

Leandro Garcia Alvarado



**MEMBRANA TRANSDÉRMICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
UTILIZANDO QUITOSANA, PLASMA E PLAQUETAS PARA A
REGENERAÇÃO DE FERIDAS**

**Botucatu – SP
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILI
HEMOCENTRO DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**



Leandro Garcia Alvarado

**MEMBRANA TRANSDÉRMICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
UTILIZANDO QUITOSANA, PLASMA E PLAQUETAS PARA A
REGENERAÇÃO DE FERIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª Drª Rosana Rossi Ferreira

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Alvarado, Leandro Garcia.

Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas / Leandro Garcia Alvarado. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rosana Rossi Ferreira

Capes:

1. Quitosana – Uso terapêutico. 2. Cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas crônicas; Hemocomponentes; Quitosana.

RESUMO

O aprimoramento de uma formulação envolve várias etapas importantes que englobam desde o conhecimento das características dos insumos utilizados, até a comprovação que a aplicação é segura para posterior comercialização. O objetivo deste trabalho é o de estudar a utilização da quitosana, plasma fresco congelado (PFC) e concentrado de plaquetas (CP) no reparo de tecidos epiteliais principalmente por feridas crônicas de etiologia venosa. Para tal serão produzidas membranas transdérmicas de quitosana associadas ao PFC e CP com a utilização de um agente reticulante adsorvido em diferentes concentrações. Estima-se que quase 3% da população brasileira é portadora desse tipo de lesão, que se eleva para 10% no caso dos diabéticos, e que em torno de 4 milhões de pessoas sejam portadoras de lesões crônicas ou tenham algum tipo de complicação no processo de cicatrização. Busca-se, portanto, novos recursos e tecnologias que possibilitem o acesso da população a um tratamento eficiente, eficaz e de baixo custo.

Palavras-chave: Quitosana, Hemocomponentes, Cicatrização de Feridas crônicas.

ABSTRACT

The improvement of a formulation involves several important steps that range from knowledge of the characteristics of the inputs used, until proof that the application is safe for commercialization. The objective of this work is to study the use of chitosan and platelet concentrates CP in the repair of epithelial tissues mainly by chronic venous wounds. This will be produced transdermal membranes chitosan CP associated with the use of cross linking agents adsorbed at various concentrations. It is estimated that nearly 3% of the population suffer from this type of injury, which rises to 10% for diabetics, and that around 4 million people are suffering from chronic injuries or have some type of complication in the process healing. Search, therefore, new features and technologies that enable the population access to a treatment effective, efficient and low cost.

Key words: chitosan, blood products, healing of chronic wounds.

SUMÁRIO

Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo/Abstract

1.0 Introdução.....	01
1.1 Cicatrização.....	01
1.2 Quitosana.....	04
1.2.0 Produção da Quitosana.....	08
1.2.1 História da Quitosana.....	08
1.2.2 Propriedades da Quitosana.....	09
1.2.3 Peso Molecular.....	12
1.2.4 Graus de Desacetilação.....	15
1.2.5 Solubilidade	16
1.2.6 Aplicações.....	18
1.2.7 Biotecnologia.....	20
1.2.8 Tratamento de Águas residuais.....	22
1.2.9 Cosméticos.....	23
1.3 Biomateriais.....	25
2.0 Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3.0 Material e Método.....	29
3.1 Obtenção da Membrana.....	30
3.2 Plastificante de Membrana.....	30
3.3 Caracterização.....	30
4.0 Resultados e Discussão.....	31
5.0 Conclusões e Perspectiva.....	35
6.0 Referências.....	40

Introdução



1.0 Introdução

O corpo humano é recoberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele, que além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corpórea e pela remoção de impurezas. Assim sendo, qualquer lesão cutânea, além de causar danos físicos, mecânicos e térmicos superficiais, pode também afetar as funções fisiológicas de tecidos internos (GEESON & BERG, 1991). Dentre as causas mais comuns de lesões cutâneas, encontram-se as de etiologia venosa

demonstrando que desde a antiguidade já se reconhecia a necessidade de protegê-las como forma de evitar complicações locais ou sistêmicas para o paciente. Hipócrates sugeriu o tratamento da limpeza da ferida com água morna e que as feridas fossem mantidas limpas e ocluídas, para reduzir a inflamação. Celsius preconizou o desbridamento das feridas contaminadas. Entre os séculos 18 e 19 compostos de cloro e iodo começaram a ser utilizados para limpeza da ferida (BLANES, 2004; MANDELBAUM et al, 2003).

Entre os anos de 1920 a 1940, surgiram as pomadas contendo enzimas destinadas ao desbridamento químico das feridas (GOMES, 2001a).

No início do ano de 1970, demonstrou-se que um ambiente úmido, sem crosta, aumentava a migração de células epiteliais através do leito da ferida, facilitando o seu fechamento (FIELD, 1994; COELHO, 1999; GOMES, 2001b; BLANES, 2004; CUNHA, 2006). O meio úmido estimula o processo fibrinolítico, realizado pelas células presentes no tecido de granulação, e aumenta a quimiotaxia do macrófago que rege o processo de cicatrização (FRIEDMAN, 1984).

1.1 Cicatrização

Toda lesão que leve à interrupção da continuidade de um tecido corpóreo é chamada de ferida, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de

defesa orgânica para o contra ataque (CESARETTI, 1998). Neste, três estágios do processo de cicatrização podem ser observados (GUIMARÃES, 2002; TOWNSEND, 2005):

- 1- Fase Inflamatória: compreende os processos de hemostasia, onde o endotélio estimula a ação plaquetária liberando os fatores de crescimento e ativando a formação de fibrina. Forma-se o trombo com a migração de polimorfonucleares e liberação de potentes mediadores inflamatórios. Nesta fase a ferida é caracterizada por grande quantidade de tecido desvitalizado em virtude da contaminação bacteriana.
- 2- Fase Proliferativa: onde a proliferação de fibroblastos dá origem a uma fibroplasia e formação de tecido de granulação com proliferação de células endoteliais e angiogênese. Na periferia das feridas observamos a ativação de queratinócitos iniciando a epitelização do tecido.
- 3- Fase de Maturação: onde se inicia o processo de remodelação da ferida com equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno (BLANES, 2004).

As plaquetas constituem-se elementos-chave no processo da hemostasia primária formando o denominado trombo branco. Além disto, armazenam e liberam substâncias mediadoras que exercem atividade pró-inflamatória incluindo metabólitos do aracdonato, prostaglandina PGE_2 e tromboxano (TX_A), fator de agregação plaquetária (PAF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); este atua como um potente agente mitogênico promovendo o crescimento e multiplicação de células endoteliais vasculares, células musculares lisas e fibroblastos estimulando a proliferação celular contribuindo com o processo de cicatrização (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

Lenharo et al. (2004) descrevem que durante o processo de desgranulação plaquetária, muitas proteínas são liberadas além do PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), dentre eles estão:

- ✓ vascular endotelial (VEGF),
- ✓ derivado de fibroblastos (FGF),
- ✓ epidermal (EGF), além do fator transformador de crescimento β (TGF- β).

Assim sendo, as plaquetas empregadas como fontes exógenas de fatores de crescimento trazem um estímulo adicional para a atividade celular potencializando o reparo tecidual. Os FGF ativam os fibroblastos para formação de protocógeno resultando na

deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os PDGF, associados ou não com os FGF, aumentam a vascularização tissular, promovem a proliferação de fibroblastos, aumentam a quantidade de colágeno, estimulam produção de tecido de granulação. O VEGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular e o EGF induz o crescimento de tecido epitelial e promove também a angiogênese. Estas substâncias tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura (BARBIERI; COSTA, 2004; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Em 2004, Barbieri e Costa lembram que o PDGF pode estimular a produção de várias moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e collagenase, proteoglicanos e ácido hialurônico.

Para a utilização de produtos farmacêuticos atuando como linha de defesa orgânica é necessário um estudo prévio da formulação a ser produzida. Este estudo envolve, dentre outros fatores, o conhecimento dos processos de preparo, avaliações relacionadas e dos insumos empregados e, a este último relacionam-se todos os materiais que farão parte do produto sejam eles matérias-primas ou recipientes de acondicionamento (MANDELBAUM et al, 2003a).

Entre os produtos de interesse dermatológico, merecem particular destaque os de ação tópica incorporados nas formas farmacêuticas. Estes, por sua vez, podem permitir o restabelecimento da integridade da pele posterior a possíveis agressões. Diante disso é necessário estabelecer novamente as condições normais e para tanto o processo de cicatrização é de fundamental importância (IRION, 2005).

O processo de cicatrização envolve a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação da cicatriz, estando associada à intensa remodelação. Vários insumos farmacêuticos vêm sendo utilizados como alternativa nos casos em que não há a reparação tissular ou em que ela é insatisfatória, dentro deste grupo encontra-se a Quitosana (MANDELBAUM et al, 2003b).

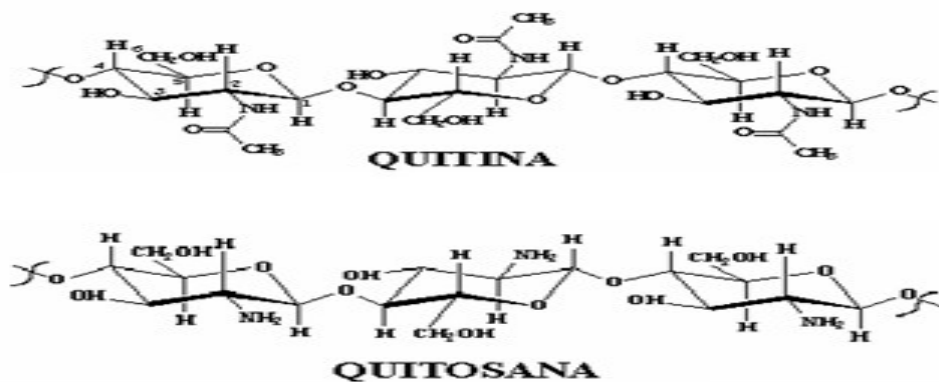
1.2 Quitosana

A Quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, biopolímero presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos. Tem sido tradicionalmente usada nos países orientais para o tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas (CHANDY; SHARMA, 1993).

Apresenta em maior proporção, na cadeia polimérica, unidades de β – (1-4) – 2 – desóxi – D – glicose e, um menor número de unidades de β – (1-4) – 2 – acetamido – 2 – desóxi - D – glicose da quitina, caracterizando-a como um copolímero composto por unidades repetidas de quitosana e quitina alternadamente (PENICHE et al., 2003).

A cadeia de distribuição é dependente do método de processamento utilizado para obter o biopolímero. A quitosana é o derivado N-desacetilado da quitina, mas a N-desacetilação é quase nunca completa (Chesnutt et al., 2007; Rinaudo, 2006; Prashanth et al., 2002) Quimicamente, a quitina é conhecida como poli-N-acetilglicosamina, e de acordo com este nome proposto, a diferença entre a quitina e a quitosana é que o grau de desacetilação na quitina é muito pequena, enquanto a desacetilação na quitosana ocorre em uma maior extensão (MUZZARELLI, 1973).

Os detalhes estruturais da quitina e quitosana são mostrados na Figura 1. A quitosana possui uma amina primária e dois grupos hidroxila livres para cada monômero de acordo com a fórmula $C_6H_{11}O_4N$. Este biopolímero natural é uma glicosaminaglicana e é composto por dois açúcares comuns, glicosamina e N-acetilglicosamina, sendo que ambos são constituintes de tecidos de mamíferos (RHOADES e RASTALL, 2007).



Estrutura química da quitina e da quitosana

Figure 1- Estrutura química da Quitina e Quitosana

A quitosana é o polissacarídeo mais abundante depois da celulose, (DUARTE et al., 2002; SINHA et al., 2004) e é estimado para ser produzida anualmente quase tanto quanto a celulose (PITTERMANN et al., 1997). A Quitosana pode ser considerada como análoga química da celulose, no qual a hidroxila no carbono-2 foi substituída por acetamido ou grupos amino. Como um ponto de diferença de outros polissacarídeos abundantes, quitina e quitosana contêm nitrogênio, além de carbono, hidrogênio e oxigênio. Quitina e quitosana são de interesse comercial devido à sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89%) em comparação com a celulose sintética substituída (1,25%), (PINTO, 2005). Como a maioria dos polímeros de hoje é composta de materiais sintéticos e sua biocompatibilidade e biodegradabilidade são limitadas quando comparadas aos polímeros naturais, como celulose, quitina, quitosana e seus derivados. No entanto, estes materiais naturalmente abundantes também apresentam uma limitação em sua reatividade e processabilidade. A quitosana é recomendada como material funcional adequado, porque possui propriedades excelentes, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e propriedades de adsorção (PINTO, 2005). Recentemente, muita atenção tem sido dada a quitosana como uma fonte potencial para a obtenção polissacarídea (FREIER et al., 2005). O polímero pode ser degradado pelos microorganismos do solo e da água. Isso faz com que se torne ambientalmente amigável (HENNEN, 1996).

1.2.0 Produção da Quitosana

Quitina e quitosana são obtidas a partir da casca de crustáceos, como caranguejos, camarões e lagostas, o exoesqueleto de insetos, e as paredes celulares de fungos como *Aspergillus* e *Mucor* onde fornece força e estabilidade (DUSAN et al., 2006). Resíduos de caranguejo e camarão são atualmente utilizados como a principal fonte industrial de biomassa e produção em grande escala de quitina e quitosana. Desperdícios do processamento de fábricas de alimentos marinhos ajudam a reciclar o lixo e fazer os derivados ou subprodutos para uso em outros campos. Estes resíduos de crustáceos são compostos inorgânicos de proteína, sais de quitina e lipídeos como principais componentes estruturais. Portanto, a extração de quitina e quitosana foram empregadas principalmente por métodos químicos (PITTERMANN et al., 1997).

Na primeira fase, a produção da quitina foi associada com indústrias de alimentos, em conservas de camarão. Na segunda etapa, a produção de quitosana foi associada com processos de fermentação, que envolveu o tratamento alcalino produzindo a quitosana. Resumidamente, conchas foram moídas em tamanhos menores e minerais, principalmente o carbonato de cálcio, foi removido por extração (descalcificação e desmineralização,) com ácido clorídrico diluído, seguido de agitação à temperatura ambiente. A proteína foi extraída (desproteínização) a partir do material residual por tratamento com soluções aquosas diluídas de hidróxido de sódio evitando a contaminação dos produtos de quitina. A quitina resultante foi desacetilada em hidróxido de sódio 45% a 120° C por 3 horas, com exclusão de oxigênio, e seguidos de procedimentos de purificação para formar quitosana com uma natureza catiônica. No processo de desacetilação, alguns dos grupos acetil foram retirados da cadeia molecular da quitina. Este encurtamento do comprimento da cadeia da molécula de quitina, eventualmente, deixa para trás um polímero com um grupo amino completo chamado quitosana. Este tratamento produz 70% de quitosana desacetilada (BRUM et al., 1995; CAMPANA-FILHO e DESBRIÈRES, 2000; GOY et al., 2000). A extensão da desacetilação depende principalmente da concentração do álcali, e tempo e a temperatura empregada durante todo o processo. Por exemplo, a temperatura ou a força de solução de hidróxido de sódio pode remover grupos acetil, resultando em uma variedade de moléculas de quitosana com diferentes propriedades físico-químicas e aplicações (JOSUÉ et al., 2000). De acordo com Kumar (2000), para produzir 1 kg de quitosana com 70% de desacetilação são necessários 6,3 kg de HCl e 1,8 kg de NaOH , além de água (1,4 toneladas). Comercialmente, a quitosana está disponível na forma de flocos de solução e pó fino. Quitina e quitosana são produzidas comercialmente na Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália. Assim, a produção e utilização da quitosana constituem um meio economicamente atraente que é procurado em todo o mundo (ASSIS e CAMPANA-FILHO, 2002).

1.2.1 História da Quitosana

A história da quitosana remonta ao século passado e desde a sua descoberta no ano de 1850 são discutidas formas de desacetilação (KITTUR et al., 1998; OLABARRIETA, 2005). Pesquisas sobre os usos da quitina e quitosana floresceram na década de 1930 e

início de 1940, mas o aumento de fibras sintéticas, como o surgimento de medicamentos sintéticos, deixou esquecido o interesse em produtos naturais. Tal interesse, incluindo a quitina e quitosana ganhou ressurgimento nos anos 1970 e continuou a se expandir desde então (PITTERMANN et al., 1997). A partir de 1960, já se conhece a aptidão dos polications em geral de se ligarem às células vermelhas do sangue. Muitos estudos têm mostrado sua eficácia como agentes aglutinantes de células. A quitosana, sendo classificada como polication, apresenta propriedades ligantes e aglutinantes. Em meados dos anos 60, estudos mostraram a capacidade da quitosana, em baixas concentrações, de promover a aglutinação das células vermelhas do sangue, sendo tal capacidade dependente da estrutura e da massa molar do polímero (DESPOND et al., 2001; ASSIS e SILVA, 2003). O foco na época era entender melhor estes materiais, os melhores métodos de produção e purificação química e uma infinidade de aplicações (RUBIN; SCHWEITZER, 2005).

Muitos pesquisadores têm focado a quitosana como uma fonte potencial de material bioativo durante as últimas décadas. No entanto, a quitosana tem várias desvantagens para ser utilizado em aplicações biológicas, incluindo a sua baixa solubilidade em condições fisiológicas (KITUR et al., 1998; OLABARRIETA, 2005). Por conseguinte, vários esforços têm sido relatados para preparar derivados funcionais da quitosana por modificações químicas como a solubilidade melhorada em água e solventes orgânicos em geral (EMBRILI, NACHT, 1996).

1.2.2 Propriedades da Quitosana

A maioria dos polissacarídeos que ocorrem naturalmente, por exemplo, a celulose, pectina, agar e agarose são neutros ou ácidos na natureza, enquanto a quitina e a quitosana são exemplos de polissacarídeos altamente básicos (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000). Este polímero é conhecido por ser atóxico, inodoro, biocompatível em tecidos animais e enzimaticamente biodegradável (RUBIN; SCHWEITZER, 2005). Suas propriedades únicas incluem a capacidade de formar filmes, a quelação com íons metálicos e características estruturais de adesão (KUMAR, 2000).

Os principais parâmetros que influenciam as características da quitosana são o seu peso molecular e grau de desacetilação (GD), que afetam a solubilidade, propriedades

físicas e reológicas. Vários graus de quitosana estão disponíveis comercialmente, que diferem principalmente no grau de desacetilação e peso molecular. Diferentes condições, tais como tipo e concentração dos reagentes, tempo e temperatura empregados em todo o processamento pode afetar suas características e desempenho do produto final (KHAN, 2001). No entanto, ambos: GD e peso molecular podem ser modificados. Por exemplo, o GD pode ser diminuído por reacetilação e o peso molecular pode ser reduzido por despolimerização ácida ou enzimática (MORGANTI et al., 2001).

1.2.3 Peso Molecular

A Quitosana geralmente se refere a uma família de polímeros caracterizados pelo número de unidades de açúcar por molécula de polímero (n), que define o seu peso molecular (PAUL e SHARMA, 2004; CLASEN et al., 2006). As propriedades físico-químicas, que incluem a viscosidade, solubilidade, adsorção em sólidos, elasticidade e resistência ao rasgo, são dependentes do peso molecular do polímero em questão (MORGANTI et al., 2001). O mesmo tem recebido muita atenção como um produto funcional para diversas aplicações. Essas funções dependem não só da sua estrutura química, mas também do tamanho do cristal e do caráter morfológico do filme preparado (RUBIN; SCHWEITZER, 2005). A cristalinidade da membrana aumenta com a diminuição no peso molecular da quitosana de acordo com Kahn (2001). O peso molecular da quitosana é dependente do processo de desacetilação e diminuiria com o tempo de desacetilação aumentada (FRANCIS e MATEUS, 2000). Dependendo da fonte e preparo, o peso molecular médio da quitosana pode variar de 50 a 1000 KDa (FRANCIS e MATEUS, 2000), 3,8-2000 KDa (SINHA et al., 2004) ou 50 a 2000 KDa (CHENITE et al., 2001).

1.2.4 Graus de Desacetilação

A quitosana é um polímero semicristalino e seu grau de cristalinidade é em função do GD sendo máxima para ambos, quitina (ou seja, 0% desacetilado) e totalmente desacetilado (100%) quitosana (FRANCIS e MATEUS, 2000). Apesar dessas designações químicas específicas, os nomes "quitina" e "quitosana", na verdade correspondem a uma família de

polímeros diferentes no conteúdo acetil, medido pelo (GD) (DUSAN et al., 2006). Quitosana é o derivado da quitina não tóxico, universalmente aceito, onde a quitina é N-desacetilada a tal ponto que se torna solúvel em ácidos aquosos diluídos (KUMAR, 2000). O processo de desacetilação envolve a remoção dos grupos acetil da cadeia molecular da quitina, deixando um grupo amino completo (-NH₂). A versatilidade da quitosana depende principalmente desse alto grau de grupos amino reativos. Para aumentar a desacetilação, a quitosana, por exemplo, GD>90% é submetida a tratamento alcalino repetido (WAN et al., 2003). Aumentar a temperatura ou a força da solução alcalina também pode melhorar a remoção dos grupos acetil da quitina (MORGANTI et al., 2001).

Um parâmetro importante para diferenciar a quitina da quitosana é a proporção de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose a 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose. Quando o número de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucopirranose é maior que 50%, o biopolímero é denominado quitosana. Por outro lado, quando o número de unidades de 2-acetamido-2-desoxi-Dglucopyranose é maior, o termo usado é quitina (PAUL e SHARMA, 2004; CLASEN et al., 2006). De acordo com Kumar (2000), quitosana é o derivado totalmente ou parcialmente N-desacetilado da quitina com grau de desacetilação maior que 0,35. Enquanto Khan (2001) relatou que quitina com GD acima de 75% é conhecida como quitosana, Montembault et al. (2005) relataram a quitosana como o composto com GD $\geq$ 60%. Tommeraas et al. (2002) relataram que a quitosana comercialmente disponível geralmente tem a faixa entre 0-0,3 fração de N-acetil unidade. Esta relação tem um marcante efeito sobre o desempenho da quitosana em muitas de suas aplicações. O GD da quitosana tem sido utilizado para correlacionar com a sua solubilidade em solução ácida e a cristalinidade de sua membrana (PILLAI et al. 2001; TRINDADE, 2004). A conversão da quitina em quitosana aumenta o GD, e, assim, altera a distribuição de carga das moléculas da quitosana (MORGANTI et al., 2001). É sabido que a densidade da carga ao longo da cadeia aumenta com o aumento do GD, e que a flexibilidade da cadeia de moléculas de quitosana pode ser manipulada mudando o GD (PILLAI et. al. 2001; TRINDADE, 2004). Quitosanas comercialmente disponíveis tem grau de desacetilação variando de 50 a 90% (Francis e Mateus, 2000), 66-95% (Sinha et al., 2004) ou 40 a 98% (Chenite et al., 2001).

1.2.5 Solubilidade da Quitosana

A quitosana é um polímero semicristalino, uma base fraca, que é insolúvel em água, solução aquosa de álcali ou acima de pH 7 e solventes orgânicos comuns, devido à sua estável e rígida estrutura cristalina. A quitosana é normalmente polidispersível e tem a capacidade de dissolver em determinados ácidos orgânicos e inorgânicos, tais como ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico e ácido fórmico em valores de pH determinados após agitação prolongada (DUREJA et al., 2001; DODANE et al., 1998). O ácido sulfúrico não dissolve a quitosana porque reage formando sulfato de quitosana, que é um sólido cristalino branco ⁴⁸ A solubilidade da quitosana também depende do pKa destes ácidos e suas concentrações. Investigações sobre as características da taxa de dissolução revelaram que há variação de acordo com o tipo de ácido usado⁴⁹. A Quitosana comporta-se como uma esfera em solução aquosa de ácido acético ou como uma esponja aleatória em uréia⁵⁰.

O polímero se degrada antes de derreter, o que é típico para polissacarídeos com ligação de hidrogênio extensiva⁵¹. Para cada sistema de solvente, a concentração de polímeros, pH, concentração de contra-íon e temperatura afetaria a viscosidade da solução⁵². Por exemplo, em valor de pH abaixo de 4, a maioria dos grupos amino da quitosana é protonado, e uma vez que este efeito promove a repulsão eletrostática entre grupos do mesmo sinal, há um inchaço maior da rede do polímero⁵³

Enquanto ⁵⁴relataram que em pH 5.2, uma estrutura instável é gerada. Após a neutralização com um excesso de NaOH, a força iônica da solução aumenta e, portanto, o tamanho dos agregados diminui devido à compactação dos poros macromoleculares. Os grupos amino livres formam ligações de hidrogênio intermoleculares com o oxigênio das cadeias adjacentes. Pelo valor de pH superior a 6,5, que é aproximadamente o pKa do grupo amino na quitosana, o tamanho dos agregados aumenta e a separação de fases ocorre. O polímero coagula e pode ser recuperado como um sólido amorfo ⁵⁵ A singularidade da quitosana depende da distribuição dos grupos acetil que permaneceram ao longo da cadeia, mas principalmente depende do grupo amino livre (-NH₂) o que é importante na sua rede conformacional⁵⁶ Embora a quitosana seja conhecida por ter importantes atividades funcionais, a baixa solubilidade é o principal fator limitante na sua utilização. Isso interfere na aplicação biomédica da quitosana, especialmente no pH fisiológico 7,4 ⁵⁷ Assim, melhorar a

solubilidade da quitosana é fundamental para que este recurso abundante possa ser utilizado em uma ampla faixa de pH. Apesar desta limitação, várias aplicações de quitosana e quitosana modificada foram relatadas⁵⁸. A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas. Novo interesse surgiu recentemente na quitosana parcialmente hidrolisada, onde o peso molecular da quitosana diminui, tornando-a facilmente solúvel em água, devido à sua cadeia de comprimentos mais curtos e grupos amino livres⁵⁹. A baixa viscosidade e maior solubilidade da quitosana com um pH neutro tem atraído o interesse de muitos pesquisadores para utilizar a quitosana em sua forma de menor peso molecular.⁶⁰

1.2.6 Aplicações

A quitosana tem baixo custo e possui importantes propriedades fisiológicas tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, adesividade, é atóxica e possui baixa alergenicidade⁶¹. É um biopolímero versátil e funcional possibilitando seu uso em diversas áreas, incluindo: alimentos, cosméticos, agricultura, biomedicina, proteção ambiental, gestão das águas residuais e fibras têxteis⁶². Uma grande variedade de aplicações médicas para quitosana e seus derivados têm sido relatadas nas últimas três décadas bem como na área farmacêutica em que a atenção tem sido focada em sua absorção, liberação controlada e propriedades bioadesivas ⁶³De fato, a quitosana é conhecida por ser biocompatível permitindo a sua utilização em várias aplicações médicas, tais como, as tópicas e oculares, implantação ou injeção. Além disso, a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima, e é considerada biodegradável. Devido à suas cargas positivas em pH fisiológico, a quitosana também é bioadesiva, o que aumenta sua retenção no local da aplicação ⁶⁴Tem sido usada extensivamente para preparar microesferas para entrega oral e intra-nasal bem como um transportador de drogas solúveis para uso parenteral ⁶⁵Tais características se devem à presença de grupos amino livres bem como a sua baixa toxicidade como relatam ⁶⁶. Há muitos estudos mostrando que a quitosana acelera a cicatrização de feridas em muitos casos clínicos, diante disso tem sido sugerida sua utilização para inibição da fibroplasia na cicatrização de feridas e promoção do crescimento e diferenciação em cultura de tecidos ⁶⁷. A quitosana é usada como matéria-prima para fibras sintéticas ou artificiais, filamento, em pó, grânulos, esponja, e composto

com algodão ou poliéster na maioria dos estudos. Produtos médicos feitos de quitosana podem ser úteis como suturas absorvíveis e materiais curativos.⁶⁸ O polímero também pode inibir o crescimento de células tumorais, exercendo imunomelhoramento. Resultados de alguns estudos sugerem que, as atividades antitumorais observadas não foram devido à morte direta de células tumorais, mas pode ser devido ao aumento da produção de linfócitos, levando a manifestação do efeito antitumoral através da proliferação citolítica de linfócitos T.⁶⁹ Apresenta atividade antiácida e antiúlceroza, impedindo ou enfraquecendo a irritação gástrica provocada pelo contato da droga no estômago. A atividade antiúlceroza é decorrente da sua capacidade de vincular ácido gástrico livre. Além disso, as formulações de quitosana parecem flutuar gradualmente em meio ácido.⁷⁰

1.2.7 Biotecnologia

A quitosana tem um grupo amino e dois grupos de hidroxila onde a modificação química destes grupos e as reações de regeneração dão a ela características biofuncionais.⁷⁰ Devido a isso tem sido usada como *scaffold* celular para terapias em animais e humanas. A atividade da lisozima extracelular mostrou ser reforçada em culturas *in vitro* de várias células de mamíferos após o tratamento com quitosana e seus derivados. Como resultado, a formação de tecido conjuntivo foi estimulada, e a função de auto-defesa contra a infecção microbiana foi reforçada no nível celular.⁷¹

O polímero tem sido usado como um agente antibacteriano e antifúngico. Os grupos amino catiônicos da quitosana provavelmente se ligam a grupos aniônicos de microorganismos e fungos, como a *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria arbusti*, *papulosum Helminthosporium*, e *Aspergillus nidulans* resultando em inibição do seu crescimento.⁷² A mesma também tem sido usada como agregadora de gordura, já que se liga a molécula de gordura no estômago antes de ser digerida. Como algumas fibras vegetais, a quitosana não é digerível; portanto, não tem valor calórico. Não importa em que quantidade a quitosana é ingerida, sua contagem de calorias permanece zero. Esta é uma propriedade muito importante para qualquer programa de redução de peso já que tem a capacidade de complexar a gordura e evitar a sua absorção pelo trato digestivo. A molécula

de gordura liga-se a quitosana, formando uma massa que o corpo não pode absorver e depois é eliminada pelo organismo. A fibra da quitosana difere das outras na medida em que possui uma carga iônica positiva que lhe confere a capacidade para ligar quimicamente com a carga negativa de lipídios, gorduras e ácidos biliares⁷³. O polímero também pode ser utilizado como material para imobilização de enzimas fundamentada em algumas características que incluem a alta afinidade para proteínas, a disponibilidade de grupos funcionais reativos para a reação direta com enzimas e para modificação química, hidrofiliabilidade, estabilidade mecânica e rigidez, facilidade de preparação em diferentes configurações geométricas com permeabilidade e área adequados para um processo determinado. Na agricultura, a quitosana tem sido descrita como um aditivo e conservante em fertilizantes líquidos ⁷⁴

1.2.8 Tratamento de águas

Como a proteção ambiental está se tornando um importante problema global, as indústrias prestam especial atenção ao desenvolvimento de tecnologias que minimizem e revertam os danos causados⁷⁵. A quitosana tem sido usada há três décadas no processo de purificação da água. Quando a quitosana é espalhada sobre os derramamentos de petróleo, ela mantém a massa de óleo unida tornando sua retirada mais eficiente e eficaz. As plantas de purificação de água de todo o mundo utilizam a quitosana para remover óleos, graxas, metais pesados e partículas finas que causam turbidez residual nas águas dos córregos ⁷⁶

Forma complexos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Portanto, a quitosana demonstra ser um eficaz agente coagulante para o tratamento de alimentos e processamento de resíduos de efluentes⁷⁷. O polímero também passa por quelação com íons metálicos e devido à sua exclusiva estrutura molecular, demonstra uma alta afinidade com muitas classes de corantes, como enxofre e naftol. A taxa de difusão de corantes em quitosana é semelhante à celulose ⁷⁸

1.2.9 Cosméticos

A quitosana tem diferentes pesos moleculares e GD, que são adaptados para uso em seguimentos cosméticos apropriados, tais como: cuidados com a pele, desodorantes e cuidados com o cabelo. É aplicada como agente formador de película e hidratação em cosméticos tendo em vista seu efeito hidratante durável em contato com a pele. Ao reduzir a perda de água trans-epidérmica ela aumenta a capacidade de hidratação da pele. Ela também melhora os parâmetros sensoriais e a compatibilidade das formulações dermatológicas. 79A capacidade de formação de película da quitosana auxilia na transmissão de uma agradável sensação de suavidade para a pele protegendo-a de condições ambientais adversas e das consequências do uso de detergentes. A quitosana tem potencial para ser superior ao ácido hialurônico como hidratante em cosméticos80. Klingels et al. (1999) relataram que a quitosana é um ativo multifuncional para a pele com vantagens adicionais em proteção solar e cuidados para o lábio. Produtos para proteção solar devem cuidar da pele para evitar ressecamento e apresentar prolongada resistência à água. A Resistência à água completa não é possível, no entanto, pode ser aumentada através da adição de ceras hidrofóbicas / óleos formadores de filme ou polímeros catiônicos. Por esta razão, 81realizaram um teste para determinar se a quitosana como um polímero catiônico poderia também aumentar a resistência à água de filtros UV em uma formulação de protetor solar. Neste estudo verificou-se que a quitosana aumentou significativamente a resistência à água, melhorou a adesão dos filtros UV e sua sensibilidade ao toque. A proteção prevista pela formulação contendo quitosana foi assim, reforçada 82A adição de quitosana torna os lábios mais macios e também suporta a longo prazo a adesão da cor , além do uso apropriado como um componente ativo em desodorantes uma vez que inibe a atividade enzimática das bactérias e como um polímero em cosméticos para o cabelo 83

Mesmo com a intensa pesquisa nesta área, nota-se a existência de poucos trabalhos enfocando a produção de membranas contendo simultaneamente quitina e quitosana (assim como outros agentes ativos em sua composição), escassez de informações detalhadas sobre as condições para a obtenção destas membranas e sobre os fatores que influenciam nas características físicas, químicas, mecânicas e biológicas destes materiais, de resultados comparativos entre as características de membranas densas e porosas bem como da padronização nos métodos de caracterização destes biomateriais 84

1.3 Biomateriais

Os biomateriais podem ser definidos como todo material utilizado para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos. Estes devem possuir a capacidade de permanecer em contato com tecido vivo e recompor partes lesadas do organismo, ou ainda auxiliar na recuperação. Podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluídos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo. ⁸⁵Os biomateriais podem ser produtos metálicos, cerâmicos, poliméricos sintéticos ou naturais, destacando-se o colágeno purificado, as fibras protéicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados⁸⁶

Tais polímeros podem ainda ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários. Os bioestáveis são materiais utilizados na substituição, por tempo indeterminado, de um tecido lesado, devendo possuir, portanto, características mecânicas e físico-químicas compatíveis com tal função. Os materiais Bioabsorvíveis são aqueles degradados tanto in vitro quanto in vivo sendo, portanto, utilizados como dispositivos temporários ⁸⁷

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar. Engloba não apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor sendo, portanto, biocompatíveis e funcionais ⁸⁸Neste contexto deve-se ressaltar que o conceito de biocompatibilidade se resume na habilidade de um material em induzir no paciente uma resposta adequada a uma aplicação específica⁸⁹ Embora, tenham sido verificados grandes avanços na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular e muito se tenha investido em pesquisa e desenvolvimento de recursos e tecnologias com o objetivo de favorecer esses processos, dados brasileiros ainda pouco precisos mostram que a incidência e prevalência de úlceras crônicas são extremamente altas, estima-se que quase 3% da população brasileira é portadora desse tipo de lesão, que se eleva para 10% no caso dos diabéticos, e que em torno de 4 milhões de pessoas sejam portadoras de lesões crônicas ou tenham algum tipo de complicação no processo de cicatrização ⁹⁰

Tais constatações requerem dos profissionais não só mais conhecimento e preparo, como implica maior investimento em pesquisas, tanto para quantificar de forma mais precisa tal população como para a busca de novos recursos e tecnologias, com maior eficácia, além de mais adequados e mais acessíveis à população brasileira⁹¹

O Hemocentro de Botucatu vem, desde 2003, promovendo protocolos de produção formulados a partir de hemocomponentes obtidos do plasma fresco congelado (PFC), crioprecipitado e concentrado de plaquetas (CP). Levando em consideração tais protocolos, busca-se agora o desenvolvimento de um polímero de Quitosana, complementando a ação dos princípios-ativos contidos nos mesmos.

Objetivos



2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Obter Membranas de Quitosana com potencial para uso na regeneração de pele lesada.

2.2 Objetivos específicos

- Estudo sistemático para a determinação da influência da concentração da solução de partida de quitosana nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas,
- Incorporação dos fatores de crescimento na concentração de quitosana, visando a redução de custo dos biomateriais sem, entretanto, prejudicar suas características.
- Estudo microbiológico da membrana de quitosana
- Dosagem dos fatores de crescimento

Material e Métodos



3.0 Material e Métodos

3.1 Material

Para a obtenção das membranas foram utilizados como reagentes a quitosana de grau comercial (**Sigma-Aldrich®**) extraída da carapaça de caranguejos com o mínimo de 85% de quitina desacetilada, o glutaraldeído e ácido acético glacial (**Sigma-Aldrich®**).

3.2 Método

Fluxograma: Etapas da Produção e Caracterização da Membrana

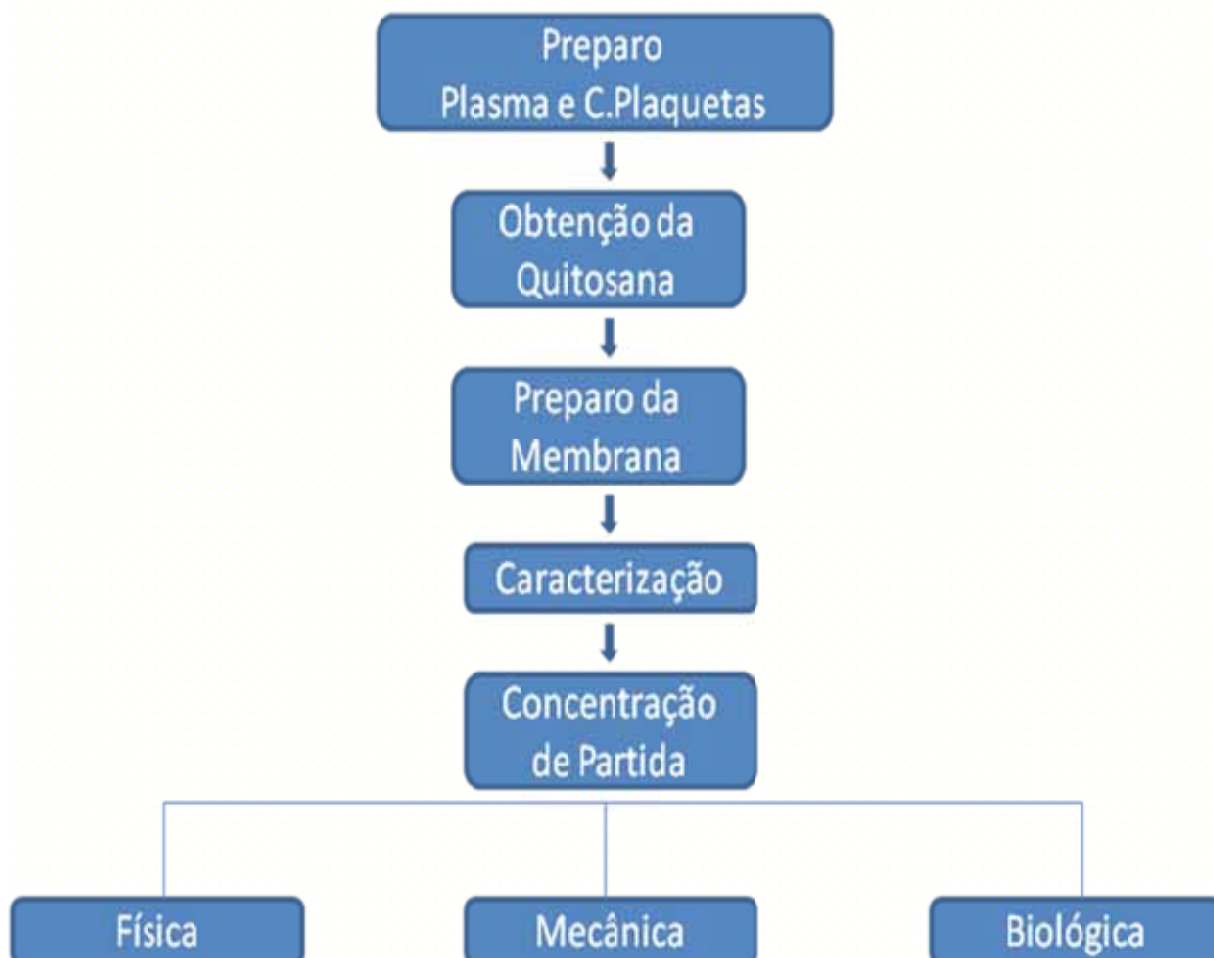


Figure 2- Método Desenvolvido

3.2.1 Estudo das Concentrações de Partida

Foram realizadas cinco diluições nas concentrações de 20 g, 10 g, 5 g, 4 g e 3 g respectivamente nas concentrações de 3%, 4% e 5% de ácido acético diluído.

Na concentração de 3g foi adicionado o glutaraldeído a 0,25% com o intuito de aumentar a resistência das membranas à degradação em condições fisiológicas. Estas condições de reticulação foram selecionadas após estudo prévio.

Tabela 1- Estudo das Concentrações de Partida

20g	10g	5g	4g	3g
3%	3%	3%	3%	3% Glut 0.25%
4%	4%	4%	4%	4% Glut 0.25%
5%	5%	5%	5%	5% Glut 0.25%

3.2.2 Preparo das membranas de quitosana

Realizada no Departamento de Química/Bioquímica da UNESP – Botucatu – IBB, sob a supervisão da Professora Dr (a). Margarida Juri Saeki.

Procedimento

Uma solução a 2,5% (em massa) foi preparada pela dissolução de 20 gramas de quitosana em 975 ml de solução de ácido acético (50 ml de ácido acético concentrado e 925 ml de água Milli-Q). Com o auxílio de um agitador mecânico a 180rpm, a quitosana foi sendo diluída, ao longo de 24h ininterruptamente. A dispersão foi armazenada por 1 semana a 4°C para completa solubilização. A solução final foi filtrada a vácuo, aquecida (a 60°C) obtendo-se um filtrado límpido e homogêneo, que foi estocado a 4°C, em frascos de polietileno. Incorporou-se o Plasma Fresco Congelado e Concentrado de Plaquetas totalizando 10% do volume total. As membranas foram preparadas espalhando-se a solução de quitosana em placas de Petri. Para a obtenção de membranas porosas, permitiu-se a parcial evaporação

do solvente a 60°C por 60 min. em estufa e para as membranas densas, evaporou-se totalmente o solvente por 180 min. Em seguida, as placas com quitosana foram imersas em solução de NaOH 0,5N a 25°C por 24h (densas) ou 48h (porosas). As membranas foram então lavadas e estocadas a -4°C em água Milli-Q. Todo o processo foi repetido, variando-se a concentração da solução de NaOH nas concentrações de 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0M. (Fig. 3)



Figure 3- Procedimento de Preparo das Membranas

3.2.3 Caracterização Física

Realizada no Departamento de Morfologia da UNESP – Botucatu – IBB, sob a supervisão do Professor Dr. Wellerson Rodrigo Scarano.

A- Inclusão em Histoiresina

As membranas foram cortadas em 5 fragmentos de 5mmx5mm e desidratadas até o álcool absoluto. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em solução de 1:1; álcool absoluto: histoiresina (Leica Microsystems®, Germany) por 4 horas; em seguida, foram mantidos em histoiresina pura (overnight) e, na manhã seguinte, incluídos em histoiresina+polímero endurecedor em moldes plásticos. Os fragmentos foram incluídos em sentido vertical para que a espessura da membrana ficasse perpendicular ao plano de corte do bloco. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura e corados pela eosina.

B- Mensuração da espessura da membrana

Os cortes corados pela eosina foram mensurados em sistema de análise de imagens Leica Quin® acoplado ao microscópio de luz (DM2000, Leica®) e, 10 medidas aleatórias de espessura foram realizadas em cada fragmento, totalizando um total de 50 mensurações. Os resultados numéricos em micrômetros foram submetidos à análise para o cálculo da média e desvio padrão da espessura da membrana analisada.

C- Morfologia

A visualização da morfologia da superfície das membranas foi realizada através do sistema de análise de imagens Leica Quin® acoplado ao microscópio de luz (DM2000, Leica®). Para a realização deste ensaio, as membranas foram cortadas na dimensão de 5 x 5 mm².

3.2.4 Caracterização Mecânica

A- Ensaio Mecânico

Para o ensaio de tração utilizaram-se 5 amostras de cada condição e utilizou-se as médias de todas as amostras para maior representatividade dos dados obtidos. Os ensaios de tração estão de acordo com a norma ASTM D882-91 (ASTM,1991).

A caracterização mecânica das membranas à base de quitosana foi realizada na Máquina Universal de Ensaio, modelo Instron do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (DEMA, UFSCar), utilizando-se célula de carga de 500 N, taxa de deformação de 10 mm/min e distância entre garras de 25 mm.

3.2.5 Caracterização Biológica

A- Teste Antifúngico

Realizado no Departamento de Microbiologia da UNESP -Botucatu- IBB, sob a supervisão do Professor Livre Docente Eduardo Bagagli. O método empregado para a análise foi o de Ágar Difusão.

- **Microorganismo**

Levedura *Candida albicans* (ATCC 10231)

- **Preparo:**

6,5g do meio de cultura Saboraud Agar (Difco™) para 100ml de água destilada, autoclavados a 12° C por 15 minutos

- **Distribuição:**

20 ml do meio líquido em placas de petri (90x15mm) esterilizadas, incubadas em estufa a 37C por 24 horas.

Os microorganismos (*C. albicans*) foram repicados em meio Ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco™) caldo 20% glicerol, armazenados em estufa a 37 C por 24 horas formando uma suspensão. Swabs estéreis foram mergulhados na suspensão de *C.albicans* e foi realizado o plaqueamento. Sobre o meio plaqueado, foram colocados 3 amostras de quitosana dopada e duas de quitosana pura de 0,6mm. As placas foram colocadas em estufa

bacteriológica a temperatura de 37°C por 48 horas, a fim de observar o crescimento dos microorganismos.

- **Esquema Ilustrativo**

B -Teste Antimicrobiano

Essa etapa foi realizada no Hospital Estadual de Bauru – Dr. Arnaldo Prado Curvêllo, sob a orientação da Farmacêutica Responsável Dr (a). Gislaine Aparecida Querino. Para a realização do teste foram produzidos quatro grupos de membrana em duas diluições ácidas, com o intuito de comparar a influência da quitosana enriquecida com plasma e plaquetas denominada (Quitosana Dopada) e da Quitosana não dopada na atividade antimicrobiana.

Tabela 2- Grupos do teste antimicrobiano

	Grupos	Ácido Acético
1	Quitosana não dopada	3%
2	Quitosana não dopada	4%
3	Quitosana dopada*	3%
4	Quitosana dopada*	4%

Para cada um dos quatro tipos de membrana apresentados foi realizado o teste antimicrobiano da seguinte maneira:

- **Microorganismos Controle**

1º Teste

- Staphylococcus aureus ATCC 25923 (10^6)
- Escherichia coli ATCC 25922 (10^6)
- Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 (10^6)
- Klebsiella pneumoniae similar ATCC K001 (10^6)

Os microorganismos foram acondicionados em poços dispostos de acordo com a ilustração abaixo:



Figure 4 - Esquema representativo 1 teste

2 ° Teste

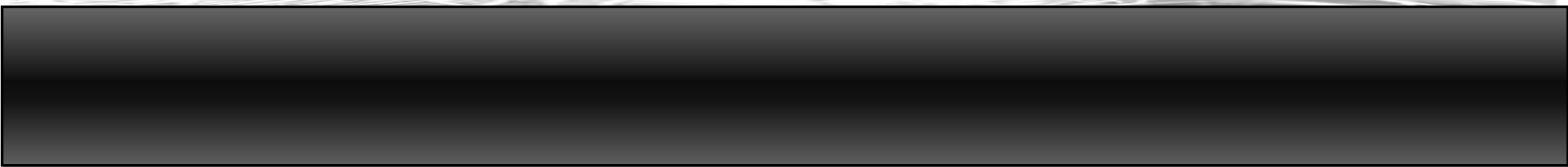
- Staphylococcus aureus ATCC 25923 (10^5)
- Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 (10^5)

Em todos os grupos também foi realizado o teste utilizando BactAlert ® à Temperatura ambiente por cinco dias.

Resultados e

Figura: Microorganismo inoculado em meio de cultura pronto para ser plaqueado

Discussão



4 Resultados e Discussão

Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados, os mesmos foram divididos em itens, de acordo com as propriedades avaliadas.

4.1 Concentrações da Solução de Partida

Foram testados cinco grupos nas concentrações de 20g, 10g, 5g, 4g e 3g de quitosana diluídos em 5%, 4% e 3% de ácido acético respectivamente, por sete dias com o intuito de avaliar a proporção inicial ideal de quitosana que possibilite a padronização e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Tabela 3- Estudo das Concentrações de Partida.

	Temp. do meio (°C)	[] de partida da solução de Quitosana (g)	[] da Solução de Ácido acético(%)	[] da Solução de Ácido acético(%)	[] da Solução de Ácido acético(%)	Tempo em Dias para a avaliação final	Glutaraldeído (%)
Ensaio 1	Ambiente	20	5	4	3	7	
Ensaio 2	Ambiente	10	5	4	3	7	
Ensaio 3	Ambiente	5	5	4	3	7	
Ensaio 4	Ambiente	4	5	4	3	7	
Ensaio 5	Ambiente	3	5	4	3	7	0,25

Os estudos envolvendo a produção e caracterização de membranas de quitosana não especificam as concentrações de partida, mencionando apenas a concentração utilizada, o que dificulta o entendimento e a reprodutibilidade dos mesmos. Neste teste, foi possível

observar que as concentrações de quitosana interferem nas características físicas das membranas e está diretamente relacionada com a sua estabilidade ao longo do tempo.

A escolha do intervalo e dos extremos de 20 a 3 g de quitosana foi estipulado de acordo com os estudos anteriores que em sua maioria utilizam 20 g e 10 g de quitosana não sendo necessário, portanto, uma quantidade maior, já que são obtidas membranas com boas características na concentração máxima, mas sim um estudo de concentrações menores o que resultaria em um menor custo e otimização dos recursos.

A figura 4 demonstra claramente que com 20 g obtivemos membranas transparentes, translúcidas, com brilho característico e maleabilidade nas três concentrações de ácido acético, não havendo diferença significativa entre elas. Tal resultado nos permite padronizar a concentração de 4% como ideal para as diluições futuras, excluindo os extremos de 5 e 3% e estabelecendo uma margem de segurança satisfatória. As demais concentrações de quitosana demonstraram degradação diretamente proporcional à concentração de ácido e ao tempo. A partir de 10 g de quitosana a degradação é acelerada, comprometendo suas características físicas, tornando-se opacas, endurecidas e com deformação das cadeias poliméricas.

A membrana desenvolvida com 3g de quitosana foi imersa em uma solução de glutaraldeído a 0,25% por 24 horas com o intuito de modificar quimicamente as membranas tornando-a resistente a degradação inicial, impedindo assim, a perda de água para o meio. As membranas tornaram-se menos escurecidas, com menor variação da cor quando comparadas com as de 4 e 5g, prolongando a Shelf life (Vida de Prateleira) da membrana.

Esse tratamento, porém, muda a característica mecânica da membrana, que se torna mais quebradiça. Para o objetivo em questão o glutaraldeído demonstrou-se eficaz, mas denota a necessidade de realizar novos estudos com diferentes agentes reticulantes menos tóxicos e biocompatíveis.

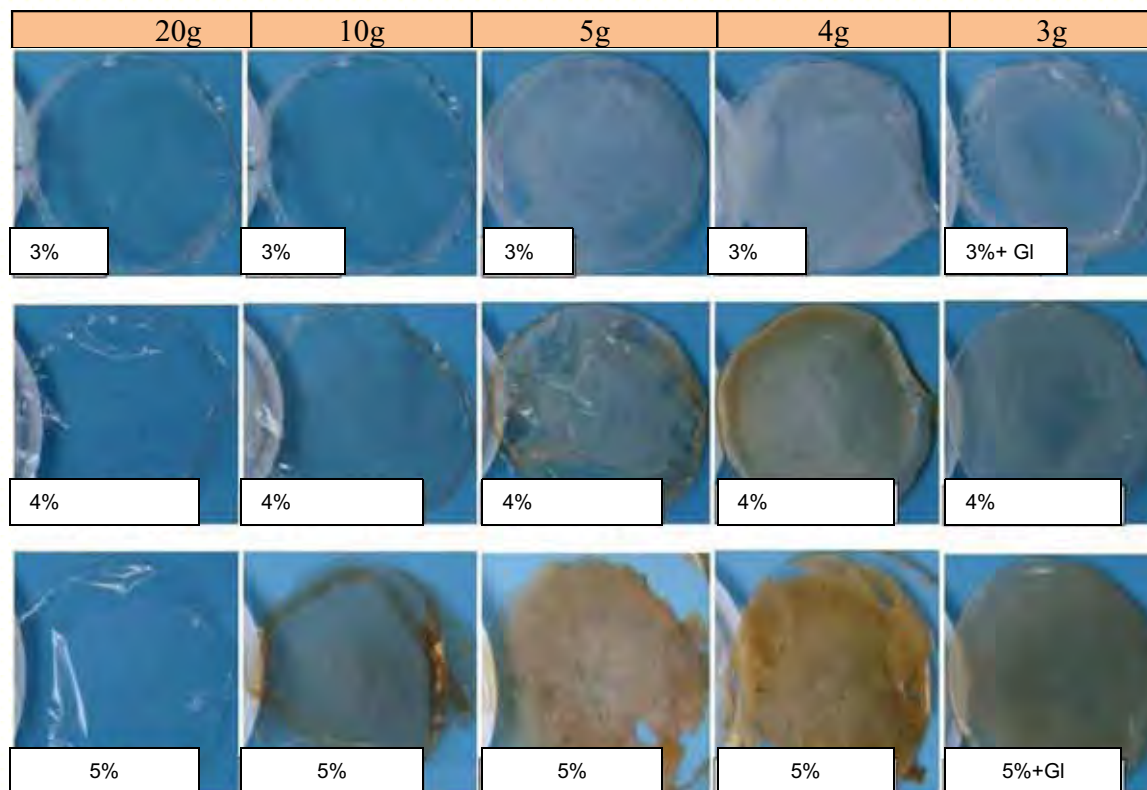


Figure 5- Diferentes concentrações de Solução de Partida

4.2 Caracterização Física

4.2.1 Espessura

Os valores das espessuras das 50 mensurações foram analisados estatisticamente resultando em uma média $\pm$ desvio padrão de $382,75 \pm 14,87\mu\text{m}$.

Veiga (2009) obteve uma espessura máxima de $165\mu\text{m}$ em membranas de quitosana, A mesma autora sugere que filmes poliméricos destinados a recuperação de lesões cutâneas devam ter uma espessura que varie de 99 a $165\mu\text{m}$, estando, então, nossas membranas muito espessas para esta finalidade, porém, a incorporação do plasma e plaquetas altera a espessura e conformação dessas membranas o que sugere uma padronização específica para tal produto e a realização de novos testes.

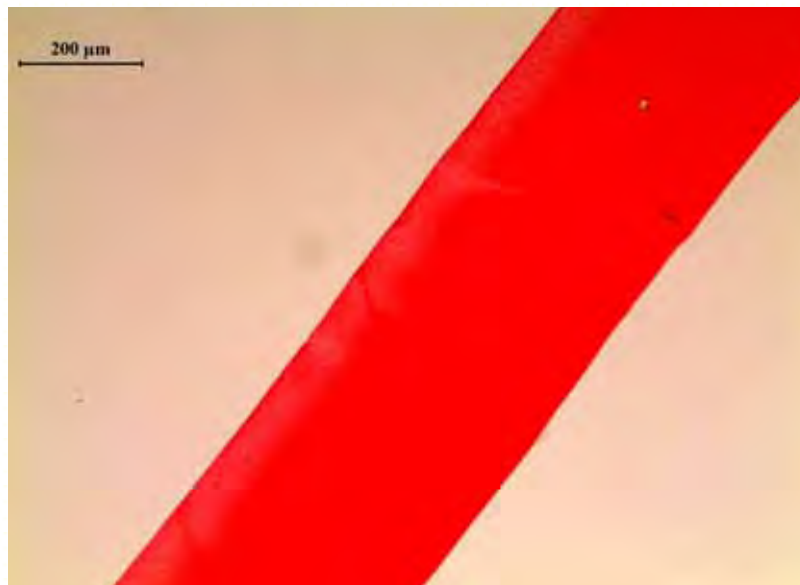


Figure 6- Espessura da Membrana corada pela Eosina

4.2.2 Morfologia

A morfologia da superfície das membranas de quitosana foi observada no microscópio de luz (DM2000, Leica®). As membranas densas, ou seja, que foram submetidas à imersão em NaOH por 48 horas apresentaram a superfície plana, com pouca rugosidade e praticamente nenhuma porosidade (Fig. 7). Além disso, riscos provenientes das ranhuras do próprio substrato de poliestireno das placas de Petri, durante o processo de formação da membrana foram observados. Tal problema foi corrigido, pela utilização de placas estéreis, de vidro, as quais não apresentavam riscos na superfície, mesmo quando observadas ao microscópio.

As membranas porosas, ou seja, que foram submetidas à imersão em NaOH por 24 horas apresentaram a superfície irregular, com ranhuras e poros evidentes não comprometendo sua estabilidade de forma significativa (Fig. 6). A porosidade na membrana apresenta vantagens já que permite a liberação e troca de substâncias contidas no substrato com o meio, de forma eficaz e controlada. As densas permitem também a liberação controlada do plasma e plaquetas e a possibilidade de maior tempo de contato com a pele lesada e diminuição das trocas de curativos, constituindo um produto com potencial de uso prolongado.

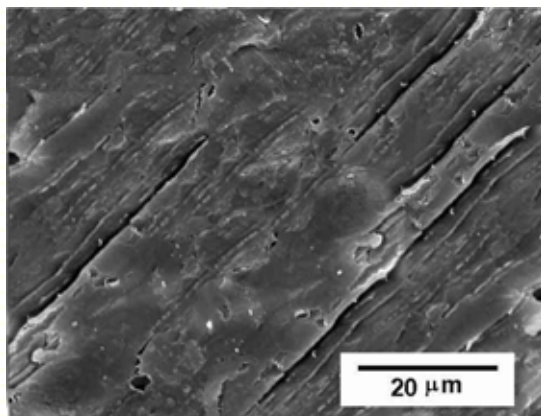


Figure 7- Superfície Irregular

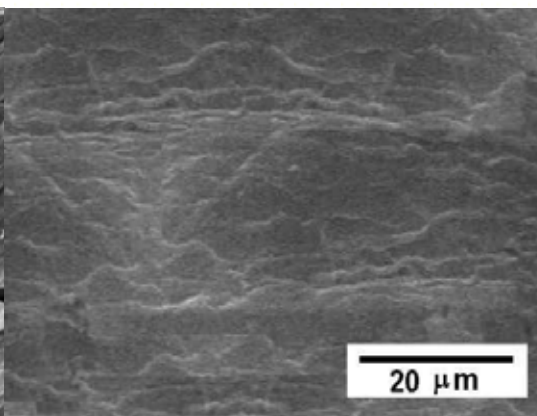


Figure 8- Superfície Plana

4.3 Caracterização Mecânica

4.3.1 Ensaio Mecânico

Com relação aos ensaios mecânicos, duas variáveis-resposta foram analisadas: a tensão de ruptura e a porcentagem de deformação das membranas após seu alongamento. Os resultados obtidos, expressos em termos de valores médios para um conjunto de cinco amostras por composição de membrana, podem ser visualizados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4- Tensão de Ruptura de duas composições de membranas porosas à base de quitosana

Composição	Tensão de Ruptura
	MPa
Quitosana Pura 4%	6,53 ± 1,49
Quitosana Dopada 4%	6,07 ± 1,63

Tabela 5- Porcentagem de deformação após o alongamento

Composição	% de deformação das membranas
	Média ± Desvio Padrão
Quitosana Pura 4%	69,17 ± 16,17
Quitosana Dopada 4%	96,67 ± 22,44

Como se pode notar na Tabela 4, tanto as membranas constituídas somente por quitosana quanto as dopadas, apresentaram valores de tensão de ruptura considerados adequados para a finalidade proposta, visto que a pele humana normal apresenta valores de tensão de ruptura que variam de 2,5 até 16 MPa (Silver, 1994 APUD Wang e col., 2002). Tal fato deve-se muito provavelmente à organização estrutural das cadeias da quitosana, a qual confere cristalinidade ao polímero e, portanto, boa resistência mecânica. Apesar da literatura descrever a quitosana como um polímero de elasticidade pouco adequada para diversas aplicações biomédicas (Cheng e col., 2003; Yamaguchi e col., 2003; Zhang e col., 2002), os valores de alongamento obtidos para as membranas constituídas foram considerados adequados para a finalidade proposta, já que a pele humana normal apresenta elasticidade de aproximadamente 70% (Hansen e Jemec, 2002) e os valores obtidos para as membranas variaram entre 69,17 e 96,67% (Tabela 5).

Deve-se ainda salientar que, além do ensaio de avaliação das propriedades mecânicas das membranas terem sido realizados com os materiais úmidos, as membranas sintetizadas eram do tipo densas, favorecendo assim, a obtenção de valores de elasticidade superiores aos possivelmente observados quando da utilização de membranas do tipo porosas.

Como as espessuras das membranas são diferentes (0,038 mm ou 38 μ m para as membranas descritas na literatura e 382,75 μ m ou 0,38mm para as membranas sintetizadas neste trabalho) e não foi divulgada a concentração da solução de partida de quitosana utilizada na obtenção da membrana descrita na literatura bem como as condições em que foram realizados os ensaios mecânicos, a análise comparativa pôde ser efetuada de forma muito limitada. Tal comparação indicou que os resultados são de mesma ordem de grandeza, mostrando conformidade entre eles.

4.4 Caracterização Biológica

4.4.1 Atividade Antifúngica

Discos de quitosana pura (QP) e dopada foram colocados na superfície do meio de cultura e previamente inoculados. Durante a incubação da placa de Petri, o agente antimicrobiano sofreu difusão do disco de papel para o meio sólido. A certa distância do disco, o valor MIC (Concentração inibitória mínima) foi atingido. Após 48 horas de incubação foi evidenciada a formação de halos de inibição de crescimento.

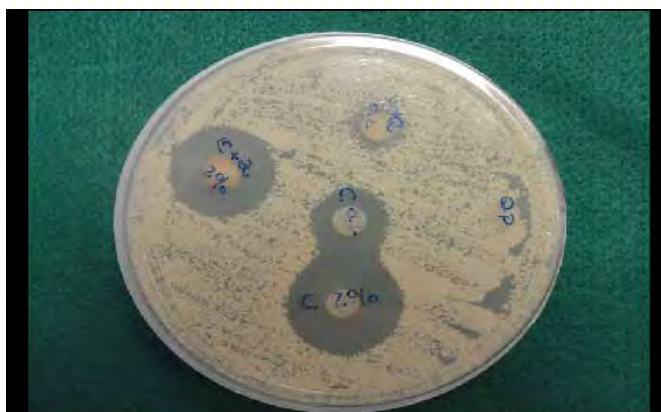


Figure 9- Halos de Inibição após 48 horas de incubação

Os três discos de quitosana dopada apresentaram atividade antifúngica evidente com formação de halo aparente e os dois discos de quitosana pura apresentaram discreta atividade inibitória. A inibição manteve-se após as 48 horas não havendo diferença significativa no halo da quitosana pura. Os mesmos foram medidos de acordo com a tabela 6

Tabela 6- Atividade Antifúngica e Halos de Inibição

Diâmetro médio dos halos de inibição do crescimento (mm)	
Quitosana	
Dopada	8,5
Dopada	7,0
Dopada	8,5
Pura	1,5
Pura	1,0

4.4.2 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da quitosana é destacável dentre as inúmeras características que distinguem a quitina e quitosana dos demais polissacarídeos. Tais polímeros provocam a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, e *Candida*. Essa atividade é explicada por seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento.

Para comprovar a atividade antimicrobiana, no primeiro experimento foram produzidos quatro tipos distintos da membrana de quitosana e inoculados os microrganismos na concentração de 10^6 Colônias por poço. Todos os microrganismos cresceram e se multiplicaram formando colônias nas condições testadas.

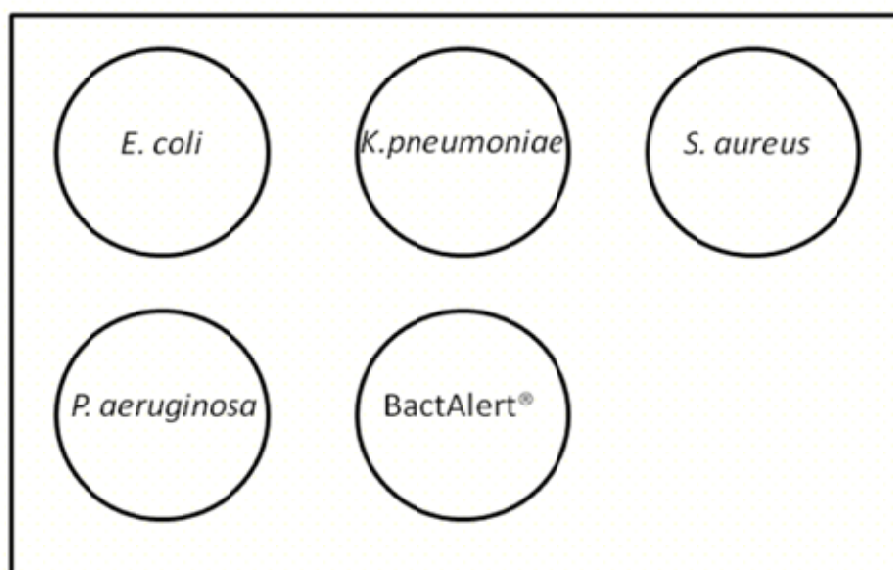


Figure 10- Microorganismos inoculados Teste 1

A hipótese levantada para a inatividade da quitosana pura e dopada frente aos microrganismos foi a de que a concentração de 10^6 colônias foi superior a capacidade da membrana de combatê-los. O mesmo não ocorreu com o teste realizado com o BactAlert, em que não houve crescimento bacteriano a temperatura ambiente.

Para o segundo teste a concentração foi diminuída para 10^5 colônias e restringiu-se o número de microorganismos, selecionando apenas os mais recorrentes nas infecções bacterianas de pele lesada, de acordo com a tabela 7.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana - Teste dois

Tipo de Membrana	Teste em Laboratório	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Membrana 3%	10^6 Colônias	Sem crescimento
Membrana DOP 3%	10^6 Colônias	Sem crescimento
Membrana 4%	Sem Crescimento	Sem crescimento
Membrana DOP 4%	4×10^4 Colônias	Sem crescimento
Membrana 4% / 20g	10^6 Colônias	Sem crescimento
Membrana DOP 4% /20g	10^6 Colônias	Sem crescimento

Observa-se que nesta situação não houve crescimento bacteriano para *P. aeruginosa* em nenhuma das membranas estudadas, mesmo quando a concentração de quitosana foi modificada para 20 g ao invés das 10 g do primeiro teste. Tanto a membrana pura a 4% quanto a membrana dopada a 4% apresentaram maior coeficiente de redução dos microorganismos se comparados as demais formulações apresentadas mesmo que de maneira discreta. Diante dos dados obtidos fica clara a relação diretamente proporcional que há entre a concentração de microorganismos e a de quitosana empregada na atividade antibacteriana. Sua efetividade foi mantida nos testes realizados com o BactAlert em condições de temperatura ambiente.

Conclusões e

Figura: Microorganismo inoculado em meio de cultura pronto para ser plaqueado

Perspectivas

5.0 Conclusões e Perspectivas



Diante dos objetivos propostos para este estudo e da metodologia aplicada, pode-se concluir que é possível formar-se membranas de porosidade muito bem controladas: quanto maior a concentração do meio coagulante (NaOH) e quanto menor a concentração de quitosana na solução a ser coagulada, maior o tamanho dos poros formados. As membranas formadas por secagem total mostraram uma superfície muito plana, conforme mostrada por morfologia. É também possível promover uma reticulação gradual da quitosana controlando-se a concentração de solução diluída de glutaraldeído. Esse tratamento muda as características mecânicas da membrana, que se torna mais quebradiça, e também torna a membrana mais hidrofóbica, fato esse verificado pela diminuição da absorção de água.

Todas as membranas preparadas apresentaram flexibilidade, transparência, boas propriedades adesivas e refrescância ao toque. Atividades antifúngicas e antibacterianas foram confirmadas o que sugere uma influência benéfica na recuperação do tecido lesado.

O estudo com glutaraldeído indicou a necessidade de realizar testes com outros agentes reticulantes com menor risco de toxicidade e que proporcione melhora na plasticidade da membrana. Outras testes são sugeridos em estudos futuros como o da degradação das amostras para tempos superiores a 7 dias, além de quantificar a liberação do plasma e paquetas. Estudar o comportamento de degradação fisiológica de membranas com as composições estudadas em meio de cultura de células e pela ação da lisozima. Realizar testes de citotoxicidade das membranas produzidas bem como testes *in vivo* e *in vitro*.

Referências

Figura: Microorganismo inoculado em meio de cultura pronto para ser plaqueado

Bibliográficas

6.0 Referências



1. BARBIERI, Cristina Marta de Oliveira; COSTA, Paulo Inácio. *Fatores de crescimento derivado das plaquetas humanas (PDGF) – obtenção e perspectiva de aplicação clínica*. In: PONTUAL, Marco Antonio Brandão; MAGINI, Ricardo de Souza. *Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento*. São Paulo: Livraria Santos, 2004.
2. BLANES, L. **Tratamento de feridas**. Cirurgia Vascular: guia ilustrado. São Paulo: Baptista-Silva J.C.C., 2004. Disponível em: <www.bapbaptista.com> Acesso em: 20 de set. 2009.
3. CESARETTI, I.UR. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Ver. Pelle Sana**, v. 2, p. 10-2, 1998.
4. CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. *biomaterial*, v. 12, n. 12, p. 65-70, 1993.
5. CUNHA, N.A. **Sistematização da Assistência de Enfermagem no tratamento de Feridas Crônicas** [monografia online]. Olinda, 2006. Disponível em: <www.abenpe.com.br>. Acesso em: 25 de julho de 2009.
6. COELHO, C. O. M.; REZENDE, M. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Cienc. Rural**, v.29, n.2, p.297-303, 1999.
7. COTRAN, Ramazi; KUMAR, Vinay; COLLINS Tucker. *Robbins/ Patologia estrutural e funcional*. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
8. CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. e QUEIROZ, D.C. **Quitosana – A fibra do futuro**, Padetec, 1999. 124p.
9. FANG, L.; LEU, Y.; WANG, Y.; TSAI, T.; **Eur. J. Pharm. Sci.** 2002, 15, 417.
10. FIELD, C.K.; KERSTEIN, M.D. Overview of wound healing in a moist environment. **Am. J. Surg.**, v. 167, n.1, p.2S-6S, 1994.
11. FRIEDMAN, S. J.; SU, D. Management of leg ulcers with hydrocolloid occlusive dressing. **Arch. Dermatol.**, v. 120, p.1329-1336, 1984.
12. GEESON, J.C. e BERG, R.A. Biochemistry of skin, bone and cartilage. In: GLASGOLD, A.I. e SILVER, F.H. **Applications of biomaterials in facial plastic surgery**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
13. GOMES, M.J.V.M.; RESIS, A.M.M. **Ciências Farmacêuticas: uma abordagem hospitalar**. Cap. 13 e 14. São Paulo: Atheneu, 2001a.

14. GOMES, F. S. L. **Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas:** alteração qualitativa da microbiota. 2001. 142f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001b.
15. GUIMARÃES, GC. Nutrição e Câncer. **Acta oncol. Bras.**; v. 22, n. 1, p. 227-232, 2002. Disponível em <bases.bireme.br/lilacs>. Acesso em 20 de mar. 2007.
16. IRION, G. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e Atlas em cores/Glenn L.Irion; tradução: João Clemente Dantas do Rego Barros. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.390
17. HIRANO, S. **Biotechnology. Annual Research.** 2, 237-258, 1996
18. YONG, L. e KHOR, E. Development of Chitin/Chitosan based wound dressings. Departamento de Farmácia e Química. Universidade de Singapura, 2001. Disponível em <http://www.nusfacultyofscience.htm>. Acesso em julho de 2003.
19. LENHARO, Ariel; COSSO, Fernando; MAGALHÃES, Denildo; MENEZES, Helder Henrique Machado. *Plasma rico em plaquetas*. In: PONTUAL, Marco Antonio Brandão; MAGINI, Ricardo de Souza. *Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento*. São Paulo: Livraria Santos, 2004.
20. LYMAN, D.J. e ROWLAND, S.M. Biomaterials. In: KROSCWITZ, J. I. **Polymers: Biomaterials and Medical Applications**, p.52-71, 1989.
21. MARK, J.E. e CALVERT, P.D. Biomimetic, hybrid and in situ composites. **Materials Science and Engineering: C**, v.1, n.3, p.59-173, 1994.
22. MALETTE, W. Chitosan: a new hemostatic. **Annals of Thoracic Surgery**, v.36, p.55, 1983.
23. MANDELBAUM, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, 2003a. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>> Acesso em: 04 Out 2009.
24. MANDELBAUM, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, 2003b. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>> Acesso em: 17 Agost 2009.
25. MUZZARELLI, R. A. A.; **Chitin Chemistry**, 1st ed., Pergamon Press Ltd: Oxford, 1978.
26. MORYSON M. Leg Ulcers. In: Moryson M. Nursing Management of chronic wounds. Cap. 10, p.177-220. Mosby, London, 2nd edition, 1998.

27. REMINGTON, Joseph P.; Medicação Tópica. In: Remington: A ciência e a prática da farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004. 862-884p.
28. SANTOS Jr., A. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico**. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 150p.
29. TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G.; **Química Nova** 2002, 25, 943.
30. TÖRMÄLÄ, P.; POHJONEN, T. e ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (Part H)**, v.212, p.101-111, 1998.
31. TOWSEND, M. C. – **Sabiston Tratado de Cirurgia: As Bases Biológicas da Prática Cirúrgica Moderna**. 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
32. WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials. **Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**, v.4, 1987.

REFERENCIA RESULTADOS

- SILVER, F.H. Wound dressings and skin replacement. In: **Biomaterials, Medical Devices and Tissue Engineering: an Integrated Approach**. Chapman & Hall, London, p.46-91, 1994.
- WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A. e LIM, L.Y. Chitosan-Alginate PEC Membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v.63, p.610-618, 2002.
- CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N. e ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v.24, p.871-2880, 2003.
- YAMAGUCHI, I.; ITOH, S.; SUZUKI, M.; SAKANE, M.; OSAKA, A. e TANAKA, J. The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. **Biomaterials**, v.24, n.12, p.2031-2036, 2003.
- ZHANG, M.; LI, X.H.; GONG, Y.D.; ZHAO, N.M. e ZHANG, X.F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. **Biomaterials**, v.23, p.2641-2648, 2002.
- HANSEN, B. e JEMEC, G.B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. **Archives of Dermatology**, v.138, n.7, p.909-1011, 2002.
- BARNES, A.; CORKHILL, H.P. e TIGHE, J.B. Synthetic hydrogels: 3-Hydroxyalkyl acrylate and methacrylate copolymers: surface and mechanical properties. **Polymer**, v.29, p.2191-2202, 1988.

3-

Chesnutt B. M., Yuan Y., Brahmandam N., Yang Y., Ong L., Haggard O., Bumgardner D., "Characterization of biomimetic calcium phosphate on phosphorylated chitosan films", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **82-A**, 343–353, (2007)

Rinaudo M., "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603–632,(2006)

Prashanth H., Kittur S., Tharanathan N., "Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions", *Carbohydrate Polymers*, **50**, 27–33, (2002)

5-

Rhoades J. , Rastall B., "Chitosan as an antimicrobial agent, School of Food Biosciences, The University of Reading", *Food Technology International*, ingredients & additives, Disponível em: http://www.fpi-international.com/articles/ingredients_additives/032_FTI007.pdf, Novembro de 2007

2

Peniche C., Argüelles-Monal W., Peniche H., Acosta N., "Chitosan: An attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation", *Macromol. Biosci.*, **3** (10), 511–520, (2003)

VEIGA, G. I. Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a regeneração de lesões de pele. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2008. 70p.