.*, 2004; MATHIOWITZ, KREITZ, BRANON-PEPPAS, 1999).

Conforme resumido por Boddohi *et al.* (2009), muitos parâmetros experimentais podem influenciar a formação desses complexos, incluindo a razão de mistura de cargas, o tamanho de cadeias e densidade de cargas de cada um dos polieletrólitos, suas concentrações, a presença de outros íons. No trabalho envolvendo a formação de PEC com quitosana (QTS, PEL catiônico), heparina (HEP) e hialuronato de sódio (HA) (PEL aniônicos), foi demonstrada a variação do diâmetro médio de partículas em função da razão de mistura entre cargas: no PCN QTS-HEP. Quando esta se aproxima de 1, ocorre tendência de seu aumento e da agregação/precipitação das partículas. Já no PCN QTS-HA, esse fenômeno não ocorreu, indicando também a dependência de outros fatores, como a própria natureza das cadeias do PEL.

2.8.1. Complexos polieletrólitos de quitosana e alginato

A complexação entre QTS e ALG vem sendo aplicada na encapsulação e estabilização de células, substâncias farmacologicamente ativas, lipídeos e proteínas, entre outros. As principais características desses sistemas são: biocompatibilidade e bioadesividade, provenientes de ambos os polímeros; estabilidade em uma faixa mais ampla de pH, devido à insolubilidade da quitosana em pHs altos e à insolubilidade do alginato em pHs baixos; aumento da resistência mecânica das micropartículas devido à forte interação eletrostática entre os dois polímeros; redução do vazamento do material encapsulado em comparação a micropartículas de alginato não recobertas por quitosana; possibilidade de modular o tempo de residência das micropartículas no trato gastrointestinal; possibilidade de chegar à liberação do material encapsulado em um sítio específico do trato gastrointestinal (SARMENTO *et al.*, 2007; BARUCH, MACHLUF, 2006; LI, MCCLEMENTS, 2011; TAKKA, GÜREL, 2010; VOO *et al.*, 2011; WITTAYA-AREEKUL *et al.*, 2006).

A característica anfifílica do sistema, proveniente da utilização de um polímero catiônico (quitosana) e de um aniônico (alginato), amplia também a variedade de substâncias que potencialmente poderiam ser encapsuladas nesses sistemas de micropartículas complexas, através do desenvolvimento de métodos de obtenção específicos, que levem em conta o processo de formação adequado, a ordem de adição das substâncias e as razões molares entre elas. Os resíduos carboxilato do alginato e os grupos amino protonados da quitosana interagem para formar complexos coacervados. Outra forma de obtenção desse complexos polieletrólitos é o recobrimento de partículas de ALG/Ca²⁺ com QTS (GEORGE, ABRAHAM, 2006; WITTAYA-AREEKUL *et al.*, 2006).

A combinação entre QTS e ALG é também bastante explorada em pesquisa de sistemas liberação sustentada, com o intuito de melhorar suas propriedades em comparação aos sistemas de QTS reticulados por polianions, como solubilidade em pHs ácidos.

Sarmiento *et al.* (2007) descreveram a preparação de nanopartículas bioadesivas de alginato/quitosana com diâmetro médio 750 nm, carregadas com insulina, obtidas a partir da pré-gelificação ionotrópica do ALG com contraíons cálcio, seguida de complexação polieletrólítica com QTS, e sua eficácia no aumento da absorção intestinal da insulina após administração oral a ratos com diabetes induzida. As nanopartículas baixaram o nível de glicose no soro em 55-59% do nível basal, com doses de insulina de 50 e 100 UI/kg. A disponibilidade farmacológica da insulina administrada em nanopartículas foi de duas a quatro vezes maior que a de administração oral e constatou-se a manutenção do efeito por mais de 18 horas.

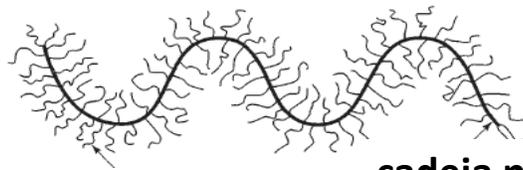
Takka e Gürel (2010) e Li *et al.* (2008) descreveram a preparação de micropartículas de QTS/ALG com diâmetro médio de aproximadamente 1 µm, como sistema de liberação de uma proteína modelo, albumina de soro bovino (BSA), mostrando sua aplicabilidade no desenvolvimento de vacinas via mucosa bucal. Variando as quantidades de alginato e/ou quitosana, foi possível verificar alterações no perfil de liberação da BSA em determinado pH. Foi também

demonstrada a suscetibilidade desses sistemas ao pH do meio de liberação, bem como a capacidade de as micropartículas complexas protegerem a BSA do meio ácido por até 2 horas quando comparado à encapsulação da proteína por micropartículas de quitosana.

2.9. Sistemas bioadesivos

2.9.1. Mucosa oral

A camada de muco sobre a mucosa oral tem função de proteger as células epiteliais da abrasão causada pelas partículas de alimentos, das condições de pH extremas de algumas regiões do trato gastrointestinal e do ataque das enzimas digestivas. O muco é um gel formado por água (até 95 %), eletrólitos, proteínas, lipídios e glicoproteínas de alta massa molar, as mucinas. A cadeia principal das mucinas é proteica, compondo 18,6-25,6 % da massa molar total, rica em aminoácidos sulfurados, serina, treonina e prolina; o restante da massa molar está distribuído em cadeias laterais compostas por 2 a 20 moléculas de carboidratos cada uma, terminando em L-frutose, ácidos siálico e sulfônico. Essas glicoproteínas são polieletrólitos aniônicos em solução com pHs acima de 2,6; interações dissulfeto, eletrostáticas e hidrofóbicas são responsáveis pelo enovelamento das cadeias de mucina, gerando o característico comportamento de gel do muco (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, 2005).



ramificações: carboidrato **cadeia principal: proteica**

Figura 9: Representação esquemática de cadeia de glicoproteína, principal componente das mucinas (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.* , 1999, pp 11)

2.9.2. O fenômeno de bioadesão/mucoadesão

A cavidade oral tem área superficial relativamente pequena e baixa permeabilidade, características vistas como desvantagens para os casos de sistemas de liberação sustentada cujo objetivo é a migração dos ativos através da mucosa bucal para atingirem sítios específicos do organismo ou corrente sanguínea, evitando sua passagem pelo metabolismo digestivo do trato gastrointestinal inferior (WERTZ *et al.*, 1991; SUDHAKAR *et al.*, 2006). Para tratamentos periodontais, no entanto, essas características são vantajosas, pois permitem atingir a concentração de ativo desejada com pequenas quantidades aplicadas e também por tornar menos crítica a preocupação com absorção indesejada de ativos através da mucosa bucal (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, 2005; SUDHAKAR *et al.*, 2006).

A permanência de qualquer substância na cavidade bucal é constante desafio a ser vencido, devido a mecanismos eficientes de salivação (de 0,5 a 2 L / dia) e engolir involuntário. O fenômeno da bioadesão, nesse caso mais especificamente a mucoadesão, é um fator contrário à tendência natural.

O termo bioadesão apareceu na literatura pela primeira vez em 1968. De forma genérica, refere-se a qualquer fenômeno de adesão entre duas partes nos quais pelo menos uma delas é de origem biológica. No campo dos sistemas de liberação sustentada, geralmente se refere à adesão de seu veículo a um tecido biológico. Já o termo mucoadesão pode ser considerado como um subsistema da bioadesão, referindo-se aos casos em que uma formulação interage com a camada de muco que recobre uma mucosa (EDSMAN, HÄGERSTROM, 2004).

O processo envolvido na formação de ligações bioadesivas, uma combinação de interações mecânicas e químicas, pode ser descrito em três etapas:

(1) molhamento e intumescimento do polímero, permitindo seu contato com o tecido biológico;

(2) interpenetração e enovelamento do polímero bioadesivo com as cadeias de mucina;

(3) formação de ligações químicas iônicas, de Van der Waals ou de hidrogênio.

2.9.3. Teorias que fundamentam a bioadesão

Várias teorias foram desenvolvidas para descrever diferentes componentes dos processos de bioadesão e guiar o desenvolvimento de sistemas bioadesivos de liberação sustentada. Algumas focam seu aspecto mecânico e outras, químico, e é geralmente através da combinação entre duas ou mais dessas teorias que se pode chegar à compreensão de sistemas específicos.

A Teoria Eletrônica baseia-se no pressuposto que as cadeias poliméricas do material bioadesivo e as glicoproteínas apresentam diferentes estruturas eletrônicas e que, quando em contato, ocorreria transferência de elétrons entre elas na tentativa de equilibrar os níveis eletrônicos de Fermi, formando assim uma dupla camada elétrica na interface. A bioadesão seria, portanto, devida a forças de atração nessa dupla camada elétrica; no entanto, outras teorias colocam a atração eletrostática como causa, e não efeito, da bioadesão entre as substâncias. (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999; GANDHI, ROBINSON, 1994).

A Teoria de Adsorção é amplamente utilizada para explicar o fenômeno de adesão; segundo ela, a adesão entre duas superfícies ocorre do surgimento de forças de Van der Waals devido à adsorção de moléculas do adesivo na outra superfície, quando em contato muito próximo, da ordem de 5 Å. Esse nível de contato é atingido pela boa molhabilidade de uma superfície por outra, em que as cadeias do adesivo fluem pelas reentrâncias da superfície do substrato (EDSMAN, HÄGERSTRÖM, 2004; PETRIE, 2000).

A Teoria da Molhabilidade leva em conta a capacidade de um polímero fluido, ou do próprio muco, em fluir sobre um substrato – a camada epitelial, por exemplo – gerando assim contato íntimo entre as partes, permitindo a adesão. Possui forte relação de causa-efeito com a Teoria de Adsorção.

A molhabilidade de uma superfície pode ser determinada através de medidas de ângulos de contato. Ela é governada pela equação de Young, que relaciona o ângulo de contato no equilíbrio, θ , às tensões interfaciais:

Equação 11

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$$

Na equação 11, γ_{LV} é a tensão interfacial de equilíbrio entre um líquido e seu vapor; γ_{SV} é a tensão interfacial de equilíbrio entre um sólido e um vapor e γ_{SL} é a tensão interfacial entre um sólido e um líquido.

Molhabilidade completa, espontânea, ocorre quando $\theta = 0^\circ$, ou seja, o líquido se espalha uniformemente para formar um filme fino. O ângulo de contato $\theta = 0^\circ$ ocorre com uma gota de água pura sobre uma lâmina limpa de vidro. Assim, a molhabilidade total ocorre quando $\cos \theta = 1$:

Equação 12

$$\gamma_{SV} > \gamma_{SL} + \gamma_{LV}$$

A molhabilidade é favorecida quando a tensão superficial γ_{SV} do substrato, ou sua energia superficial crítica γ_C , é alta e quando a tensão superficial do líquido γ_{LV} é baixa.

No caso de sistemas biológicos, o coeficiente de espalhamento (S) de um bioadesivo sobre um tecido biológico pode ser determinado pela relação:

Equação 13

$$S_{bt} = \gamma_{tf} - \gamma_{bt} - \gamma_{bf}$$

Na equação 13, b, t e f correspondem a bioadesivo, tecido e fluido, respectivamente. Fluido pode ser tanto saliva quanto outros de outras regiões do trato gastrointestinal.

É possível, em princípio, calcular os parâmetros que compõem o coeficiente de espalhamento. A tensão interfacial entre tecido e fluido pode ser determinada *in vitro*, utilizando a análise de Zisman. A tensão interfacial entre bioadesivo e fluido pode ser medida através de técnicas tradicionais de medidas de tensão de superfície, como a da placa de Wilhelmy. Além disso, diversas publicações já relatam dados de tensão interfacial entre diversos tecidos biológicos e os biomateriais mais utilizados (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999).

A tensão interfacial entre bioadesivo e tecido, γ_{bt} , é proporcional ao quadrado do parâmetro de Flory para interação polímero-polímero, c (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999):

Equação 14

$$\gamma_{bt} \sim c^{1/2}$$

Quando c é pequeno, os componentes biológico e bioadesivo tornam-se próximos, resultando em maior força de ligação e espalhamento.

Além do coeficiente de espalhamento, outro parâmetro importante na indicação da força de uma ligação adesiva é o trabalho específico de adesão, W_{bt} . De acordo com a equação de Dupré, ele é igual à soma das tensões superficiais de bioadesivo e tecido, menos a tensão interfacial (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999):

Equação 15

$$W_{bt} = \gamma_b + \gamma_t - \gamma_{bt}$$

Através da teoria da molhabilidade, medindo as tensões superficiais e interfaciais, é possível prever a intensidade da interação bioadesiva, contribuindo no desenvolvimento de sistemas bioadesivos de liberação sustentada (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999; PETRIE, E.M., 2000).

A Teoria de Difusão descreve a bioadesão como resultado da interpenetração e enovelamento das cadeias do biopolímero e do muco; neste sentido, maior a força de adesão quanto maior a penetração das cadeias poliméricas, até o limite teórico da distância entre as terminações das cadeias. Acredita-se que para um efeito de bioadesão efetivo ocorrer, a penetração deva estar entre 0,2 e 0,5 μm . É possível calcular o comprimento da interpenetração das cadeias, I , através da relação com o tempo, t , e o coeficiente de difusão desse polímero no muco, D_b :

Equação 16

$$I = (t.D_b)^{1/2}$$

Gradientes de concentração e coeficientes de difusão são determinantes na penetração. Cadeias reticuladas tendem a ter menos poder de interpenetração, embora ramificações pequenas ainda possam ser suficientes para alguma interpenetração. É importante que haja boa solubilidade de um material no outro, ou seja, estruturas químicas similares, bem como parâmetros de solubilidade próximos, levando a ligações adesivas mais fortes. Com base nessa teoria, conclui-se que polímeros com parâmetros de solubilidade próximos aos das glicoproteínas do muco sejam melhores candidatos a veículos para sistemas bioadesivos eficazes (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999; GANDHI, ROBINSON, 1994).

A Teoria de Fratura analisa as forças necessárias para separar duas superfícies após sua união, e foi desenvolvida a partir de análises de tensão-deformação. A tensão máxima, σ_μ , produzida durante o desprendimento pode ser determinada pela divisão da força máxima de desprendimento, F_m , dividida pela área superficial envolvida, A_o :

Equação 17

$$\sigma_\mu = F_m / A_o$$

Pode-se considerar a tensão de ruptura (ou fratura) σ_f igual à tensão de desprendimento, σ_μ , e proporcional à energia de fratura, γ_c , ao módulo de elasticidade de Young, E , e ao comprimento crítico de fratura, c , do sítio onde esta ocorre. Ela é descrita pela relação:

Equação 18

$$\sigma_f \sim (\gamma_c E / c)^{1/2}$$

A energia de fratura, γ_c , pode ser obtida da soma do trabalho de adesão reversível (energia requerida para produzir novas superfícies de fratura), W_r , e do trabalho de adesão irreversível (trabalho de deformação plástica na ponta da fratura crescente), W_i , ambos expressos por unidade de área da superfície de fratura (A_f):

Equação 19

$$\gamma_c = W_r + W_i$$

O módulo elástico E está relacionado à tensão, σ , e à deformação, ε , pela lei de Hooke:

Equação 20

$$E = \left[\frac{\sigma}{\varepsilon} \right]_{\varepsilon \rightarrow 0} = \left[\frac{F/A_0}{\Delta l/l_0} \right]_{\Delta l \rightarrow 0}$$

Nessa equação, a tensão é igual à força, F , sobre a área, A_0 , dividida pela variação na espessura, Δl , dividida pela espessura inicial, l_0 .

Essas equações, no entanto, são válidas para sistemas monocomponente uniformes; para utilizá-las na análise de sistemas multicomponentes, como no caso de um biopolímero aderindo ao muco, e/ou à mucosa, é necessário ajustá-las para acomodar dimensões e módulos elásticos de todos os componentes.

Além disso, a utilização do modelo de fratura deve considerar que sua ocorrência é geralmente próxima às interfaces (falha coesiva), e não realmente na interface (fratura adesiva) e também que esse modelo, puro, não leva em conta interpenetração, enovelamento, nem difusão e, portanto, deve ser combinado às outras teorias para tratar adequadamente o fenômeno de bioadesão (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999).

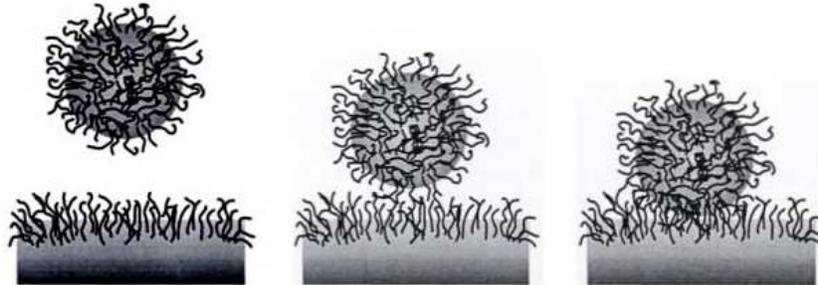


Figura 10: Representação esquemática da interpenetração entre cadeias do bioadesivo e da camada de muco (MATHIOWITZ, CHICKERING *et al.*, 1999, pp 6).

Smart (1999) defendeu a teoria de que a consolidação bioadesiva advém da habilidade dos materiais mucoadesivos, quando na forma seca ou parcialmente hidratada, de intumescer e desidratar os géis do muco, e de que é a movimentação das moléculas de água, e não a interpenetração macromolecular, que dirige a consolidação da junta adesiva. Descreve, ainda, o fenômeno de intumescimento como a busca do equilíbrio de potencial químico do sistema e que um polímero seco em contato com um gel rico em água exercerá intensa “pressão osmótica” sobre as moléculas de água, até que o potencial químico se equilibre. Obviamente, essa teoria só é aplicável a materiais bioadesivos na forma sólida ou apenas parcialmente hidratada.

2.9.4. Sistemas bioadesivos para liberação sustentada tópica na cavidade oral

Os sistemas bioadesivos de liberação sustentada de ativos (BDDS) com aplicação em periodontologia têm sido foco de grande número de pesquisas.

Propostas de sistemas de liberação sustentada visando a liberação de antibióticos ou antissépticos em bolsas periodontais datam das décadas de 1980 e 1990 (STEINBERG *et al.*, 1990).

Bromberg *et al.* (2001) descrevem um DDS periodontal conceitualmente novo: trata-se de um *wafer* compósito, cujas camadas exteriores são compostas por carboximetilcelulose sódica (CMC), amido de milho ou Carbopol 971P-NF, poli(ácido acrílico), os quais possuem propriedades bioadesivas, e nitrato de prata (AgNO_3); a camada interna é composta por uma matriz polimérica de etilcelulose (EC) contendo polímero biodegradável poli(D,L-lactato-co-glicolato) (PLGA) e agentes antimicrobianos, como nitrato de prata, benzilpenicilina, ou tetraciclina. Experimentos *in vitro* demonstraram que estes *wafers* permitem liberação dos ativos com cinética de ordem zero, ao longo de mais de quatro semanas. Verificou-se, também, baixo inchamento dos dispositivos, potencialmente maximizando sua retenção nas bolsas periodontais.

Govender *et al.* (2005) otimizaram sistemas para liberação sustentada de cloridrato de tetraciclina (TC) veiculada em microesferas, com diâmetro entre 1400 e 1700 μm , de quitosana reticulada ionotropicamente por trifosfato de sódio (TPP), para máxima bioadesão e liberação controlada do ativo. Utilizando planejamento experimental de Box-Behnken, os autores chegaram a equações polinomiais dependentes das concentrações de QTS, TPP e TC que permitem encontrar as formulações ótimas em termos desses parâmetros.

No caso do parâmetro bioadesão, a concentração de TC mostrou ser um efeito estatisticamente não significativo. Calculadas as concentrações de QTS e TPP que permitiriam chegar ao máximo de bioadesão (473 mN), reproduziu-se essa situação na prática e o resultado obtido (469 ± 20 mN) mostrou-se estatisticamente equivalente ao valor calculado (teste de Wilcox, $P=0,548$). No caso de liberação do ativo, a concentração de QTS mostrou ser um efeito estatisticamente não significativo. Calculadas as concentrações de TPP e TC que permitiriam chegar ao máximo de liberação (40,82 %), reproduziu-se essa

situação na prática e o resultado obtido ($40,42 \pm 3,37 \%$) mostrou-se estatisticamente equivalente ao valor calculado (teste de Wilcoxon, $P=0,548$).

Com objetivo de identificar uma formulação ótima de ambos os pontos de vista, calculou-se também o fator de similaridade (f_2) entre a liberação proporcionada pela formulação otimizada para bioadesão e pela otimizada para liberação, verificando que a formulação ótima para bioadesão, apesar de apresentar liberação menor durante o período de acompanhamento de 8 horas, os perfis podem ser considerados similares ($50 < f_2 = 61,03 < 100$). Assim, conclui-se que a escolha da formulação com bioadesividade maximizada é a melhor opção, garantindo maior permanência do sistema no sítio de liberação e um bom perfil de liberação (GOVENDER *et al.*, 2005).

Piñón-Segundo *et al.* (2005) obtiveram e caracterizaram nanopartículas carreadoras de triclosan a partir dos polímeros poli(D,L-lactato-co-glicolato) (PLGA), poli(D,L-lactato) (PLA) e ftalato de acetato de celulose (CAP), utilizando álcool polivinílico (PVA) como estabilizante. Foram obtidas partículas com diâmetro abaixo de 500 nm pela técnica de emulsão-difusão. A cinética de liberação das formulações obtidas foi avaliada *in vitro*, mostrando que todas elas apresentaram perfil de liberação similar, atingindo liberação do ativo maior que 90 % logo após 1 hora.

Bruschi *et al.* (2007) desenvolveram formulações contendo poloxamer 407 (P407), um polímero com comportamento reológico dependente de variações de temperatura; carbopol 934P (C934P), de reconhecidas propriedades mucoadesivas e extrato de própolis (EP). Foram avaliadas diversas propriedades físico-químicas – temperatura de gelificação, reologia, dureza, compressibilidade, adesividade, mucoadesividade e trabalho requerido para expelir de uma seringa – e a liberação do ativo *in vitro*. A cinética de liberação da própolis, acompanhada ao longo de 7 dias, apresentou comportamento cinético de ordem zero, expoentes de liberação n próximos de 1,0, indicando que a liberação do ativo ocorre pelo desenovelar das cadeias poliméricas do carreador. Nesse intervalo, 80 % do ativo foram liberados. As propriedades reológicas, incluindo o trabalho para expelir de

uma seringa, indicam ótimo potencial de aplicabilidade dessas formulações em periodontologia.

2.9.4.1. Sistemas bioadesivos para liberação sustentada de clorexidina

Irwin *et al.* (2003) descreveram a formulação, propriedades físico-químicas e mucoadesivas de compactados poliméricos, contendo carboximetilcelulose de sódio (CMC) ou misturas 1:3 e 3:1 de hidroxietilcelulose (HEC) e ácido poliacrílico (PAA), para aplicação de digluconato de clorexidina (CHG) na cavidade oral. Foram feitas avaliações da liberação de CHG *in vitro* e *in vivo* e de fatores sensoriais *in vivo* em pequeno grupo de voluntários (n = 5 e n = 10, respectivamente). Em termos do tempo de residência na cavidade oral (da aplicação até o desprendimento espontâneo), os compactados produzidos com a mistura HEC/PAA apresentaram resultados similares entre si (média > 300 min), e bastante superiores aos compactados de CMC (média em 130 min). A formulação com melhor aceitação em termos sensoriais (gosto residual e percepção de presença na cavidade bucal), a formulação HEC 3:1 PAA foi a mais bem avaliada e escolhida, portanto, para continuidade dos estudos.

Foram analisados compactados com 100 mg de polímero e massas de CHG de 0, 5, 10 e 20 mg, em termos de trabalho requerido para sua fratura; a formulação contendo 20 mg de CHG apresentou resultado significativamente inferior (2,22 N.mm) ao das outras três (> 3,4 N.mm). Essas mesmas formulações apresentaram mucoadesividades equivalentes, tanto na força para romper um contato inicial com a mucina (aproximadamente 0,08 N), quanto para rompimento após readesão (aproximadamente 0,07 N).

A liberação *in vitro* mostrou perfil de liberação de CHG em função do tempo semelhante para todas as formulações e massa de CHG liberada proporcional à sua concentração inicial. Ao longo das 8 horas de acompanhamento da liberação *in vitro*, apenas 20% do ativo presente foi liberado, indicando a continuidade da liberação por longos períodos; além disso, os testes *in vivo* demonstraram

concentrações de CHG na cavidade oral, ao longo de 6 horas de acompanhamento, acima da concentração inibitória mínima de diversos microrganismos patogênicos presentes na cavidade bucal, por exemplo, *Candida albicans* (IRWIN *et al.*, 2003).

Ceschel *et al.* (2006) desenvolveram e avaliaram, *in vitro*, tabletes para liberação de diacetato de clorexidina monohidratado (CHD), pela compressão direta de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Carbopol 940P em diferentes proporções comparando-os com o produto comercial Corsodyl gel[®]. Usando uma célula de Franz modificada, foi possível estudar simultaneamente a cinética de liberação do ativo e sua permeação através da mucosa bucal. Verificou-se que, dependendo da composição do tablete, a liberação de 100% de CHD ocorreu entre 3 e 9 horas; o coeficiente de permeação de mucosa porcina medido foi menor que 10^{-7} cm.s⁻¹, indicando nível de absorvidade desprezível, favorecendo a eficácia da aplicação local.

Jothi *et al.* (2009) prepararam *chips* (5 x 5 mm²) de quitosana contendo digluconato de clorexidina (CHG) e avaliaram o perfil de liberação do ativo *in vitro* durante 30 dias. Realizaram também um estudo *in vivo* em pacientes que apresentavam periodontites, constatando melhorias significativas em índices de biofilme e inflamação gengival, profundidade de bolsas periodontais e nível de adesão dental, em relação ao placebo e controle negativo. Constataram também que a liberação *in vivo* foi comparável à do estudo *in vitro*.

Huynh *et al.* (2010) desenvolveram filmes de poliuretano (PU), grau médico, contendo CHD, e também filmes de PU multicamada tipo “sanduíche”, contendo CHD somente na camada central. Estudos de liberação foram realizados em água destilada e em solução salina a 0,9% (m/V). Foi possível constatar diferenças importantes na cinética de liberação do ativo em função das diferentes estruturas do DDS, da concentração inicial de CHD na matriz e do meio de liberação. A atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. epidermidis* persistiu por 35 dias.

2.9.5. Técnicas instrumentais utilizadas na pesquisa e desenvolvimento dos sistemas bioadesivos de liberação sustentada

O desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada é essencialmente baseado em experimentação, sendo proporcionalmente poucos nesse campo os trabalhos como os apresentados nas seções anteriores que tratam de seus fundamentos físico-químicos e nos quais se buscam estabelecer modelos matemáticos e realizar previsões das propriedades de DDS a partir das estruturas moleculares envolvidas. Nesse tipo de trabalho, o ponto de partida do desenvolvimento são as propriedades finais desejadas, e a caracterização físico-químico-biológica dos sistemas serve como ferramenta na validação e otimização de DDS desenvolvidos para esse fim, ou previamente existentes na literatura.

Devido a essa característica fortemente experimentalista, na literatura pesquisada para o desenvolvimento desta pesquisa foram apresentadas inúmeras abordagens de caracterização, utilizando técnicas analíticas instrumentais tradicionais e também combinações com análises *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* e até mesmo técnicas sensoriais (avaliação de conforto, efeitos no paladar).

As técnicas instrumentais permitem caracterizar os DDS do ponto de vista estrutural, descrevendo propriedades como distribuição de diâmetros, carregamento de ativo, propriedades reológicas, morfologia ou, ainda, suas características funcionais, como bioadesividade/tempo de residência na cavidade oral, cinética de liberação do ativo, permeação da mucosa epitelial, etc.

Os artigos apresentados a seguir foram selecionados para oferecer, ao mesmo tempo, uma visão da variedade e das técnicas mais utilizadas.

Moustafine *et al.* (2006) acompanharam a formação de complexos polieletrólíticos (PEC), entre o polímero policatiônico Eudragit E PO (EE) e o polímero polianiônico Eudragit L100-55 (EL) (marcas comerciais), através de turbidimetria a 600 nm, por espectrofotometria de UV-vis e viscosimetria. Verificaram que na proporção equimolar atinge-se o máximo de turbidez e o mínimo de viscosidade do sobrenadante após formação do complexo e

centrifugação, indicando que na razão molar 1:1 ocorre o máximo de interação eletrostática entre os polímeros formadores do complexo. Realizaram, também, análise estrutural do complexo através de espectroscopia no infravermelho (FTIR) comparando seu espectro com o dos polímeros puros e também com o de uma mistura física de EE e EL. A análise estrutural foi complementada pela realização de calorimetria diferencial de varredura com temperatura modulada (MTDSC), que mostrou que a T_g dos IPEC sempre foi maior que a do polímero de T_g mais baixa, EE, indicando a inexistência de microdomínios de EE isolado em meio ao PEC, hipótese essa levantada pela observação das bandas puras relativas ao grupo dimetilamino não protonado em 2776 e 2824 cm^{-1} .

Foram avaliados os comportamentos de intumescimento e liberação de ativo, respectivamente, por gravimetria e teste de dissolução padrão (método do cesto), ambos de acordo com a farmacopéia americana USP XXV. A concentração de ativo (ibuprofeno, um antiinflamatório e analgésico) liberado ao longo do tempo foi acompanhada por espectrofotometria a 264 nm (MOUSTAFINE *et al.*, 2006).

Bromberg *et al.* (2001) acompanharam a liberação *in vitro* de íons prata (Ag^+) de seu DDS, desenvolvido para inserção em bolsas periodontais. A quantificação de Ag^+ nas alíquotas obtidas durante o experimento foi realizada eletroquimicamente para liberação medida em meio aquoso, com eletrodo de prata/sulfeto de prata, e foi realizada por espectrometria atômica de plasma indutivamente acoplado (ICP), para liberação medida no soro sanguíneo humano. A liberação se manteve por até 4 semanas. As alterações morfológicas do *wafer* foram acompanhadas qualitativamente através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de Raio-X com dispersão de energia (EDS). Acompanhando também a perda de massa do *wafer*, por gravimetria, estabeleceram que o mecanismo de liberação baseia-se na bioerosão do dispositivo (BROMBERG *et al.*, 2001).

Needleman *et al.* (1998) buscaram relacionar propriedades reológicas e de hidratação de hidrogéis de quitosana, goma xantana e poli(óxido de etileno), utilizados em DDS periodontais na forma de filmes, à sua retenção (adesão) à

mucosa bucal, medida *in vitro* e *in vivo*. As medidas de hidratação dos filmes em água, solução tampão fosfato 0,1 M ou solução tampão fosfato 0,1 M misturada a 25 % v/v de saliva humana, em um dispositivo desenvolvido pelos autores, foram realizadas por acompanhamento gravimétrico. As medidas indicaram relação direta entre a taxa de hidratação e a retenção dos filmes aderidos à mucosa.

Análises reológicas contínuas e oscilatórias foram aplicadas aos géis em sua forma inicial e, em alguns casos, também para géis com 1% e 10 % de hidratação. As curvas de fluidez dos polímeros (tensão de cisalhamento em função da taxa de tensão aplicada) permitiram verificar as diferenças de comportamento entre eles, em termos de linearidade da relação e reversibilidade do comportamento (histerese). Os experimentos oscilatórios de torque e frequência variáveis foram realizados na região viscoelástica linear, onde não ocorrem prejuízos à estrutura dos géis. O módulo de armazenamento, G' , e o módulo de perda, G'' , fornecem evidência direta da natureza física das formulações: G' é o componente elástico, ou de armazenamento de energia, que implica na existência de um componente estrutural no gel; G'' é o componente viscoso, indicando a tendência do gel a fluir em resposta a um estímulo mecânico. Verificou-se maior retenção na mucosa das formulações com maior componente elástico, ou estrutura de gel. Além disso, formulações que mantiveram suas propriedades reológicas após aumento de seu nível de hidratação também mostraram maior retenção na mucosa (NEEDLEMAN *et al.*, 1998).

Bruschi *et al.* (2007) e Jones *et al.* (2009) fizeram extensa caracterização das propriedades viscoelásticas, mecânicas e mucoadesivas de misturas poliméricas sensíveis à temperatura para uso em periodontologia, com diferentes concentrações de poloxamer 407 (P407), e carbopol 934P (C934P) – em um dos casos adicionadas de extrato de própolis (EP), utilizando ensaios reológicos e mecânicos.

As propriedades reológicas foram medidas por reometria de cisalhamento (fluxo) contínuo, utilizando a relação de Oswald-de-Waele:

Equação 21

$$\sigma = k\gamma^n$$

Na equação 21, σ é a tensão de cisalhamento (Pa), k é o índice de consistência [(Pa.s)ⁿ], γ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹) e n é o índice de comportamento sob cisalhamento (sem dimensão).

As propriedades viscoelásticas foram medidas através de reometria oscilatória em função da temperatura. O cálculo dos módulos de armazenamento e perda, G' e G'' , da viscosidade dinâmica, η' , e da tangente de perda, $\tan \delta$, para formulações monopolímericas e para formulações binárias, permitiu verificar a presença de interações entre os polímeros P407 e C934P, através da Equação 22:

Equação 22

$$\Delta G' = G'_{mix(P407/C934P)} - (G'_{P407} + G'_{C934P})$$

Foram avaliadas propriedades mecânicas através de ensaios de compressão e a mucoadesividade, através de análise tensiométrica (ensaios de tensão de destacamento entre duas superfícies, uma recoberta com formulação, a outra um disco recoberto com mucina) (BRUSCHI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009).

Sudhakar *et al.* (2006) apresentam extensa revisão sobre sistemas bioadesivos para liberação de ativos na cavidade oral. Diversos métodos descritos anteriormente para medir bioadesão foram apresentados e classificados em quantitativos e qualitativos. Quantitativos: determinação de parâmetros mecânicos (despелamento, tensão/deformação e tensão de cisalhamento); formação de complexo com partículas coloidais de ouro e medidas espectrofotométricas a 525 nm, coraçào direta com azul de alcian ou soluçào de eosina. Qualitativos: métodos viscosimétricos (reologia dinâmica); sedimentação por ultracentrifugação; avaliação de mudanças de topografia por microscopia de força atômica;

condutância elétrica; marcador fluorescente; inibição da ligação de lecitina, medida colorimétrica e avaliação sensorial.

Harding, em sua revisão sobre sistemas bioadesivos, faz outro tipo de distinção: chama de método macroscópico a análise tensiométrica de separação de duas superfícies, uma lâmina coberta com muco e outra com o polímero em avaliação. Por outro lado, cita métodos capazes de fornecer informações para o entendimento da interação molecular entre mucinas/mucosa e os polímeros envolvidos: viscosimetria/reometria, ressonância plasmônica de superfície, espalhamento dinâmico de luz, turbidimetria, cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC), sedimentação por ultracentrifugação e técnicas de imagem – microscopias eletrônicas e de força atômica. Enfatiza a importância e praticidade da técnica de ultracentrifugação analítica, devido à ampla gama de tamanhos de partículas possível de ser analisada e sua habilidade em separar e analisar soluções de macromoléculas sem necessidade de meios adicionais de separação (HARDING, 2006).

Deacon *et al.* (2000) utilizaram microscopia de força atômica (AFM) para estudar as interações moleculares entre mucina gástrica de porco, purificada, e quitosana. As imagens topográficas permitiram distinguir claramente entre o arranjo conformacional estendido assumido pelas cadeias de glicoproteínas de que a mucina é composta, e também pelas cadeias de polissacarídeo da quitosana, e o arranjo em agregados formados quando ambas as substâncias são misturadas em solução. Tais dados mostraram total concordância com resultados prévios obtidos pelo grupo, de estudo dessas mesmas interações através de técnicas de hidrodinâmica molecular, microscopia eletrônica e de tunelamento.

Kockisch *et al.* (2003) analisaram as propriedades mucoadesivas de micropartículas poliméricas de potencial uso oral através de medidas de força de destacamento, após 2 minutos de contato, entre uma camada de 5 mg de microesferas aderidas a uma superfície plana e uma amostra de mucosa esofágica porcina esticada para adquirir forma plana e área com 11 mm de diâmetro. As medidas obtidas geraram curvas de força em função da distância,

que permitiram também calcular o trabalho total de adesão (área sob a curva). Utilizando técnica semelhante e aplicação de tensão constante de baixa intensidade (35 mN) à interface aderida, mediu-se a duração da ligação adesiva (até ocorrência de falha adesiva). Além disso, caracterizaram morfologicamente as micropartículas obtidas através de microscopia eletrônica de varredura e determinam seus diâmetros médios através de espalhamento de laser.

Modelos de mucosa epitelial para avaliação de bioadesividade

A caracterização do comportamento de DDS na cavidade oral, nos casos em que se visa à liberação local do ativo ou sua permeação através da mucosa bucal para ação fisiológica, pressupõe que se utilize um bom modelo para medir bioadesão e/ou propriedades de barreira/permeação; a mucosa bucal porcina é considerada de maneira geral boa opção (İKINCI *et al.*, 2002, KOCKISCH *et al.*, 2003).

Em 1984, Park e Robinson propuseram uma técnica experimental para quantificar as propriedades bioadesivas de polímeros, permitindo estabelecer relações com as estruturas poliméricas. A técnica consistiu na marcação da camada lipídica de células conjuntivas epiteliais humanas com pireno. A adição de polímeros a esse substrato comprime a camada lipídica de acordo com sua viscosidade, relacionada à interação com o polímero, alterando a medida obtida através de espectrofotometria de fluorescência. Outro marcador utilizado foi isotiocianato de fluoresceína, medindo a despolarização das proteínas marcadas antes e depois da ligação ao polímero. Utilizando essas técnicas, foram comparados sinal e densidade de carga das interações entre a cultura celular e diferentes estruturas de polímeros policatiônicos e polianiônicos, indicando maior bioadesão de poliânions carboxilados.

Jacobsen *et al.* (1995) propuseram o modelo *in vitro* de células TR146, originadas de um nódulo de metástase de carcinoma bucal humano, no pescoço, cultivadas sobre filtros; as células TR146, conforme a caracterização apresentada anteriormente e no artigo em questão, formam culturas estratificadas com

morfologia e características de queratinização comparáveis às do epitélio bucal humano. Através de microscopia eletrônica de transmissão, observou-se crescente número de organelas e desmossomos desenvolvidos ao longo da vida da cultura. Através de medidas de resistência elétrica trans-epitelial (técnica conhecida como TEER) e de estudos sobre permeabilidade de manitol (hidrofílico) e testosterona (lipofílica) marcados com radioisótopos, determinou-se que com 30 dias as culturas apresentaram máxima integridade das camadas celulares. Vários estudos seguiram-se a esse, buscando correlações entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, e efeitos de outras variáveis, como pH do meio fisiológico, por exemplo.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Amostras de Quitosana (Chitopharm S, M e L) foram cedidas pela Cognis Brasil. Alginato de sódio (Manugel LBA) foi cedido pela ISP do Brasil. Digluconato de clorexidina foi adquirido da Sigma-Aldrich. Outras substâncias utilizadas foram reagentes de grau analítico.

3.1.2. Preparo de soluções

3.1.2.1. Quitosana (QTS)

Soluções estoque de QTS “S” a 1,0% (m/V) foram preparadas em solução de ácido acético a 1%, sob agitação mecânica, com barra magnética, por 24 horas. Foi feito ajuste para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

3.1.2.2. Alginato (ALG)

Solução estoque de ALG 1,5% (m/V), em água, foi preparada com agitação mecânica, com barra magnética, por várias horas.

3.1.2.3. Digluconato de clorexidina (CHG)

Soluções estoque de CHG 1,0% (m/V) foram preparadas pela diluição da solução original de CHG a 20% (m/V).

3.1.2.4. Cloreto de cálcio (CaCl₂)

Soluções aquosas de CaCl₂ a 0,5, 1 e 2 % (m/V) foram preparadas por dissolução sob agitação mecânica, com barra magnética.

3.1.2.5. Fase móvel para Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de quitosana

Solução tampão acetato foi preparada diluindo 30 mL de ácido acético em 1000 mL de água, dissolvendo 27,22 g de acetato de sódio, sob agitação mecânica, com barra magnética.

3.1.2.6. Fase móvel para Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de alginato

Solução 100 mM de cloreto de sódio (NaCl), 50 mM de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e 200 ppm de azida de sódio (NaN_3) foram preparadas por dissolução, sob agitação mecânica, com barra magnética.

3.1.2.7. Fase móvel e diluente para Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

Fase móvel A: mistura de acetonitrila (30%) e solução tampão fosfato pH 3 adicionada de trietilamina 0,5% (70%).

Fase móvel B: acetonitrila.

Diluente para amostras de HPLC: solução tampão fosfato pH 3.

3.1.2.8. Saliva artificial (s.a.)

Para preparar 1 L de s.a., 115,59 mg de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 11,18 g de cloreto de potássio (KCl), 0,06 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 2,42 g de tampão tri-hidroximetilaminometano (Tris) foram diluídos em 700 mL de água; o pH foi ajustado a 7, com ácido clorídrico (HCl) concentrado e o volume completado para 1000 mL (SERRA e CURY, 1992).

3.1.3. Membrana de diálise

A membrana de diálise, feita de celulose regenerada, com porosidade de 25 Å e corte de massa molar de 12 a 16 kDa, foi adquirida da Inlab na forma de sacos com 25 mm de largura, 16 mm de diâmetro e 30 cm de comprimento. Antes do uso, foram cortadas tiras com 10 cm e colocadas para ferver em água deionizada por 30 minutos, de acordo com recomendações do fabricante, para eliminar sais e outras impurezas. As membranas foram armazenadas sob refrigeração depois que a água em que foram fervidas foi substituída por nova água deionizada.

3.2. Caracterização das substâncias utilizadas

3.2.1. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)

Os espectros foram registrados no espectrômetro FTIR Bomem MB Series, modelo MB102, utilizando pastilhas de KBr como suporte, prensadas a 5 ton.

3.2.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas calorimétricas foram registradas no calorímetro diferencial DSC TA Instruments, modelo 2910, nas condições: fluxo de argônio; rampa de aquecimento 10°C/min; aquecimento de 25 a 250°C; amostra com aproximadamente 5 mg.

3.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas no analisador termogravimétrico TGA TA Instruments, modelo 2050, nas condições: fluxo de argônio; rampa de aquecimento 10°C/min; aquecimento de 10 a 600°C; amostra com aproximadamente 5 mg.

3.2.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

3.2.4.1. Quitosana

As amostras de QTS foram dissolvidas a 0,1% em tampão acetato pH 4,5 e filtradas em membrana de 0,45 µm. A fase móvel foi tampão acetato pH 4,5 e as análises de GPC foram feitas com fluxo de 0,8 mL/min em duas colunas ultrahydrogel linear (7,8 x 300 mm) em série. A temperatura do forno que contém as colunas e os detectores foi 40°C. Foram utilizados detectores Viscotek modelo TDA 302 contendo: refratômetro, viscosímetro e de espalhamento de luz de 7° e 90°. Os dados foram analisados pelo programa Viscotek OmniSEC v.4.1.0.224.

3.2.4.2. Alginato

A amostra de ALG foi dissolvida a 0,2% em água. A fase móvel consistiu de solução 100 mM de cloreto de sódio (NaCl), 50 mM de fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) e 200 ppm de azida de sódio (NaN₃). As análises de GPC de ALG foram feitas injetando 199 µL de amostra, com fluxo da fase móvel de 0,8 mL/min em duas colunas ultrahydrogel linear (7.8 x 300 mm) em série. A temperatura do forno que contém as colunas e os detectores foi de 40°C. Foram utilizados detectores Viscotek modelo TDA 302 contendo: refratômetro, viscosímetro e espalhamento de luz de 7° e 90°. Os dados foram analisados pelo programa Viscotek OmniSEC v.4.6.2 (WEST *et al.*, 2007).

3.2.5. Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

3.2.5.1. Quitosana

As amostras de QTS “S”, “M” e “L” foram analisadas para determinar seu grau de desacetilação (GD) (HEUX *et al.*, 2000). Espectros de RMN ^{13}C , das amostras sólidas, foram obtidos por CP/MAS (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico), no aparelho Bruker 400MHz, com sonda 3R a 10kHz.

3.2.5.2. Alginato

A amostra de alginato de sódio foi analisada para determinar sua composição em termos de fração de grupos guluronato (G) e manuronato (M) (SALOMONSEN *et. al*, 2009A; SALOMONSEN *et. al*, 2009B). Espectros de RMN ^{13}C , das amostras sólidas, foram obtidos por CP/MAS (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico) e HPDEC (desacoplamento de alta potência), no aparelho Bruker 300MHz, com sonda 2R a 10kHz.

3.3. Metodologia de quantificação de clorexidina

Os estudos para quantificar digluconato de clorexidina (CHG) foram realizados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 30 – NF 25, 2007), fluxo 1mL/min, no equipamento HPLC Agilent 1200 Series, com coluna Zorbax C18 L1 Agilent (4,6 x 250 mm) com partículas de 5 μm e detector de 254 nm.

Fase móvel A: mistura de solução tampão fosfato pH 3 contendo 0,5% de trietilamina (70%) e acetonitrila (30%).

Fase móvel B: acetonitrila.

O diluente utilizado das amostras foi preparado de acordo com a Farmacopéia americana, consistindo de tampão fosfato pH 3 (USP 30 – NF 25, 2007).

A curva analítica foi construída na faixa de 0,25 a 2,5 μg de CHG e a quantificação de CHG incorporado às amostras de MPs obtidas seguiu a metodologia de separação descrita em 3.5.3., realizando as diluições requeridas para injeção das amostras no cromatógrafo HPLC. A quantificação de CHG liberada em função do tempo nos estudos de cinética de liberação de ativo seguiu a metodologia descrita em 3.5.4.

3.4. Preparação de suspensão de micropartículas (MPs) de quitosana (QTS) e alginato (ALG) contendo clorexidina (CHG)

3.4.1. Avaliação de métodos de obtenção e agitação

Partindo dos métodos de obtenção reportados na literatura (BARUCH e MACHLUF, 2006; LI e MCCLEMENTS, 2001; TAKKA e GÜREL, 2010; VOO *et al.*, 2011; WITTAYA-AREEKUL *et al.*, 2006), realizou-se uma etapa inicial para reproduzir e avaliar algumas das condições descritas. Com base nos resultados reportados nessas publicações e nos obtidos experimentalmente, criou-se um delineamento experimental simples, 2^2 , para avaliação simultânea de dois métodos de obtenção de micropartículas e dois métodos de agitação do sistema durante a obtenção.

Métodos de obtenção:

1. Em um estágio: uma mistura de 30 mL de solução de QTS 2,5 mg/mL, 15 mL de H₂O e 1,5 mL de CHG 20% foi adicionada sobre 30 mL de ALG 2,5 mg/mL, sob agitação (métodos de agitação A e B descritos a seguir). Os 15 mL de água foram adicionados para compensar a não adição de CaCl₂ e garantir mesmo volume final e mesmas concentrações finais das substâncias que no Método 2.

2. Em dois estágios: 15 mL de CaCl₂ 5 mg/mL foram adicionados sobre 30 mL de ALG 2,5 mg/mL sob agitação; após estabilização da viscosidade do meio, uma mistura de 30 mL de solução de QTS 2,5 mg/mL e 1,5 mL de CHG 20% foi adicionada, ainda sob agitação (métodos de agitação A e B descritos a seguir).

Métodos de agitação:

A. Durante a obtenção, agitação durante 10 minutos em dispersor de alto cisalhamento Ultra-Turrax® IKA T-25, a 8000 rpm; em seguida, agitação suave por 6 horas em agitador magnético.

B. Durante a obtenção, agitação durante 10 minutos em agitador magnético na velocidade de rotação média; em seguida, agitação suave por 6 horas em agitador magnético.

A Tabela 2 descreve o delineamento experimental de dois fatores em dois níveis. A Tabela 3 descreve os experimentos realizados através da combinação

entre os dois fatores (método de obtenção e método de agitação) e seus níveis, codificados como -1 e +1 para o delineamento experimental.

Tabela 2: Delineamento experimental fatorial 2^2 para obter suspensões de micropartículas de quitosana/alginato, variando métodos de obtenção e agitação.

Fator	Nível	
	-1	+1
Método de obtenção	1	2
Método de agitação	A	B

Tabela 3: Descrição dos experimentos variando métodos de obtenção e agitação para obter suspensões aquosas de micropartículas de quitosana e alginato.

Experimento	Método de obtenção	Método de agitação
1	1	A
2	1	B
3	2	A
4	2	B

Em todos os experimentos desta etapa, foi utilizada mesma quantidade de clorexidina (CHG): 1,5 mL da solução original a 20% (m/V), resultando em concentração final total na suspensão 3,9 mg/mL.

Após definir a melhor combinação de métodos de obtenção e agitação, foi preparada uma suspensão de MPs nessas condições, porém sem adição de CHG, com finalidade de servir de experimento controle para os testes de quantificação de CHG e eficácia microbiológica.

3.4.2. Influência dos componentes da suspensão

Foi feito delineamento experimental fatorial 2^3 , com ponto central em duplicata, mantendo constantes a massa total de biopolímero (150 mg), o volume total das suspensões (76,5 mL) e as condições mecânicas de preparação: em todos os

experimentos foi utilizada a obtenção em dois estágios e a agitação em dispersor de alto cisalhamento, correspondente à combinação entre o método de obtenção 2 e o de agitação A já descritos. As variáveis testadas foram: massa de CHG adicionada, razão entre as massas de QTS e de ALG e a razão entre as massas de CaCl₂ e de ALG. O ponto central foi fixado com a formulação obtida nos experimentos anteriores, que serviram para estabelecer os parâmetros iniciais do trabalho. A Tabela 4 descreve o delineamento experimental e a Tabela 5 os experimentos realizados. O experimento “0” corresponde ao ponto central.

Tabela 4: Delineamento experimental fatorial 2³, com ponto central, para obter suspensões de MPs, variando a massa de CHG adicionada, a razão entre as massas de QTS e de ALG e razão entre as massas de CaCl₂ e ALG.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
mCHG / mg	150	300	450
QTS / ALG	1:2	1:1	2:1
CaCl ₂ / ALG	1:2	1:1	2:1

Tabela 5: Experimentos realizados a partir do delineamento experimental descrito na Tabela 4.

Experimento	mCHG, mg	mQTS / mALG, mg	mCaCl ₂ , mg
0	300	75/75	75
1	150	50/100	200
2	150	50/100	50
3	150	100/50	100
4	150	100/50	25
5	450	50/100	200
6	450	50/100	50
7	450	100/50	100
8	450	100/50	25

3.5. Caracterização das suspensões de micropartículas

3.5.1. Distribuição de diâmetros

Diâmetros medianos (D) e distribuição de diâmetros de partículas (PSD, do inglês *particle size distribution*) foram medidos por difração de *laser*, em equipamento Malvern Mastersizer-2000. As medidas foram registradas como frequência volumétrica em função do diâmetro. Algumas foram também convertidas para frequência numérica de partículas em função do diâmetro, para comparação.

3.5.2. Estabilidade

Algumas das preparações obtidas na primeira fase da pesquisa tiveram suas PSD monitoradas periodicamente, por período de até sete meses, quando chegaram ao fim.

3.5.3. Carregamento de ativo e eficiência de incorporação

O carregamento de clorexidina (CHG) nas micropartículas de QTS/ALG, em relação à massa total de polímero da suspensão e em relação à de CHG adicionada, foi calculado por diferença, quantificando CHG livre na fase líquida de cada suspensão: 500 µL de suspensão de MPs foram colocados em dispositivo de ultrafiltração Amicon® Ultra 0,5 MWCO 100K e centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. O líquido foi coletado e diluído em H₂O. A quantificação foi realizada com medidas em duplicata.

Alternativamente, a separação entre MPs e o líquido original da suspensão foi feita com filtro similar acoplado à seringa de 1 mL, com posterior diluição para quantificação.

O percentual de carregamento (PC%) foi calculado sobre a massa de polímeros em base seca, com a Equação 23 e a eficiência de incorporação (EI%), com a Equação 24.

Equação 23

$$PC(\%) = \frac{(massa\ CHG\ total - massa\ CHG\ livre)}{(massa\ QTS\ total + massa\ ALG\ total)} \times 100$$

Equação 24

$$EI(\%) = \frac{(massa\ CHG\ total - massa\ CHG\ livre)}{(massa\ CHG\ total)} \times 100$$

3.5.4. Perfis de liberação

O procedimento descrito a seguir foi utilizado para acompanhar a cinética de liberação de clorexidina das suspensões de micropartículas.

Uma alíquota (8 mL) da suspensão em estudo foi centrifugada ou deixada para decantar em tubo plástico com tampa de rosca. O líquido foi então retirado e substituído por 8 mL da solução de saliva artificial (s.a.). As MPs foram re-suspendidas na s.a. e transferidas para um saco de membrana de diálise, fechada nas extremidades com presilhas apropriadas. Esse dispositivo foi colocado em frasco de vidro com tampa e no tempo zero da liberação adicionado ao frasco um volume conhecido (aproximadamente 100 mL) de s.a., suficiente para cobrir o saco até a parte inferior da presilha superior.

Essa montagem foi deixada em estufa a 35 °C, com agitação magnética. Em intervalos pré-definidos, uma alíquota de 1 mL da saliva artificial foi retirada e seu volume repostado com s.a. na mesma temperatura do sistema de liberação. Esse procedimento foi repetido em intervalos cada vez maiores, até atingir o tempo máximo de cada estudo (2 ou 7 dias). Cada experimento foi realizado em duplicata.

De maneira semelhante, dois experimentos adicionais foram realizados como referência:

- Estudo de liberação em que o líquido original da suspensão relativa ao ponto central não foi substituído por s.a., ou seja, em que as suspensões foram colocadas dentro do saquinho na forma como foram obtidas;
- Estudo de liberação com clorexidina livre, diluída em água na mesma concentração em que foi adicionado à suspensão do ponto central.

3.5.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV, através da análise de 20 µL de suspensão diluída (1:50) seca sobre suporte metálico ou lâmina de vidro, seguida de metalização a ouro-paládio.

3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura com dispositivo de emissão de campo (MEV-FEG)

A MEV-FEG foi feita em microscópio eletrônico de varredura marca FEI, modelo Quanta 600 FEG e detector de EDS, tecnologia SDD, da marca Bruker, modelo Xflash Quantax 400 e *software* analisador Esprit, também da Bruker. Esse equipamento tem capacidade de realizar análises em baixo vácuo e sem metalização, conhecidas como condições ambientais, e foi utilizado na Faculdade de Engenharia de Minas da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

As MPs foram analisadas em diluições de 1:2 e 1:10 da concentração de preparo das suspensões, após substituição de todo seu líquido original por água deionizada.

3.6. Avaliação da eficácia antimicrobiana

Os procedimentos de avaliação de eficácia antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e seguiram normas padronizadas para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras e serão sucintamente descritos a seguir (NCCLS, 2002).

As micropartículas QTS/ALG contendo CHG foram avaliadas comparativamente à CHG livre e ao produto comercial Periogard, que contém CHG em concentração de 0,12%.

Um volume conhecido de suspensão foi deixado para decantar de um dia para outro. O líquido sobrenadante foi então descartado e substituído por água e as micropartículas foram ressuspensas. Dessa nova suspensão foram retiradas alíquotas e feitas as diluições necessárias aos experimentos.

3.6.1. Preparo da solução estoque

CHG foi diluída em água, a partir da solução original de CHG a 20% (m/V), para obter solução a 0,24%.

3.6.2. Preparo da placa para diluição

Uma diluição seriada ao meio, a partir da solução estoque de clorexidina, ou da suspensão de micropartículas, foi feita para obter dez concentrações diferentes.

3.6.3. Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose (2%), tamponado com 0,165 M de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS) em pH 7,0, esterilizado por filtração a vácuo (filtro 0,45 µm). O meio não pode ser autoclavado e, pronto, pode ser mantido sob refrigeração, por no máximo, 15 dias.

3.6.4. Cepas padrão

Para os testes de identificação e susceptibilidade a antifúngicos foram utilizadas as cepas padrão *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019), *Candida krusei* (ATCC® 6258) e *Candida albicans* (ATCC® 90028).

3.6.5. Preparo do inóculo

A partir do número de células contadas foi feita nova diluição para obter a concentração final 1×10^4 UFC/mL. Depois que o inóculo foi adicionado à placa teste, uma nova diluição acontece, restando inóculo final com 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.6.6. Execução do teste

Um volume conhecido da suspensão de micropartículas foi deixado em decantação de um dia para outro. Posteriormente a fase líquida foi descartada e substituída por água deionizada e a fase sólida re-suspendida por agitação. A partir dessa nova suspensão foram feitas as pipetagens e diluições necessárias.

Podem ser utilizadas placas de microtitulação com fundo “U” ou fundo chato. O preparo e execução seguiram o esquema da Figura 11.

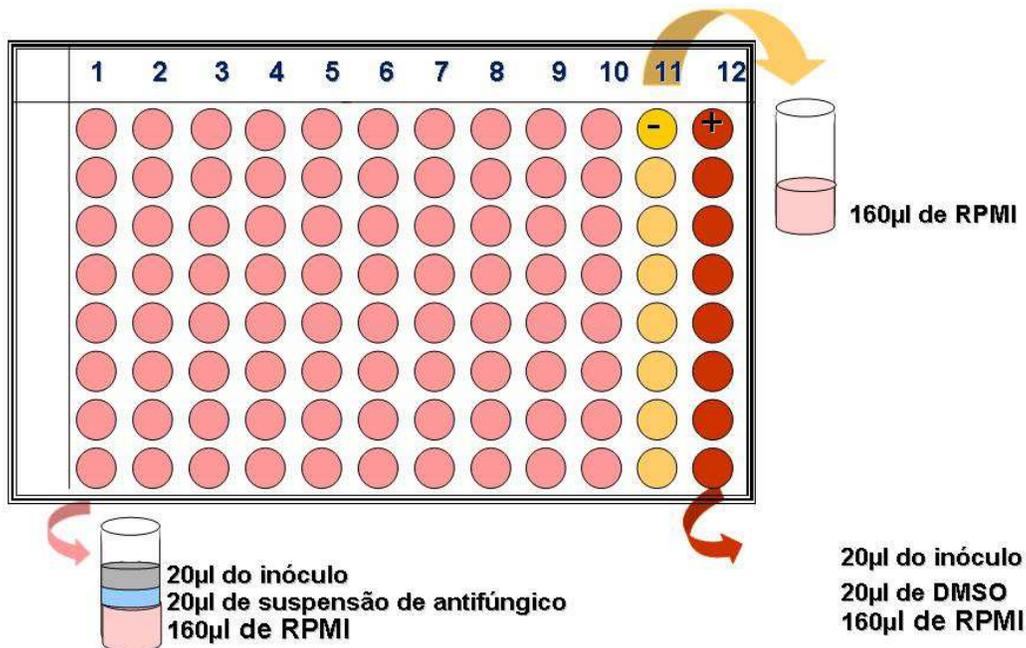


Figura 11: Esquema de preparo da placa de microtitulação para teste de eficácia antimicrobiana. Diagrama cedido por Luzia Lyra (Lab. de Patologia Clínica/FCM/Unicamp).

3.6.7. Leitura dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após 48h (\pm 2h) de incubação a 35°C, o crescimento fúngico em cada poço foi comparado com o do controle positivo (Figura 12), observado visualmente com auxílio de um espelho de leitura (BIANCALANA *et al.*, 2011).

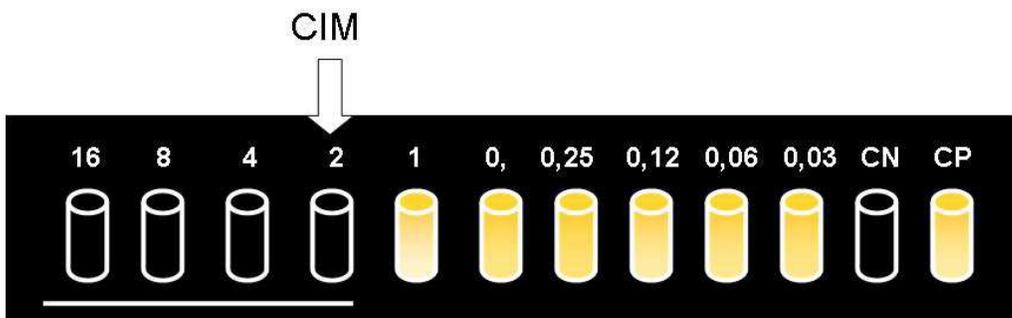


Figura 12: Representação da leitura de CIM para antifúngicos que produzem 100% de inibição de crescimento – aparência semelhante à do controle negativo (CN) em relação à do controle positivo (CP). Diagrama cedido por Luzia Lyra (Lab. de Patologia Clínica/FCM/Unicamp).

3.6.8. Testes de Concentração Fungicida Mínima (CFM)

100 μ L de solução em cada poço, com inibição visível do crescimento, foram colocados em uma seção de placa de Petri com meio de cultura e o crescimento foi observado depois de 24 e 48 horas. A CFM foi determinada como equivalente à do poço com menor concentração a partir do qual não cresceu nenhuma colônia na placa de Petri correspondente (Figura 12a).

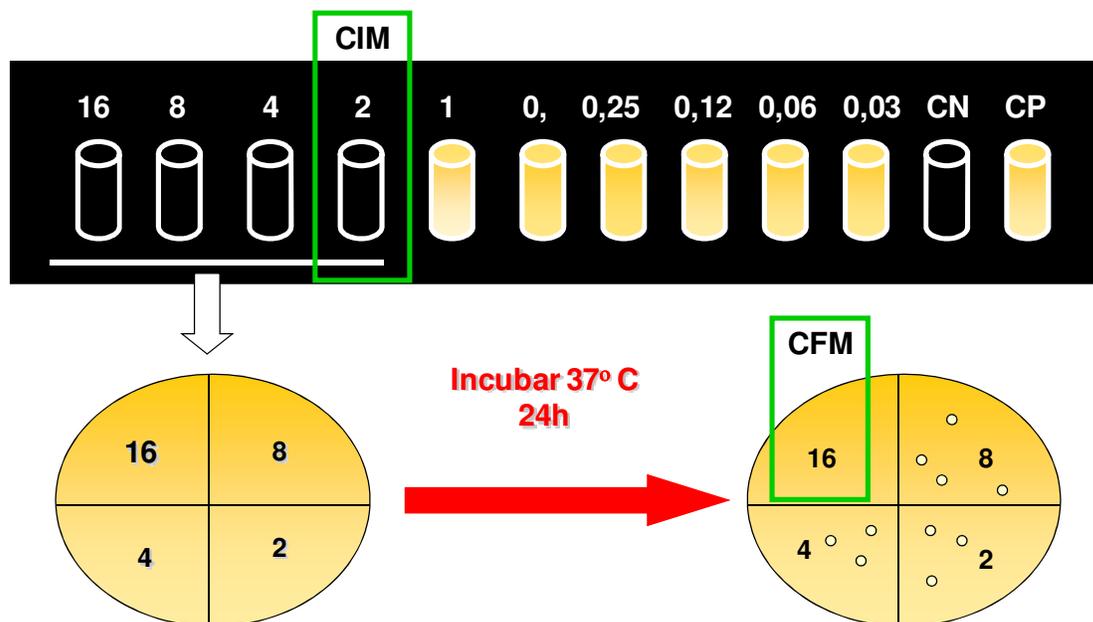


Figura 12a: Representação da leitura de CFM para antifúngicos que produzem 100% de inibição de crescimento. Diagrama cedido por Luzia Lyra (Lab. de Patologia Clínica/FCM/Unicamp).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das substâncias utilizadas

O objetivo da caracterização físico-química dos principais materiais utilizados nos experimentos de preparação de micropartículas (MP) complexas de quitosana e alginato com clorexidina incorporada foi conhecer ou confirmar os aspectos mais relevantes de sua estrutura, propriedades e grau pureza, que pudessem ser relacionados a características estruturais ou funcionais das MP obtidas.

4.1.1. Espectros de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR), obtidos de quitosana, alginato e digluconato de clorexidina estão nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

4.1.1.1. Quitosana

A atribuição das bandas, juntamente com os comentários de Kasai (2008), encontram-se na Tabela 6 (KASAAI, 2008; WAN *et al.*, 2008).

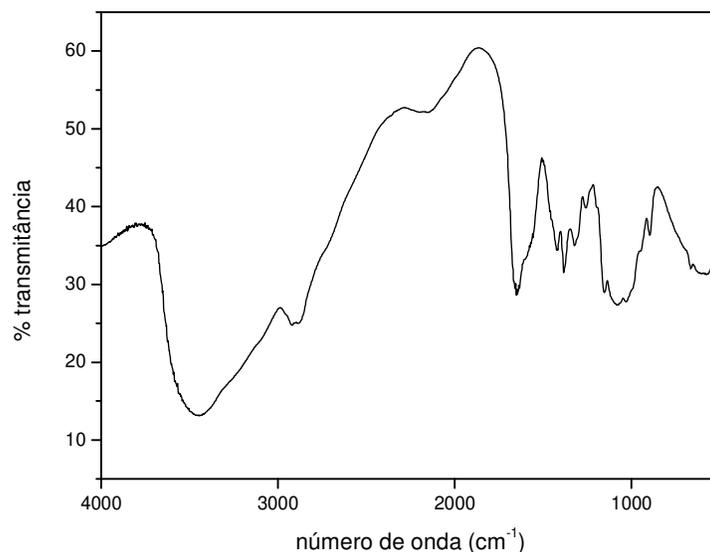


Figura 13: Espectro, na região do infravermelho, de quitosana QTS “S”.

Tabela 6: Bandas de referência para quitosana (KASAAI, 2008; WAN *et al.*, 2008).

3450	estiramento O—H	Banda intensa. O—H de moléculas de água aparece nessa região. O—H se envolve em ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, resultando em banda larga.
3300	estiramento N—H	Ocorre interferência entre as bandas referentes aos estiramentos O—H e N—H. A intensidade desta banda varia com o grau de acetilação (GA).
2930, 2870	estiramento C—H	Banda de intensidade significativa, que não se envolve em ligações de hidrogênio e nem sofre interferência de moléculas de água. A posição dos estiramentos C—H correspondentes ao grupo N-acetila varia com GA.
1655	estiramento C=O de grupos amida I e acetila	
1420	torsão CH ₂	Perfil e intensidade da banda variam com alterações na cristalinidade da quitosana em decorrência do rearranjo de ligações de hidrogênio na posição de grupos OH primários.
1375, 1325, 1261	estiramento e torsão C≡N de grupo amida III	
1160	estiramento assimétrico C—O—C	
1100, 1070, 1030	estiramento C—O	Várias bandas de absorção nessa região, bandas pouco intensas e não claramente resolvidas.
897	estiramento C—O de ligação glicosídica	

4.1.1.2. Alginato

O espectro de absorção no infravermelho do alginato está na Figura 14. A atribuição das bandas encontra-se na Tabela 7 (LAWRIE *et al.*, 2007).

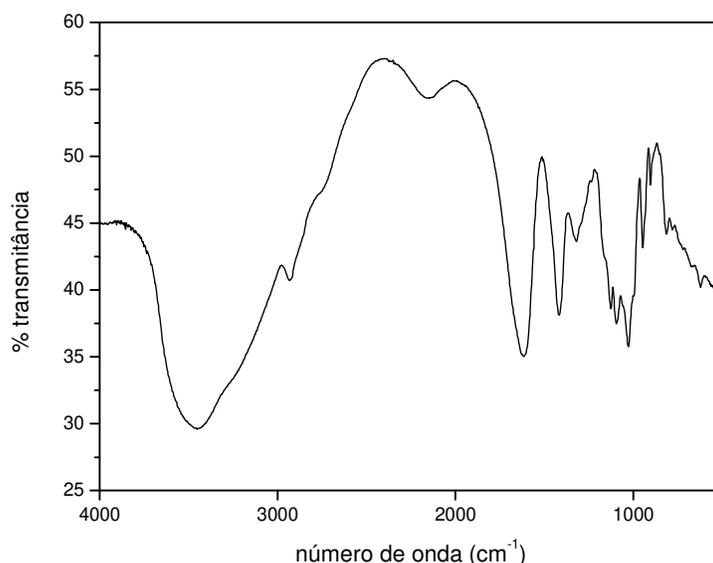


Figura 14: Espectro, na região do infravermelho, de alginato.

Tabela 7: Bandas de referência para alginato de sódio (LAWRIE *et al.*, 2007).

3700 – 3000	estiramento O—H
3000 – 2850	estiramento C—H
1596	estiramento assimétrico COO ⁻
1412	estiramento simétrico COO ⁻
1297	vibração da cadeia polimérica
1081 – 1027	estiramento antissimétrico C—O—C

4.1.1.3. Clorexidina

O espectro de absorção, no infravermelho, do digluconato de clorexidina sólido, obtido por liofilização, está na Figura 15. A atribuição das bandas, que se encontra na Tabela 8, é referente ao diacetato de clorexidina, comercializado na forma sólida (CORTÉS *et al.*, 2001).

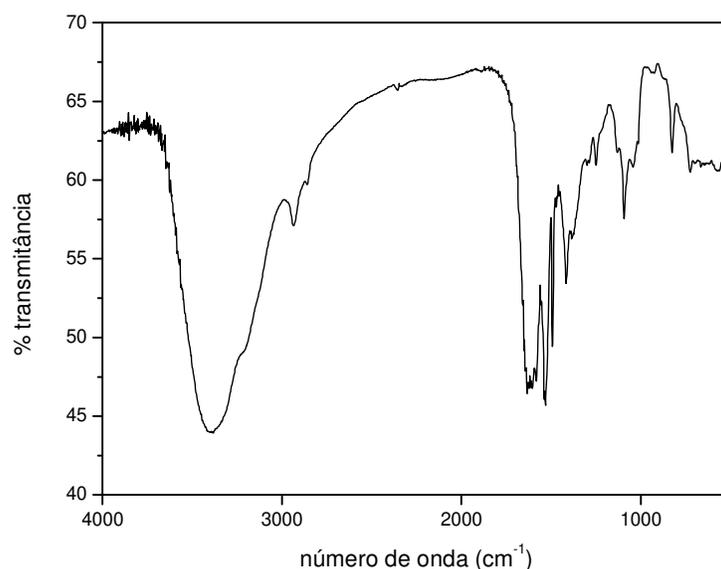


Figura 15: Espectro, na região do infravermelho, de digluconato de clorexidina.

Tabela 8: Bandas de referência para digluconato de clorexidina (CORTÉS *et al.*, 2001).

3500-3300	estiramento O—H
3400	estiramentos simétrico e assimétrico N—H
1650, 1600, 1550, 1500	estiramento C=C aromático
1100	estiramento antissimétrico C—O—C

4.1.2. Espectro de absorção de clorexidina na região do UV-Vis

A Figura 16 mostra o espectro de absorção do digluconato de clorexidina na região do ultravioleta. Em 254 nm há um dos máximos de absorção da substância, indicando ser esse um comprimento de onda adequado para seu acompanhamento nas análises de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme indicado pelo método padrão de quantificação da substância (USP 30 – NF 25, 2007).

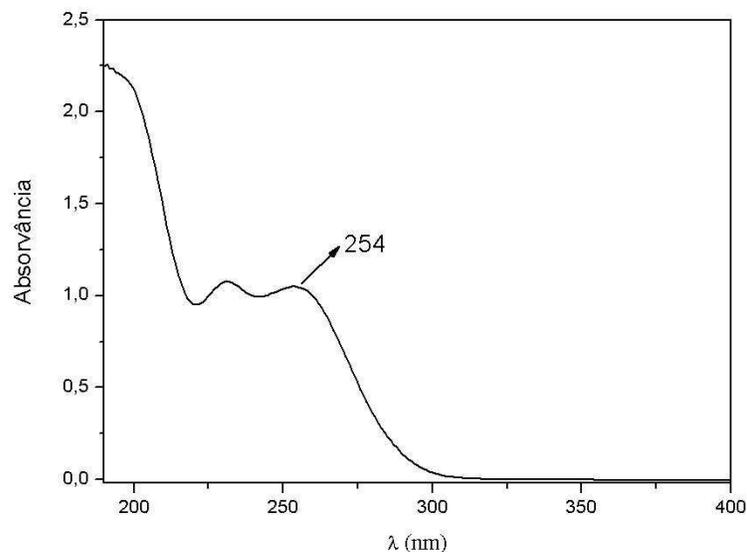


Figura 16: Espectro de absorção de digluconato de clorexidina na região do UV-Vis.

4.1.3. Curvas termogravimétricas

As curvas obtidas através de análise termogravimétrica (TGA) dos polissacarídeos utilizados neste trabalho estão nas Figuras 17 e 18.

Em ambos os casos, foi constatado indicativo de significativa polidispersividade dos tamanhos das cadeias dos polímeros, que degradaram em faixas de temperatura bastante amplas.

4.1.3.1. Quitosana

A quitosana apresentou uma primeira perda de massa gradual da ordem de 12% da massa inicial, na região entre temperatura ambiente e 120°C, típica da evaporação de água adsorvida nos flocos de quitosana. A 245°C, nova perda de massa se iniciou, com máximo em 300°C e perda de mais 46% da massa total até 430°C, indicando sua degradação. Nessa temperatura a perda de massa não se encerrou, mas continuou ocorrendo de forma constante até a temperatura máxima de realização da análise.

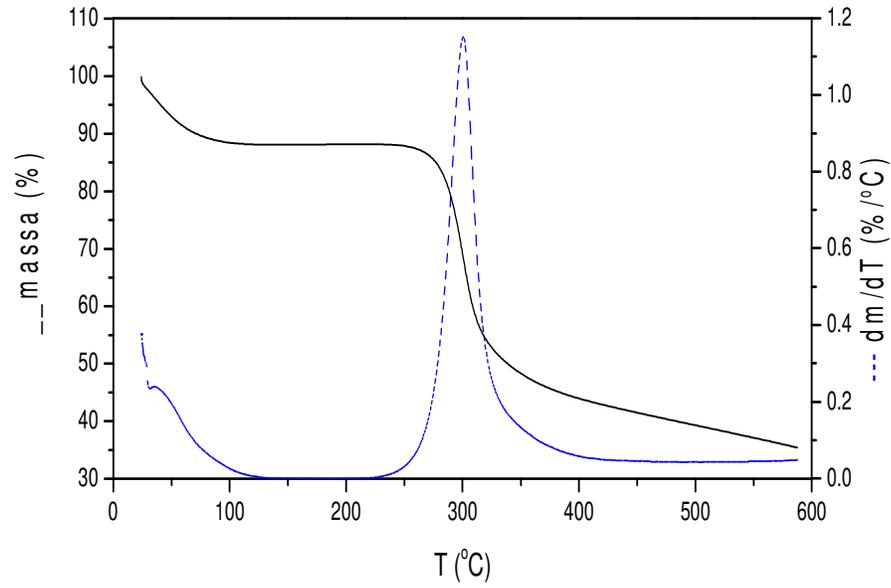


Figura 17: Curva da análise termogravimétrica de quitosana “S”.

4.1.3.2. Alginato

Entre a temperatura ambiente e 150°C , ocorreu também a perda de 12% da massa total da amostra, indicando a saída de água adsorvida. Entre 195°C e 300°C , com máximo em 245°C , a amostra perdeu mais 37% de sua massa inicial mas, da mesma forma como ocorreu com a quitosana, desse ponto em diante a degradação continuou ocorrendo e não se encerrou até a temperatura máxima de realização da análise.

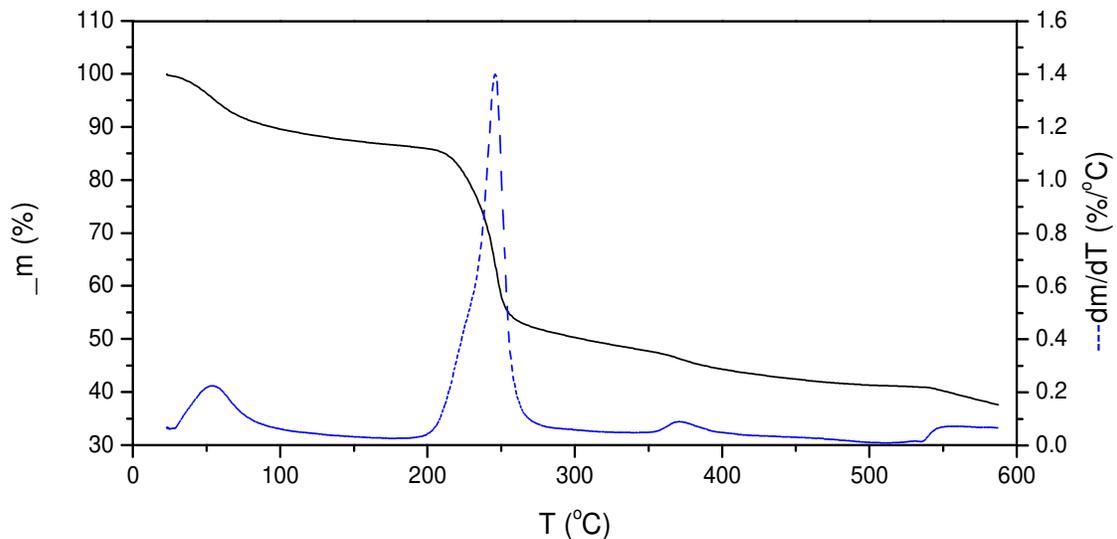


Figura 18: Curva da análise termogravimétrica (TGA) de alginato.

4.1.4. Curvas calorimétricas

As curvas calorimétricas (DSC) obtidas para quitosana e alginato estão nas Figuras 19 e 20.

4.1.4.1. Quitosana

A curva de DSC da quitosana evidenciou um processo endotérmico que se iniciou em torno de 100°C e teve seu ponto de mínimo em 162°C, relacionado à perda de água. Em seguida iniciou-se um processo exotérmico, indicativo de início de degradação das cadeias poliméricas, mas que no entanto não foi totalmente acompanhado pois a análise foi encerrada em 250°C e, como se constatou na análise TGA, a degradação da quitosana se inicia em torno de 245°C e tem seu máximo de perda de massa em 300°C. Tais resultados são coerentes ao observado na análise termogravimétrica e com dados da literatura (NIETO e PENICHE-COVAS, 1991; KITTUR *et al.*, 2002).

4.1.4.2. Alginato

A curva de DSC do alginato de sódio evidenciou um processo endotérmico que se iniciou em torno de 125°C e teve seu ponto de mínimo em torno de 170°C, relacionado à perda de água. Em seguida iniciou-se um processo exotérmico, indicativo de degradação das cadeias poliméricas. Tais resultados são coerentes ao observado na análise termogravimétrica e com dados da literatura (SOARES *et al.*, 2004; SARMENTO, 2006).

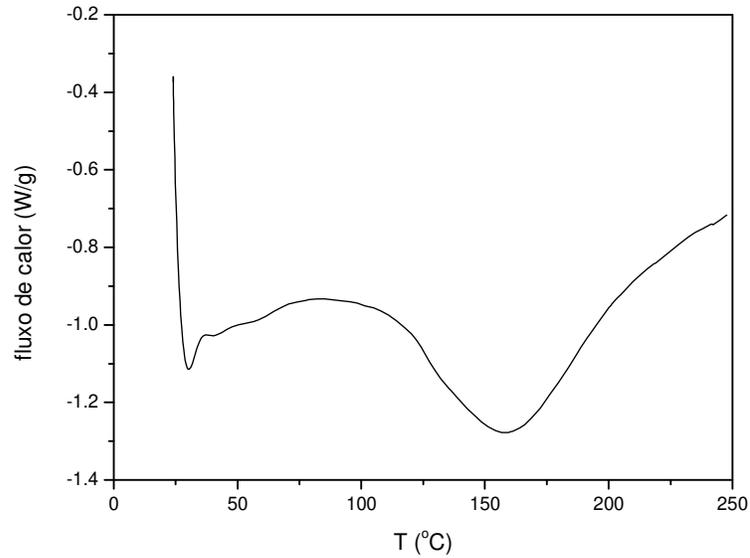


Figura 19: Curva calorimétrica de quitosana “S”, obtida por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

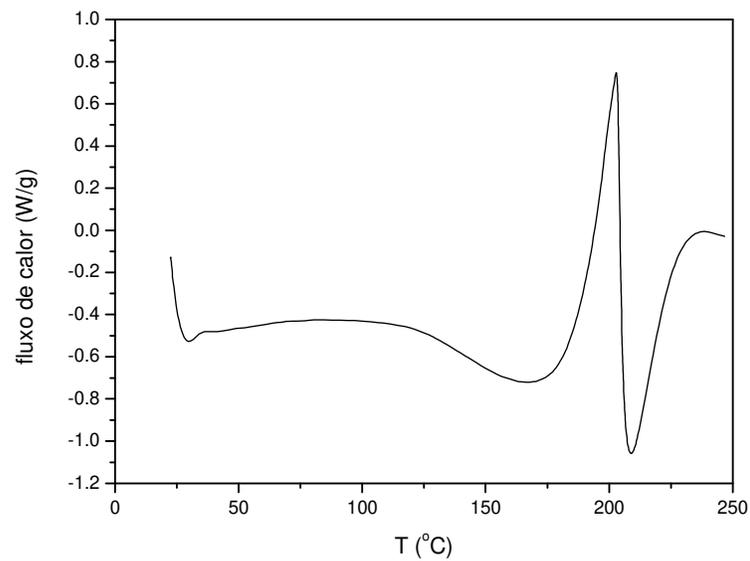


Figura 20: Curva calorimétrica de alginato, obtida por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

4.1.5. Massa molar

4.1.5.1. Parâmetros de massa molar de quitosana

As análises de GPC permitiram determinar os parâmetros médios de distribuição de massa molar das amostras de QTS, necessários para

caracterização de amostras poliméricas. Tais parâmetros são a massa molar média numérica, M_n , massa molar média por peso, M_w , e massa molar média relacionada à raiz quadrada média do raio de giro, M_z . Também o índice de polidispersividade (PDI), M_w/M_n , faz parte da caracterização de uma amostra polimérica (SCHATZ *et al.*, 2004; HIEMENZ e LODGE, 2007).

Cada amostra foi analisada em duplicata. A Tabela 9 apresenta os resultados médios.

Tabela 9: Parâmetros médios de massa molar das amostras de QTS obtidas por análise de GPC. Os relatórios gerados pelo programa encontram-se no Anexo 8.1.

Amostra	M_n (10^5 Da)	M_w (10^5 Da)	M_z (10^5 Da)	PDI
QTS-S	2,5	3,0	3,7	1,2
QTS-M	5,6	6,5	8,2	1,2
QTS-L	7,2	8,6	11	1,2

4.1.5.2. Parâmetros de massa molar de alginato

A análise de GPC permitiu determinar os parâmetros médios de distribuição de massa molar da amostra de ALG. Cada amostra foi analisada em duplicata. A Tabela 10 apresenta os resultados médios.

A determinação foi realizada por meio da calibração universal. Esta calibração tem o seguinte procedimento: inicialmente, foi injetado um padrão de poli(óxido de etileno) para calibração dos detectores e em seguida injetou-se a amostra para obter seus valores de massa molar. Todos os cálculos (calibração e determinação de massa molar) foram realizados pelo software Viscotek OmniSEC versão 4.6.2.

Tabela 10: Parâmetros médios de massa molar das amostras de ALG obtidas por análise de GPC. Os relatórios gerados pelo programa encontram-se no Anexo 8.2.

Amostra	Mn (10 ⁴ Da)	Mw (10 ⁴ Da)	Mz (10 ⁴ Da)	PDI
alginato de sódio Manugel LBA	4,4	7,9	7,3	1,8

4.1.6. Grau de desacetilação de quitosana

A Figura 21 mostra os espectros de RMN¹³C das amostras de quitosana denominadas QTS “S”, “M” e “L”. Na Figura 22 estão identificados os átomos de carbono conforme sua posição relativa no anel glucopiranosídeo, e a Tabela 11 descreve os deslocamentos químicos obtidos. Na literatura, é mais usual a utilização de espectrometria de RMN¹H, por dissolução de quitosana em solução fraca de ácido clorídrico, acético ou fórmico deuterado em água deuterada para cálculo de grau de desacetilação. Contudo, a utilização de técnicas em estado sólido permite a comparação entre quitinas e quitosanas com diferentes composições monoméricas, visto que muitas vezes a solubilização de quitinas é impossível para aplicação da técnica de RMN¹H em solução aquosa deuterada (HEUX *et al.*, 2000).

Não foi possível obter espectros de RMN¹H satisfatórios das amostras de quitosana utilizadas neste estudo, devido à baixa solubilidade resultante nas soluções deuteradas disponíveis. Porém, de acordo com Rinaudo (2006), a técnica de RMN¹³C no estado sólido já foi comparada à RMN¹H com boa concordância entre resultados.

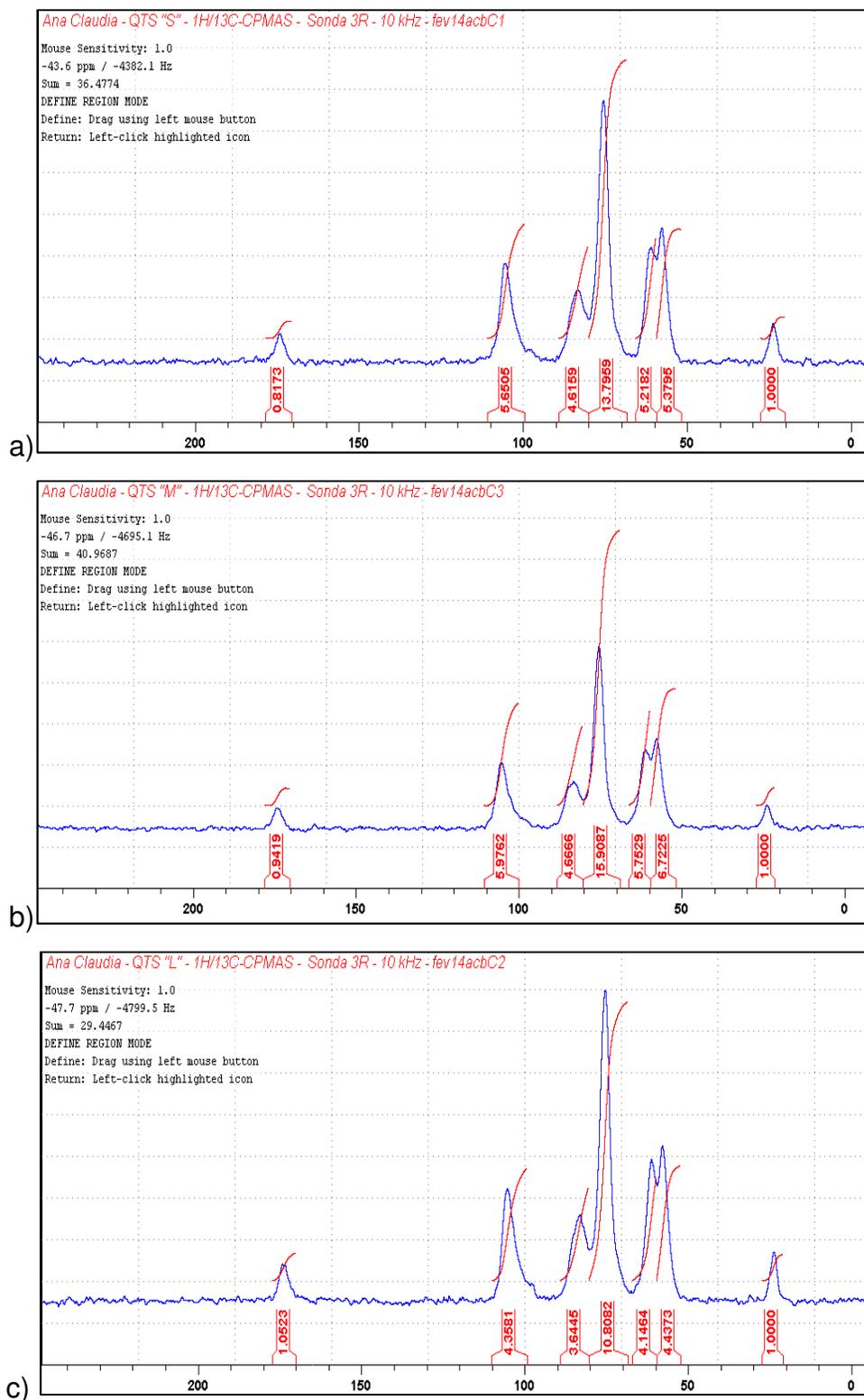


Figura 21: Espectros de RMN¹³C obtidos para quitosanas, e valores de integração de áreas dos picos. a) QTS "S"; b) QTS "M"; c) QTS "L".

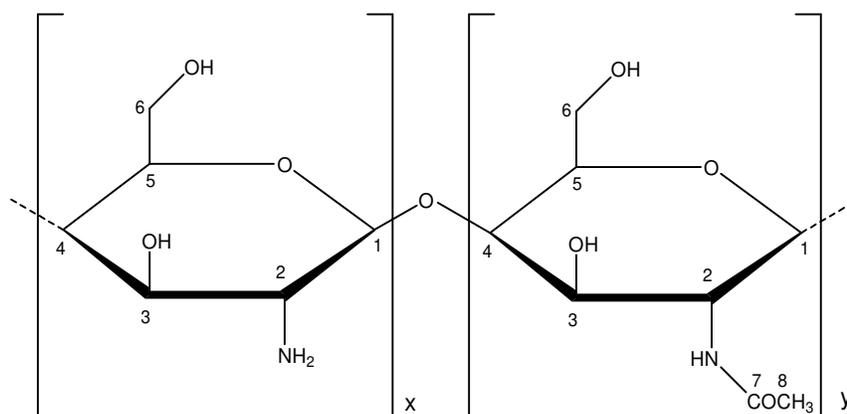


Figura 22: Identificação dos átomos de carbono conforme sua posição relativa no anel glucopiranosídico dos monômeros que compõem as cadeias de quitosana (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000300004&script=sci_arttext. Acesso em 04/8/2013).

Tabela 11: Deslocamentos químicos (em ppm) dos átomos de ^{13}C das quitosanas analisadas, de acordo com a numeração representada na Figura 22 (HEUX *et al.*, 2000). Os espectros com indicações dos deslocamentos químicos estão no Anexo 8.3.

	Amostra		
	QTS "S"	QTS "M"	QTS "L"
C1	105,4	105,5	105,3
C2	57,7	57,8	57,9
C3	75,6	75,4	75,4
C4	83,6	83,2	83,1
C5	75,6	75,4	75,4
C6	61,0	61,1	61,2
C7	174,2	174,4	174,2
C8	23,8	23,9	23,8

Devido a quitosana ser geralmente obtida por desacetilação de quitina no estado sólido, sua forma cristalina é em grande parte herdada desta última e, da

mesma forma como ocorre com a quitina, a boa resolução dos espectros em estado sólido está estreitamente relacionada a maiores graus de cristalinidade. Os espectros obtidos apresentaram sinais razoavelmente bem resolvidos, indicando quitosanas de alta cristalinidade. A isso se relacionou sua baixa solubilidade na solução de D₂O com adição de pequenas quantidades de ácido deuterado, impedindo a obtenção de espectros de RMN¹H satisfatórios (RINAUDO, 2006).

De acordo com Heux *et al.* (2000), o grau de acetilação (GA) é calculado a partir da razão entre a integral do pico do átomo de carbono do grupo metila e a soma das integrais dos picos dos átomos de carbono do anel D-glucopiranosil (átomos C1-C6), conforme Equação 25. Por sua vez, o grau de desacetilação (GD) é calculado pela Equação 26.

Equação 25

$$GA(\%) = \frac{100 \times I_{N-CH_3}}{\left[\frac{1}{6} \times (I_{C1} + I_{C2/C5} + I_{C3} + I_{C4} + I_{C6}) \right]}$$

Equação 26

$$GD(\%) = 100 - GA$$

A Tabela 12 apresenta os resultados de GD obtidos para as amostras de QTS analisadas e os compara ao GD indicado pelo fabricante no certificado de análise, a partir dos espectros de RMN¹³C.

Verificou-se certa divergência entre os valores obtidos e os informados pelo fabricante, o que pode, ao menos em parte, ser explicado pela proposta de cálculo utilizada, na qual o grau de acetilação é calculado com base apenas na integração do pico referente ao átomo de carbono do grupo metila, devido ao fato que o pico relativo ao carbono da carbonila atinge percentual mais baixo (84%) da magnetização máxima teórica, enquanto que os picos referentes ao grupo metila e do anel polissacarídeo atingem 88%. Atribui-se a isso diferenças de cálculo de GA/GD de até 4% (HEUX *et al.*, 2000). A ficha técnica do produto indica que a determinação do grau de desacetilação pelo fabricante foi realizada através da metodologia descrita Farmacopeia Europeia, que é a RMN¹H.

Tabela 12: Grau de desacetilação (GD) de QTS calculado de acordo com Heux *et al.* (2000) e GD informado pelo fabricante (Cognis).

Amostra	GD calculado (%)	GD informado (%)
QTS-S	83	81
QTS-M	85	83
QTS-L	78	80

O grau de desacetilação é uma das propriedades físicas mais importantes da quitosana, juntamente com sua massa molar média. Além disso, a maneira como os monômeros acetoamido e amina se distribuem ao longo da cadeia também terá forte influência sobre a cristalinidade e a solubilidade de QTS em soluções de diferentes pH. No estado sólido, as cadeias são unidas por inúmeras ligações de hidrogênio. A protonação dos grupos amino dos monômeros desacetilados promove dissolução de QTS, cujo GD mínimo é 50%, em soluções aquosas de pH < 6. Quitosanas com GDs mais altos geralmente exigem dissolução em ácido acético ou clorídrico (pH 4,5 – 5). Sua alta insolubilidade em meio neutro ou alcalino é útil, por exemplo, em processos industriais de extração e purificação de QTS de biomassa; sua precipitação ocorre também em soluções de ácidos bivalentes, devido ao favorecimento de interações intermoleculares, pois ânions sulfato, fosfato e outros atuam como agentes de reticulação iônica (HUDSON e JENKINS, 1964; RINAUDO, 2006).

4.1.7. Composição monomérica do alginato (razão M/G)

A Figura 23 mostra o espectro de RMN¹³C do alginato e rotula os sinais de acordo com Salomonsen *et al* (2009B). Na Figura 24 estão identificados os átomos de carbono conforme sua posição no anel manuronato (M1-M6) ou guluronato (G1-G6) e a Tabela 13 descreve os deslocamentos químicos e as intensidades relativas dos sinais.

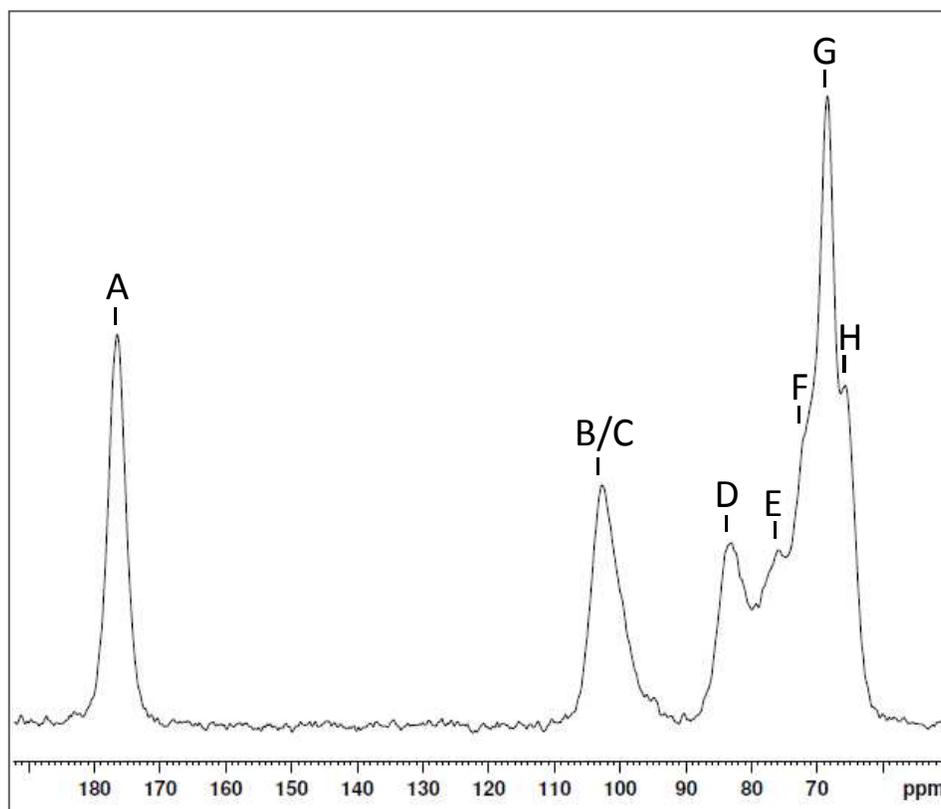


Figura 23: Espectro de RMN¹³C do alginato. Os espectros com indicações dos deslocamentos químicos estão no Anexo 8.4.

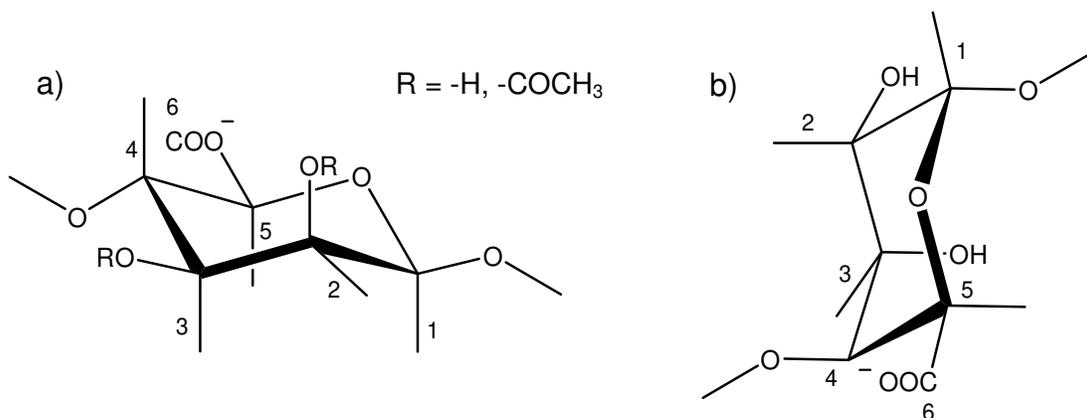


Figura 24: Identificação dos átomos de carbono conforme sua posição relativa nos anéis dos monômeros uronato que compõem as cadeias de alginato. a) β -D-manuronato, M1-M6 b) α -L-guluronato, G1-G6 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813002000028>. Acesso em 24/8/2013).

Tabela 13: Deslocamentos químicos e intensidades relativas de sinais dos átomos de ^{13}C do alginato de sódio, de acordo com a numeração representada na Figura 24 e com a notação indicada na Figura 23 (SALOMONSEN *et al.*, 2009B).

Notação	A		B	C	D	E		F		G		H
^{13}C	G6	M6	G1	M1	G4	M4	M5	M3	M2	G3	G5	G2
Deslocamento químico, ppm	176,8		102,6		82,7	76,1		71,4		68,6		65,8
Intensidade relativa do sinal	81,4		38,1		29,3	35,7		70,7		100		64,4

Da mesma forma como no caso de quitosana, a metodologia mais comum para análise estrutural de alginatos é a RMN ^1H , em solução. No entanto, a dissolução deste polímero em água deuterada é difícil e requer despolimerização parcial da amostra. Já se demonstrou a viabilidade de utilizar técnicas em estado sólido, tais como dicroísmo circular, espectroscopia no infravermelho, Raman e infravermelho próximo e RMN ^{13}C e a alta correlação encontrada entre elas e a técnica de referência, RMN ^1H (SALOMONSEN *et al.*, 2009A; SALOMONSEN *et al.*, 2009B).

No caso de RMN ^{13}C , a aplicação da técnica de polarização cruzada (CP), rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e desacoplamento de alta potência supera os efeitos de alargamento de linhas causados por anisotropia do deslocamento químico (CSA), alargamento dipolar homonuclear (^1H - ^1H) e heteronuclear (^1H - ^{13}C), bem como a baixa sensibilidade e os longos tempos de relaxação do ^{13}C devido à sua baixa ocorrência natural, permitindo a obtenção de espectros razoavelmente bem resolvidos. Além disso, demonstrou-se que CP-MAS RMN ^{13}C não causa superestimação da razão monomérica M/G quando na presença de íons cálcio residuais (SALOMONSEN *et al.*, 2009A).

Deve-se notar que os sinais alargados que são obtidos no espectro CP-MAS impossibilitam designar cada carbono com a mesma exatidão com que se pode fazer na RMN em solução. Alguns sinais do espectro CP-MAS consistem de

contribuições de mais de um carbono dos anéis M e G (sinais com notação E, F e G do espectro). Além disso, os sinais correspondentes aos carbonos 1 e 4 de ambos os monômeros (sinais com notação B, C, D e E) são mais largos e, no caso do espectro obtido, não foi possível distinguir B e C. Isso se deve aos carbonos das ligações glicosídicas serem mais sensíveis a seus grupos vizinhos e por isso possuírem uma faixa maior de deslocamentos. A técnica de estado sólido carece de resolução suficiente para determinar a estrutura dos blocos monoméricos (SALOMONSEN *et al.*, 2009B).

Avaliando várias possibilidades de estimar a razão M/G de alginatos, utilizando grande quantidade de amostras de alginato com razões M/G que variavam entre 0,5 e 2,0, Salomonsen *et. al* (2009B) concluíram que uma forma bastante simples é o cálculo a partir da razão entre a intensidade (altura) dos sinais F e G, o qual resulta em alta correlação com as razões obtidas a partir de RMN¹H, em solução ($R^2=0,99$). Apesar de contarem com pequenas contribuições da ressonância de carbonos do outro monômero, o sinal F é majoritariamente resultante da ressonância de M2 e M3 e o sinal G é majoritariamente resultante da ressonância de G3 e G5.

O resultado obtido para a amostra de alginato utilizada neste trabalho, através do cálculo direto descrito, foi razão M/G de 0,71. A prevalência de monômeros G favorece interação com íons cálcio devido à conformação “caixa de ovos” que estes adquirem, porém reduz a flexibilidade das cadeias do alginato, o que pode resultar em formação de partículas maiores e mais porosas, o que muitas vezes limita sua habilidade de encapsulação de fármacos, requerendo a incorporação de uma membrana (de quitosana, por exemplo), para redução da porosidade (FMC; GRANT *et al.*, 1973; GEORGE, ABRAHAM, 2006).

4.2. Quantificação de clorexidina (CHG)

As curvas analíticas de CHG foram construídas após estabilização das condições de análise conforme a metodologia descrita na seção Experimental (USP 30 – NF 25, 2007). Partiu-se de solução de 50 ppm, realizando injeções de volumes sucessivamente maiores, entre 5 e 50 μ L, correspondendo a 0,25 a 2,5

µg. O pico cromatográfico de saída de CHG teve boa resolução (Figura 25). Verificam-se outros menos intensos, que podem ser relacionados a produtos de degradação de CHG (REVELLE *et al.*, 1993). A curva analítica (curva de calibração) apresentou excelente ajuste linear (Figura 26), indicado no coeficiente de correlação dos dados com a equação linear, $R^2=1,00$. As barras de erro padrão da curva correspondem a repetições de três a doze corridas cromatográficas em cada ponto (N = 3 – 12), realizadas ao longo dos experimentos de quantificação de CHG no sobrenadante das suspensões e nos estudos de acompanhamento de sua liberação das MP em função do tempo.

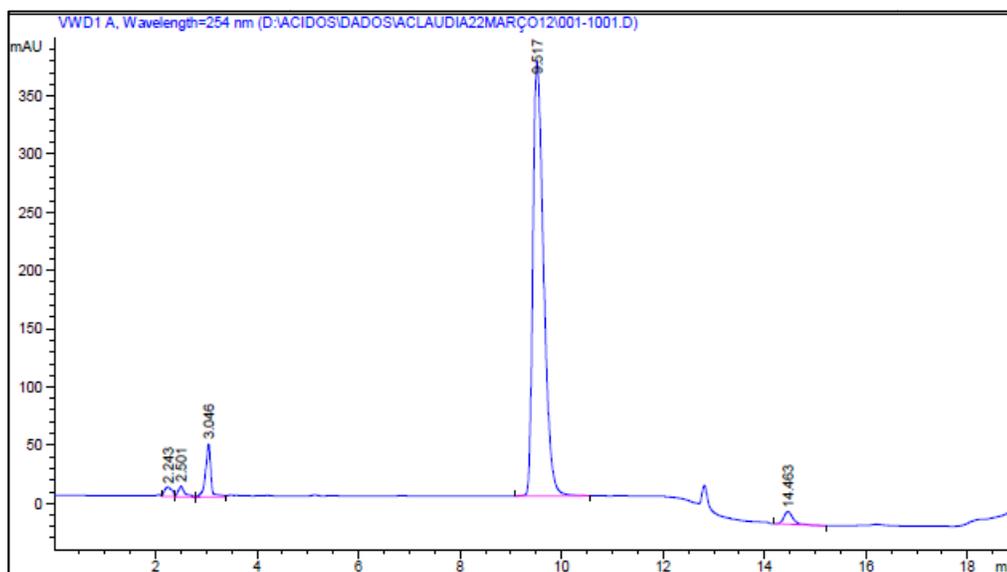


Figura 25: Cromatograma de HPLC de cloxacilina, injeção de 50 µL de solução a 50 ppm (2,5 µg).

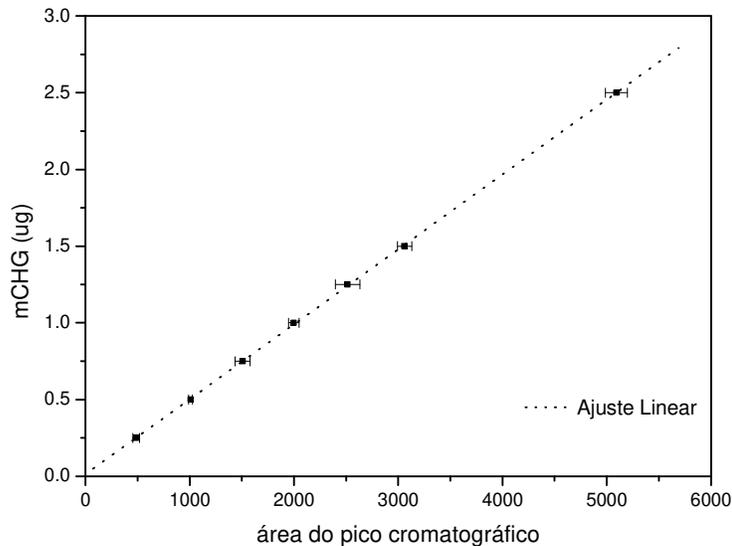


Figura 26: Curva analítica de CHG em HPLC em função das áreas de sinal do pico de saída acompanhado em 254 nm.

4.3. Obtenção de micropartículas do complexo polieletrólito (PEC) de quitosana e alginato com CHG incorporada

Devido a sua natureza tanto de polímeros quanto de eletrólitos, polieletrólitos (PEL) representam uma classe especial de materiais com propriedades interessantes e alta relevância prática. Um de seus principais aspectos é a capacidade de formação de PECs entre poliânions e policátions, fenômeno este dirigido por atrações entre suas cargas opostas. Tais sistemas são complexos devido à grande variedade de parâmetros que afetam sua formação e estabilidade. A obtenção de partículas com as características necessárias a uma determinada aplicação exige extensa caracterização das propriedades físico-químicas dos biopolímeros, como massas molares médias, polidispersividade, composição monomérica, ramificações, raio hidrodinâmico e densidade molar de cargas em determinada solução, bem como conhecimento e controle das proporções entre eles e das condições de obtenção, como velocidades de adição e de agitação, ordem de adição dos componentes, número de etapas, etc. (DAUTZENBERG, 2001; GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Conforme já discutido na introdução desta Tese, a obtenção de nano e micropartículas por coacervação complexa entre quitosana (QTS) e alginato (ALG) vem sendo pesquisada com diversas finalidades biomédicas e na indústria alimentícia (LI e MCCLEMENTS, 2001; BARUCH e MACHLUF, 2006; WITTAYA-AREEKUL *et al.*, 2006; SARMENTO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; TAKKA e GÜREL, 2010; VOO *et al.*, 2011). Devido à complexidade dos sistemas e ao grande número de parâmetros envolvidos, tais trabalhos diferem muito entre si no que concerne tanto o grau de caracterização dos materiais apresentado, quanto à discussão das correlações entre suas propriedades e as características dos PEC obtidos; uma fração significativa das publicações encontradas, incluindo as citadas neste trabalho, concentra-se na caracterização dos PEC e seu comportamento na liberação da substância ativa encapsulada.

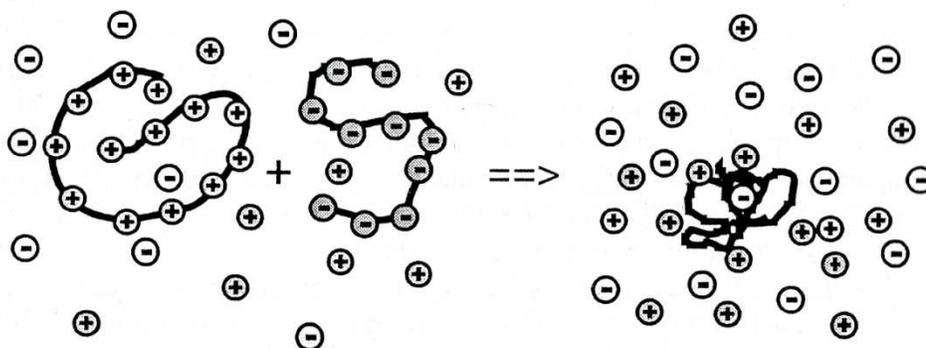


Figura 27: Esquema ilustrativo da formação de complexos polieletrólitos (PEC) (DAUTZENBERG, 2001, pp. 744).

Nesta Tese buscou-se equilibrar uma abordagem experimentalista – no sentido de se chegar a um sistema de liberação de clorexidina potencialmente eficaz nas aplicações-fim que motivaram o trabalho com os materiais disponíveis – e um forte embasamento em conceitos físico-químicos e resultados experimentais existentes na literatura, de maneira que o trabalho experimental não se estendesse em demasia na busca exaustiva de caracterização ou investigações sobre o efeito de cada uma das propriedades físico-químicas e condições de obtenção possíveis para o sistema.

Com base em dados de literatura e em experimentos realizados no início deste trabalho, para obtenção de micropartículas (MP) de quitosana por reticulação iônica com trifosfato de sódio, já se conhecia uma relação de proporcionalidade direta entre o diâmetro médio das MP e a massa molar média de QTS. Portanto, optou-se por trabalhar diretamente com a QTS-S e eliminar essa variável dos estudos. No caso de ALG, utilizou-se a amostra disponível no laboratório, com indicação para fins farmacêuticos (DOUGLAS e TABRIZIAN, 2005; SCHATZ *et al.*, 2004; BARBOZA e PESSINE, 2010).

A formação de MP se deu de forma espontânea assim que a solução de QTS, com ou sem adição de CHG, era adicionada sob agitação à solução de ALG pré-gelificado com íons Ca^{2+} . Após alguns experimentos nos quais a adição das soluções de CaCl_2 e QTS era feita por gotejamento, mudou-se para a adição de todo o volume de cada substância de uma única vez, sem que com isso fosse verificada variação nos parâmetros acompanhados de diâmetro médio e distribuição de diâmetros de partículas (PSD). Essa comparação também foi descrita na literatura, de onde os autores concluíram que a adição única ajudava evitar a formação de agregados (SCHATZ *et al.*, 2004).

A viscosidade aparente do meio líquido caiu após formação de MP, indicando que a totalidade das cadeias de QTS e ALG interagiram e passaram a fazer parte do PEC. Conforme discutido por Dautzenberg (2001), a formação de sistemas altamente agregados se dá, especialmente em concentrações consideradas altas ($> 0,01$ g/mL), em pontos distantes da estequiometria de cargas dos PEL envolvidos (Figura 27). Já em sistemas altamente diluídos ($< 10^{-4}$ g/mL), em relações não estequiométricas dos PEL ocorre formação de partículas de dimensões coloidais, mas quando próximos do ponto de mistura 1:1 também ocorre floculação, ou agregação macroscópica, característica do modelo estrutural de formação de PEC conhecido como “ovos mexidos”, em oposição ao modelo “escada”, ambos ilustrados na Figura 28. Tal fenômeno apresenta aplicações práticas em complexos entre diferentes pares de polieletrólitos, inclusive nesta pesquisa (DAUTZENBERG, 2001; SCHATZ *et al.*, 2004; DOUGLAS e TABRIZIAN, 2005).

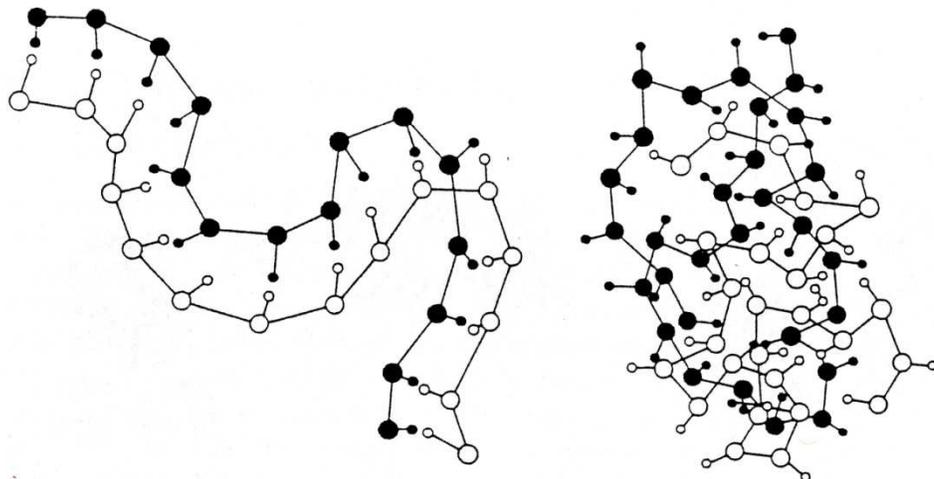


Figura 28: Modelos estruturais de complexos polieletrólitos: “escada” e “ovos mexidos” (DAUTZENBERG, 2001, pp.754).

a)



b)



c)



Figura 29: Imagens de suspensão de micropartículas tipicamente obtida neste trabalho. a) logo após obtenção ou agitação; b) após 5 h em repouso; c) após 48 h em repouso.

As suspensões obtidas eram de cor branca, variando desde o translúcido em alguns casos, até opaco em outros. De maneira geral as MP, pouco tempo após sua obtenção, já começavam a apresentar algum grau de decantação que, no entanto, apenas se concluíu após várias horas em repouso (Figura 29). Essa foi uma indicação da presença de alta polidispersividade das distribuições de

diâmetros, também bastante características desse tipo de sistema (SCHATZ *et al.*, 2004).

4.3.1. Escolha do método de preparação

A principal diferença entre as formas de obtenção de micropartículas avaliadas consiste na utilização, em uma delas, de cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente de pré-gelificação das cadeias de alginato, em etapa anterior à coacervação entre alginato e quitosana (GRANT *et al.*, 1973; GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Para escolha do processo de obtenção das suspensões a ser fixado na continuidade dos experimentos definiu-se como parâmetros primários o perfil de distribuição de diâmetros e o valor mediano do diâmetro. As suspensões de micropartículas de QTS/ALG tiveram suas PSD avaliadas com a técnica de espalhamento de feixe de luz.

No caso do sistema em estudo, que visa o desenvolvimento de uma suspensão ou gel para aplicação tópica na cavidade bucal, busca-se a obtenção de micropartículas com diâmetro em torno de 10 μm . A existência de nanopartículas com diâmetro menor que 500 nm não é interessante, pois deve-se evitar a permeação de CHG na mucosa epitelial e sua chegada à corrente sanguínea; é importante levar em conta que quitosana é um conhecido agente de mobilidade intercelular e, portanto, o controle de tamanho das partículas é importante (FERNÁNDEZ-URRUSUNO *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 2005).

4.3.1.1. Distribuição de diâmetros de partículas (PSD)

As PSD obtidas são registradas pelo aparelho em termos de percentual em volume das partículas de cada faixa de tamanho, pois o espalhamento é função do raio das partículas sobre as quais o feixe de luz incide (FRISVAD *et al.*, 2012). Os dados de diâmetros medianos apresentados na Tabela 14 e as curvas de PSD ilustradas na Figura 30 estão relacionadas às distribuições volumétricas informadas pelo equipamento.

Concluiu-se que o método de obtenção é fator relevante na PSD de cada amostra e que a combinação entre o método de obtenção 2 (em dois estágios) e o

método de agitação A (em dispersor de alto cisalhamento) possibilitou obter suspensões de micropartículas com diâmetros da ordem de 10 μm , com a distribuição mais homogênea e menos polidispersa, e foi escolhido para a continuidade dos trabalhos, tendo sido aplicado na preparação da maioria das amostras.

Tabela 14: Mediana da distribuição de diâmetros das MP complexas QTS/ALG. Os resultados que possuem desvio padrão correspondem às médias de valores medianos de nove (método 2 / A) e duas (método 2 / B) preparações de suspensões.

Método de obtenção / agitação	D mediano (μm)	Desvio padrão σ
1 / A	53,8	n/a
1 / B	48,3	n/a
2 / A	8,5	1,7
2 / B	286,4	2,0

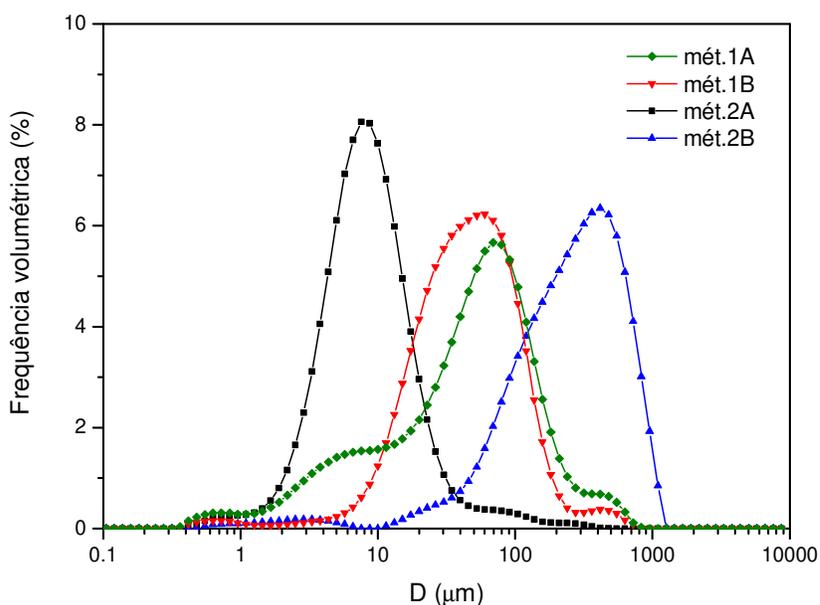


Figura 30: Distribuição volumétrica de diâmetros das MP QTS/ALG. 2A representa a curva média de cinco repetições dessa combinação de métodos de obtenção e agitação ($N = 5$). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização.

No entanto, a distribuição em função dos percentuais volumétricos torna mais relevante a fração de partículas de maior diâmetro, pois o volume é função cúbica do raio. Esse efeito é mais relevante nas amostras com grupos de partículas de diâmetros com diferentes ordens de grandeza. Para ilustrar, estão na Figura 31 as distribuições de frequência numérica e volumétrica, em função do diâmetro, de MP de mesma suspensão.

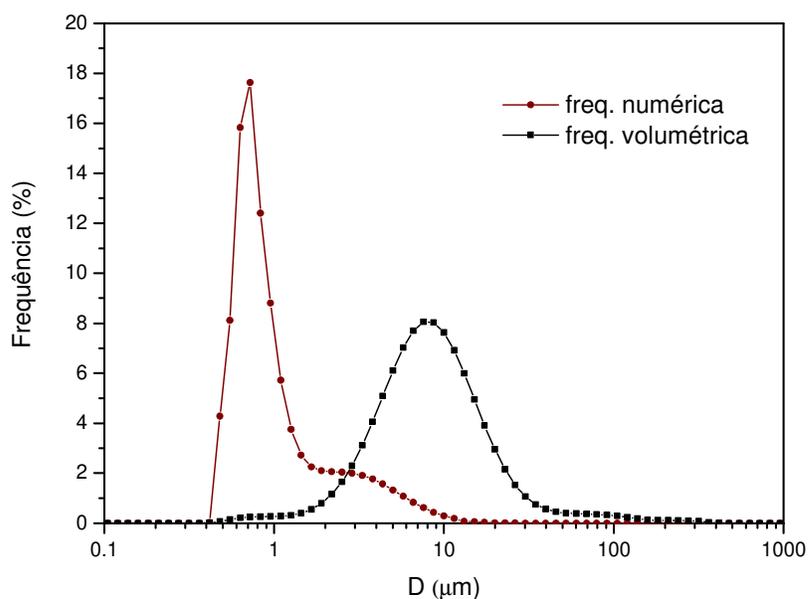


Figura 31: Distribuições de diâmetros das MP em termos de frequência numérica e volumétrica. A curva relativa à frequência numérica é a média de quatro repetições (N=4) da combinação de método de obtenção 2 e de agitação A e a curva relativa à frequência volumétrica, de cinco repetições (N=5). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização.

Verifica-se através da distribuição de frequência numérica que a maioria das MP presentes tem diâmetro entre 0,5 μm e 10 μm e que a quantidade de partículas de diâmetros maiores que 10 μm é desprezível na maioria dos casos. Contudo, como o próprio programa do equipamento adverte, a distribuição numérica é resultado de um cálculo algorítmico realizado pelo equipamento Mastersizer e, portanto, os resultados seguirão sendo apresentados como PSD

volumétricas, que são resultados diretamente relacionados com as medidas físicas de espalhamento de luz realizadas pelo equipamento.

4.3.2. Estabilidade das suspensões

Considerando a importância das MP serem estáveis, buscou-se acompanhar suas PSD com o tempo. A Figura 32 ilustra a mudança temporal, durante sete meses, de PSD para a suspensão A160312.

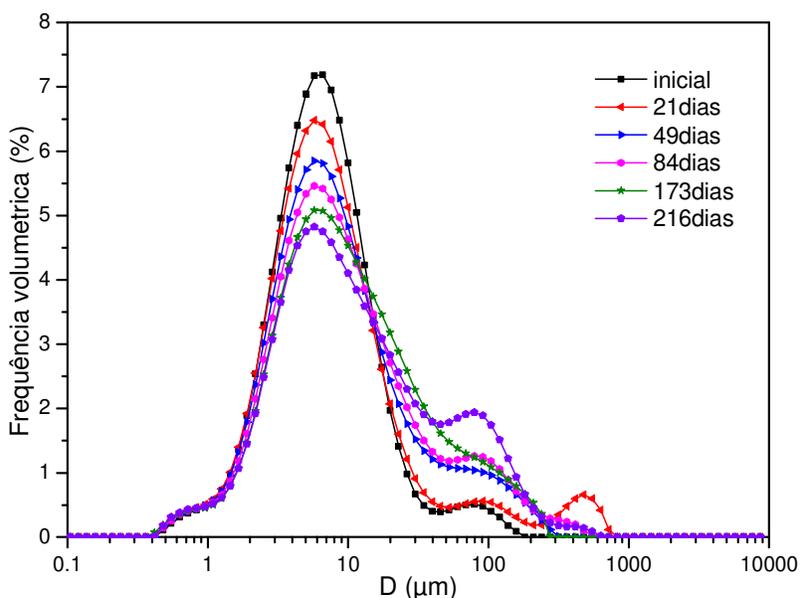


Figura 32: Distribuições volumétricas das MP obtidas pela combinação do método de obtenção 2 e de agitação A ao longo do tempo.

A maioria das suspensões seguiu leve tendência de aumento dos diâmetros ao longo do tempo sem, no entanto, apresentarem alterações significativas. Especialmente as MP das suspensões obtidas pela combinação de métodos 2/A, com diâmetros iniciais entre 7 e 10 μm, mantiveram-se relativamente estáveis, apesar de haver pequenos aumentos dos valores médios no intervalo de três, quatro e até sete meses em que foram acompanhadas. Levando em conta que as PSD são apresentadas em função de volume das partículas, mesmo o surgimento de alguns poucos agregados de partículas alteram a PSD pois, como discutido anteriormente, o volume é função cúbica do diâmetro.

4.3.3. Análise Morfológica

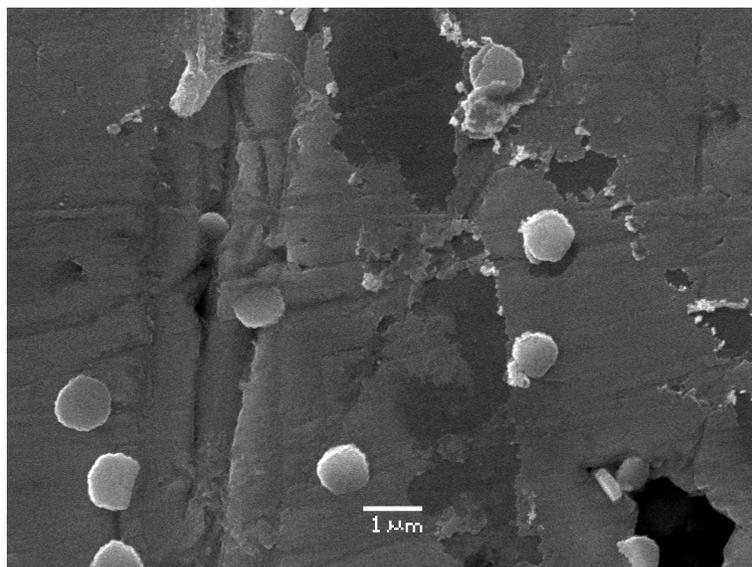
4.3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica convencional, em que as amostras são metalizadas e analisadas sob vácuo, são na maioria das vezes danosas a amostras biológicas e também a micro ou nanopartículas lipídicas, lipossomais ou biopoliméricas.

Depois de muitas tentativas, nas quais geralmente as partículas se rompiam e as imagens apresentavam apenas material amorfo sobre o *stub*, algumas imagens puderam ser obtidas por esta técnica e duas delas estão na Figura 33. Devido à alta diluição empregada nessa tentativa, na primeira imagem (Figura 33 a) poucas partículas puderam ser visualizadas, as quais tem formato esférico muito semelhante às apresentadas na literatura (SCHATZ ET AL., 2004). Na segunda imagem (Figura 33 b), na qual se utilizou como substrato uma superfície de vidro aderida sobre o *stub* com uma fita condutiva, visualiza-se quantidade maior de partículas, nem todas de formato esférico e com distribuição mais ampla de tamanhos.

Quando são comparadas as ordens de grandeza dos tamanhos das partículas observadas com as obtidas em suspensão líquida, conclui-se que a secagem e aplicação de vácuo, mesmo quando permitiu que algumas partículas permanecessem íntegras, diminuiu seus tamanhos, indicando que no meio aquoso as cadeias poliméricas das micropartículas estavam mais relaxadas e que quando secas, encolheram significativamente.

a)



b)

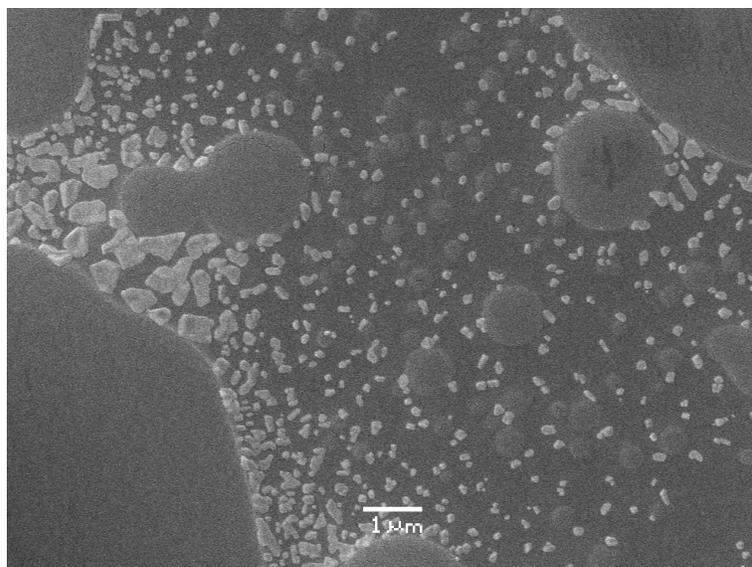


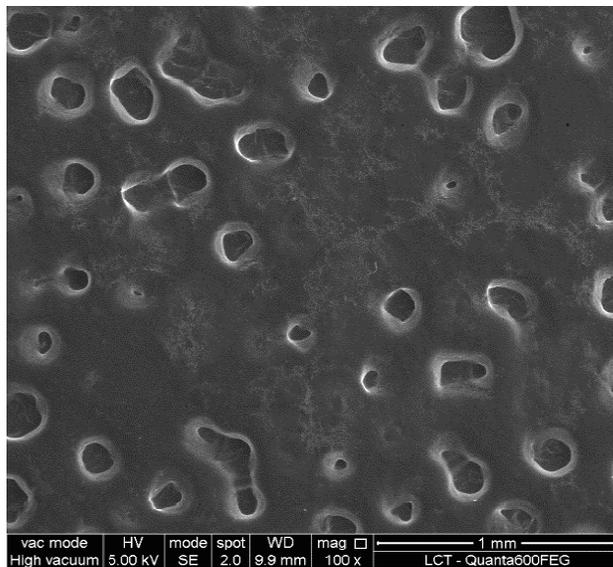
Figura 33: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra A220313, diluída 1:50 e depositada a) sobre *stub* metálico; b) sobre vidro.

4.3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A técnica de MEV-FEG (conhecida coloquialmente como MEV “ambiental”), no entanto, ainda se encontra pouco desenvolvida no país, devido ao reduzido número de equipamentos disponíveis. As imagens das MP complexas de

QTS/ALG deste trabalho (Figura 34) foram obtidas em uma primeira tentativa e mostraram seu potencial para análise morfológica, bem como a necessidade de identificar condições de diluição da amostra e de realização da análise que permitam a obtenção de imagens com mais qualidade.

a)



b)

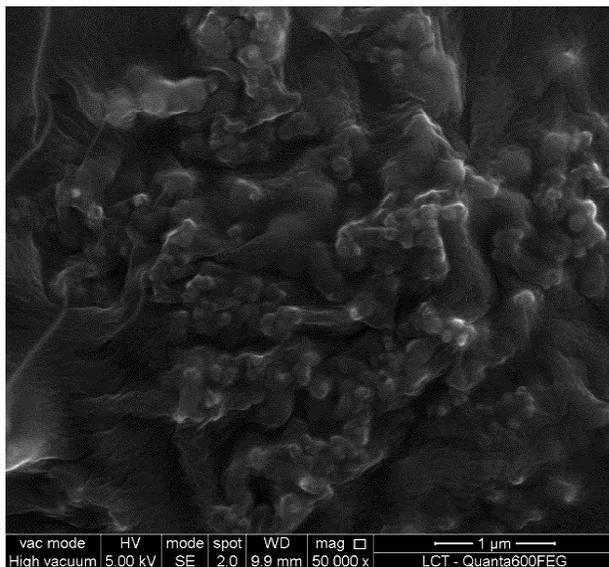


Figura 34: Imagens de MEV ambiental de MP complexas de QTS/ALG, com adição de CHG. Amostra A160312 a) diluição 1:10; b) diluição 1:2.

Foi possível identificar as partículas com formatos e ordens de grandeza semelhantes às das imagens de MEV tradicional; no entanto, ainda com baixa resolução. A primeira imagem (Figura 34 a) permitiu melhor visualização das partículas individuais.

4.3.4. Influência dos componentes da suspensão

A Tabela 15 apresenta os resultados de eficiência de incorporação (EI%), percentual de carregamento (PC%) e diâmetro mediano (D) das MP obtidas no delineamento experimental realizado. Essas características do sistema foram relacionadas aos fatores do experimento através de ajuste de modelo linear, utilizando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.) – Tabela 16 e Equações 27 e 28.

A análise dos parâmetros descritos na Tabela 16 indica um nível médio de ajuste do modelo linear, pois R^2 situou-se entre 50 e 75 %. No entanto, o ajuste do modelo também depende da quantidade de repetições na obtenção de cada sistema. Mais repetições aumentam os graus de liberdade e reduzem o erro. Caso os experimentos houvessem sido realizados em replicata ou triplicata, também seria possível analisar o ajuste dos dados a outros modelos, como por exemplo o quadrático (BARROS NETO et al., 2007). Porém, não estavam entre os objetivos do trabalho o aprofundamento e otimização dos parâmetros experimentais, os quais julgamos mais adequados a uma etapa de desenvolvimento de produto, em que suas características precisem ser ajustadas a uma aplicação específica.

O valor p deve ser menor ou igual a 0,05 para que o parâmetro a que se refere tenha significância. Quando p apresenta valores maiores que 0,05, o intervalo de confiança compreende o valor zero, indicando a possibilidade do efeito do fator em questão sobre um dado resultado ser nulo (BARROS NETO et al., 2007)

Dessa forma, chegou-se às Equações 27 e 28 para descrever a relação entre fatores do sistema e resultados de EI% e PC% obtidos. No caso do diâmetro mediano D, constatou-se através dos valores p que nenhum dos fatores se correlaciona aos resultados obtidos com significância ($p < 0,05$) no modelo linear. Isso também se evidencia no valor de R^2 em torno de 50%. No entanto, para o

fator razão CaCl_2/ALG , o valor p 0,11 – acima do limite de significância mas ainda razoavelmente baixo – indica que poderia existir alguma influência no diâmetro mediano das partículas. Isso voltará a ser discutido na seção seguinte (item 4.3.4.1).

Tabela 15: Eficiência de Incorporação (EI%), Carregamento (PC%) e Diâmetro mediano (D) das MP obtidas com o delineamento experimental fatorial 2^3 , ponto central, em duplicata.

Experimento	EI%	PC%	D (μm)
0	49%	97%	16,4
1	94%	94%	89,0
2	61%	61%	11,3
3	8,5%	8,5%	9,5
4	19%	19%	8,8
5	96%	289%	33,7
6	26%	77%	6,4
7	68%	205%	9,4
8	11%	32%	10,6

Equação 27

$$\text{EI}\% = 48(\pm 7) - 21(\pm 8) \cdot \text{QTS}/\text{ALG} + 19(\pm 8) \cdot \text{CaCl}_2/\text{ALG}$$

Equação 28

$$\text{PC}\% = 99(\pm 17) + 53(\pm 19) \cdot \text{mCHG} + 51(\pm 19) \cdot \text{CaCl}_2/\text{ALG}$$

A eficiência de incorporação de CHG mostrou ser independente da massa de CHG adicionada ao sistema mas dependente da relação entre as massas de biopolímeros, bem como da relação entre as massas de cloreto de cálcio e alginato, indicando que mesmo em sistemas com adição de grande quantidade de CHG é possível obter altas EI%.

O valor negativo do coeficiente de QTS/ALG na equação que descreve EI% indicou que a eficiência de incorporação decresce à medida que aumenta a fração de QTS. Isso pode ser interpretado como um efeito de competição entre quitosana e clorexidina na interação com os sítios negativos das cadeias de alginato. Tal efeito foi relatado por Takka e Gürel (2010) em experimentos de incorporação de albumina de soro bovino (BSA), também carregada positivamente, em partículas de quitosana / alginato / cloreto de cálcio (TAKKA, GÜREL, 2010).

A capacidade de carregamento de CHG demonstrou ser diretamente dependente da massa de CHG e da relação entre as massas de cloreto de cálcio e alginato, indicando que a adição de maiores quantidades de CaCl_2 favorece redes de alginato com melhor capacidade de formação de micropartículas e incorporação de moléculas com cargas positivas, como é o caso da clorexidina. O parâmetro de relação entre as massas de QTS e ALG não foi considerado na equação devido a seu valor $p = 0,14$. No entanto, se pensarmos no sistema em termos físico-químicos, isso não parece correto, pois o carregamento deveria apresentar, da mesma forma como EI%, relação negativa com a quantidade de QTS. Na prática foi o que se constatou nos experimentos 3, 4 e 8, cujos PC% foram baixos e nos quais a relação QTS/ALG foi 2:1. O experimento 7 foi uma exceção nesse sentido, mas nele a relação CaCl_2 /ALG de 2:1 pode ter superado o efeito anterior e elevado o PC%.

Douglas e Tabrizian (2005) discutiram o efeito de diversos parâmetros experimentais semelhantes aos deste estudo na formação de nanopartículas – que em alguns casos chegaram a apresentar ordens de grandeza micrométricas – de QTS e ALG pré-gelificadas por CaCl_2 , às quais houve incorporação de ácido desoxirribonucleico (DNA) *a posteriori*. Reportaram que as partículas obtidas em razões QTS:ALG mais próximas de 1:1 (em massa) apresentaram os menores diâmetros, indicando uma proporção mais estequiométrica em suas interações iônicas. Os diâmetros de partículas aumentaram de maneira bastante semelhante à medida em que as razões se deslocavam tanto na direção de 1:5 e de 5:1. Esse resultado ocorreu tanto no uso de pares de polímeros de massas molares mais altas quanto mais baixas, mas foram mais pronunciados no par de polímeros de

massas molares mais altas. Mostraram também que o diâmetro médio da MP aumenta com o uso de polímeros de massas molares mais altas, e que esse efeito foi mais pronunciado quando se avaliou a variação de massa molar de quitosana. A explicação para as diferenças observadas foi a maior capacidade da QTS de baixa massa molar difundir pela rede de alginato gelificado, em oposição à formação de uma camada externa de QTS quando se empregou a de maior massa molar.

Tabela 16: Estimativa de efeito dos fatores sobre os resultados, ajuste de modelo linear. R^2 indica o ajuste dos dados ao modelo, CRL é o coeficiente de cada fator, se o erro padrão, p o parâmetro de significância na equação com confiança de 95%, as colunas -95% e $+95\%$ indicam o intervalo de confiança.

Resultado	Fator	R^2	CRL	se	p	-95%	+95%
EI%	intercepto	70%	48	7	0,00	31	65
	mCHG		2,3	8	0,77	-16	21
	QTS / ALG		-21	8	0,03	-40	-3
	CaCl ₂ / ALG		19	8	0,05	0,3	37
PC%	intercepto	75%	99	17	0,00	57	141
	mCHG		53	19	0,03	6	99
	QTS / ALG		-32	19	0,14	-78	14
	CaCl ₂ / ALG		51	19	0,04	4,5	97
D	intercepto	53%	20	7	0,03	2,8	36
	mCHG		-7,3	8	0,38	-26	11
	QTS / ALG		-12	8	0,17	-30	7
	CaCl ₂ / ALG		14	8	0,11	-5	32

Esses autores reportaram também que a faixa de pH que permitiu obter MP de menores diâmetros foi de 5,1 a 5,7, na qual tanto os grupos amino da QTS quanto os grupos carboxila do ALG estão ionizados, otimizando as interações. Em relação à razão Ca²⁺/ALG, em massa, os autores não encontraram relação, na faixa de 0

a 0,87, com variações no diâmetro das partículas obtidas, mas relataram que outros autores haviam anteriormente concluído que em razões acima de 0,2 a tendência seria a de formação de micropartículas. Como parte das diferenças encontradas entre seu trabalho e o mencionado, discutiram que um parâmetro de grande importância é a razão entre o número de monômeros manuronato e guluronato do ALG, bem como sua distribuição ao longo das cadeias (DOUGLAS, TABRIZIAN, 2005).

4.3.4.1. Distribuição de diâmetros de partículas

A Figura 35 apresenta as distribuições de diâmetros de partículas (PSD) nas suspensões obtidas com o delineamento experimental. A maioria das amostras apresentou distribuições semelhantes, indicando mais uma vez que o processo de obtenção desenvolvido é reprodutivo.

As exceções foram as MP das suspensões relativas aos experimentos 1 e 5, cujas PSD apresentaram diâmetros medianos bem maiores que as demais, bem como polidispersividade muito maior. Elas têm em comum a razão QTS/ALG de 1:2 e a razão CaCl_2/ALG de 2:1. No entanto, as suspensões relativas aos experimentos 2 e 6 também possuem razão QTS/ALG de 1:2 e mesmo assim suas PSD são equivalentes à da maioria. Por aí concluiu-se que o fator relevante que levou as suspensões dos experimentos 1 e 5 a serem tão diferentes das outras foi realmente a razão CaCl_2/ALG .

Esse efeito já havia sido cogitado quando na seção anterior, Influência dos componentes da suspensão (4.3.4), se analisou as estimativas dos efeitos dos fatores relacionados aos componentes das suspensões sobre os resultados analisados. No caso do diâmetro mediano (D), nenhum dos fatores apresentava significância estatística; no entanto o valor p associado à razão CaCl_2/ALG (p 0,11) permitiu considerar que, ainda que com nível de confiança mais baixo, esse fator efetivamente tem relação com D, efeito que ficou evidente quando as curvas de PSD foram comparadas (Figura 35).

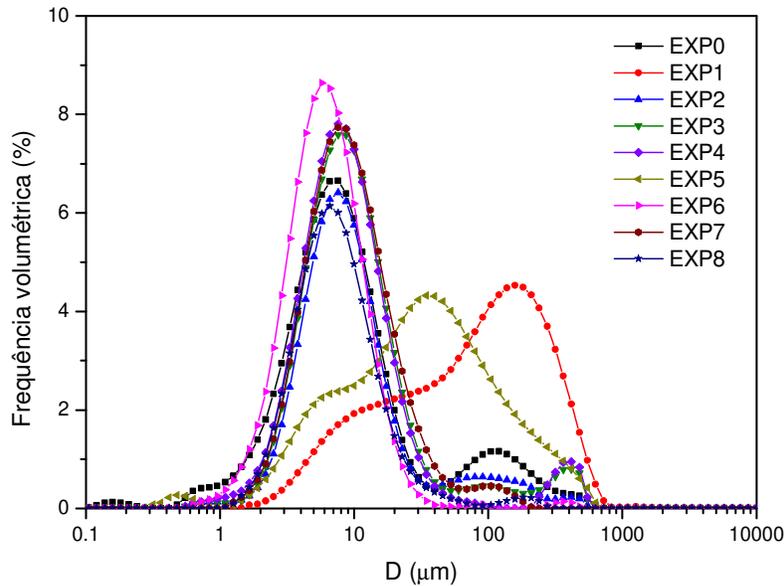


Figura 35: Distribuições de diâmetros de MP obtidas com o delineamento experimental para determinar a influência dos componentes e de razões entre eles, sobre o diâmetro mediano.

4.3.4.2. Carregamento de ativo e eficiência de incorporação

A necessidade de quantificar CHG na fase líquida das suspensões foi consequência da impossibilidade de dissolver uma alíquota de MP para possibilitar a quantificação direta de CHG incorporada. Devido à natureza anfifílica das MP, a partir da complexação de dois polímeros de cargas opostas, a mudança de pH do meio favorece a dissolução de um deles em detrimento do outro e a tentativa de realizar dissoluções sequenciais também não foi bem-sucedida. A tentativa de dissolução das MP em solventes orgânicos não foi feita por julgar que seria incompatível com a alta solubilidade em água do CHG, mas pode ser objeto de trabalhos futuros.

A Tabela 15 apresenta os resultados de percentual de carregamento (PC%) e eficiência de incorporação (EI%) de CHG nas MP resultantes do delineamento experimental, calculados por diferença entre a massa de CHG adicionada em cada preparação e a quantificada no líquido sobrenadante das suspensões. Em todas as preparações, a massa de biopolímero total foi constante (150 mg), em relação à qual se calculou o percentual de carregamento.

Alguns dos valores de PC% obtidos foram surpreendentemente altos. As razões entre as massas de ativo e polímero de algumas das suspensões (2:1 no EXP 7 e aproximadamente 3:1 no EXP 5), levantaram dúvidas sobre a confiabilidade da metodologia de quantificação de CHG para determinação de EI% e PC%. Contudo, foi possível identificar que na literatura valores de mesma ordem de grandeza já foram reportados em sistemas com características semelhantes, como nos estudos realizados por Kennon e Higuchi (1957) sobre fármacos catiônicos interagindo com os polieletrólitos aniônicos poliácido acrílico e copolímero estireno-cloromaleato, e outros (GOODMAN, BANKER, 1970, *apud* RANADE e HOLLINGER, 1996; RHODES et al., 1970, *apud* RANADE e HOLLINGER, 1996).

Neste caso específico, os valores altos de EI% e PC% indicaram interação química entre CHG, positivamente carregada, e as cadeias de ALG, em competição com sua interação com cadeias de QTS. Foi possível verificar, por exemplo, que os experimentos que forneceram os percentuais de carregamento (PC%) de CHG mais baixos (8,5%, 19% e 32%) foram, respectivamente, os EXP 3, 4 e 8, nos quais a razão QTS/ALG era 2:1. Apenas no caso do EXP 7 esse comportamento não se repetiu – apesar da relação QTS/ALG de 2:1, o carregamento de CHG nessa amostra foi alto, 205%.

Sistemas semelhantes, contendo sais macromoleculares, foram os primeiros sistemas de liberação prolongada (DDS) descritos. Ranade e Hollinger (1996) trataram de vários, como por exemplo antibióticos e amins com efeito terapêutico, combinados quimicamente com poliácidos como poliácido acrílico, polissacarídeos sulfonados ou fosforilados, amidos modificados e poliácidos urônicos, dos quais o alginato faz parte. Sistemas de liberação interessantes citados por esses autores foram alginato de estreptomicina (EL-SHIBINI *et al.*, 1971, *apud* RANADE e HOLLINGER, 1996), poligalacturonato de quinidina (CAVALLITO, JEWELL, 1958, *apud* RANADE e HOLLINGER, 1996), alginato de pilocarpina e de uma amina terapêutica não identificada (KLAUDIANOS, 1971, *apud* RANADE e HOLLINGER, 1996). O principal efeito fisiológico discutido nesses casos foi a retenção, prolongada, de macromoléculas pelo sistema

linfático, alterando a intensidade e duração da resposta terapêutica (RANADE e HOLLINGER, 1996).

A eficiência de incorporação diz respeito somente à relação entre as massas de CHG adicionado e CHG quantificado na fase líquida das suspensões e, por conseguinte, com CHG carregado nas MP. Usa-se o valor de EI% para calcular a massa de CHG existente na fração de MP presente em determinada alíquota da suspensão. Além disso, EI% é uma informação de referência útil para estudos futuros de otimização do sistema, buscando atingir o máximo de carregamento mas, ao mesmo tempo, determinando qual deve ser a menor massa de CHG possível que o permita. Para um mesmo percentual de carregamento, a maximização da eficiência de incorporação significará economia da substância ativa e menor investimento para recuperar a fração não incorporada, por exemplo em um processo de produção industrial, com consequentes vantagens econômicas e ambientais.

4.3.5. Perfis de liberação

Considerando o objetivo de entender como ocorreria a liberação de CHG incorporada às MP em um meio simulador de saliva, algumas formulações foram selecionadas para acompanhamento do perfil de liberação.

Os estudos de cinética de liberação de ativo exigiram a estruturação de um sistema de teste confiável e reprodutivo. A solução de saliva artificial utilizada é semelhante à saliva humana em termos de conteúdo de cálcio e fósforo (solução remineralizadora), sendo composta de 1,5 mmol/L de cálcio (na forma de fosfato de cálcio), 50 mmol/L de potássio e cloreto (na forma de cloreto de potássio), 0,9 mmol/L de fosfato (na forma de fosfato de cálcio) e 20 mmol/L de tampão TRIS (tri-hidroximetil-aminometano), com pH 7,0 (SERRA e CURY, 1992).

A Figura 36 apresenta os perfis de liberação obtidos a partir das suspensões mais promissoras em termos de EI% e PC%, apesar de algumas delas terem apresentado resultados de D bastante diversos dos valores mais próximos de 10 µm geralmente obtidos no preparo das suspensões deste trabalho. O experimento

do ponto central também foi incluído nesses experimentos, pois essa foi a suspensão com a qual foi realizada a maior parte dos experimentos e caracterizações anteriores.

As amostras seguiram perfis de liberação com ordens de grandeza bem diferentes entre si, o que pode ser verificado, por exemplo, na diferença entre os perfis de liberação da amostra obtida no EXP 5, em que a massa de CHG inicial adicionada foi 50 % maior (450 mg) e a do EXP 0 (300 mg).

Buscando encontrar a relação entre os perfis de liberação relativos às amostras obtidas nos EXP 1 e 5 e os parâmetros dessas amostras, concluiu-se que as razões, em massa, QTS/ALG (1:2) e CaCl_2/ALG (2:1) levaram a interações excessivamente fortes de CHG com as MP, devido à maior quantidade de alginato e de íons cálcio nessas suspensões, de forma que sua liberação ocorreu em níveis bem mais baixos que no EXP 0 (ponto central), em que as razões QTS/ALG e CaCl_2/ALG são 1:1 e favoreceram maior liberação de CHG quando o meio líquido foi alterado. Ainda assim, verifica-se que mesmo o EXP 0 apresentou liberação bastante prolongada, levando quase dois dias para chegar a um platô.

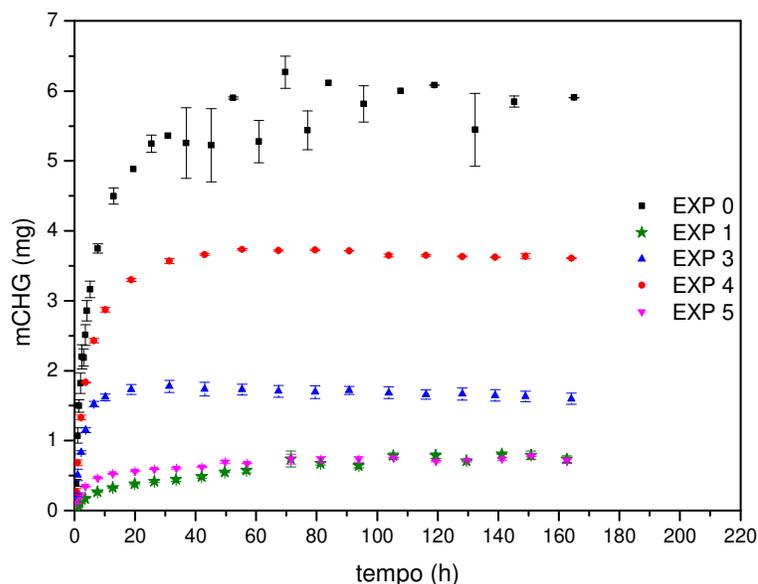


Figura 36: Perfis de liberação de CHG a 35°C de MP obtidas nos Experimentos 0, 1, 3, 4 e 5, em saliva artificial.

Comparando os perfis de liberação relativos aos EXP 3 e 4 e buscando determinar a relação entre eles e os componentes das suspensões, verificou-se que a maior liberação apresentada no EXP 4 se deveu à menor razão CaCl_2/ALG (1:2) que a do EXP 3 (2:1), a qual desfavorece a formação do pré-gel de alginato com íons Ca^{2+} , influenciando a interação ALG-CHG, da mesma forma que verificado no caso da interação ALG-QTS nos experimentos para escolha do método de preparação das MP.

Concluiu-se, portanto, que alguns dos sistemas obtidos foram eficazes em manter a concentração de CHG no meio por longos períodos e liberá-la de maneira sustentada. A cinética de liberação e a concentração de CHG quando o sistema atinge o equilíbrio, dependem da composição das MP e das interações que se estabelecem entre seus componentes.

Para fins de comparação, acompanhou-se a difusão de CHG livre, com concentração inicial equivalente à concentração total de CHG adicionada na preparação do experimento do ponto central (EXP 0), através da membrana semipermeável utilizada nos experimentos de liberação (Figura 37). Verificou-se que difere totalmente do perfil de liberação das suspensões de MP, ocorrendo uma difusão inicial rápida até atingir o equilíbrio de potencial químico da CHG nos dois compartimentos separados pela membrana, e que depois a concentração externa passou a decair, devido à retirada de alíquotas do sistema e sua reposição com novos volumes de s.a., ocasionando diluição da CHG ao longo do tempo, ao mesmo tempo em que não ocorria sua reposição por CHG vinda das MP, como se observa nos perfis ilustrados na Figura 36.

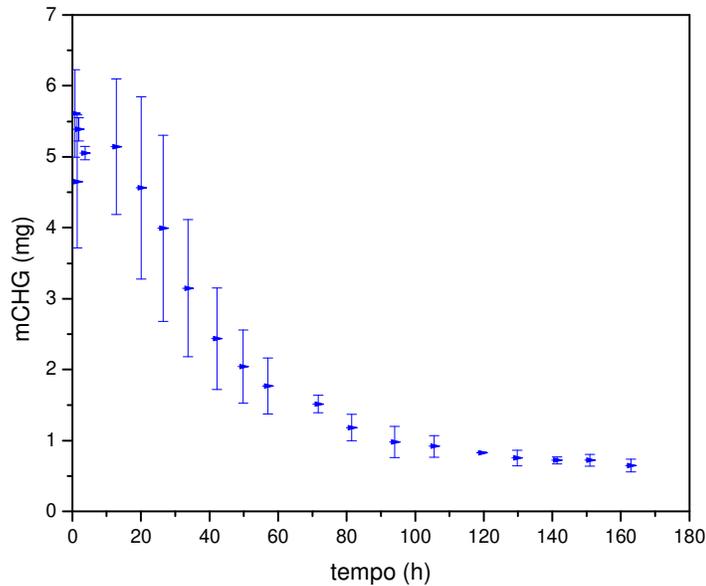


Figura 37: Difusão de CHG livre em saliva artificial a 35°C.

4.3.6. Aspectos físico-químicos da liberação de CHG

Os estudos mecanísticos e/ou de modelagem matemática da liberação de ativos em matrizes poliméricas consideram fenômenos de difusão, intumescimento, relaxação e degradação de cadeias e erosão da matriz polimérica. Em sua maioria, na forma como foram apresentados resumidamente na Introdução, partem do pressuposto de que não existem ligações químicas ativo-polímero (SIEPMANN E SIEPMANN, 2008; NARASIMHAM et al., 1999).

Sistemas de liberação de ativos (DDS) onde estão presentes tais interações apresentam comportamento de liberação mais difícil de ser modelado. Nesses sistemas, os fenômenos físicos discutidos anteriormente também participam da liberação do ativo para o meio, mas seu fator determinante é a dissociação da molécula de ativo da cadeia polimérica, seja por degradação hidrolítica ou enzimática, seja por troca iônica, causada por deslocamentos de equilíbrio químico, como alteração de pH, do potencial químico de uma ou mais espécies do meio, da temperatura (KUMAR et al., 1964).

A seguir serão destacados alguns modelos que também levam em conta interações ativo-polímero.

A investigação dos mecanismos envolvidos na cinética de liberação se iniciou nas décadas de 1940 e 1950. Kennon e Higuchi (1956, 1957) discutiram interações entre fármacos catiônicos e polieletrólitos aniônicos partindo dos conceitos de equilíbrio de Donnan (Equações 29 e 30) e fisissorção/quimissorção, análogos aos descritos pelas isotermas de Langmuir (Equações 31 e 32), ainda que existam limitações e dificuldades em sua aplicação aos sistemas em questão (KENNON, HIGUCHI, 1956; KENNON, HIGUCHI, 1957; ATKINS, 1994).

O equilíbrio de Donnan foi usado para estabelecer os graus de associação e dissociação quando polieletrólitos e outros íons interagem em sistemas onde o polieletrólito se encontra restrito por uma membrana semipermeável, estabelecendo, assim, uma diferença no potencial químico, compensada pela forma como os outros íons se distribuem e interagem entre si e com o polieletrólito.

Equação 29

$$[C^+]_E + [C^+]_D = \frac{\nu[P][C^+]_E}{2[A^-] + \nu[P]}$$

Equação 30

$$[A^-]_E + [A^-]_D = \frac{\nu[P][A^-]_E}{2[A^-]}$$

nas quais $P^{\nu-}$ é o poliânion, C^+ a somatória dos cátions presentes (fármaco e contraíons), A^- o ânion, D e E são as duas regiões delimitadas pela membrana semipermeável.

Desenvolvendo essas equações com as concentrações reais de cada componente, é possível determinar o grau de dissociação do polieletrólito e a concentração teórica de fármaco em cada região. Comparando o cálculo teórico aos resultados experimentais obtidos, verifica-se se o sistema é regido apenas pelo equilíbrio osmótico de Donnan (KENNON, HIGUCHI, 1956 e 1957).

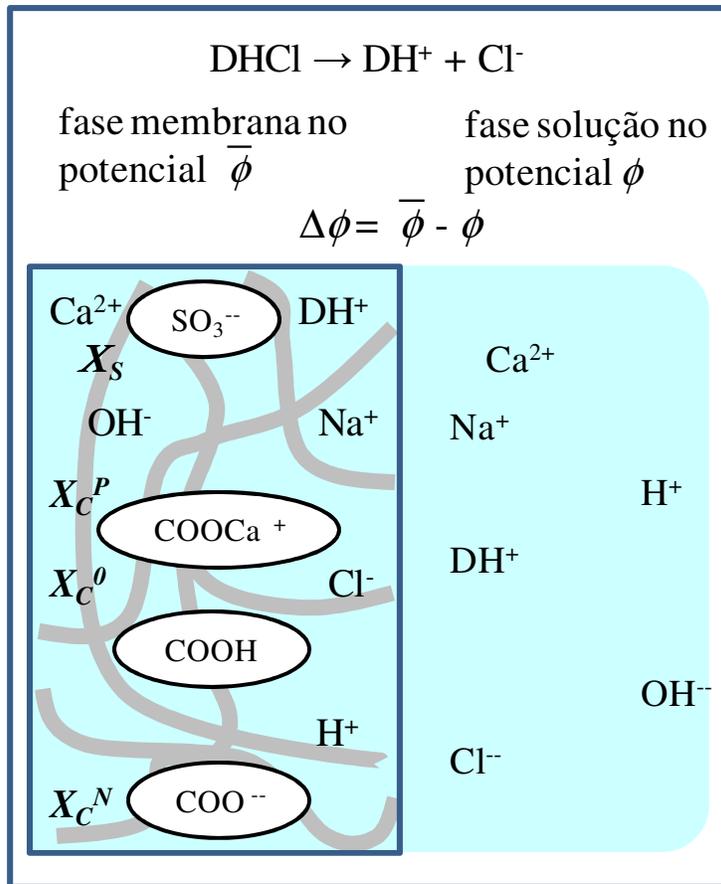


Figura 38: Representação esquemática do sistema modelado matematicamente utilizando a teoria do equilíbrio de Donnan (adap. RAMÍREZ *et al.*, 2002, pp 172).

Mais recentemente, Ramírez *et al.* (2002) realizaram a modelagem matemática do equilíbrio de Donnan em um sistema de fármaco catiônico DH^+ , cátions H^+ , Na^+ e Ca^{2+} , ânions Cl^- e OH^- , e uma membrana fixa contendo as seguintes terminações negativas ligadas a ela: ácido forte sulfônico ($-\text{SO}_3^-$), ácido fraco carboxílico nas formas dissociada ($-\text{COO}^-$) e neutra ($-\text{COOH}$) e grupos positivamente carregados decorrentes da ligação com os íons Ca^{2+} . A Figura 38 ilustra o sistema modelo estudado. Comparando os dados teóricos com resultados experimentais, avaliou-se os efeitos do pH, das concentrações de sal, de fármaco e de cargas fixas na membrana e da ligação de Ca^{2+} sobre o equilíbrio do fármaco iônico. Dentre os resultados obtidos, destaca-se o efeito que o aumento de concentração dos íons Na^+ e Ca^{2+} causa na liberação do fármaco catiônico através da substituição gradual de DH^+ na membrana por esses cátions. O efeito

do Ca^{2+} mostrou ser mais intenso devido a sua maior carga positiva. Aqui, pode-se fazer uma analogia à liberação de CHG que se iniciava quando o líquido original das suspensões era substituído pela solução de saliva artificial, rica em diversos sais.

Desvios desse comportamento, especialmente em sistemas com concentrações altas de fármacos, indicam mecanismos adicionais de interação e passam a ser explicados por uma somatória do efeito osmótico descrito anteriormente e por outro, de adsorção das moléculas de fármaco nas cadeias de polímero por mecanismos de fisissorção/quimissorção (KENNON, HIGUCHI, 1957; SINGH *et al.*, 1995; ATKINS, 1994; ABDEKHODAIE, WU, 2008).

Equação 31

$$\theta = \frac{Kp}{1 + Kp}$$

Equação 32

$$K = \frac{k_a}{k_d}$$

nas quais θ é o número de moléculas de ativo ligadas ao polímero, a e d representam os fenômenos de adsorção e dessorção, respectivamente, e p a pressão de vapor do fármaco (soluto).

O valor de K é diretamente proporcional à força de ligação do ativo com grupos carregados do polímero. Consequentemente, quanto maior for K , mais lenta e incompleta será a liberação do ativo, mantendo as outras condições constantes. Em $t \rightarrow \infty$, quando o sistema atinge o equilíbrio, mesmo que ainda exista um gradiente de concentração, sistemas com altos valores de K cessam a liberação. A fração de ativo que permanecerá ligada ao polímero no equilíbrio será diretamente proporcional a K (ABDEKHODAIE, WU, 2008).

Abdekhodaie e Wu (2008) apresentaram, pela primeira vez, um modelo matemático para mecanismo de liberação de ativo envolvendo tanto troca iônica

como contra-difusão transiente de um fármaco e de contraíons. Foi conduzida análise numérica para estudar o efeito de diferentes fatores envolvidos na liberação de ativos, incluindo condições do ambiente, propriedades dos materiais envolvidos e parâmetros experimentais. O modelo revelou a existência de perfis de concentração de contraíons e espécimes de fármaco, frente móvel de troca iônica e três regiões diferentes dentro de uma microesfera de troca iônica rígida, intumescida: região não-extraída, de troca iônica e de difusão do fármaco.

O sistema de micropartículas desenvolvido neste trabalho é composto por um polímero catiônico – quitosana protonada dissolvida em ácido acético diluído – um aniônico – alginato de sódio – o ativo clorexidina em sua forma catiônica associada ao ânion gluconato e cloreto de cálcio, agente de pré-gelificação das cadeias de alginato, em meio aquoso. É, portanto, um sistema complexo em termos da quantidade de componentes e da variedade de interações que se estabelecem, nos quais a aplicação dos conceitos e modelos discutidos exigiria a determinação teórica ou experimental de uma série de parâmetros adicionais do sistema, o que não chegou a ser realizado. No entanto, pela similaridade dos conceitos envolvidos, bem como pela relativa simplicidade em termos de parâmetros exigidos para resolver as equações diferenciais propostas e conduzir integração numérica, o modelo proposto por Abdekhodaie e Wu (2008) pareceu ser o mais aplicável ao sistema desenvolvido, para prever a cinética e o equilíbrio da liberação de CHG das MP de QTS/ALG e otimizar seu desenvolvimento em etapas futuras.

É necessária cautela na aplicação de modelos mais simples e que por isso são os mais presentes na literatura. Portanto, modelos como o de ordem zero, primeira ordem, de Higuchi e de Baker-Lonsdale não serão considerados, pois nenhum deles especifica o conjunto de condições geométricas, de concentração de fármaco e de interação ativo-polímero dos sistemas desenvolvidos neste trabalho (SIEPMANN E SIEPMANN, 2008).

Korsmeyer e Peppas (1981) apresentaram a "lei da potência" (Equação 33) como forma de descrever fenômenos de liberação de ativos de matrizes

poliméricas envolvendo diferentes fenômenos físico-químicos, diferenciando-os a partir dos valores de n obtidos da curva linearizada, de liberação (Equação 34).

Nos sistemas desenvolvidos, como a fase líquida não foi removida nem trocada, o sistema permaneceu em equilíbrio, não sendo verificadas alterações significativas nos diâmetros médios de partículas e nem no percentual de carregamento de CHG. Com intuito de simular sua aplicação tópica na cavidade oral, o estudo de liberação foi feito trocando o líquido original da suspensão por saliva artificial, o que levou ao início da liberação de CHG. Verificou-se que os perfis de liberação se estenderam por longos períodos, atingindo o máximo de liberação por volta de dois dias, indicando interação da CHG com as cadeias de alginato.

Equação 33

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{PK} t^n$$

Equação 34

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln k_{PK} + n \cdot \ln t$$

nas quais M_t é a massa de ativo liberado no tempo t , M_∞ é a massa de ativo quando a curva atinge o equilíbrio (assíntota), k_{PK} é a constante de Peppas-Korsmeyer e n é o expoente difusional, indicador do mecanismo regente da liberação no sistema.

Ritger e Peppas (1987a,b) descreveram os valores de n relacionados aos diferentes fenômenos de transporte (difusão Fickiana, não-Fickiana, de ordem zero, intumescimento de cadeias) para carregadores com diferentes geometrias: filmes finos, esferas, cilindros e discos (Tabela 17). No caso em estudo, será assumida geometria esférica para as micropartículas obtidas, o que é coerente com a metodologia empregada em sua obtenção, bem como com as imagens microscópicas obtidas.

Tabela 17: Expoentes difusionais n e mecanismos de liberação de sistemas de liberação sustentada com diferentes geometrias (RITGER, PEPPAS, 1987).

Expoente difusional n			Mecanismo de liberação de ativo
Filme fino	Cilindro	Esfera	
0,50	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,50 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Difusão não-Fickiana / Transporte anômalo / Mecanismos combinados
1,0	0,89	0,85	Liberação de ordem zero / Intumescimento de cadeias

A Tabela 18 apresenta os dados de ajuste dos perfis de liberação apresentados na Figura 36 ao modelo linear da Equação 30.

Tabela 18. Dados de ajuste dos perfis de liberação obtidos ao modelo de Peppas-Korsmeyer linearizado (Equação 34). Os dados ajustados corresponderam à fração inicial de 60% da massa total de CHG liberada em cada caso. As curvas indicando o ajuste linear realizado encontram-se na seção de Anexos, na seção 8.5.

EXP	N	R ²	σ	$\ln k_{PK}$ (\pm erro)	n (\pm erro)
0	11	0,92	0,20	-1,9 (0,1)	0,72 (0,07)
1	11	0,99	0,09	-2,3 (0,05)	0,49 (0,02)
3	5	0,97	0,14	-1,4 (0,08)	0,75 (0,07)
4	6	0,95	0,21	-1,9 (0,1)	0,78 (0,09)
5	12	0,93	0,18	-1,5 (0,09)	0,38 (0,03)

Este ajuste demonstrou ser adequado para até 60% da fração de massa de ativo liberada em função do tempo. Nesse cálculo, o valor M_{∞} é o ponto de liberação máxima de ativo para o meio, que pode corresponder ou não à liberação total de ativo incorporado à matriz (KORSMEYER, PEPPAS, 1981).

O ajuste dos dados ao modelo linear foi de razoável a bom. Verificou-se que as curvas relativas aos EXP 1 e EXP 5 são as que apresentaram os menores valores de n , 0,49 e 0,38. Esses dados são coerentes com os perfis apresentados nesses casos (Figura 36), onde a inclinação da reta na etapa inicial da liberação é nitidamente menor que dos outros. Apesar dos valores de n nessa faixa serem indicadores de difusão Fickiana, tal mecanismo não encontra suporte nas características físico-químicas destes sistemas, tampouco na combinação entre altas eficiências de incorporação e baixas quantidades de CHG liberadas desses sistemas. Os baixos valores de n nesses casos refletiram também a forte interação entre CHG e a matriz polimérica, que levou ao equilíbrio com liberação de pequena quantidade de ativo.

Nos casos dos EXP 0, 3 e 4, os valores de n obtidos (0,72, 0,75 e 0,78, respectivamente) foram todos bastante próximos entre si e se encontram na faixa onde a liberação se dá pela combinação de diversos mecanismos (transporte anômalo). Nestes casos, tais valores foram relacionados aos fenômenos de interações entre ativos iônicos e polieletrólitos que vêm sendo discutidos. Quando o valor do expoente difusional se aproxima de 1, o comportamento do sistema se assemelha ao de um sistema reservatório com fonte de atividade constante e liberação de ordem zero (SIEPMANN E SIEPMANN, 2008).

O estudo da difusão de solutos em sistemas hidrogéis homogêneos ou heterogêneos parte dos mesmos fenômenos mencionados anteriormente, mas busca explicá-la a partir de teorias como a do "Volume Livre", "Hidrodinâmica" e da "Obstrução". Além do efeito do solvente sobre a mobilidade do soluto existente nas duas primeiras teorias, a presença das cadeias de hidrogel foi modelada em todas elas como fator adicional de redução de difusão das moléculas de soluto. No caso de hidrogéis homogêneos, nos quais as cadeias poliméricas possuem

flexibilidade, o modelo hidrodinâmico escalar de Cukier explicou melhor a difusão de solutos. Em hidrogéis heterogêneos, em que as cadeias poliméricas são rígidas, geralmente devido a altos graus de reticulação, modelos de "Obstrução" se mostraram mais coerentes com os dados experimentais. Também não é considerada nesses modelos a existência de interações químicas entre o soluto e as cadeias poliméricas (AMSDEN, 1998, MASARO e ZHU, 1999).

De maneira geral, podem ser reconhecidos basicamente dois tipos de DDS com interações ativo-polímero: pró-fármacos poliméricos, nos quais o polímero continua solúvel mesmo após sua ligação às moléculas de ativo e resinas de troca iônica, que se encontram na forma sólida (KUMAR et al., 1964; CORO, 1997).

Badawi *et al.* (1980) acompanharam o perfil de liberação dos ácidos salicílico e p-aminosalicílico a partir de tabletes, obtidos por compressão, de copolímeros de metacrilato catiônico e aniônico (Eudragit E e Eudragit L90, respectivamente). Avaliando a dissolução de cada tablete, verificou-se que o copolímero de metacrilato catiônico ligou-se quimicamente a ambos os ácidos, enquanto que o copolímero aniônico interagiu apenas com o ácido p-aminosalicílico, indicando possível reação entre o grupo amino do ácido e o grupo aniônico do polímero.

De forma semelhante, Jenquin e McGinity (1994) realizaram experimentos de liberação de ativo e sorção com sistemas DDS formados pelas resinas acrílicas Eudragit RS e RL com as substâncias modelo ácido salicílico e maleato de clorfeniramina e também analisaram diversas de suas propriedades físico-químicas, com intuito de discutir os mecanismos de interação fármaco-polímero. Estudos de difração de raios X indicaram que o ácido salicílico estava em solução com o polímero e não como material cristalino disperso. Os polímeros Eudragit avaliados possuíam grupos quaternário de amônio e interagiram com os grupos catiônicos dos ativos de forma semelhante à de resinas de troca iônica. Durante os estudos de sorção, constatou-se que tanto ligações reversíveis como irreversíveis ocorreram, indicando mais de um tipo de interação. A reversibilidade da ligação de ácido salicílico quando houve alteração da força iônica do meio indicou interação iônica eletrostática como o tipo primário de interação. A inexistência de alterações no posicionamento de bandas de absorção e de

surgimento de novas bandas, sugeriu que a formação de ligações de hidrogênio e de ligações covalentes entre as substâncias era mínima ou inexistente. Reduções de pH e aumento de força iônica do meio diminuíram a sorção e aumentaram a liberação de ativo da matriz polimérica.

Takka (2003) avaliou a interação de cloridrato de propanolol com copolímeros metacrilato aniônicos (Eudragit S100 e Eudragit L 100-55) e com carboximetilcelulose sódica, utilizando espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). As curvas de DSC dos complexos indicaram mudança no estado cristalino do propanolol, bem como alterações na temperatura de transição vítrea dos polímeros, ambas indicações de forte interação entre ativos e polímeros. Nos espectros de FTIR, constatou-se o surgimento de bandas relativas à formação de sal nos espectros dos complexos com copolímeros acrilato, em 1550 e 1556 cm^{-1} , o que não ocorreu com carboximetilcelulose sódica.

4.3.7. Avaliação da eficácia antimicrobiana

4.3.7.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é considerada a menor concentração da fármaco capaz de inibir qualquer crescimento microbiano visível no ensaio. Após 48 horas (+/- 2h) de incubação a 35°C, o crescimento fúngico em cada pocinho foi comparado com o do controle positivo (Figura 12), observado visualmente com auxílio de um espelho de leitura (BIANCALANA *et al.*, 2011).

A avaliação de eficácia das suspensões desenvolvidas frente a cepas padrão de fungos, ao invés de trabalhar com bactérias da microbiota bucal em condições normais ou patológicas, foi devido ao conhecimento estabelecido de que CHG é um ativo de grande eficiência contra diversos fungos e bactérias, especialmente os gram-negativos. A avaliação de eficácia de sistemas de liberação sustentada frente a cepas fúngicas padrão, em comparação com o efeito do ativo em sua forma livre, permite uma extrapolação razoável desse efeito para outros fungos e bactérias, na forma de cepas padrão ou isolados de ocorrência natural.

As Figuras 39 e 40 demonstram a leitura da placa de microtitulação com auxílio do espelho e o crescimento fúngico dentro dos pocinhos. Os resultados de CIM de crescimento das cepas padrão avaliadas, para determinação da sensibilidade frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina, estão resumidos na Tabela 19. Imagens de placas de cultura indicando o crescimento das cepas padrão utilizadas, como forma de assegurar a validade dos estudos realizados, encontram-se na seção de Anexos, na seção 8.6.



Figura 39: Sistema de leitura da placa de microtitulação com auxílio de espelho.



Figura 40: Crescimento fúngico dentro dos pocinhos da placa de leitura.

De acordo com o parâmetro utilizado nesse estudo, concentrações separadas por até duas diluições seriadas ao meio devem ser consideradas estatisticamente equivalentes (NCCLS, 2002, BIANCALANA et al., 2011). De acordo com esse parâmetro, ambos os padrões de CHG apresentaram CIM equivalentes em todos os microrganismos avaliados.

No caso de *C. albicans*, somente a suspensão EXP 3 apresentou CIM significativamente mais baixa, 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Para *C. parapsilosis*, somente a suspensão EXP 4 apresentou CIM mais baixa que as outras, também 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Para *C. krusei*, ambas se diferenciaram, com CIM de 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando que, frente aos microrganismos padrão avaliados, em alguns casos essas duas suspensões se mostraram mais eficientes que a CHG em solução padrão ou em sua versão comercial.

Buscando comparar os resultados de CIM obtidos ao carregamento de CHG dessas suspensões (Tabela 15), e também ao seu perfil de liberação (Figura 36), constatou-se que, apesar de as amostras dos EXP 3 e EXP 4 possuírem concentrações mais baixas de CHG incorporada que as dos EXP 0, 1 e 5, o equilíbrio entre os componentes dessas micropartículas permitiu liberação de CHG

em quantidade e velocidade mais equilibradas, permitindo CIM mais baixas para alguns microrganismos.

Tabela 19: Resultados de concentração inibitória mínima de crescimento das cepas padrão avaliadas, para determinação da sensibilidade frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina.

Ativo	CIM – Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
	Cepa padrão avaliada		
	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Solução de digluconato de clorexidina (CHG) ^(a)	8	4	8
Periogard® Colgate ^(b)	8	2	8
Suspensão EXP 0	4	2	2
Suspensão EXP 1	2	1	2
Suspensão EXP 3	0,5	4	0,5
Suspensão EXP 4	2	0,5	1
Suspensão EXP 5	4	1	2

(a) Diluição a partir de CHG Sigma-Aldrich 20 % (m/V)

(b) Produto comercial – CHG 0,12% (m/V)

4.3.7.2. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

CFM pode ser definida como a menor concentração plasmática de antimicrobiano necessária para promover uma resposta. Para os microbiocidas (antimicrobianos letais), a CFM tem que ser similar à CIM, promovendo diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias (CFU) observadas em comparação ao crescimento do controle positivo (BIANCALANA *et al.*, 2011).

A Tabela 20 apresenta os resultados de CFM das cepas padrão avaliadas frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina. A Figura 41 mostra as placas de experimento de CFM realizadas para os três microrganismos.

Os experimentos de CFM realizados tiveram um fator diferente do padrão empregado no restante das avaliações microbiológicas: nessa rodada, as micropartículas não foram ressuspensas no meio de cultura líquido; foram, ao invés disso, pipetadas diretamente após remoção do líquido original da suspensão. Dessa forma, a CFM obtida não pode ser comparada diretamente às CIM apresentadas na seção anterior e por isso são também apresentadas na Tabela 20 os dados de CIM obtidos no mesmo experimento em que as CFM foram determinadas.

Da mesma forma em que nos resultados de CIM, concentrações diferentes entre si em até duas diluições seriadas ao meio, devem ser consideradas equivalentes.

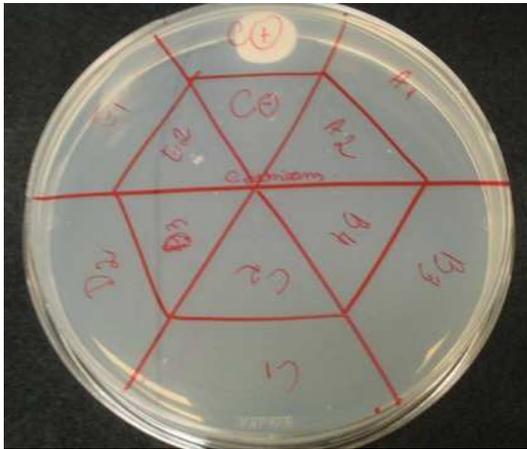
Tabela 20: Resultados de CFM das cepas padrão avaliadas frente às diferentes formas de veiculação de clorexidina. Os números entre parênteses são as CIM obtidas no mesmo experimento no qual as micropartículas não foram ressuspensas em líquido antes de serem pipetadas.

Ativo	CFM – Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
	Cepa padrão avaliada		
	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Suspensão EXP 0	2 (2)	0,5 (0,5)	0,5 (1)
Suspensão EXP 1	2 (2)	1 (0,25)	0,25 (1)
Suspensão EXP 3	0,5 (1)	0,125 (0,125)	0,125 (0,25)
Suspensão EXP 4	0,5 (0,5)	0,25 (0,125)	0,125 (0,25)
Suspensão EXP 5	1 (2)	0,5 (0,5)	0,5 (0,5)

Notou-se que estes resultados de CFM são, na maioria dos casos, equivalentes aos da CIM, havendo sido obtida a mesma concentração para ambas, ou a diferença entre elas foi menor que duas diluições seriadas ao meio. Tais resultados são confirmadores do mecanismo de ação da clorexidina, que se liga

aos fosfolipídeos das membranas do microrganismo, levando a extravazamento citoplasmático e consequente destruição celular. Por isso clorexidina é classificada como substância antisséptica e não como um antibiótico (BONESVOLL *et al.*, 1974; HUGO, LONGWORTH, 1964; DENTON, 1991).

a)



b)



c)

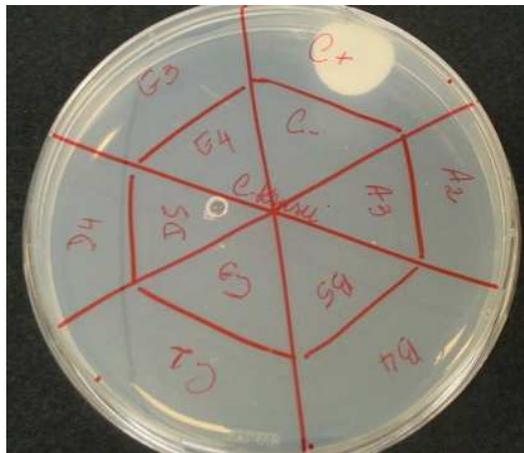


Figura 41: Placas de experimento de CFM realizadas para os três microrganismos avaliados. a) *C. albicans*; b) *C. parapsilosis*; c) *C. krusei*.

5. CONCLUSÕES

Com objetivo de desenvolver um sistema bioadesivo biocompatível de potencial uso tópico bucal para liberação sustentada do antisséptico digluconato de clorexidina (CHG), suspensões de micropartículas foram obtidas através da complexação dos polieletrólitos quitosana (QTS) e alginato de sódio (ALG) e de CHG a partir da pré-gelificação das cadeias de ALG por íons cálcio (Ca^{2+}).

Os estudos de métodos de obtenção e agitação permitiram obter distribuições de diâmetros de partículas (PSD) adequadas. Através de delineamento experimental, estabeleceu-se o efeito dos principais componentes do sistema sobre o diâmetro mediano (D), eficácia de incorporação (EI%) e percentual de carregamento de clorexidina (PC%).

O perfil de liberação de CHG em saliva artificial foi sustentada por até sete dias, indicando incorporação de CHG através de interação química ativo-polímero. A intensidade de interação CHG-ALG em cada formulação resultou em diferença expressiva na quantidade e percentual de CHG liberado.

Os mecanismos envolvidos na cinética de liberação e sua modelagem matemática são complexos devido à diversidade de fenômenos que precisam ser considerados, principalmente devido à existência de interação ativo-polímero. Pela similaridade dos conceitos envolvidos, o modelo proposto por Abdekhodaie e Wu (2008) pareceu ser o mais aplicável ao sistema desenvolvido, para prever a cinética e o equilíbrio da liberação de CHG das MP de QTS/ALG e otimizar seu desenvolvimento em trabalhos futuros.

O modelo matemático semi-empírico de Peppas-Korsmeyer, conhecido como lei da potência, foi aplicado aos perfis de liberação de CHG de algumas formulações. Foi possível relacionar adequadamente os valores obtidos para o expoente n com os fenômenos físico-químicos propostos para explicar a cinética de liberação desses sistemas: fisissorção e quimissorção do ativo nas cadeias poliméricas, troca iônica com o meio por diferença de potencial químico, difusão, intumescimento e alterações na matriz polimérica.

As análises preliminares de eficácia antimicrobiana indicaram que os sistemas de liberação sustentada desenvolvidos apresentaram eficácia inibitória (CIM) e biocida (CFM) comparáveis à de CHG livre e do produto comercial de referência frente às cepas de microrganismos padrão avaliadas.

Devido à complexidade do sistema, há ainda diversos aspectos que poderão ser aprofundados para ampliar o conhecimento a respeito de sua obtenção, propriedades finais e da relação entre elas. A escolha de quais parâmetros do sistema precisarão ser mais bem compreendidos dependerá da aplicação a que se estiver visando.

Portanto, conclui-se que esta Tese contribuiu tanto com o estabelecimento dos parâmetros experimentais básicos, como também com a identificação e discussão dos principais fenômenos físicoquímicos do sistema.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver técnica de quantificação direta da clorexidina incorporada às micropartículas.
- Determinar as condições ideais para secagem das micropartículas por liofilização ou em estufa.
- Desenvolver sistema com meio líquido espessado que mantenha as micropartículas homoganeamente distribuídas e evite sua decantação.
- Aprofundar o conhecimento dos diversos efeitos de componentes sobre o carregamento e liberação de clorexidina, através de planejamentos experimentais e análises estatísticas adicionais.
- Avaliar *in vitro* a bioadesividade das micropartículas em modelo simulador da cavidade oral, utilizando mucina gástrica de porco.
- Investigar as interações químicas entre a substância ativa e os polímeros do sistema, através de experimentos de liberação adicionais em meios de diferentes forças iônicas, com o intuito de verificar se nessas condições uma fração maior de CHG seria liberada.
- Investigar as interações químicas entre a substância ativa e os polímeros do sistema, através de comparação entre dados adicionais de caracterização das micropartículas obtidas e misturas físicas (a seco) de seus componentes.
- Desenvolver estudos conjugados de liberação sustentada das MP e avaliação de efeito antimicrobiano, para estabelecer correlação entre PC% e eficácia antimicrobiana.
- Realizar testes *in vivo* e testes clínicos, para confirmar a eficácia dos sistemas desenvolvidos e estabelecer forma, frequência e dosagens de aplicação recomendadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S.A.; AMINABHAVI, T.M. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J. Control. Rel.* 96, pp. 245–259, 2004.

AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.* 100, pp. 5–28, 2004

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of ultrasonic atomization as a new approach to prepare ionically cross-linked chitosan microparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, pp. 821-829, 2005.

APPEL, G.; REUS, M. *Formulações aplicadas à odontologia*. RCN Editora, São Paulo, pp.193-197, 2005.

ASH, M.; ASH, I. *Handbook of pharmaceutical additives*. (3rd Ed.), edição eletrônica, 2008 Disponível em http://knovel.com/web/portal/browse/display?EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2191&VerticalID=0. Acesso em 20 jan 2012.

ATKINS, P.W. *Physical chemistry*. (5th Ed.), Oxford University Press, Oxford, pp.218-219; 985-993, 1994.

BARAHNI-MOUGEOT, F.K.; PASTER, B.J.; COLEMAN, S.; BARBUTO, S.; BRENNAN, M.T.; NOLL, J.; KENNEDY, T.; FOX, P.C.; LOCKHART, P.B. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 45, pp. 1588-1593, 2007.

BARBOZA, A.C.R.N.; PESSINE, F.B.T. Micropartículas de quitosana reticuladas com trifosfato de sódio: distribuição de tamanhos. *33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindoia, 2010.

BARUCH, L.; MACHLUF, M. Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: effect on mechanical properties and on long-term viability. *Biopolymers* 82, pp. 570-579, 2006.

BERALDO, C.C.; ANDRADE, D. Higiene bucal com clorexidina na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica. *J. Bras. Pneumol.* 34, pp. 707-714, 2008.

BERDAL, J.E.; BJØRNHOLT, J.; BLOMFELDT, A.; SMITH-ERICHSEN, N.; BUKHOLM, G. Patterns and dynamics of airway colonisation in mechanically-ventilated patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, pp. 476–480, 2007.

BIANCALANA, F.S.C.; LYRA, L.; MORETTI, M.L.; SCHREIBER, A.G.Z. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, pp. 378–385, 2011.

BODDOHI, S.; MOORE, N.; JOHNSON, P.A.; KIPPER, M.J. Polysaccharide based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan heparin and hyaluronan. *Biomacromolecules* 10, pp. 1402–1409, 2009.

BODMEIER, R.; OH, K.-H.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, pp. 1475-1494, 1989.

BOGDANIC, G.; FREDENSLUND, A. Revision of the group-contribution flory equation of state for phase equilibria calculations in mixtures with polymers. 1. prediction of vapor-liquid equilibria for polymer solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33, pp. 1331-1340, 1994.

BONESVOLL, P.; GJERMO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regards to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Archives Oral Biol.* 23, pp. 289-294; 1978.

BONESVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G.; PAUS, P.N. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Archives Oral Biol.* 19, pp.209-212, 1974.

BONITO, A.J.; LUX, L.; LOHR, K.N. Impact of local adjuncts to scaling and root planning in periodontal disease therapy: a systematic review. *J. Periodontol.* 76 , pp. 1227-1236, 2005.

BROMBERG, L.E.; BRAMAN, V.M.; ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P.; O'CONNOR, S.M.; NELSON, E.J.; BUXTON, D.K.; TONETTI, M.S.; FRIDEN, P.M. Sustained release of silver from periodontal wafers for treatment of periodontitis. *J. Control. Rel.* 68, pp. 63-72, 2000.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2, pp. 1089-1096, 2001.

BROMBERG, L.E.; BUXTON, D.K.; FRIDEN, P.M. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. *J. Control Rel.* 71, pp. 251-259, 2001.

BRUSCHI, M.L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *J. Pharm. Sci.* 96, pp. 2074-2089, 2007.

CDC. *Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia*, 2003. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5303a1.htm>>. Acesso em 12 jul 2013.

CESCHEL, G.C.; BERGAMANTE, V.; CALABRESE, V.; BISERNI, S. Design and evaluation *in vitro* of controlled release mucoadhesive tablets containing chlorhexidine. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, pp. 53-61, 2006.

CHANEY; RUEST, A; O'MEADE, M.; COOK, D.J. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 334:889. Epub Mar 26, 2007

CHIEN, Y.W. Thermodynamics of controlled drug release from polymeric delivery devices In: PAUL, D. et al. *Controlled Release of Polymeric Formulations*. ACS Symposium Series 33, pp. 53-71, 1976.

CHIEN, Y.W. *Polymeric Materials in Medication*. Plenum Press, New York, pp. 27-46, 1985.

CONTI, B.; MODENA, T.; GENTA, I.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F. A proposed new method for the crosslinking of chitosan microspheres. *Drug Deliv.* 5, pp. 87-93, 1998.

CONTI, B.; MODENA, T.; GENTA, I.; PERUGINI, P.; DACARRO, C.; PAVANETTO, F. Microencapsulation of cetylpyridinium chloride with a bioadhesive polymer. In: *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, pp. 822-823, 1998.

COPPI, G.; IANNUCELLI, V; LEO, E.; BERNABEI, M.T.; CAMERONI, R. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *J. Microencapsulation* 19, pp. 37-44, 2002.

CORRIGAN, D.O.; HEALY, A.M.; CORRIGAN, O.I. Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62, pp. 295–305, 2006.

CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D.; AVILACAMPOS, M.J.; TORTAMANO, N.; ROCHA, R.G. The chlorhexidine: β -cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 40, pp. 297–302, 2001.

COSYN, J.; WYN, I.; DE ROUCK, T.; SABZEVAR, M.M. Long-term clinical effects of a chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 77, pp. 406-415, 2006.

CROWLEY, M.M.; SCHROEDER, B.; FREDERSDORF, A.; OBARA, S.; TALARICO, M.; KUCERA, S.; MCGINITY, J.W. Physicochemical properties and mechanism of drug release from ethyl cellulose matrix tablets prepared by direct compression and hot-melt extrusion. *Int. J. Pharm.* 296, pp. 509-522, 2004.

DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems: methodical aspects and general tendencies. In: RADEVA, T. *Physical chemistry of polyelectrolytes*. Marcel Dekker, New York, pp. 743-792, 2001.

DEACON, M.P.; MCGURK, S.; ROBERTS, C.J.; WILLIAMS, P.M.; TENDLER, S.J.B; DAVIES, M.C.; DAVIS, S.S.; HARDING, S.E. Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. *Biochem. J.* 348, pp. 557-563, 2000.

DECKER, E.-M.; WEIGER, R.; WIECH, I.; HEIDE, P.-E.; BRECX, M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur. J. Oral Sci.* 111, pp. 144-148, 2003.

DENTON, G.W. Chlorhexidine. *Disinfection, sterilization and preservation*. (4th Ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 274-289, 1991.

DERISO, A.J.; LADOWSKI J.S.; DILLON T.A.; JUSTICE J.W.; PETERSON A.C. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 109, pp. 1556-1561, 1996.

DOUGLAS, K.L.; TABRIZIAN, M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, vol. 16, n. 1, pp. 43-56, 2005.

EDSMAN, K.; HÄGERSTROM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, pp. 3-22, 2005.

ELEY, B.M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque — a review *Br. Dent. J.* 186, pp. 286-296, 1999.

ENGLISH, J.P.; DANG, W.; ZHAO, Z. Fabrication of controlled delivery devices. In: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. John Wiley & Sons, pp. 349-364, 1999. Edição eletrônica. Disponível em: <www.knovel.com>. Acesso em 10 jun 2010.

FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P.A.; LI, L. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *J. Phys. Chem. B.* 111, pp. 2456-2462, 2007.

FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P.A. Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Pol.* 72, pp. 334-341, 2008.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R.; CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res* 16, pp. 1578-1581, 1999.

FMC Biopolymer, Alginates: a world of possibilities lies just below the surface, pp. 2-11. Disponível em: www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceutical/Products/Alginates.aspx. Acesso em 13 jul 2013.

GASTMEIER, P.; GEFERS, C. Prevention of ventilator-associated pneumonia: analysis of studies published since 2004. *J. Hosp. Infec.* 67, pp. 1-8, 2007.

GANDHI, R.B.; ROBINSON, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, pp. 43-74, 1994.

GARCIA, R.B.; DA SILVA, D.L.P.; COSTA, M.; RAFFIN, F.N.; RUIZ, N.M.S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. *Quím. Nova* [online]., vol. 31, n. 3, pp. 486-492. ISSN 0100-4042, 2008.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. *J. Control. Rel.* 114, 1-14, 2006.

GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M.A.; MUSOTTO, G.C.; GIANGRECO, R. In Vitro Antifungal Properties of Mouthrinses Containing Antimicrobial Agents. *J. Periodontol.* 68, pp. 729-733, 1997.

GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M.A.; MUSOTTO, G.C.; GIANGRECO, R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 87, pp. 44-49, 1999.

GOVENDER, S.; PILLAY, V.; CHETTY, D.J.; ESSACK, S.Y.; DANGOR, C.M.; GOVENDER, T. Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres. *Int. J. Pharm.* 306, pp. 24-40, 2005.

GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32, pp. 195-198, 1973.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY S.S.; GUNSOLLEY, J.C. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann. Periodontol.* 8, pp. 115-181, 2003.

HAFFAJEE, A.D.; TORRESYAP, G.; SOCRANSKY, S.S. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J. Clin. Periodontol.* 34, pp. 243-253, 2007.

HARDING, S.E. Trends in mucoadhesive analysis. *Trends Food Sci. Tech.* 17, pp. 255-262, 2006.

HERRERA, D.; SANZ, M.; JEPSEN, S.; NEEDLEMAN, I.; ROLDÁN, S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 29 (Suppl. 3), pp. 136-159, 2002.

HEUX, L.; BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES J.; VERSALI, M.-F; RINAUDO, M. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1, pp. 746-751, 2000.

HIEMENZ, P.C.; LODGE, T.P. *Polymer Chemistry.* (2nd Ed.), CRC Press, pp. 24-31, 2007.

HOUSTON, S.; HOUGLAND, P.; ANDERSON, J.J.; LAROCCO, M.; KENNEDY, V.; GENTRY, L.O. Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in

reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Am. J. Critical Care* 11, pp. 567-570, 2002.

HUDSON, S.M.; JENKINS, D.W. Chitin and chitosan. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. John Wiley & Sons, vol. 1, pp. 569-580, 1964.

HUGO, W.B.; LONGWORTH, A.R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 16, pp. 655-662, 1964.

HUYNH, T.T.N.; PADOIS, K.; SONVICO, F.; ROSSI, A.; ZANI, F.; PIROT, F.; DOURY, J.; FALSON, F. Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 74, pp. 255-264, 2010.

IHI. *How-to guide: prevent ventilator-associated pneumonia*. Cambridge, MA. Institute for Healthcare Improvement; 2012. Disponível em <www.ihl.org>. Acesso em 19 mai 2013.

İKINCI, G.; ŞENEL, S.; AKINCIBAY H.; KAŞ, S.; ERCİŞ, S.; WILSON, C.G.; HINCAL, A.A. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int. J. Pharm.* 235, pp. 121-127, 2002.

IRWIN, C.R.; MCCULLOUGH, K.C.; JONES, D.S. Chlorhexidine-containing mucoadhesive polymeric compacts designed for use in the oral cavity: an examination of their physical properties, *in vitro/in vivo* drug release properties and clinical acceptability. *J. Material Sci. Mat. Med.* 14, pp. 825-832, 2003.

JACOBSEN, J.; VAN DEURS, B.; PEDERSEN, M.; RASSING, M.R. TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. *Int. J. Pharm.* 125, pp. 165-184, 1995.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.G.; ANDREWS, G.P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int. J. Pharm.* 372, pp. 49-58, 2009.

JOTHI, M.V.; BHAT, K.M.; PRATIBHA, P.K.; BHAT, G.S. The evaluation of a biodegradable dental chip containing chlorhexidine in chitosan base as a targeted drug delivery in the management of chronic periodontitis in patients. *Drug Dev. Res.* 70, pp. 395-401, 2009.

KASAAI, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 71, pp. 497-508, 2008.

KITTUR, F.S.; HARISH PRASHANTH, K.V.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl

derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers* 49, pp. 185-193, 2002.

KO, J.A.; PARK, H.J.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; LEE, J.S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 249, pp.165-174, 2002.

KOCKISCH, S.; REES, G.D.; YOUNG, S.A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an *in vitro* evaluation of mucoadhesive potential. *J. Pharm. Sci.* 92, p. 1623, 2003.

KOEMAN, M.; VAN DER VEN, A.J.A.M.; RAMSAY, G.; HOEPELMAN, I.M.; BONTEN, M.J.M. Ventilator-associated pneumonia: recent issues on pathogenesis, prevention and diagnosis. *J. Hosp. Infection* 49, pp.155-162, 2001.

KOEMAN, M.; VAN DER VEN, A.J.A.M.; HAK, E.; IOORE, H.C.A.; KAASJAGER, K.; SMET, A.G.A.; RAMSAY, G.; DORMANS, T.P.J.; AARTS, L.P.H.J.; BEL, E.R.; HUSTINX, W.N.M.; TWEEL, I.; HOEPELMAN, A.M.; BONTEN, M.J.M. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173. pp 1348–1355, 2006.

KOFUJI, K.; QIAN, C.-J.; MURATA, Y.; KAWASHIMA, S. Preparation of chitosan microparticles by water-in-vegetable oil emulsion coalescence technique. *React. Funct. Polym.* 62, pp. 77–83, 2005.

KOUSKOUMVEKAKI, I.A.; ABILDSKOV, V. Thermodynamic modeling as a tool in the design of microsphere controlled-delivery systems. *Chem. Eng. Res. Des.* 84 , pp. 652-663, 2006.

KUMAR, N.; CHAUBAL, M.; DOMB, A.J.; MAJETI, R.K.N.V. Controlled release technology. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. John Wiley & Sons, vol. 5, pp. 697-721, 1964-1972.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* 8, pp. 2533-2541, 2007.

LI, X.; KONG, X.; SHI, S.; ZHENG, X.; GUO, G.; WEI, Y.; QIAN, Z. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnol.* 8, pp. 89-99, 2008.

LI, Y.; MCCLEMENTS, J. Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. *Food Hydrocolloids* 25, pp. 1025-1033, 2001.

MAGLIOLI, T.S., *Topoi* argumentativos nos provérbios e ditos populares. *Filologia*. Edição eletrônica, disponível em <<http://www.filologia.org.br/revista/36/11.htm>>. Acesso em 04 jun 2010.

MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D.; JACOB, J.S.; SANTOS, C. Bioadhesive drug delivery systems. In: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, John Wiley & Sons Editora, vol. 1-2, pp. 9-16, 1999. Edição eletrônica, disponível em: <www.knovel.com>. Acesso em 10 jun 2010.

MATHIOWITZ, E.; KREITZ, M.R.; BRANNON-PEPPAS, L. Microencapsulation. In: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. John Wiley & Sons, vol. 1-2, pp. 493-504, 1999. Edição eletrônica disponível em <www.knovel.com> Acesso em 10 jun 2010.

MCBAIN, A.J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R.G.; GILBERT, P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of *in vitro* oral bacterial ecosystems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, pp. 3531-3538, 2003.

MEILLER, T.F.; KELLEY, J.I.; JABRA-RIZK, M.A.; DEPAOLA, L.G.; ABDULLAHEL BAQUI, A.A.M.; FALKLER, W.A. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 91, pp.663-670, 2001.

MERCK & CO. INC. Chlorhexidine. *The Merck Index Online*. All rights reserved. Dialog File Number 304 Accession Number 00209, 2010. Disponível em <<http://www.rsc.org/publishing/merckindex/index.asp>> Acesso em 31 jan 2010.

MI, F.; SHYU, S.; LEE, S.; WONG, T. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method *J. Pol. Sci.: Part B: Pol. Phys.* 37, pp. 1551–1564 ,1999.

MI F.-L.; SUNG H.-W.; SHYU S.-S.; SU C.-C.; PENG C.-K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer* 44, pp. 6521-6530, 2003.

MICROMEDEX, *Chlorhexidine*. Disponível em <<http://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch>> Acesso em 20 jan 2012.

MIKOS, A.G.; PEPPAS, N.A. Flory interaction parameter χ for hydrophilic copolymers with water. *Biomaterials* 9, pp. 419-423, 1988.

MÖBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Zinc–alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. *Eur. J.Pharm. Biopharm.* 81, pp. 121–130, 2012

MODENA, T.; GENTA, I.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; DACARRO, C.; CONTI, B. Development of a microencapsulated antiseptic agent intended for cutaneous wound healing. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti*, 10, pp. 227-239, 1999.

MOUSTAFINE, R.I.; ZAHAROV, I.M.; KEMENOVA, V.A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit and PO/Eudragit L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, pp. 26-36, 2006.

MUNRO, C.L.; GRAP, M.J.; JONES, D.I.; MCCLISH, D.K.; SESSLER, C.N. Chlorhexidine, tooth brushing and preventing ventilator-associated pneumonia in critically ill adults. *Am. J. Critical Care* 18, pp. 428-437, 2009.

MURTAZA, G.; WASEEM, A.; NISAR-UR-REHMAN; HUSSAIN, I. Alginate microparticles for biodelivery: a review. *African J. Pharmacy Pharmacol.* 5, pp. 2726-2737, 2011.

NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S.K.; PEPPAS, N.A. Release kinetics, data interpretation. In: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. John Wiley & Sons, vol. 1-2, pp. 921-941, 1999. Edição eletrônica disponível em <www.knovel.com>. Acesso em 10 jun 2010.

NCCLS. *Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; norma aprovada - Segunda edição*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, pp. 19087-1898, 2002.

NIETO, J. M.; PENICHE-COVAS, C. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 176, pp. 63-68, 1991.

OLIVEIRA, B.F.; SANTANA, M.H.A.; RE, M.I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. *Braz. J. Chem. Eng.* 22, pp. 353-360, 2005.

OLIVEIRA, B.F.; SANTANA, M.H.A.; RE, M.I. Spray-dried chitosan microspheres as a pDNA carrier. *Drying Technol.* 24, pp. 373-382, 2006.

PAJU S; SCANNAPIECO F.A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis.* 13, pp. 508-512, 2007.

PARK, J.W.; CHOI, K-H; PARK, K.K. Acid-base equilibria and related properties of chitosan. *Bul. of Kor. Chem. Soc.* 4, pp. 68-72, 1983.

PEPPAS, N.A.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of fragrances from polymers I: thermodynamic analysis. *J. Control. Rel.* 40, pp. 245-250, 1996.

Periochip[®]. Disponível em <<http://periochip.com>>. Acesso em 19 mai 2013.

PETERSEN, E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J. Periodontol.* 76, pp. 2187-2193, 2005.

PETERSEN, P.E. *The world oral health report 2003*. Disponível em <http://www.who.int/oral_health/publications/report03/en/index.html>. Acesso em 31 jul 2013.

PETRIE, E.M. *Handbook of adhesives and sealants 2000*. McGraw-Hill, pp. 49-91, 2000. Edição eletrônica disponível em <www.knovel.com> Acesso em 12 jun 2010.

PIÑÓN-SEGUNDO, E.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALONSO-PÉREZ, V.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Pharm.* 294, pp. 217-232, 2005.

POLISHCHUK, A.Y.; ZAIKOV, G.E. *Multicomponent transport in polymer systems for controlled release*. Gordon and Breach Science Publ., Amsterdam, pp. 1-43, 1997.

RANADE, V. V.; HOLLINGER, M. A. Role of polymers in drug delivery. *Drug Delivery Systems*, CRC Press, Boca Raton, pp. 73-78, 1995.

REVELLE, L. K.; DOUB, W. H.; WILSON, R. T.; HARRIS, M. H.; RUTTER, A. M. Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. *Pharm. Res.* 10, pp. 1777-1784, 1993.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, pp. 603-632, 2006.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, pp. 1666-1691, 2005.

SALOMONSEN, T.; JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; STEUERNAGEL, S.; ENGELSEN, S. B. Alginate monomer composition studied by solution- and solid-state NMR – a comparative chemometric study. *Food Hydrocolloids* 23, pp. 1579-1586, 2009A.

SALOMONSEN, T.; JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; STEUERNAGEL, S.; ENGELSEN, S. B. Direct quantification of M/G ratio from ¹³C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution. *Carbohydrate Research* 344, pp. 2014-2022, 2009B.

SANTAGAPITA, P.R.; MAZZOBRE, M.F.; BUERA, M.d.P. Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. *Food Res. Int.* 47, pp. 321–330, 2012.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers* 66, pp. 1-7, 2006.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res.* 24, pp 2198-2206, 2007.

SASHIWA, H.; SHIGEMASA, Y. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohydrate Pol.* 39, pp.127-138, 1999.

SBPT. Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica. *J. Bras. Pneumol.* 33 (Supl 1), S1-S30, 2007.

SCHATZ, C.; DOMARD, A.; VITON, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* 5, pp. 1882-1892, 2004.

SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; VIVIEN-CASTIONI; GURNY, R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, pp. 83-99, 2000.

SERRA, M.C.; CURY, J.A. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence Int.* 23, pp. 39-44, 1992.

SHEA. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals. *Infection Control Hosp. Epidemiol.* 29, (October 2008), pp. S31-S40. Disponível em <<http://www.ijstor.org/stable/10.1086/591062>> Acesso em 31 jul. 2013.

SHEIHAM, A. *Bulletin of the World Health Organization* 83, pp. 644-645, 2005. Disponível em <www.who.int/bulletin/volumes/83/9/661.pdf> Acesso em 04 jun. 2010.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* 364, pp. 328-343, 2008.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274, pp. 1-33, 2004.

SMART, S.D. *Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development.* Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 11-23, 1999.

SMIDSRØD, O.; LARSEN, B.; PAINTER, T.; HAUG., A. The role of intramolecular autocatalysis in the acid hydrolysis of polysaccharides containing 1,4-linked hexuronic acid. *Acta Chem. Scand.*, 23, pp. 1573-1580, 1969.

SOARES, J. P.; SANTOS, J. E.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química* 29, número 2, 2004.

SOGIAS, I.A.; WILLIAMS, A.C.; KHUTORYANSKIY, V.V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* 9, pp. 1837-1842, 2008.

SRINATHA, A.; PANDIT, J.K.; SINGH, S. Ionic cross-linked chitosan beads for extended release of ciprofloxacin: *in vitro* characterization. *Indian J. Pharm. Sci.* 70, pp.16-21, 2008.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLNE, A.; SELA, M.N. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: *in vitro* release study. *J. Periodontol.* 61, pp. 393-398, 1990.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A.K. Buccal bioadhesive drug delivery - a promising option for orally less efficient drugs *J. Control. Rel.* 114, pp. 15-40, 2006.

TAKKA, S.; GÜREL, A. Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: formulation and *in vitro* characterization. *AAPS PharmSciTech.* 11, pp. 460-464, 2010.

TAMILVANAN S.; VENKATESHAN N.; LUDWIG A. The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *J. Control. Rel.* 128, pp. 2-22, 2008.

TIERA, M.J.; QIU, X.-P.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J.C.; WINNIK, F.M. Synthesis and characterization of phosphorylcholine - substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. *Biomacromolecules* 7, pp. 3151-3156, 2006.

TSE, G.; BLANKSCHTEIN, D.; SHEFER, A.; SHEFER, S. Thermodynamic prediction of active ingredient loading in polymeric microparticles *J. Control. Rel.*, 60, pp. 77-100, 1999.

USP 30 – NF 25. Chlorhexidine. *U. S. Pharmacopeial Convention*, vol. 2, Rockville/MD, pp. 1718-1719, 2007.

VAN WINKELHOFF, A.J.; RAMS, T.E.; SLOTS, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* 2000, 10, pp. 45-78, 1996.

VAN WINKELHOFF, A.J.; WINKEL, E.G. Antibiotics in periodontics: right or wrong? *J. Periodontol.* 80, pp. 1555-1558, 2009.

VOO, W.-P.; RAVINDRA, P.; TEY, B.-T.; CHAN, E.-S. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *J. Biosci. Bioeng.* 111, pp. 294-299, 2011.

WAN, A.; SUN, Y.; LI, H. Characterization of folate-graft-chitosan as a scaffold for nitric oxide release. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, Issue 5, pp. 415scem, 2008.

WEST, E. R.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L.D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials* 28, pp. 4439-4448, 2007.

WERTZ, P.W.; SQUIER, A.S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8, pp. 237-269, 1991.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Oral health*. Disponível em <http://www.who.int/topics/oral_health/en/> Acesso em 04 jun. 2010.

WIENER-KRONISH, J.P.; DORR, H.I. Ventilator-associated pneumonia: problems with diagnosis and therapy. *Best Practice Res. Clin. Anaesth.* 22, pp. 437-449, 2008.

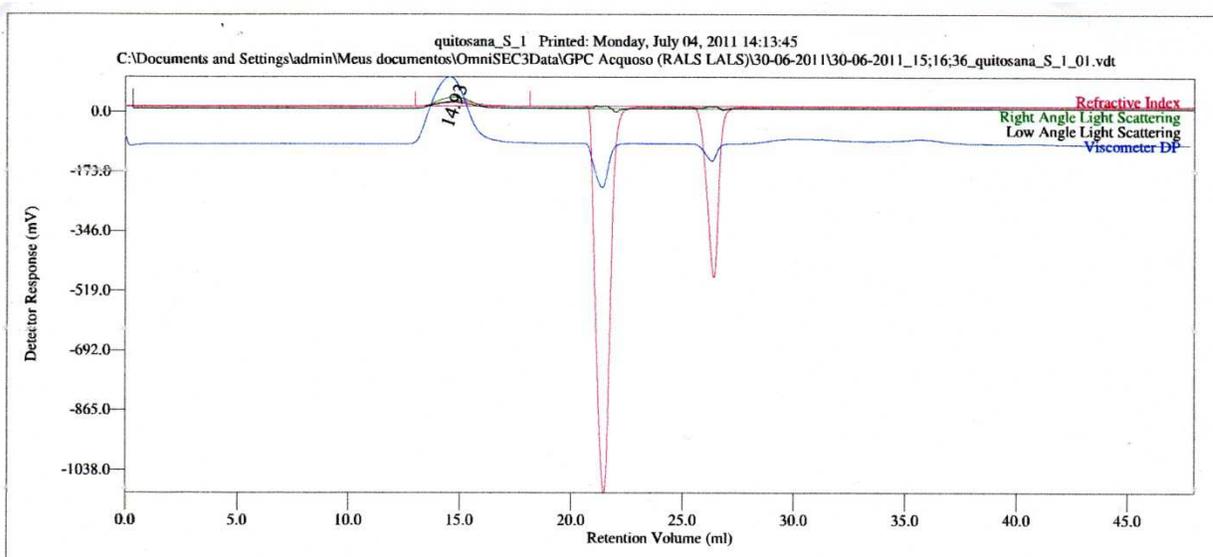
WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Int. J. Pharm.* 312, pp. 113-118, 2006.

YAMAMOTO, H.; KUNO, Y.; SUGIMOTO, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Rel.* 102, pp. 373-381, 2005.

YOUNG, C.R.; DIETZSCH, C.; CEREIA, M.; FARRELL, T.; FEGELY, K.A.; RAJABI-SIAHBOOMI, A.; MCGINITY, J.W. Physicochemical characterization and mechanisms of release of theophylline from melt-extruded dosage forms based on a methacrylic acid copolymer. *Int. J. Pharm.* 301, pp. 112-120, 2005.

8. ANEXOS

8.1. Resultados de Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) de Quitosana (QTS)

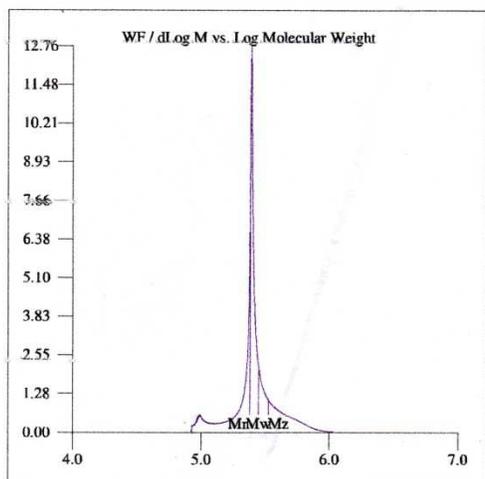
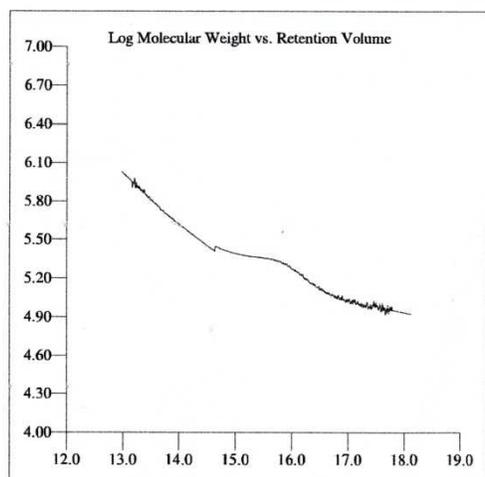


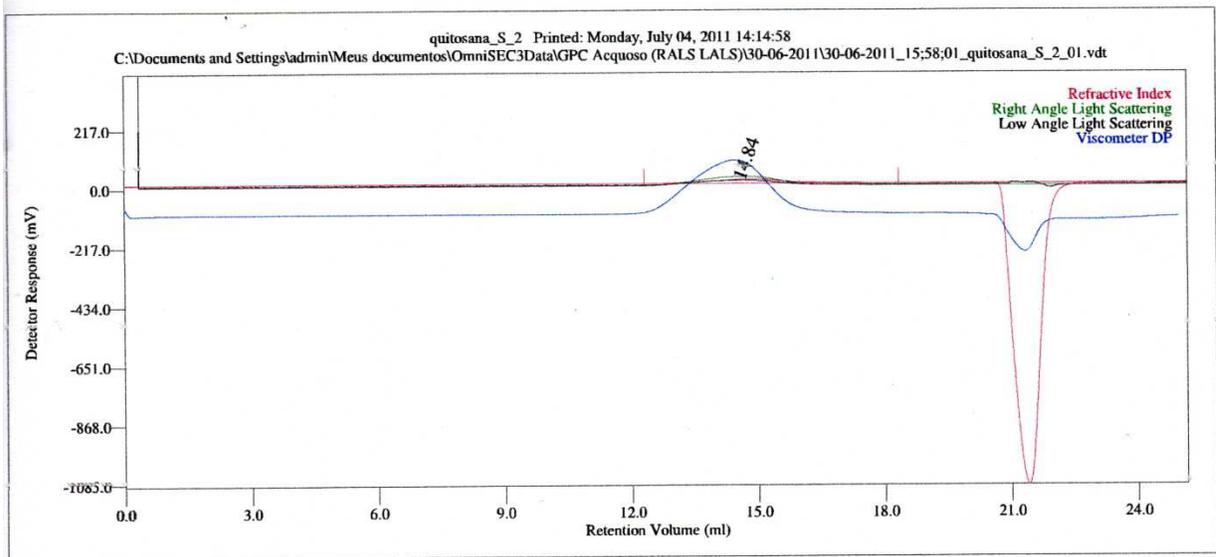
Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.933
Mn - (Daltons)	239,478
Mw - (Daltons)	280,840
Mz - (Daltons)	333,870
Mp - (Daltons)	251,099
Mw / Mn	1.173
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.000
IV - (dl/g)	4.5960
Rh - (nm)	26.617
Rg - (nm)	No Calc
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.549
Mark-Houwink logK	-7.778
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mVml)	30.86
UV Area - (mVml)	0.00
RALS Area - (mVml)	61.72
LALS Area - (mVml)	33.44
DP Area - (mVml)	360.46

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	98.296
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	-06-2011_15;16;36_quitosana_S_1_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jun 30, 2011 - 15:16:36
Solvent	AcOH 0,33- NaOH 0,1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00267
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224



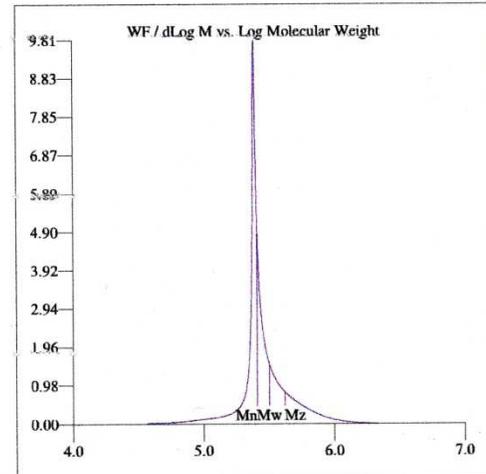
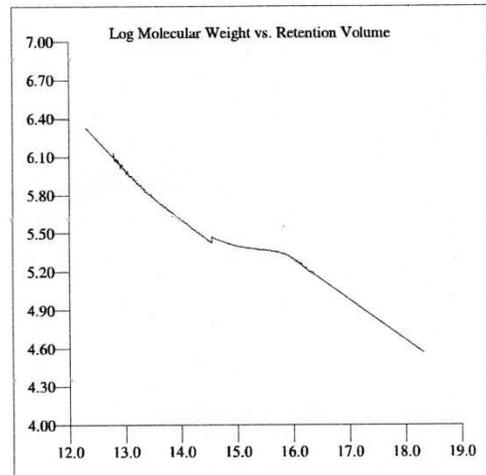


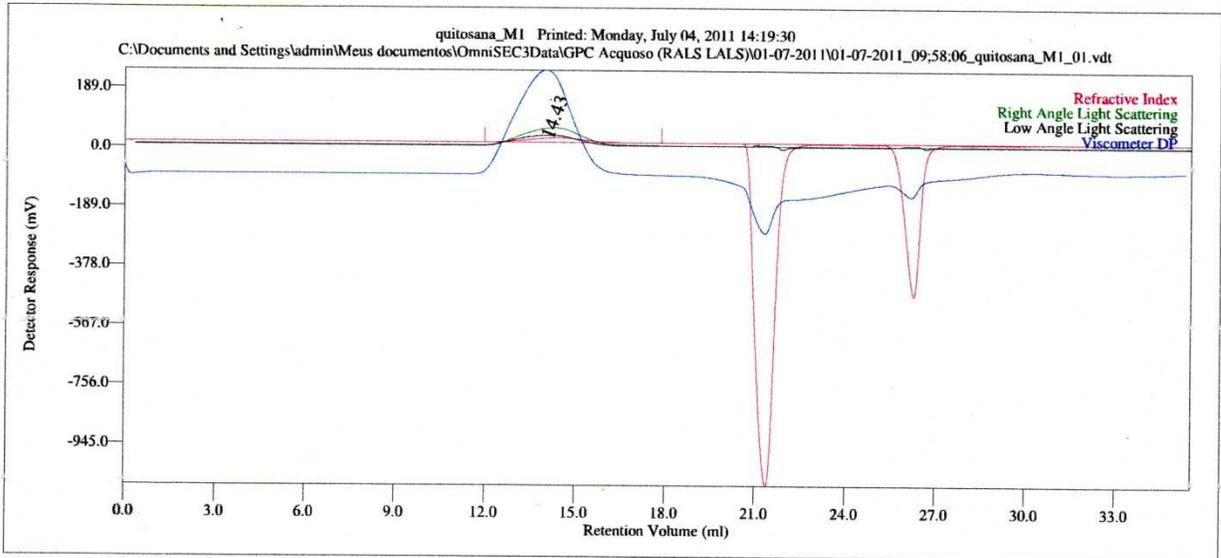
Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.838
Mn - (Daltons)	258.382
Mw - (Daltons)	318.752
Mz - (Daltons)	416.923
Mp - (Daltons)	261.997
Mw / Mn	1.234
Percent Above Mw:	0
Percent Below Mw:	0
IV - (dl/g)	5.2190
Rh - (nm)	28.675
Rg - (nm)	No Calc
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.283
Mark-Houwink logK	-6.324
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mvml)	31.70
UV Area - (mvml)	0.00
RALS Area - (mvml)	69.69
LALS Area - (mvml)	36.08
DP Area - (mvml)	409.89

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	100.989
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	-06-2011_15:58:01_quitosana_S_2_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jun 30, 2011 - 15:58:01
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	42.0
OmniSEC Build Number	224



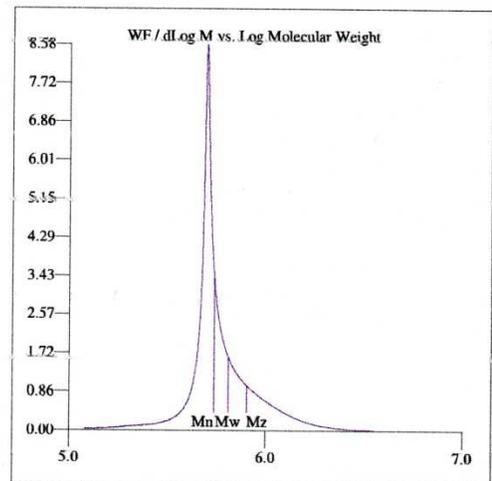
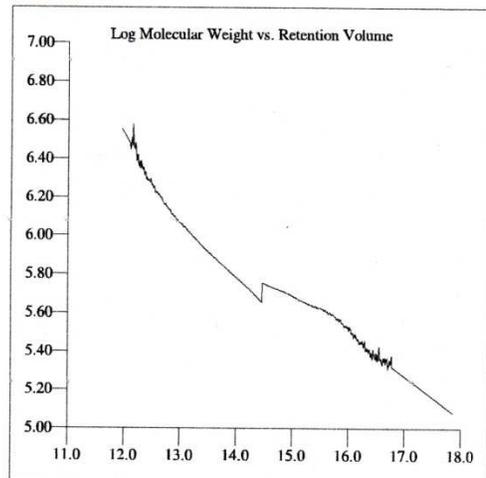


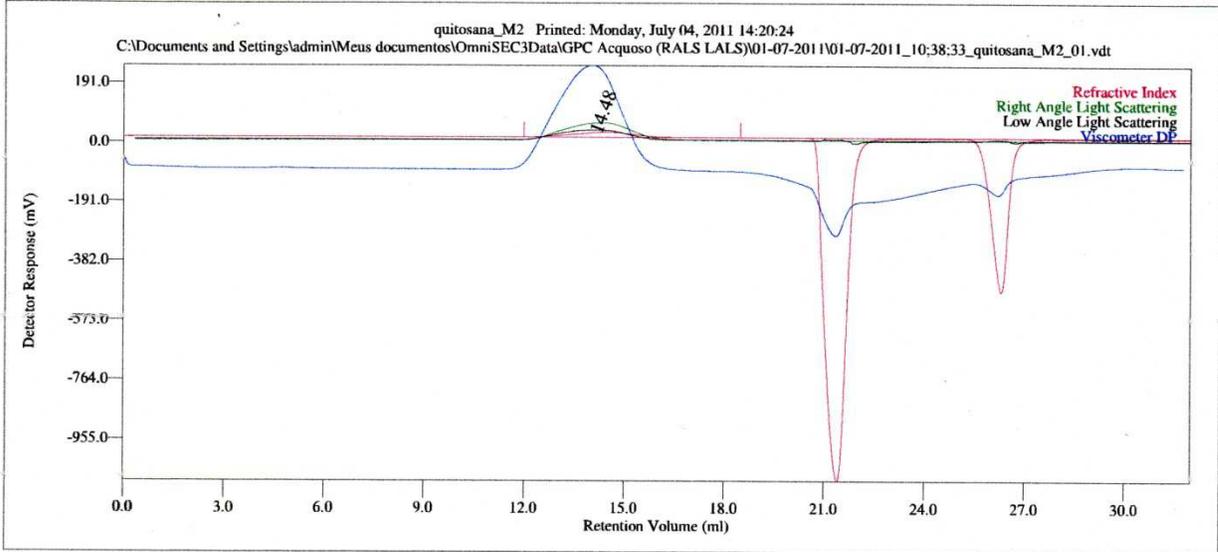
Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.431
Mn - (Daltons)	547.617
Mw - (Daltons)	644.933
Mz - (Daltons)	804.244
Mp - (Daltons)	463.548
Mw / Mn	1.178
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.000
IV - (dl/g)	9.7174
Rh - (nm)	44.794
Rg - (nm)	36.352
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.555
Mark-Houwink logK	-8.059
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mvm)	34.52
UV Area - (mvm)	0.00
RALS Area - (mvm)	123.59
LALS Area - (mvm)	76.95
DP Area - (mvm)	718.48

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	110.014
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	-07-2011_09:58:06_quitosana_M1_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jul 01, 2011 - 09:58:06
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224



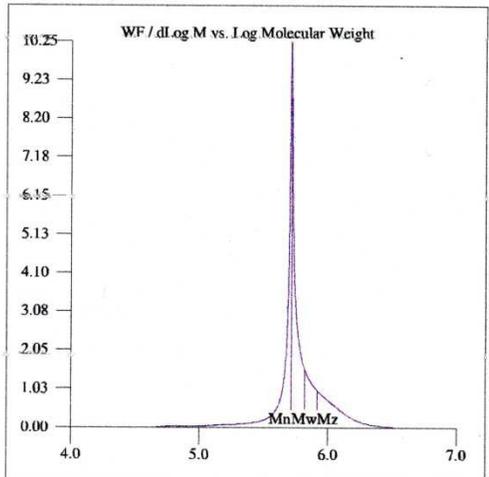
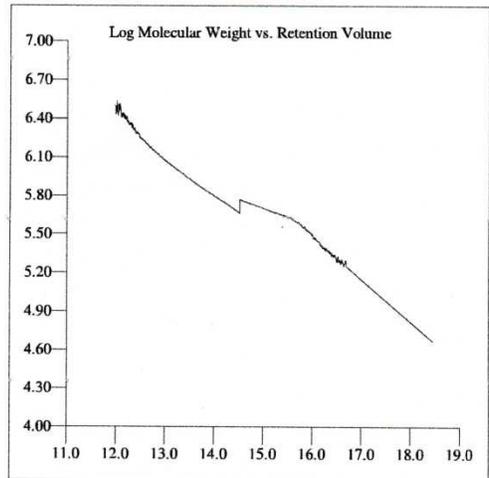


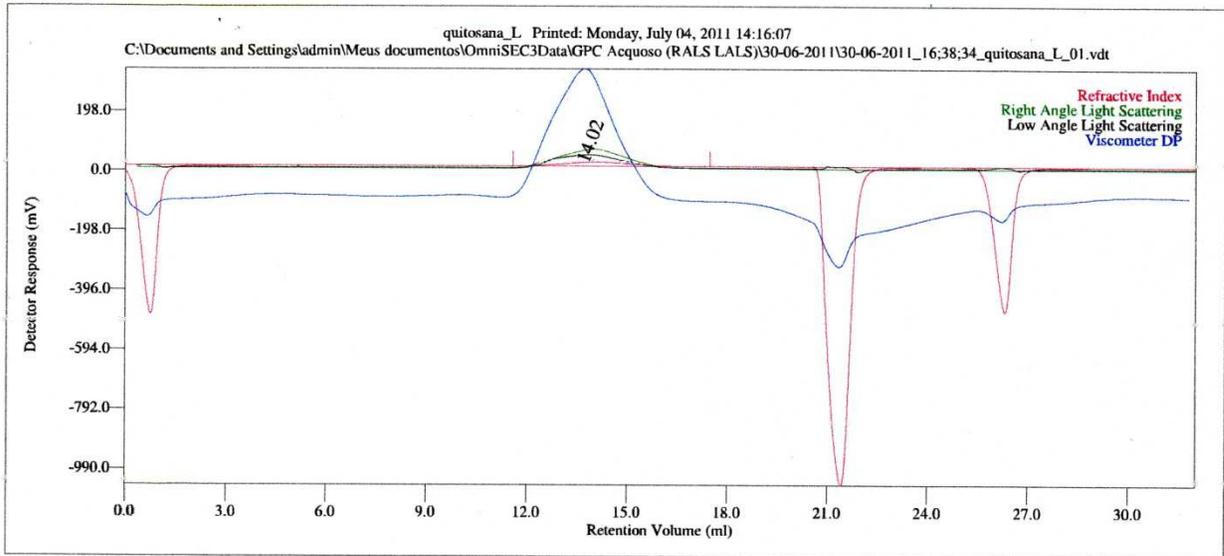
Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.480
Mn - (Daltons)	518,413
Mw - (Daltons)	658,682
Mz - (Daltons)	829,512
Mp - (Daltons)	472,693
Mw / Mn	1.271
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.001
IV - (dl/g)	9.9726
Rh - (nm)	45.071
Rg - (nm)	36.313
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.646
Mark-Houwink logK	-8.607
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mvm)	36.84
UV Area - (mvm)	0.00
RALS Area - (mvm)	126.38
LALS Area - (mvm)	79.07
DP Area - (mvm)	740.94

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	117.413
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	-07-2011_10:38:33_quitosana_M2_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jul 01, 2011 - 10:38:33
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224



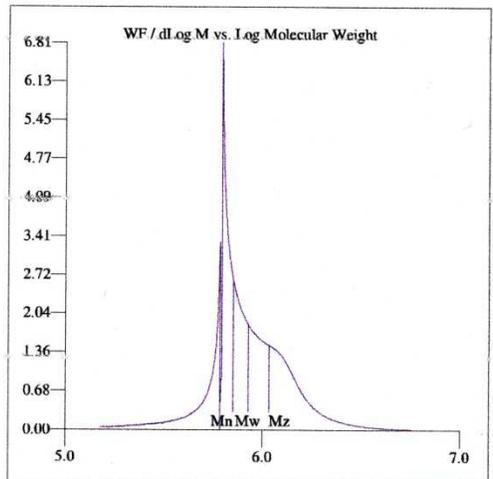
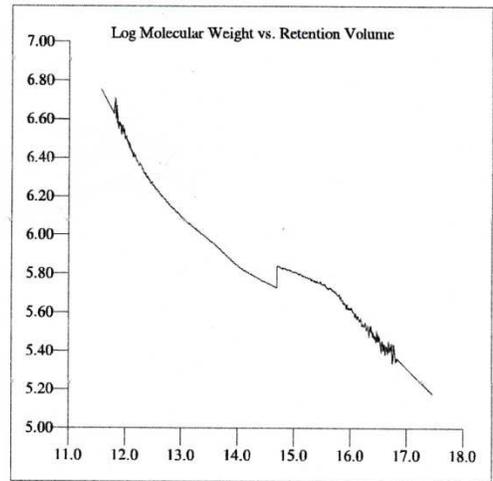


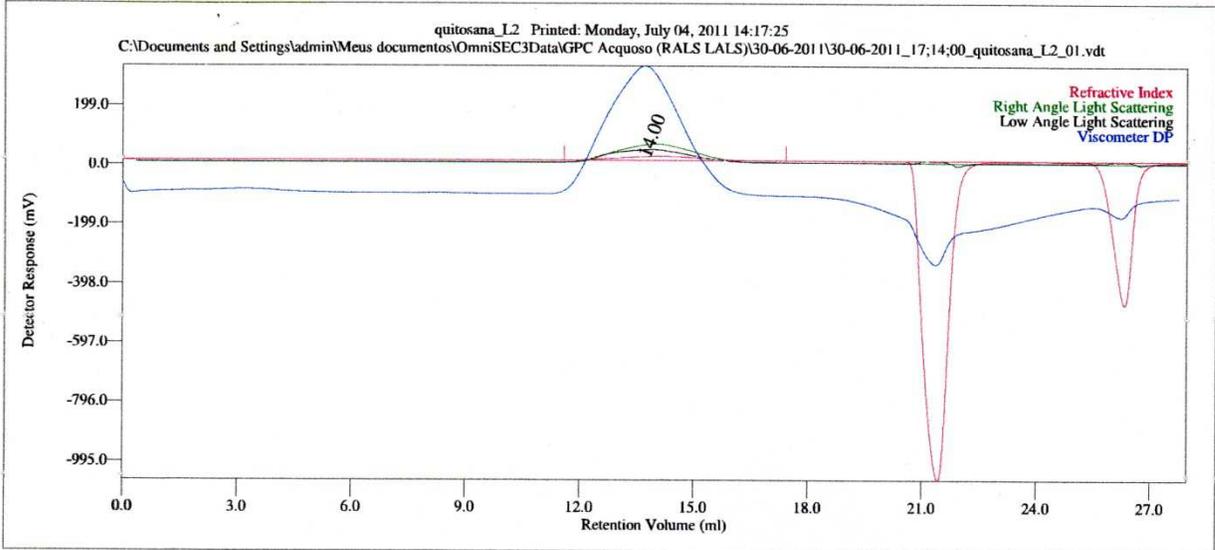
Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.019
Mn - (Daltons)	710.425
Mw - (Daltons)	845.715
Mz - (Daltons)	1.081 e 6
Mp - (Daltons)	687.619
Mw / Mn	1.190
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.006
IV - (dl/g)	11.4813
Rh - (nm)	51.614
Rg - (nm)	49.436
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.750
Mark-Houwink logK	-9.335
Branches	0.000
Branch Freq	0.000
RI Area - (mVml)	34.59
UV Area - (mVml)	0.00
RAIS Area - (mVml)	147.83
LALS Area - (mVml)	107.02
DP Area - (mVml)	921.95

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	110.170
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	30-06-2011_16:38:34_quitosana_L_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jun 30, 2011 - 16:38:34
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RAIS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224



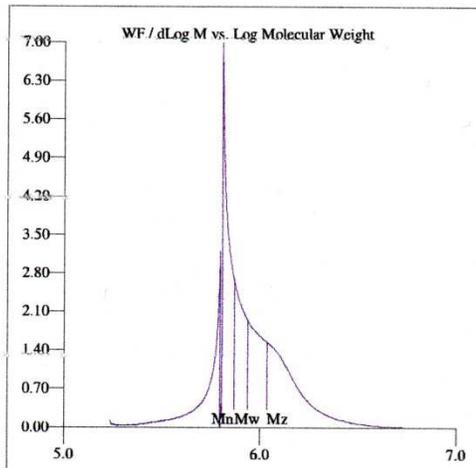
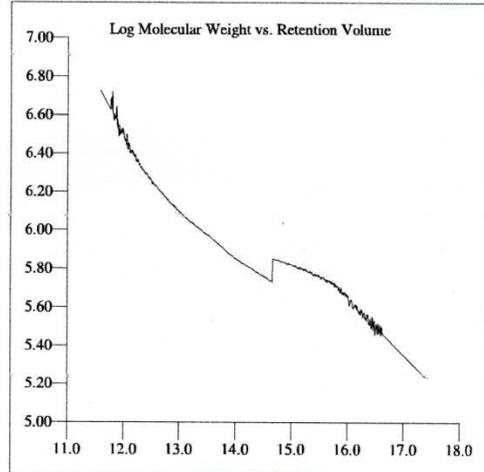


Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	14.001
Mn - (Daltons)	736,133
Mw - (Daltons)	862,681
Mz - (Daltons)	1,089 e 6
Mp - (Daltons)	712,373
Mw / Mn	1.172
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.000
IV - (dl/g)	12.0266
Rh - (nm)	53.023
Rg - (nm)	48.953
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.290
Mark-Houwink logK	-6.571
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mVml)	35.36
UV Area - (mVml)	0.00
RALS Area - (mVml)	150.53
LALS Area - (mVml)	107.81
DP Area - (mVml)	968.78

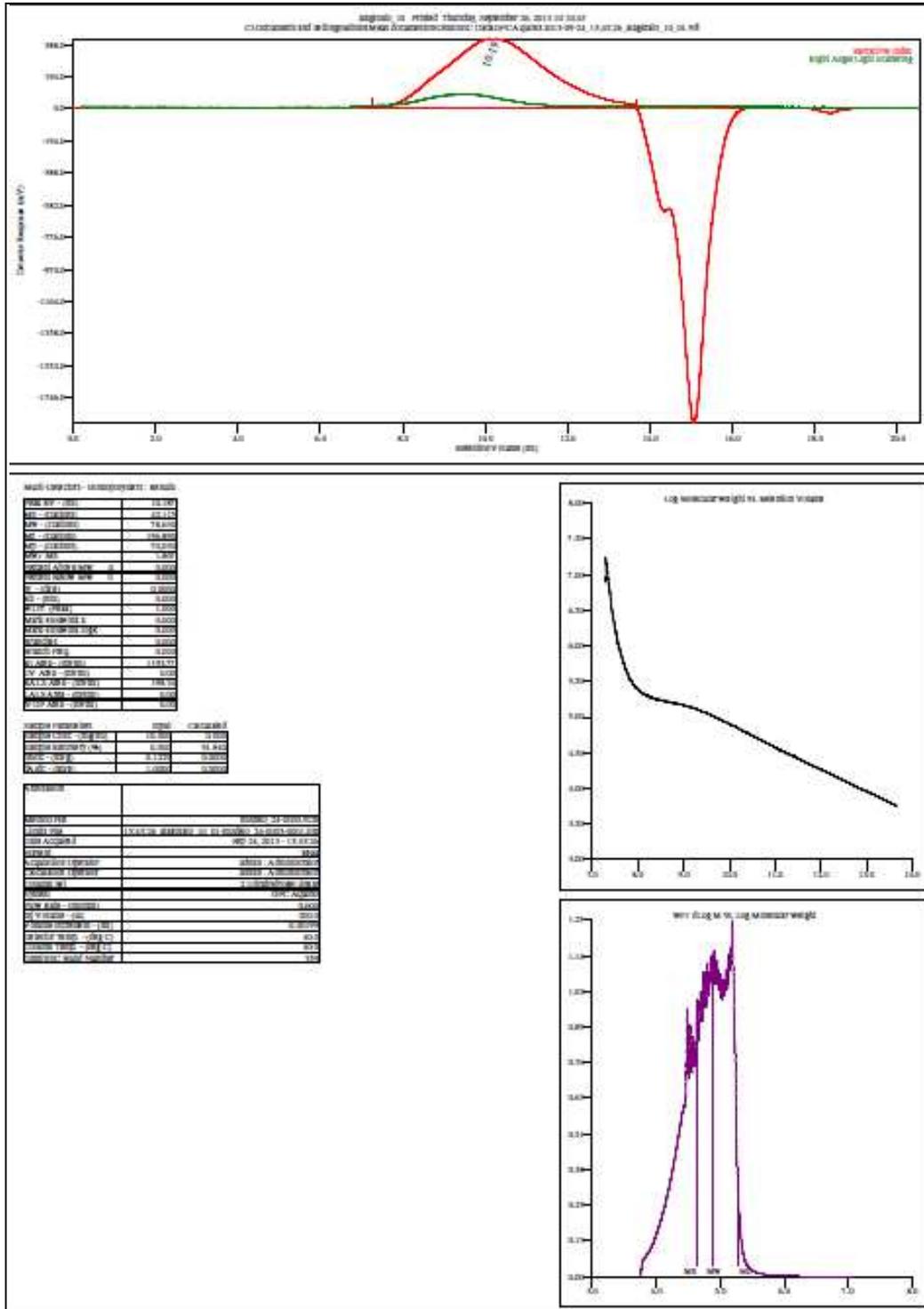
Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1.000	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	112.649
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	0-06-2011_17;14:00_quitosana_L2_01-a-0000-0000.lim
Date Acquired	Jun 30, 2011 - 17:14:00
Solvent	AcOH 0,33- NaOH 0,1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224

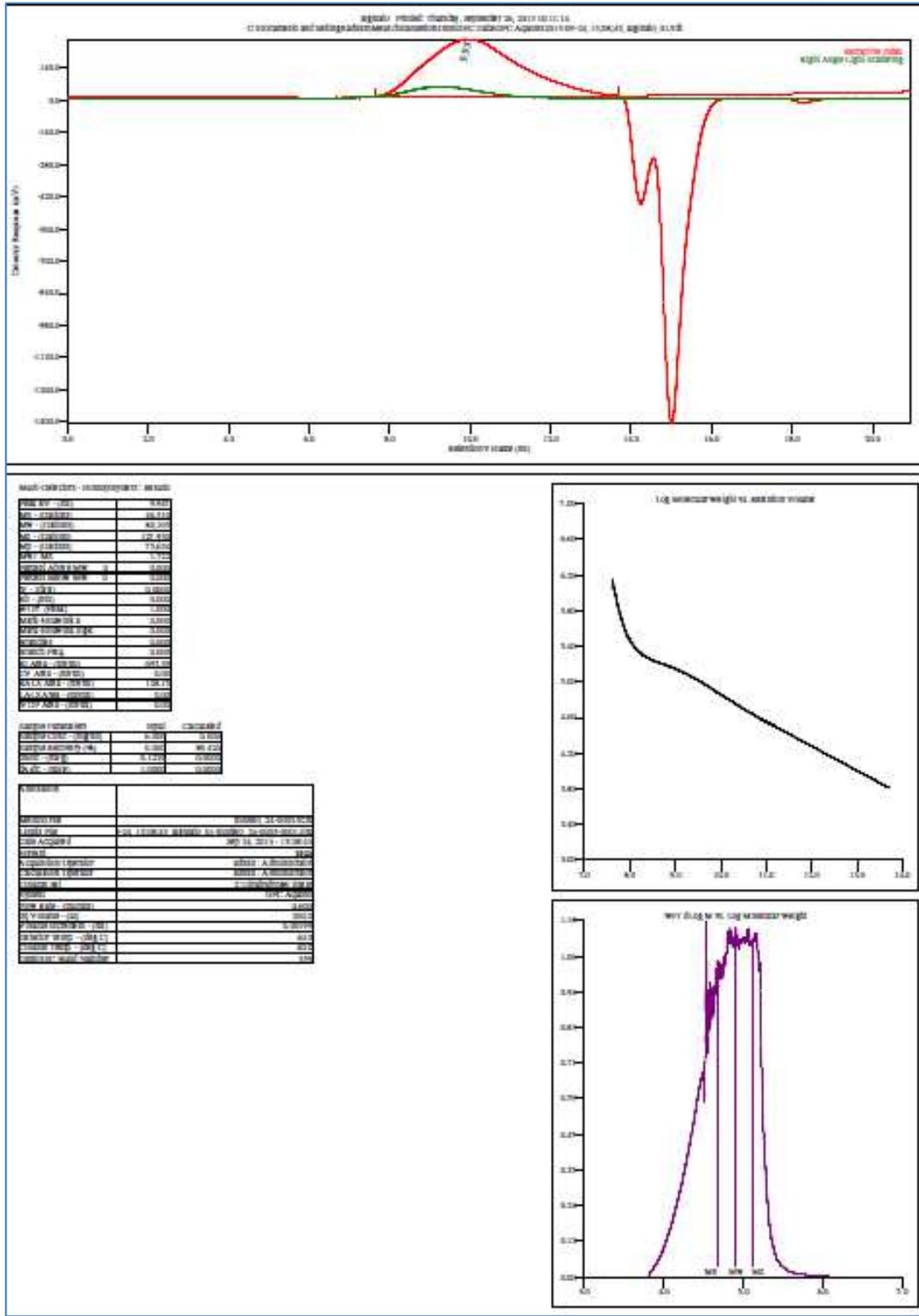


8.2. Resultados de Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) de Alginato de Sódio (ALG)

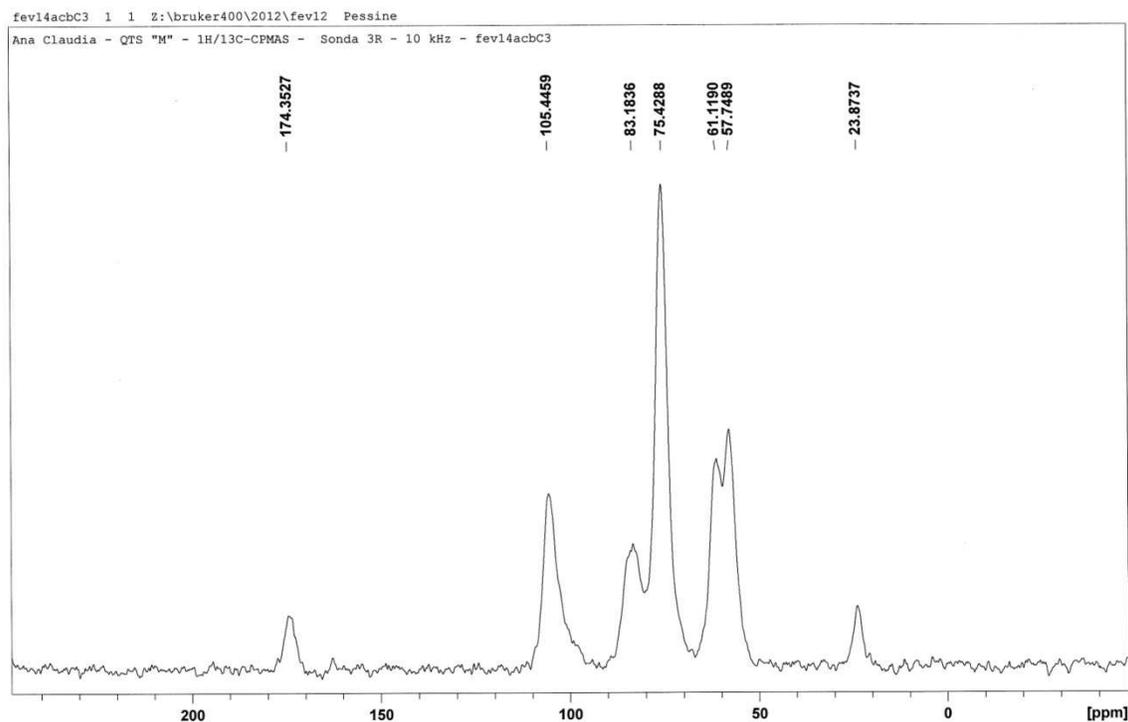
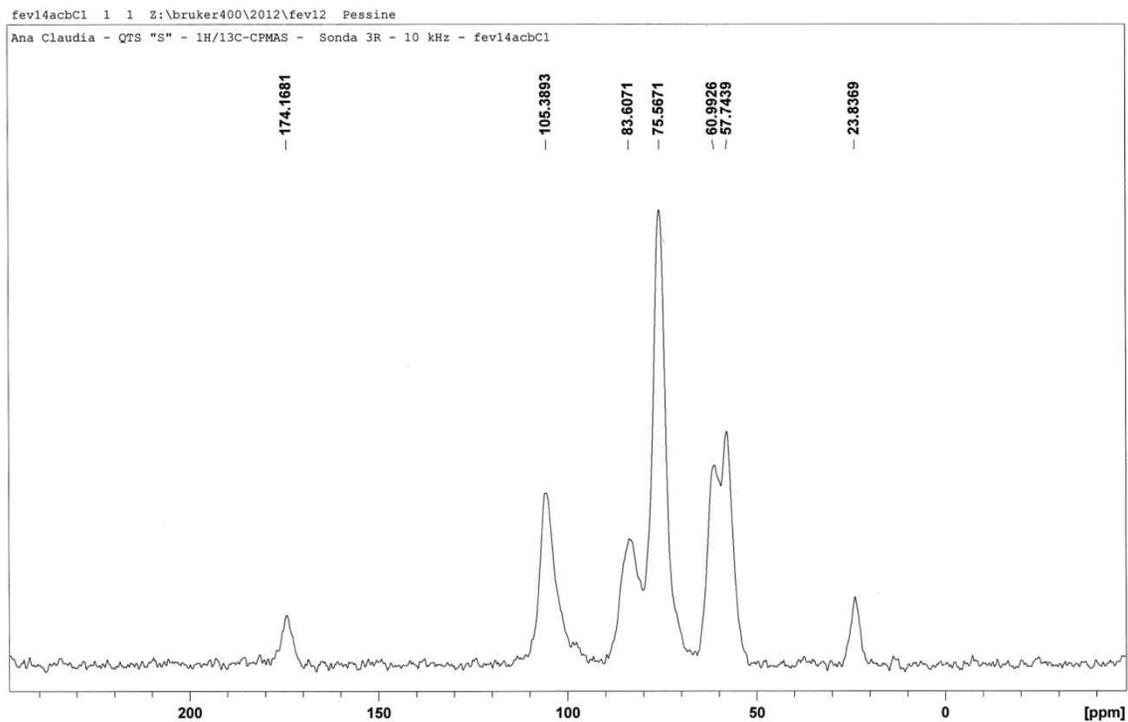
Corrida 1

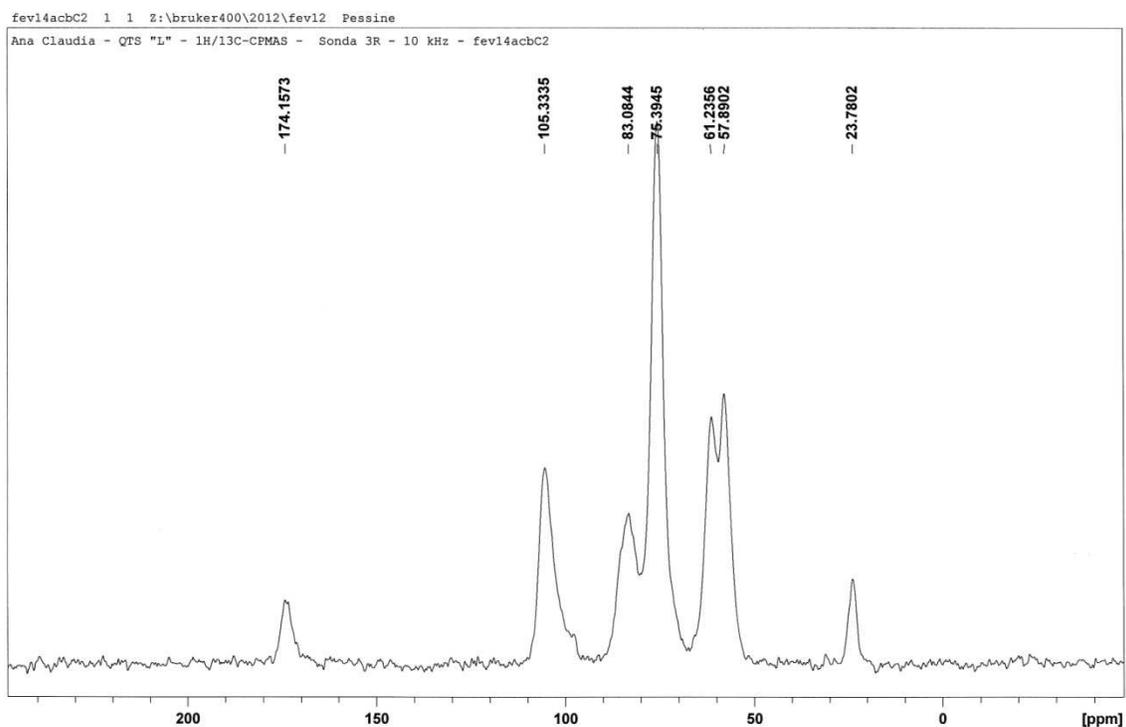


Corrida 2

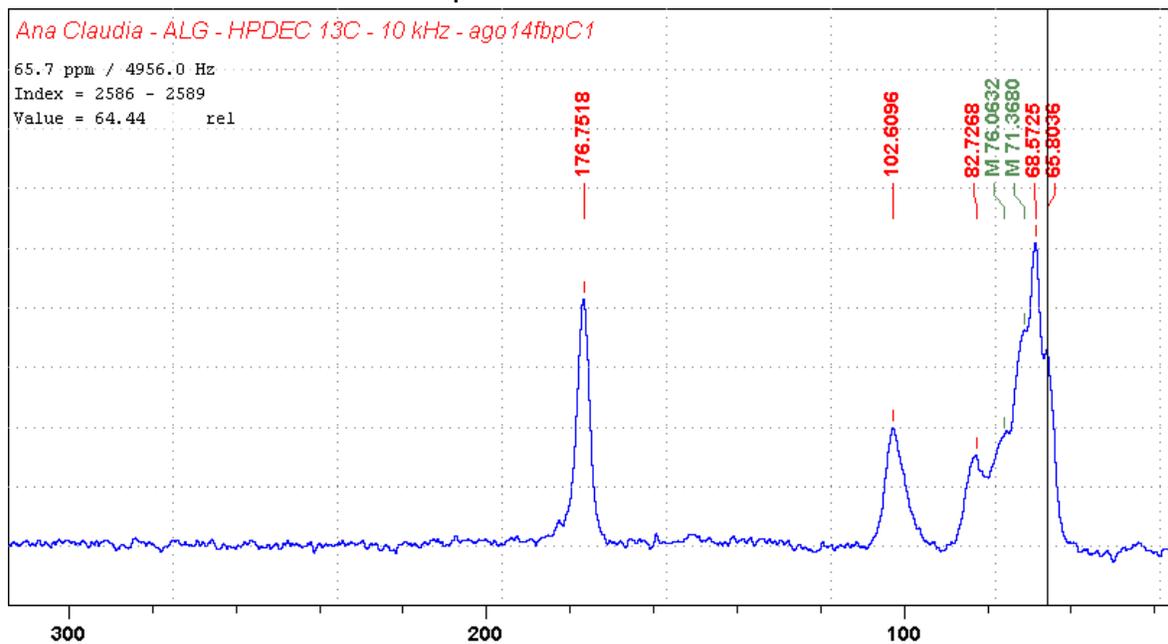


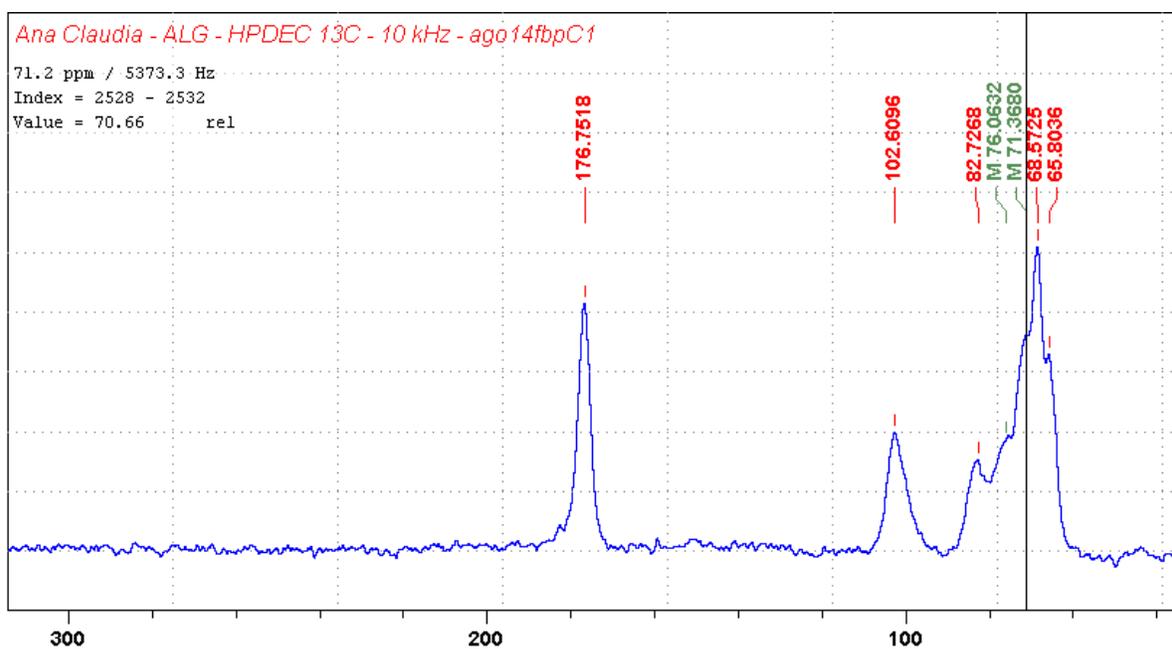
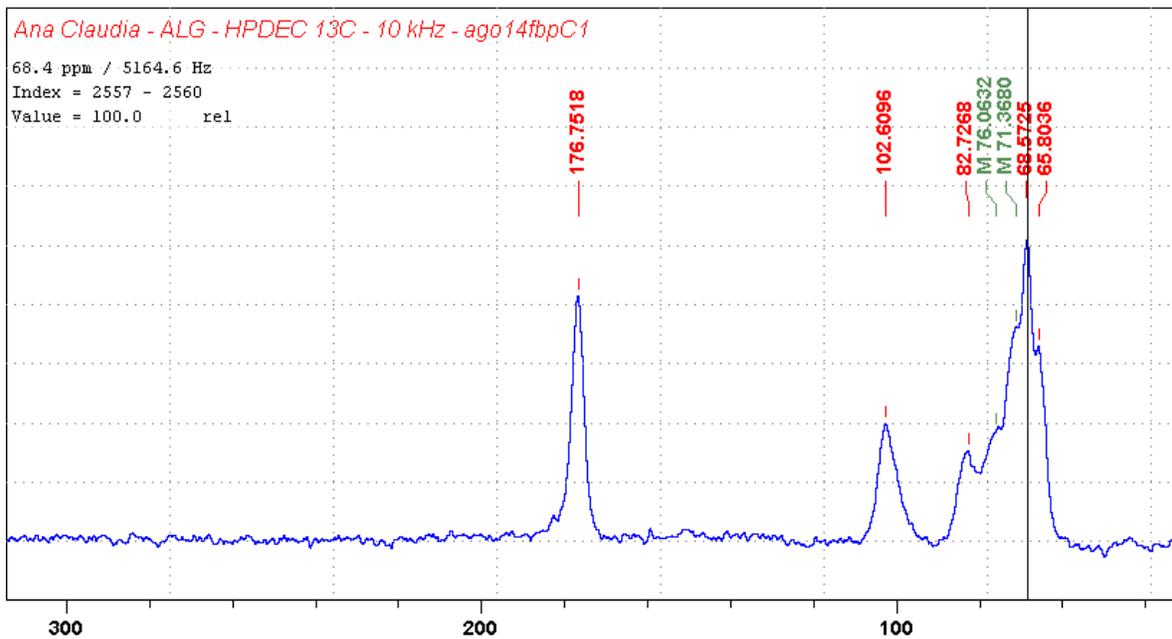
8.3. Espectros de RMN ^{13}C de quitosana (QTS) com indicação dos deslocamentos químicos

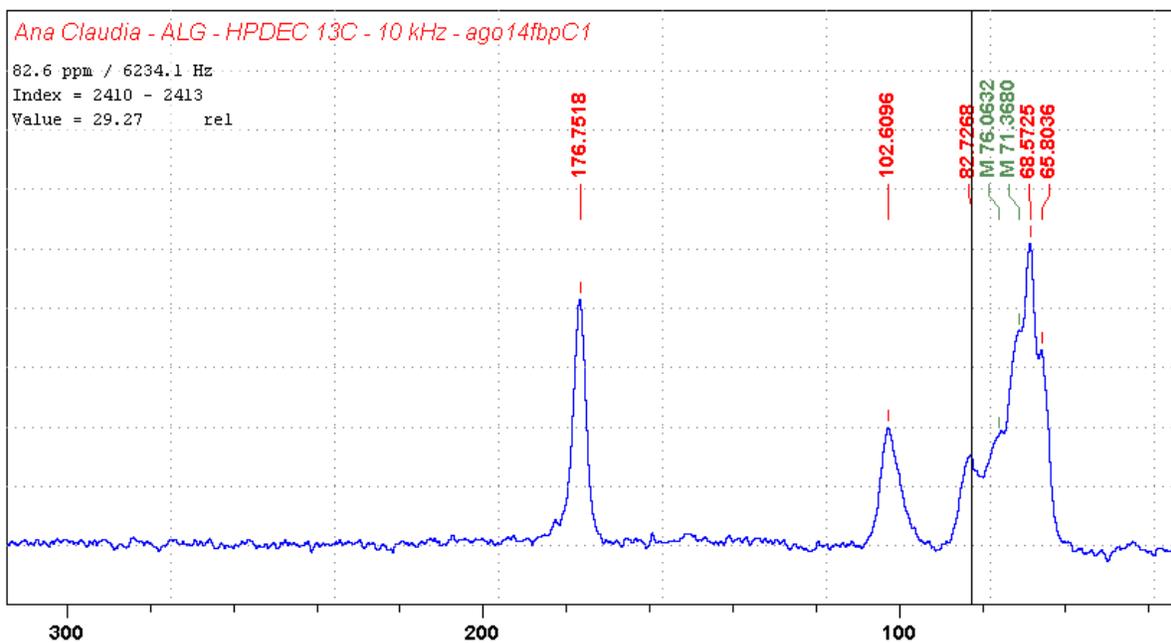
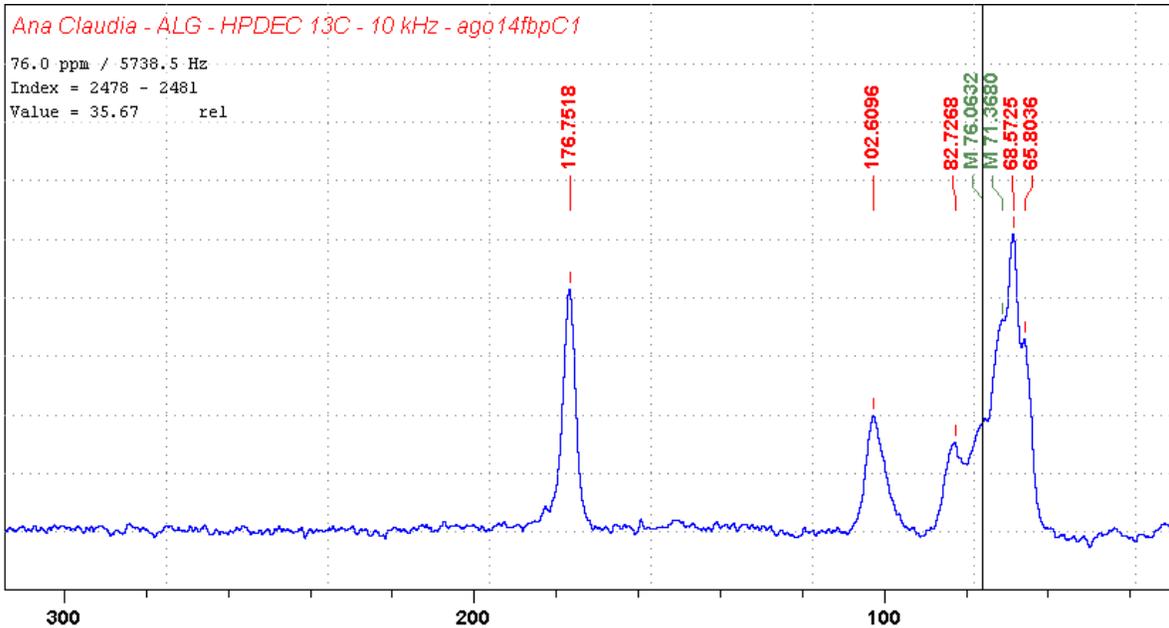




8.4. Espectros de RMN 13C de alginato (ALG) com indicação dos deslocamentos químicos

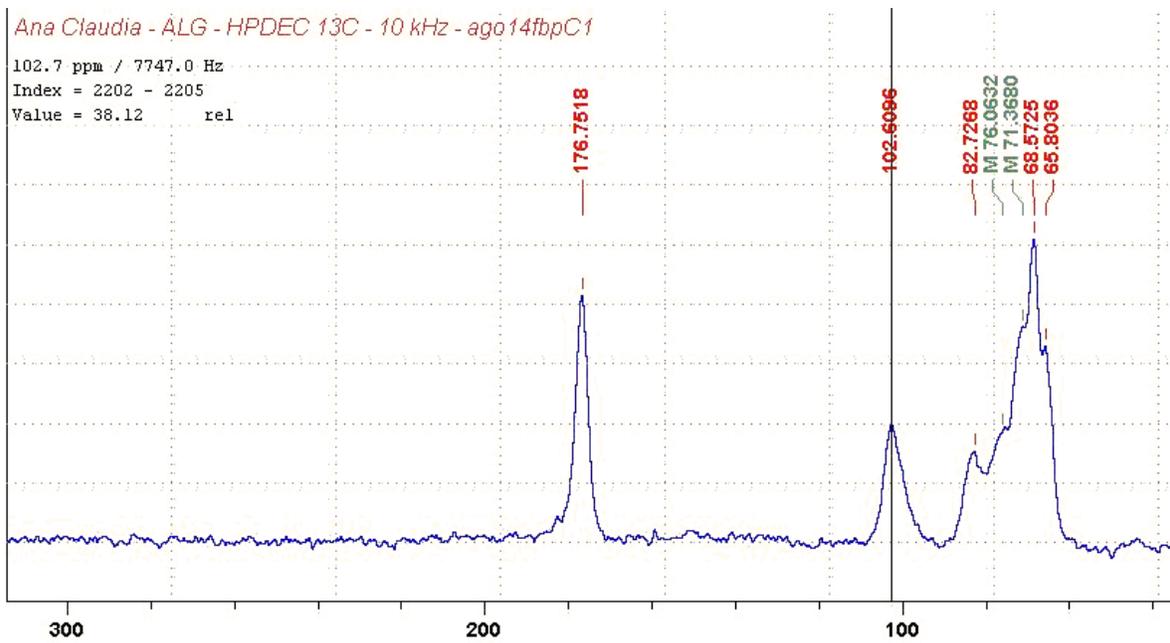






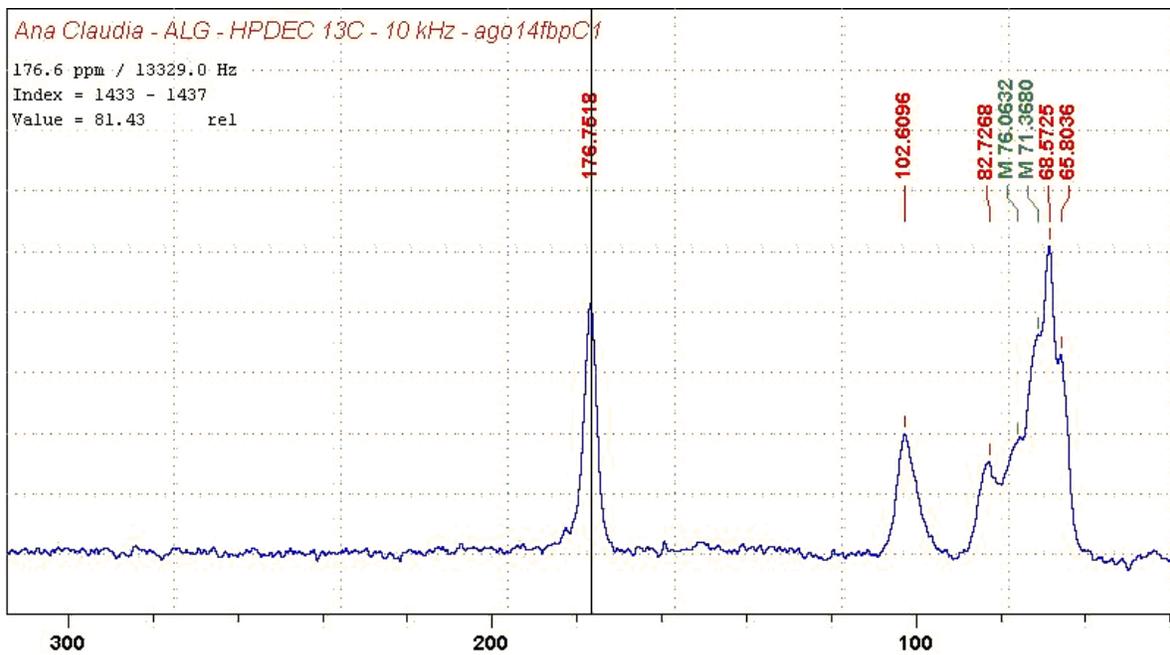
Ana Claudia - ALG - HPDEC 13C - 10 kHz - ag014fbpC1

102.7 ppm / 7747.0 Hz
Index = 2202 - 2205
Value = 38.12 rel

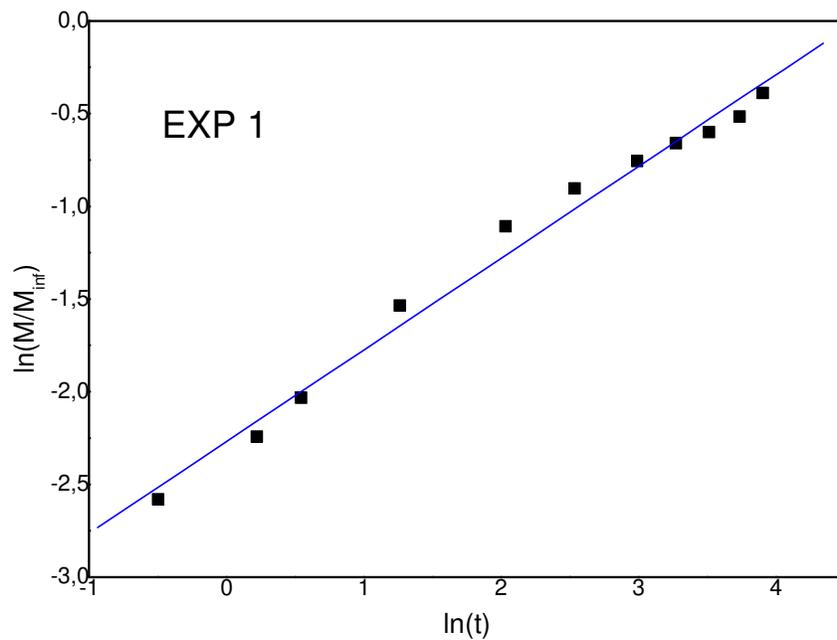
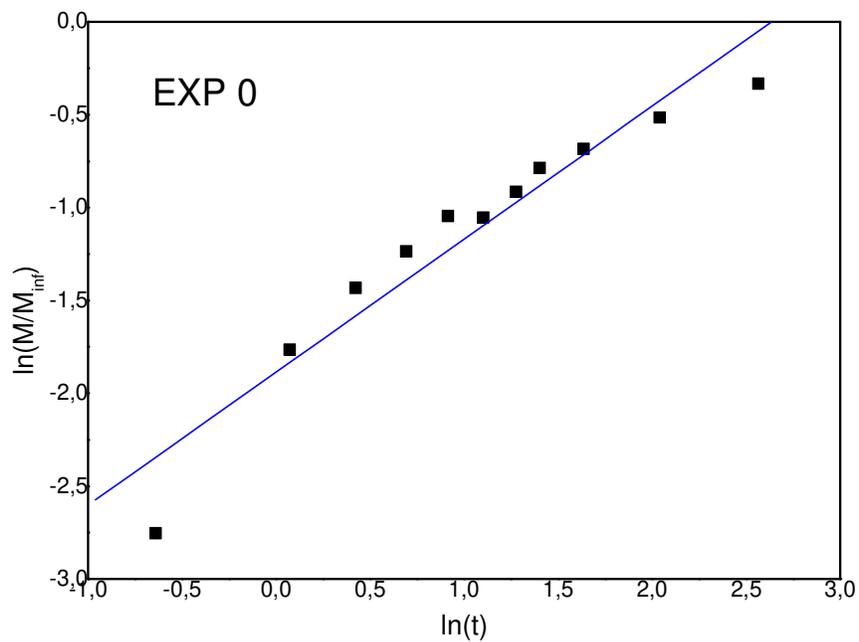


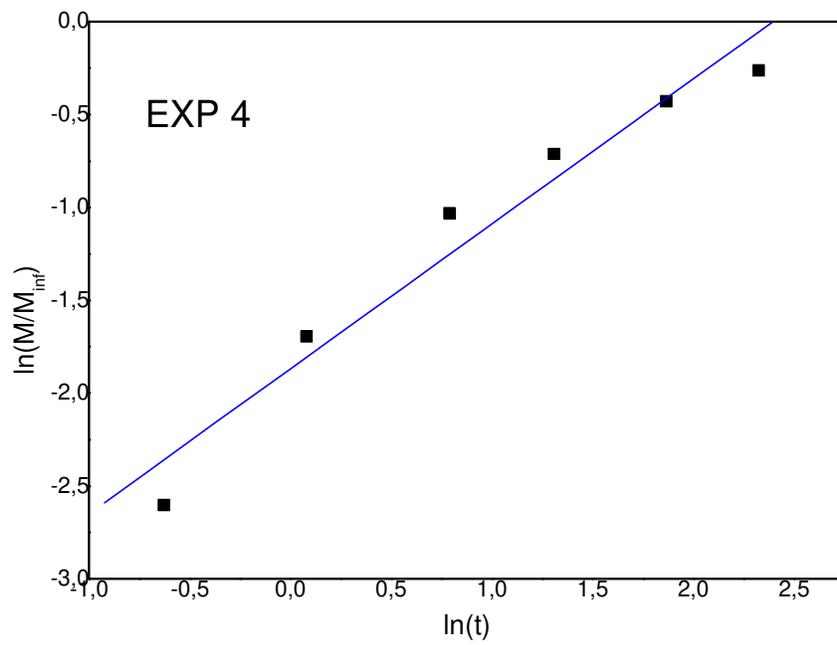
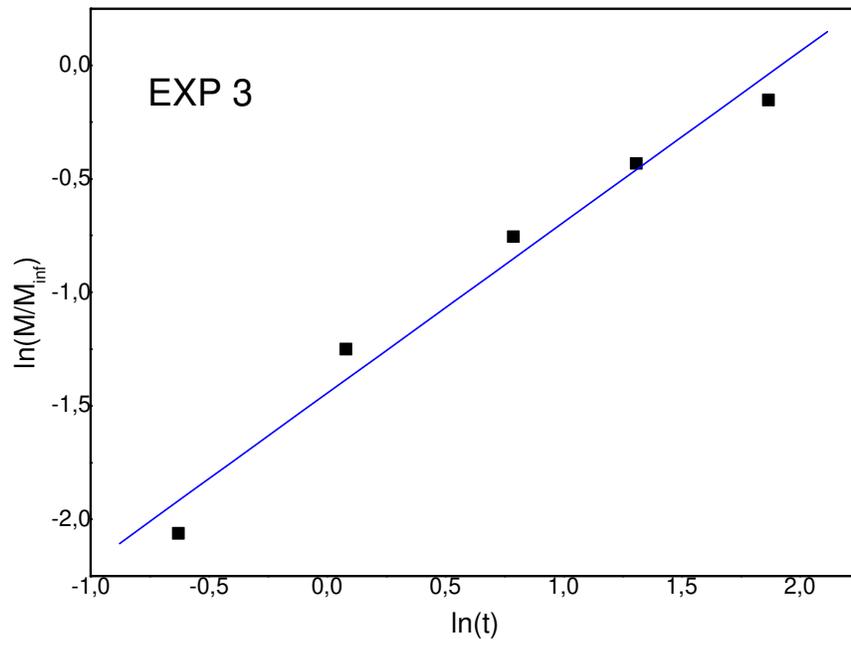
Ana Claudia - ALG - HPDEC 13C - 10 kHz - ag014fbpC1

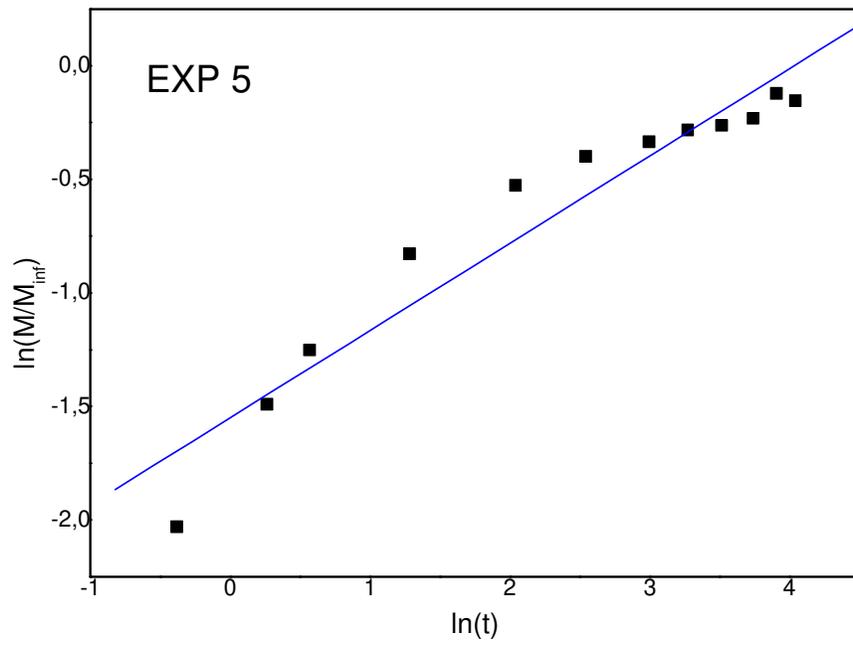
176.6 ppm / 13329.0 Hz
Index = 1433 - 1437
Value = 81.43 rel



8.5. Curvas de ajuste ao modelo de Peppas-Korsmeyer linearizado de 60% da massa total de CHG liberada.







8.6. Imagens de placas de cultura indicando o crescimento das cepas padrão utilizadas



C. albicans
ATCC90028



C. parapsilosis
ATCC22019



C. krusei
ATCC6258

