

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE PELE**

Autora: **Paula Rulf Marreco Dallan**

RA: **972375**

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

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

Campinas – São Paulo

Outubro de 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE PELE**

Autora: **Paula Rulf Marreco Dallan**

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

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

Campinas – São Paulo

Outubro de 2005.

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

D161s Dallan, Paula Rulf Marreco
Síntese e caracterização de membranas de quitosana
para aplicação na regeneração de pele / Paula Rulf
Marreco Dallan.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

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

1. Quitosana. 2. Quitina. 3. Glicerina. 4.
Biomaterial. 5. Membranas (Tecnologia). 6.
Queimaduras. I. Moraes, Ângela Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Synthesis and characterization of chitosan membranes for
application in skin regeneration

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Chitin, Glycerin, Biomaterials,
Membranes, Burns

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: César Costapinto Santana, Marisa Masumi Beppu,
Selma Candelária Genari, Sônia Maria Malmonge

Data da defesa: 10/10/2005

Tese de Doutorado defendida por **Paula Rulf Marreco Dallan** e aprovada em **10 de outubro de 2005** pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes (orientadora)
Universidade Estadual de Campinas – DPB/FEQ

Prof^a Dr^a Sônia Maria Malmonge (titular)
Universidade Metodista de Piracicaba - Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo, campus Santa Bárbara D'Oeste

Prof^a Dr^a Selma Candelária Genari (titular)
Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – IB/UNIPINHAL

Prof^a Dr^a Marisa Masumi Beppu (titular)
Universidade Estadual de Campinas – DTF/FEQ

Prof. Dr. César Costapinto Santana (titular)
Universidade Estadual de Campinas – DPB/FEQ

Campinas, 10 de outubro de 2005.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por **Paula Rulf Marreco Dallan** e aprovada pela comissão julgadora em **10 de outubro de 2005**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

Dedico,

*Com amor, ao meu marido Émerson,
pais Marcela e Luiz e
irmãos Alexandre e Carla.*

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Ao meu marido, pela paciência, atenção, dedicação e pelas valiosas sugestões durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e total compreensão.

À Prof^ª Ângela Maria Moraes, pela amizade e orientação incentivadora em todas as etapas deste trabalho.

Ao Sr. Manuel Marcos Cunha Quatter da empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda pela esterilização das membranas de quitosana utilizando-se o óxido de etileno.

Ao Sr. Mário Cabral da empresa Literal Mercantil Ltda pela doação dos curativos Omiderm[®].

Ao Prof. Eduardo José de Arruda do Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco pela parceria na realização dos ensaios utilizando-se membranas de quitosana do tipo porosas.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA/UFSCar), ao Prof. Luis Antônio Pessan e ao aluno de pós-doutorado Marcelo Massayoshi Ueki pelo auxílio na realização dos ensaios mecânicos.

Ao Instituto de Pesquisas e Energia Nuclear (IPEN) e ao Prof. Wagner de Oliveira (DTP/FEQ/UNICAMP) pela esterilização das membranas de quitosana utilizando-se a radiação gama.

Ao Laboratório de Cultura de Células Animais (IB/UNICAMP), à Prof^ª Selma Candelária Genari (IB/UNIPINHAL), à Dr^ª Patrícia da Luz Moreira e ao aluno de doutorado Leandro Petinari (IB/UNICAMP) pela parceria na realização dos ensaios biológicos.

À Dr^ª Rosana Emi Tamagawa do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) pela realização dos ensaios de caracterização das membranas de quitosana por calorimetria diferencial exploratória.

Ao Laboratório de Separações Físicas (LASEFI/FEA/UNICAMP) e ao aluno de doutorado Elias de Souza Monteiro Filho pelo uso do liofilizador.

Às Bancas de Qualificação e de Defesa de Tese, compostas pelos professores César Costapinto Santana, Leila Peres, Marisa Masumi Beppu, Selma Candelária Genari, Sônia Maria Malmonge e Vanessa Petrilli Bavaresco pelas correções e sugestões para a conclusão deste trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP/DTF/FEQ/UNICAMP) e ao técnico Celso Camargo pela realização das análises termogravimétricas das membranas de quitosana.

Ao Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP) e à técnica Kelly Palma pelo auxílio na realização das microscopias eletrônicas de varredura e dos ensaios de difração de raios-X.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA/FEM/UNICAMP) e à técnica Claudenete Leal pela realização dos ensaios de análise dinâmico-mecânica das membranas de quitosana.

À equipe de pesquisadores que trabalham com quitosana: Prof^a Marisa Masumi Beppu e aos alunos de doutorado Marco Torres e Rodrigo Vieira, pelas sugestões.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro na compra de equipamentos e materiais de consumo.

Ao pessoal do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química (DPB/FEQ) e do Laboratório de Cultura de Células Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP: Ana Paula, Cristiane, Érika, Fabiana, Geórgia, Goran, Igor, Isa, Ivanildo, Leandro, Marco, Mariana e Patrícia, que com simples gestos facilitaram o meu cotidiano.

Às minhas grandes amigas Christianne, Gabriela, Janete e Rosana.

Aos demais professores e funcionários da FEQ e amigos da UNICAMP, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu aprendizado e para o bom andamento do trabalho.

"Se você quer ter sucesso na vida,
tem que ter dedicação total, buscar seu último
limite e dar o melhor de si"
(Ayrton Senna)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
NOMENCLATURA	iii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	01
1.1. Justificativa e relevância	01
1.2. Objetivos	04
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1. Queimaduras	07
2.1.1. Fisiopatologia	10
2.1.2. Classificação	11
2.2. Biomateriais	12
2.2.1. Curativos em geral	14
2.2.2. Curativos utilizados em queimaduras	16
2.3. Quitina e seus derivados	21
2.3.1. Propriedades e aplicações da quitosana	23
2.3.2. Uso da quitosana como biomaterial	24
2.4. Métodos para a obtenção de membranas de quitosana	26
2.4.1. Membranas densas	28
2.4.2. Membranas porosas	31
2.5. Métodos para a caracterização de membranas de quitosana	34
2.5.1. Caracterização física, química e mecânica	34
2.5.2. Caracterização biológica	35
2.5.2.1. Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	35

2.6. Esterilização de biomateriais	38
2.6.1. Esterilização a vapor	39
2.6.2. Óxido de etileno	39
2.6.3. Radiação	41
2.7. Esterilização de membranas de quitosana	42
2.8. Considerações finais	45
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1. Material	49
3.1.1. Obtenção das membranas	49
3.1.2. Caracterização das membranas	49
3.2. Métodos	50
3.2.1. Preparo das membranas	50
3.2.2. Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas	52
3.2.3. Avaliação do tempo para a eliminação dos resíduos do processo de esterilização quando utilizado o óxido de etileno como agente esterilizante	53
3.2.4. Determinação do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel	55
3.2.5. Caracterização das membranas e de seus componentes	56
3.2.5.1. Diâmetro das partículas de quitina	56
3.2.5.2. Avaliação da ocorrência de microrganismos contaminantes em membranas não estéreis	58
3.2.5.3. Espessura das membranas	58
3.2.5.4. Grau de hidratação das membranas	58
3.2.5.5. Propriedades mecânicas	59
3.2.5.6. Citotoxicidade indireta	61
3.2.5.7. Citotoxicidade direta, adesão e proliferação celular	62

3.2.5.8. Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas	64
3.2.5.9. Morfologia da superfície das membranas após exposição às células Vero	64
3.2.5.10. Cristalinidade das membranas	65
3.2.5.11. Estabilidade em soluções aquosas	65
3.2.5.12. Degradação enzimática	66
3.2.5.13. Permeabilidade ao vapor d'água	67
3.2.5.14. Permeabilidade ao oxigênio	68
3.2.5.15. Decomposição térmica das membranas	68
3.2.5.16. Técnicas alternativas de detecção de glicerol nas membranas	69
3.2.5.17. Determinação de elementos inorgânicos	69
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Caracterização das matérias-primas	71
4.1.1. Determinação do diâmetro das partículas de quitina	71
4.1.2. Determinação da cristalinidade da quitina e da quitosana	72
4.1.3. Avaliação quanto à presença de elementos inorgânicos na quitina e na quitosana	73
4.1.4. Estudo da estabilidade térmica da quitosana, da quitina e do glicerol por análise termogravimétrica	75
4.2. Ensaio preliminares de determinação das condições experimentais para a obtenção das membranas	78
4.3. Avaliação da ocorrência de microrganismos contaminantes em membranas não estéreis	79
4.4. Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas	80
4.4.1. Efeito da variação da composição na espessura das membranas	81

4.4.2. Avaliação da morfologia das membranas	82
4.4.3. Influência nas propriedades mecânicas das membranas	86
4.4.4. Avaliação da citotoxicidade das membranas	93
4.4.5. Comparação dos resultados obtidos na caracterização das membranas pelos diferentes métodos empregados	96
4.5. Avaliação do tempo para a eliminação dos resíduos do processo de esterilização quando utilizando o óxido de etileno como agente esterilizante	100
4.6. Determinação do efeito da composição nas propriedades das membranas obtidas pelo método sol-gel	101
4.6.1. Custo das membranas	102
4.6.2. Caracterização física das membranas	106
4.6.2.1. Efeito da variação da composição na morfologia das membranas	106
4.6.2.2. Efeito da variação da composição na espessura das membranas	108
4.6.2.3. Efeito da variação da composição no grau de hidratação das membranas	111
4.6.2.4. Efeito da variação da composição na cristalinidade das membranas	115
4.6.3. Caracterização mecânica das membranas	119
4.6.4. Caracterização biológica das membranas	124
4.6.4.1. Efeito da variação da composição das membranas na adesão e na proliferação celular	124
4.6.4.2. Efeito da variação da composição na degradação enzimática das membranas	133
4.6.5. Estabilidade das membranas em soluções aquosas	138
4.7. Avaliação da possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas	140
4.7.1. Análise qualitativa da flexibilidade das membranas	140

4.7.2. Análise de perda de massa	142
4.7.3. Espectroscopia por infravermelho (FTIR)	143
4.7.4. Difração de raios-X	145
4.7.5. Análise térmica	148
4.7.5.1. DMA	148
4.7.5.2. DSC	149
4.7.5.3. TGA	150
4.8. Análise comparativa do desempenho das membranas e seleção da composição com características mais adequadas para a função destinada	156
4.9. Caracterização das membranas quanto à permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio	159
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	165
5.1. Conclusões	165
5.2. Sugestões para próximos trabalhos	166
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
ANEXOS	183

RESUMO

Dallan, P.R.M. – Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

A quitosana é um polissacarídeo atóxico, biocompatível e biodegradável, que possui propriedades antimicrobiana e cicatrizante e, em decorrência destas propriedades, apresenta grande potencial de uso na confecção de biomateriais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a realização de um estudo sistemático quanto à influência da concentração da solução de partida de quitosana no custo e nas características físicas (morfologia, espessura, grau de hidratação e cristalinidade), mecânicas (resistência mecânica e ductilidade) e biológicas (resistência à degradação enzimática, adesão e proliferação celular) de membranas densas de quitosana para uso no tratamento de queimaduras, bem como quanto ao efeito da substituição de parte da quitosana utilizada na formulação dos materiais por quitina e/ou glicerol. A influência da técnica de esterilização nas características das membranas sintetizadas (morfologia, espessura, propriedades mecânicas e citotoxicidade) foi avaliada utilizando-se três diferentes agentes de esterilização (etanol a 70%, óxido de etileno e radiação gama). O óxido de etileno foi aquele que apresentou os resultados mais promissores em termos de manutenção das características iniciais dos biomateriais sintetizados, sendo, portanto, selecionado como o agente de esterilização das membranas de quitosana obtidas ao longo do desenvolvimento deste trabalho. O estudo sistemático das características das membranas densas de quitosana contendo quitina e/ou glicerol em suas composições mostrou que o uso de uma solução de quitosana mais concentrada (2,5% m/m) eleva o custo das membranas, mas, em contrapartida, confere a estes materiais, maior espessura no estado úmido, resistência mecânica e ductilidade além de dificultar a degradação dos mesmos quando em presença da enzima lisozima, característica esta importante quando do uso destes materiais como curativos temporários não biodegradáveis. A substituição de parte da quitosana por quitina permite a obtenção de membranas de menor custo, porém com capacidade de absorção de líquidos e propriedades mecânicas inferiores às observadas para as membranas formadas exclusivamente por quitosana. Tal substituição promove ainda aumento da espessura (seca e úmida) dos materiais bem como redução na cristalinidade dos mesmos, além de torná-los mais susceptíveis à ação da lisozima. Assim como quando da substituição por quitina, o uso do glicerol reduz o custo das membranas bem como a espessura úmida, a cristalinidade e o tempo de degradação das mesmas quando em presença da lisozima. Nenhuma das composições sintetizadas mostrou-se favorável à adesão de células Vero em suas superfícies. A análise global dos resultados indicou que a maioria das composições apresentou características adequadas para utilização como curativos temporários não biodegradáveis sendo as membranas compostas somente por quitosana e obtidas a partir de uma solução a 2,5%, aquelas que mostraram os resultados mais promissores de uso para esta finalidade. Ensaio complementares de determinação da permeabilidade destes materiais ao vapor d'água e ao oxigênio mostraram que os mesmos apresentavam valor adequado quanto à passagem do vapor d'água, porém comportamento aquém do desejado quanto à passagem do oxigênio. Para suprir tal deficiência, membranas de quitosana do tipo densas de menor espessura e membranas do tipo porosas foram sintetizadas, porém, apenas a porosidade apresentou influência na propriedade em estudo.

Palavras-chave: quitosana, quitina, glicerol, biomaterial, membrana, curativo, queimadura.

ABSTRACT

Dallan, P.R.M. – Synthesis and characterization of chitosan membranes for application in skin regeneration. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Chitosan is an atoxic, biocompatible and biodegradable polysaccharide with bacteriostatic and healing properties showing potential use in biomaterial synthesis. In this context, the aim of this work was to study the effects induced by chitosan solution concentration and by chitin and glycerol incorporation in the total raw material cost, physical (morphology, thickness, cristallinity and swelling ratio), mechanical (tensile strength and percentage of strain at break) and biological properties (resistance to enzymatic degradation, cell adhesion and proliferation) of dense chitosan membranes with potential use as burn dressings. The influence of sterilization technique on the chitosan membrane characteristics (morphology, thickness, mechanical properties and cytotoxicity) was evaluated using three different sterilization agents (70% ethanol, ethylene oxide and gamma radiation). According to the results obtained, ethylene oxide was considered the most adequate agent to sterilize chitosan membranes since it kept their starting characteristics having been chosen as the sterilizing agent of the biomaterials obtained in this work. The systematic study concerning the effects induced by chitosan solution concentration and by chitin and glycerol incorporation on dense chitosan membranes showed that the use of the most concentrated chitosan solution (2.5% w/w) increases the biomaterials cost but improves the membranes wet thickness, mechanical resistance and ductility, and reduces the degradation degree of the materials after two months of exposure to lysozyme, an important characteristic for biomaterials used as temporary non-biodegradable burn dressings. Chitin incorporation reduces the membranes cost but decreases their swelling ratio and mechanical properties if compared to the membranes composed exclusively by chitosan. Such incorporation also promotes an increase in membranes thickness (dry and wet), reduction in their cristallinity as well as an increase in the materials degradability after exposure to lysozyme. Glycerol incorporation reduces the membranes cost, wet thickness and cristallinity and increases the membranes degradability after exposure to lysozyme. Strong cell adhesion was not observed in any of the tested membrane formulations. The overall results indicate that the majority of the prepared membranes meet the performance requirements of temporary non-biodegradable burn dressings and the membranes composed exclusively by chitosan obtained using the most concentrated chitosan solution showed the most appropriated results for this application. Despite showing adequate characteristics concerning the water vapor permeability, this formulation did not present high enough oxygen permeability. To overcome this drawback, dense chitosan membranes with lower thickness and porous chitosan membranes were produced but only the porosity has effectively shown influence in this property.

Key words: chitosan, chitin, glycerol, biomaterial, membrane, dressing, burn.

NOMENCLATURA

Abreviaturas

DMA = análise dinâmico-mecânica

DMSO = dimetil sulfóxido

DSC = calorimetria diferencial exploratória

DTGA = derivada da análise termogravimétrica

EDX = espectrometria por dispersão de energia de raios-X

ETCH = etilenocloridrina

ETG = etilenoglicol

EtO = óxido de etileno

FTIR-ATR = infravermelho por transformada de Fourier acoplada a reflectância total atenuada

GM-CSF = glicoproteína de massa molecular entre 4,5 e 19,5 kDa

HEPES = N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo

PBS = tampão fosfato salino

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

PEG = polietilenoglicol

SFB = soro fetal bovino

TGA = análise termogravimétrica

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor d'água

T_g = temperatura de transição vítrea

T_m = temperatura de fusão cristalina

TPO_2 = taxa de permeabilidade ao oxigênio

Siglas

ASTM = *American Society for Testing and Materials*

EPA = *Environmental Protection Agency*

FDA = *Food and Drug Administration*

ISO = *International Standardization Organization*

OSHA = *Occupational Safety and Health Association*

SAL = *Sterility Assurance Level*

SIH/SUS = Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa e relevância

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 e Berg, 1991). Dentre as causas mais comuns de lesões cutâneas, encontram-se as queimaduras (Yong e Khor, 2001).

Nos últimos anos, o estudo de lesões cutâneas causadas por queimaduras tem sido intensificado, principalmente porque as mesmas ocupam o terceiro lugar entre os acidentes que mais ocorrem no mundo (Rossi e col., 2003) e por se tratar de uma doença debilitante, que traz consigo conseqüências devastadoras à vítima e sua família.

No Brasil, dentre as diversas causas de agravo à saúde da população, os acidentes envolvendo queimados assumem um relevante perfil, entretanto, as estatísticas publicadas são escassas e desatualizadas. De acordo com os dados do Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS), disponibilizados pela Secretaria de Saúde de São Paulo, as queimaduras, somente no Estado de São Paulo, representaram 1,4% dos casos de internações ocorridos em 2003, constituindo um gasto de aproximadamente R\$ 2,2 milhões, ou seja, 2% dos custos do Estado de São Paulo com acidentes de causas externas (Gawryszewski, 2004). No Brasil, segundo os dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (2000), o Sistema Único de Saúde gasta anualmente, cerca de R\$ 55 milhões com o tratamento de queimados. Em 1998 e 1999, foram

atendidos pelo SUS aproximadamente 28.000 pacientes queimados, o que corresponde ao atendimento de mais de 2.300 pacientes ao mês, computados apenas aqueles que procuraram o sistema público de saúde. Estes dados permitem inferir que o número total de queimados é, possivelmente, maior do que mostra esta já elevada cifra oficial (Justificativa do projeto de lei do senado nº 354, 1999).

Especificamente para o caso do tratamento de queimaduras, existem atualmente no mercado cerca de 120 tipos de produtos constituídos de diversos materiais, dentre os quais se encontram os curativos Bioclusive® e Silicone n-a® (Johnson & Johnson), Geliperm® sheet (Geitlich Ltd.), Granuflex® (ConvaTec Ltd.), Jelonet® e Opsite flexigrid® (Smith & Nephew Medical Ltd.), Paratulle® (Seton Healthcare Group plc), Spenco 2ndin® (Spenco Medical (UK) Ltd.), Tegaderm® e Tegapore® (3M Health Care Ltd.), Vigilon® (Bard), Omiderm® (Omiderm Ltd.), além de uma linha de produtos produzidos pela Hyperion Medical (hidrogéis, hidrocolóides, filmes, etc), dentre outros. Deve-se salientar que todos os produtos anteriormente citados são importados. Em 2003, um biomaterial do tipo hidrogel reforçado com fibras de polipropileno para uso em queimaduras foi desenvolvido no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil) e no Instituto de Pesquisas e Energia Nuclear (IPEN, São Paulo, SP, Brasil) pelo Prof. Luiz Henrique Catalani e sua equipe (Vasconcelos, 2003). Tal curativo está em fase final de aprovação (ensaios *in vivo*) e ainda não se encontra disponível para comercialização. Ainda em território nacional, a empresa Bionext Produtos Biotecnológicos (São Paulo, SP), em parceria com pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus em Araraquara, SP) e do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP, campus em São Carlos, SP), desenvolveu um curativo de celulose produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum* para o tratamento de queimaduras (Ereno, 2004). Este curativo, durante algum tempo chegou a ser comercializado em hospitais, entretanto, por motivos comerciais estratégicos da empresa não divulgados à imprensa, teve sua distribuição interrompida.

Apesar da diversidade de materiais destinados ao tratamento de queimaduras disponíveis no mercado, normalmente o custo do tratamento é bastante elevado, principalmente devido ao custo dos curativos e à necessidade de sua freqüente troca. Assim, um dos grandes desafios da pesquisa na área de regeneração de pele consiste no desenvolvimento de biomateriais a partir de matérias-primas de baixo custo, fácil acesso e com características adequadas para a função destinada, como a quitosana.

A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina e apresenta reconhecida propriedade antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e cicatrizante (Craveiro e col., 1999). A quitosana é biocompatível e naturalmente degradada no organismo (o monômero e os oligômeros de glucosamina são substâncias que participam de rotas do metabolismo animal), apresentando a propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas (Craveiro e col., 1999).

A quitina e a quitosana vêm despertando grande interesse de cientistas e tecnólogos como materiais poliméricos com aplicações na área biomédica. Estes polissacarídeos, além de apresentarem propriedades biológicas adequadas ainda têm diversas outras características tecnológica e economicamente relevantes, como por exemplo: são resíduos da indústria da pesca produzidos a partir do processamento da carapaça dos crustáceos e apresentam um grande valor comercial devido à sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89%), quando comparada à celulose substituída sinteticamente (1,25%), tornando-as agentes quelantes (Rabea e col., 1993).

No tratamento de ferimentos ou queimaduras, a quitina e a quitosana podem ser empregadas sob a forma de filmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas (Craveiro e Craveiro, 2000). A Chitoderm®, produzida pela Oligopharm Co. Ltd. (Nizhni Novgorod, Rússia), foi a única membrana de quitosana comercialmente disponível encontrada, tendo sido identificada através de anúncios na internet. No Brasil, o curativo HemoBand®, produzido pela Polymar (Fortaleza, CE), apesar de não estar sendo comercializado até o presente momento, foi o único tipo de biomaterial à base de quitosana encontrado, entretanto, sua aplicação não é destinada ao tratamento de queimaduras e sim como agente hemostático. A maioria dos produtos que contêm quitina e/ou seus derivados disponíveis comercialmente é destinada à administração por via oral no auxílio a processos de emagrecimento, o que reforça seu caráter de baixa toxicidade.

Devido à disponibilidade mundial desta matéria-prima, são encontrados na literatura diversos métodos para a extração e a caracterização da quitina, principalmente aquela proveniente da carapaça de crustáceos, além de métodos para a obtenção e a caracterização da quitosana e de membranas à base de quitosana com aplicação em processos de regeneração de pele atuando como pele artificial ou como recobrimento temporário de pele lesada principalmente por queimaduras. Grandes centros internacionais de pesquisa que estudam as aplicações destes polímeros na área

farmacêutica, médica e biotecnológica encontram-se localizados nos Estados Unidos (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts), Canadá (Queen's University, Kingston, Ontário), Europa (Technical University of Lodz, Lodz, Polônia) e Japão (Tottori University, Tottori). Em território nacional, as pesquisas concentram-se nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, em Universidades como a UFC (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE), a UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN), a UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP), a USP (Universidade de São Paulo, campi em São Paulo e São Carlos, SP), a UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, PR), a UFRS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS) e em Centros de Pesquisa como o PADETEC (Parque de Desenvolvimento Tecnológico) da UFC.

Apesar da 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.

Outro importante fator a ser considerado refere-se à influência do método de esterilização nas características do biomaterial, variável esta por vezes sequer mencionada nas publicações. Contudo, a esterilização é parte integrante e fundamental no processo de fabricação de biomateriais e estudos nesta área são de grande relevância.

1.2. Objetivos

O trabalho em questão apresentou os seguintes objetivos:

- Objetivo geral: contribuir para os estudos realizados no ramo de obtenção de membranas com potencial de uso na regeneração de pele lesada principalmente por queimaduras.

- Objetivo específico: estudo sistemático para a determinação da influência da concentração da solução de partida de quitosana nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas bem como do efeito da substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol visando a redução de custo dos biomateriais sem, entretanto, prejudicar suas características.
- Objetivo secundário: análise quanto à influência de diferentes agentes de esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas constituídas fundamentalmente por quitosana. Para este estudo foram selecionados como agentes de esterilização o óxido de etileno, a radiação gama e uma solução aquosa de álcool etílico a 70%.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

O projeto de tese intitulado “Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele” envolve o conhecimento de princípios da engenharia e das ciências da vida. Assim sendo, para sua melhor compreensão, fez-se necessária a realização de uma detalhada revisão da literatura sobre alguns itens considerados de fundamental importância, os quais se encontram descritos a seguir.

2.1. Queimaduras

A pele é a barreira natural de proteção do corpo humano contra microrganismos, agentes físicos e químicos. Além disso, corresponde a 16% do peso corpóreo, exercendo diversas funções, como por exemplo: regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo e de funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato).

A pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme e por uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme, conforme detalhadamente descrito por Junqueira e Carneiro (1999) e ilustrado na Figura 2.1. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que, embora possua a mesma origem da derme, não faz parte da pele, servindo-lhe apenas de suporte e união com os órgãos subjacentes. Na pele ainda podem ser visualizadas diversas estruturas anexas como os pêlos, as unhas e as glândulas sudoríparas e sebáceas.

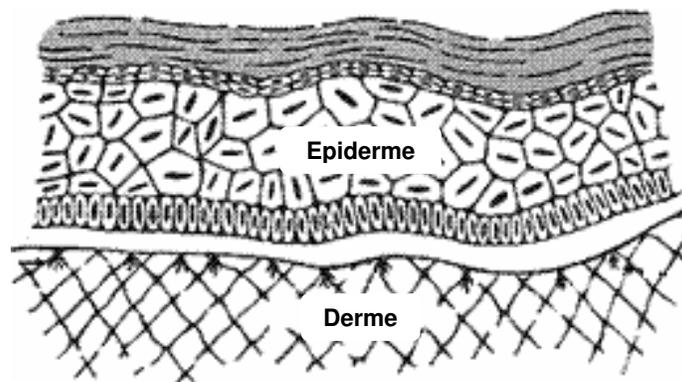


Figura 2.1 – Estrutura da pele (Figura adaptada de *Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association of America*).

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso, de origem ectodérmica. Sua espessura varia entre 0,07 e 0,12 mm na maior parte do corpo, podendo atingir 0,8 mm na palma das mãos e 1,4 mm na planta dos pés. É resistente, quando bem hidratada assegura uma proteção eficaz contra as substâncias externas que representam um perigo para o organismo e participa da oxigenação das células até as camadas mais profundas. Além dos queratinócitos, encontram-se também na epiderme os melanócitos, que produzem o pigmento que dá cor à pele (melanina), as células de defesa imunológica (células de Langerhans) e as mecano-receptoras (células de Merkel).

De uma maneira geral, pode-se dizer que a epiderme está dividida em cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal é constituída por células prismáticas ou cubóides, as quais repousam sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. Apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. A camada espinhosa é constituída por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central com pequenas expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas partindo de cada uma das células adjacentes. Estas expansões citoplasmáticas se aproximam e se mantêm unidas através dos desmossomos, conferindo à célula um aspecto espinhoso. Deve-se ressaltar que, tanto as tonofibrilas quanto os desmossomos apresentam importante função na manutenção da coesão das células da epiderme, conferindo a mesma, resistência ao atrito. A camada granulosa é caracterizada pela presença de células poligonais achatadas

com núcleo central e citoplasma contendo grânulos grosseiros e basófilos. São os grânulos de querato-hialina, os quais não são envolvidos por membrana, que irão contribuir para a formação do material citoplasmático inter-filamentoso da camada córnea. Além destes grânulos, as células da camada granulosa produzem grânulos envolvidos por membrana, de substância fosfolipídica associada à glicosaminoglicanas. Estes grânulos são expulsos das células e contribuem para a formação do material extracelular, que é importante para tornar a camada granulosa impermeável à água e a outras moléculas. As células da camada granulosa, e também as da parte mais superficial da camada espinhosa, apresentam uma camada protéica, a qual confere grande resistência à membrana celular. A camada lúcida é constituída por células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e assim, desapareceram. A camada córnea, que apresenta espessura variável, é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma destas células encontra-se repleto de uma escleroproteína filamentosa e birrefringente, a queratina, rica em ligações dissulfeto.

Deve-se ressaltar que, a descrição feita acima corresponde à epiderme na sua maior complexidade, a qual pode ser encontrada na planta dos pés e na palma das mãos. Nas demais regiões do corpo, a epiderme é mais fina e mais simples, faltando-lhe freqüentemente, as camadas granulosa e lúcida, além de apresentar uma camada córnea muito reduzida.

A derme é o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme, sendo, portanto, considerada a base da pele. Leve e extensível, assegura a função de suporte e de proteção dos órgãos. Sua superfície externa é irregular, podendo-se observar saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. A essas saliências dá-se o nome de papilas dérmicas. Sua espessura varia entre um e dois milímetros podendo-se alcançar valores próximos a três milímetros na planta dos pés. Está comumente dividida em duas camadas de limites pouco distintos: a papilar, delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo e a reticular, mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele. Além dos vasos sangüíneos e linfáticos, e dos nervos, também são encontradas na derme as seguintes estruturas derivadas da epiderme: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas, além das unhas.

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo, que une, de maneira pouco firme, a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da

pele sobre as estruturas na qual se apóia. Dependendo da região em estudo e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida, constitui o pânículo adiposo. Assim sendo, é a responsável pelo depósito de reserva energética. Tem como função amortecer choques mecânicos, funcionar como isolante térmico e modelar a superfície corpórea que define os padrões femininos e masculinos. Sua espessura varia entre dez e trinta milímetros.

A queimadura é uma doença que se caracteriza por uma lesão na pele ou nos tecidos mais profundos, podendo ser causada por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. Sua manifestação varia desde uma pequena bolha até formas mais graves capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à gravidade e extensão da lesão. Pode ser classificada de acordo com o agente causal, a profundidade ou a extensão. Esta doença deve ser considerada um grande problema não somente pela gravidade de suas lesões agudas como também em relação às importantes seqüelas que poderão marcar para sempre a vida dos pacientes queimados. Estimativas não oficiais indicam que no ano de 2000 ocorreram, aproximadamente, um milhão de acidentes com queimaduras no Brasil, sendo que destes, apenas 10% dos acidentados procuraram auxílio médico e 2,5% faleceram (Fonte: <http://www.medstudents.htmT>, 2001). Mesmo causando impacto à sociedade, ainda hoje são poucos os centros dedicados ao tratamento de queimados no Brasil.

Deve-se ressaltar que as estatísticas de incidência de queimaduras são muito dispersas e não comparáveis entre países e até mesmo, dentro de um mesmo país, de serviço para serviço, dependendo do tipo de população estudada. Entretanto, os dados sobre as queimaduras podem ser úteis para a determinação da extensão do problema na população, dos tipos mais comuns de agentes causadores de queimaduras, na avaliação da eficiência do cuidado médico para pacientes queimados, na identificação dos fatores de risco que predispõem a ocorrência do acidente, na avaliação dos programas de prevenção e no exame do impacto do trauma por queimadura na economia do país (Mcloughlin, 1995).

2.1.1. Fisiopatologia

As queimaduras podem ser descritas como um grave estresse oxidativo produzido por uma combinação de isquemia e reperfusão, acompanhadas de reações

inflamatórias que irão afetar os diversos mecanismos de defesa do organismo (Burri, 1978).

Logo após a lesão, uma grande quantidade do líquido extracelular é seqüestrada para a área lesada, podendo este desvio de líquido causar falência dos órgãos e dos tecidos restantes do corpo. Tal fato resulta do aumento da permeabilidade vascular, da oclusão de pequenos vasos, do edema das células afetadas e do acúmulo de sal e água. O quadro de isquemia pode ser corrigido através de reperfusão, entretanto, ao se resolver o problema da isquemia, cria-se um novo, a formação de radicais livres decorrente da reação do ADP com o íon férrico. Desta reação resulta o íon superóxido, que realiza a peroxidação lipídica, liberando prostaglandinas e ativando enzimas que irão produzir mais radicais livres.

Como se pode notar, as queimaduras são causadoras de estresse para o organismo, iniciando com uma isquemia que induz a liberação de substâncias como catecolaminas, histamina, glucagon e cortisol, criando-se assim, dois quadros, um de hipovolemia e outro, de hipermetabolismo.

2.1.2. Classificação

A classificação das queimaduras pelo grau refere-se à sua profundidade. Neste caso, elas podem ser agrupadas em quatro categorias: de primeiro, segundo, terceiro e quarto grau.

As queimaduras de primeiro grau atingem a camada superficial da pele, a epiderme, sem causar alterações hemodinâmicas. Clinicamente, a lesão se apresenta hiperemiada e dolorosa. Já as queimaduras de segundo grau atingem tanto a epiderme quanto a derme apresentando, clinicamente, alterações hemodinâmicas e bolhas ou flictenas. As queimaduras de terceiro grau são de alta gravidade, principalmente quando acometem uma grande área da superfície corpórea. Elas atingem a totalidade das camadas da pele, além de poderem se estender para os tecidos subjacentes, como os tecidos ósseo, subcutâneo e muscular. Clinicamente, a lesão se apresenta com aspecto marmóreo, indicando redução da elasticidade na área lesada. Além disso, é potencialmente deformante e capaz de causar choque hipovolêmico. As queimaduras de quarto grau referem-se à carbonização.

A classificação das queimaduras quanto à sua profundidade pode ser realizada mediante a análise de alguns fatores como, por exemplo: doenças sistêmicas subjacentes, agente causal, traumas associados, idade, lesão das vias aéreas, profundidade e extensão da área queimada. Assim sendo, as queimaduras podem ser classificadas de acordo com sua gravidade em leves, moderadas e graves (Burri, 1978), conforme discutido a seguir.

As queimaduras leves englobam as de primeiro grau de qualquer extensão, as de segundo grau que acometem menos de 10% da superfície corpórea e as de terceiro grau que acometem menos de 2% da superfície corpórea. Para este tipo de queimadura, não há indicação de internação. As queimaduras moderadas englobam as de segundo grau que acometem entre 10 e 20% da superfície corpórea e as de terceiro grau que acometem de 3 a 10% da superfície corpórea. Nestes casos, a internação só é indicada quando o paciente: possui idade inferior a dois anos, foi atingido por queimaduras especiais (elétrica ou química), possui situação sócio-econômica desfavorável, possui uma doença sistêmica subjacente, está impossibilitado de receber reidratação por via oral ou quando as queimaduras encontram-se localizadas na face e/ou genitália. Já as queimaduras graves englobam as de segundo grau que acometem mais de 20% da superfície corpórea, ou então as de terceiro grau que abrangem mais de 10% da superfície corpórea. Nestes casos, a internação é sempre recomendada.

2.2. Biomateriais

Biomateriais são dispositivos que, de modo contínuo ou intermitente entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo quando localizados fora do corpo (Lyman e Rowland, 1989). Tais materiais são projetados para reparar e/ou reconstituir partes ou funções do corpo humano, desempenhando funções em contato com tecidos vivos.

Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética, sendo esta última classe constituída por metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos (Mark e Calvert, 1994). Dentre os naturais destacam-se o colágeno purificado, as fibras protéicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados.

Os biomateriais podem ainda ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários (Törmälä e col., 1998). 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 (Törmälä e col., 1998). Estes tipos de dispositivos são comumente utilizados como próteses para a substituição de articulações, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares, dentre outros. Por outro lado, existem tecidos que necessitam de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Nestas situações, uma alternativa refere-se à utilização de biomateriais temporários. Os materiais bioabsorvíveis são aqueles degradados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sendo, portanto, utilizados como dispositivos temporários (Törmälä e col., 1998).

Como se pode notar, a ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar. Seu objetivo geral não engloba apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor. Tal fato tem levado diferentes pesquisadores, dentre eles médicos, engenheiros, químicos e biólogos, à criação e ao aperfeiçoamento de dispositivos que sejam simultaneamente biocompatíveis e funcionais (Santos Jr., 2001). Neste contexto, deve-se ressaltar que o conceito biocompatibilidade se resume na habilidade de um material em induzir no paciente uma resposta adequada a uma aplicação específica (Williams, 1987).

Na área de regeneração de pele, o perfil científico e tecnológico não é diferente. Diversas pesquisas têm sido realizadas nos últimos 20 anos visando à obtenção de biomateriais que melhorem tanto a quantidade como a qualidade de vida dos pacientes. Neste caso, os biomateriais sintetizados geralmente se apresentam em quatro diferentes formas: filmes, espumas, géis ou compósitos (Craveiro e Craveiro, 2000) e devem apresentar como características fundamentais: leveza, ausência de odor, impermeabilidade a microrganismos, permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, biodegradabilidade, propriedades mecânicas e biológicas adequadas além de facilidade no processamento. Como exemplo, pode-se citar o curativo Omiderm®, um copolímero de poliuretano enxertado com acrilamida e metacrilato de hidroximetila, produzido pela Omiderm Ltd. e distribuído pela ITG Medev Inc. Dentre suas principais características pode-se ressaltar a transparência, o ajuste à região lesada (curativo aderente, porém sem ser adesivo), a flexibilidade, a resistência mecânica, a durabilidade, a permeabilidade ao vapor d'água, ao oxigênio e aos medicamentos, a impermeabilidade aos microrganismos além de sua pequena espessura.

2.2.1. Curativos em geral

O tratamento de um ferimento e assepsia cuidadosa têm como principais objetivos a prevenção e/ou redução dos riscos de infecções, a eliminação de fatores desfavoráveis que possam retardar o processo de cicatrização, bem como a diminuição da probabilidade da ocorrência de infecções cruzadas pelo uso de técnicas e procedimentos corretos.

Os curativos atualmente disponíveis no mercado podem ser classificados como: convencionais, hidrogéis, hidrocolóides, polímeros, bioativos, enzimas proteolíticas, curativos anti-odor e filmes adesivos, conforme detalhadamente discutido por Candido (2001) e apresentado a seguir.

Os curativos convencionais são aqueles que utilizam compressas de gazes. São os de emprego mais amplo e têm como princípio a limpeza mecânica diária da lesão, propiciando assim uma menor concentração bacteriana local e, conseqüente manutenção da cicatrização. Devido à alta adesividade da compressa de gaze ao tecido de granulação e, conseqüente trauma do mesmo quando da troca do curativo, é recomendado o uso de algum produto para que haja a redução da aderência deste material ao ferimento. As gazes tecidas de algodão têm uma boa absorção e podem ser embebidas em agentes como vaselina e antibióticos tópicos. Diversas preparações já vêm impregnadas, como o Jelonet® e o Adaptic®. Já as gazes prensadas são formadas com a compactação de uma mistura de dois ou mais componentes como o algodão, o rayon e o poliéster. Apresentam a desvantagem de não se coaptarem perfeitamente ao ferimento devido à sua pouca maleabilidade, entretanto, promovem melhor absorção e menor aderência. As gazes são mais indicadas quando a quantidade de secreção na lesão é pequena.

Os hidrogéis são curativos desenvolvidos para os ferimentos com crostas secas, sendo constituídos por polímeros hidrofílicos (preparados com gelatina, polissacarídeos, poliacrilamidas ou glicerina) que retêm grande quantidade de água em suas estruturas. São insolúveis em água e absorvem a secreção da região lesada promovendo assim, a redução da viscosidade do gel que, conseqüentemente, se torna líquido e libera água na superfície do ferimento. Estes curativos retêm a secreção da região lesada ao mesmo tempo em que a mantêm hidratada. A vantagem de sua utilização deve-se à hidratação que proporciona e à sensação refrescante que causa, uma vez que ocorre redução da dor inerente aos ferimentos secos (muito provavelmente pela prevenção da exposição dos terminais nervosos ao ambiente). São contra-indicados para os ferimentos com moderada

ou grande quantidade de secreção. Podem ser apresentados na forma de gel, gazes impregnadas com gel ou folhas de gel, estando dentre os mais utilizados o Intrasite® e o NuGel®.

Os hidrocolóides são curativos compostos por gelatina, partículas de carboximetilcelulose suspensas em poli-isobutileno e pectina, sendo cobertos por uma espuma ou filme de poliuretano. Apresentam absorção para médias quantidades de secreção, são impermeáveis às bactérias externas e podem ser utilizados em conjunto com compressão elástica nas úlceras venosas. Entretanto, este tipo de curativo pode ocasionar a maceração do tecido ao redor da lesão, devido ao acúmulo de secreção durante os dias entre as trocas, podendo levar ao aparecimento de um tecido de granulação exuberante.

Os polímeros de poliuretano são produzidos na forma de espumas, apresentando, portanto, alto poder de absorção. São indicados para as lesões com muita secreção. Apresentam expansão conforme absorvem a secreção e acabam por se coaptarem à superfície da lesão, promovendo um micro-ambiente semelhante ao dos curativos hidrocolóides. Muitos destes curativos vêm com uma camada de filme polimérico, que deve ser posicionado voltado para o meio externo, uma vez que permitirá o escape de vapor d'água e bloqueará a entrada de bactérias. Sua alta capacidade de absorção propicia, nos ferimentos com alto fluxo, umidade controlada, evitando a maceração do tecido ao redor da lesão. Pode ser utilizado em combinação com outros filmes adesivos, como por exemplo, o Alevyn®.

Com o desenvolvimento da becaplermina (Regranex®), que é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), foi estabelecida a categoria dos curativos bioativos, isto é, curativos ou substâncias que interagem diretamente com as fases da cicatrização para promover a aceleração da mesma. Devem ser indicados somente em situações especiais e têm seu alto custo como maior limitação para o uso. A utilização da becaplermina é indicada nos casos em que comprovadamente existe deficiência da ação dos fatores de crescimento, como por exemplo, nas úlceras neuropáticas crônicas de pacientes diabéticos.

As enzimas proteolíticas mais utilizadas são: fibrinolisinase, colagenase, desoxiribonuclease e papaína. Analisando a fisiologia da cicatrização, diversos pesquisadores identificaram a existência de atividade proteolítica na lesão, uma vez que a degradação da matriz extracelular é parte essencial e auto-limitada durante o processo de

cicatrização. Por outro lado, também identificaram a presença de atividade proteolítica nos ferimentos crônicos como uma das causas para a persistência da lesão.

Os curativos antiodor foram desenvolvidos com o intuito de amenizar o odor que alguns ferimentos produzem e que, por vezes, chegam a perturbar o paciente mais do que a própria lesão. São constituídos por duas camadas absorvíveis: uma interna de carvão ativado, com inclusão ou não de prata (como agente bactericida) e uma externa semipermeável (nylon, curativo em filme ou espuma de polímeros). Secreções, bactérias e gases são absorvidos e neutralizados pelo curativo. Após o curativo estar completamente úmido, ele perde a sua função redutora de odor. Os mais comumente utilizados são o Actisorb® e o CarboFlex®.

Os filmes adesivos foram desenvolvidos com a utilização de polímeros (poliuretano e polietileno), os quais formam uma membrana, conjuntamente com uma camada de adesivo acrílico. Possuem algumas características da epiderme, isto é, permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, alta propriedade elástica e de extensão (resistência às forças tensionais da pele) e impermeabilidade às bactérias. São usados comumente como curativos primários sobre cateteres de acesso venoso e queimaduras superficiais, mas também podem ser utilizados como curativos secundários sobre outros materiais (polímeros na forma de espumas, pastas e alginatos). São transparentes, com boa coaptação, entretanto, contra-indicados para lesões com muita secreção. Alguns exemplos são o Op-Site®, o Tegaderm® e o Bioclusive®.

A Tabela 2.1 ilustra alguns dos diferentes tipos de curativos disponíveis no mercado e suas aplicações, as quais são detalhadamente discutidas pelo Grupo de Estudos de Feridas (1999).

2.2.2. Curativos utilizados em queimaduras

O tratamento de queimaduras pode ser realizado de diversas formas, variando de caso para caso, conforme as necessidades, as possibilidades e a experiência da equipe médica responsável. Pode-se dizer que o melhor tratamento é aquele de que se dispõe no momento e que se crê ser o justo, procurando facilitar a epitelização tecidual (Candido, 2001).

Tabela 2.1 – Diferentes tipos de curativos disponíveis no mercado e suas aplicações.

TIPO DE LESÃO	TIPO DE CURATIVO	EXEMPLOS
Infectada	Convencional, gazes com anti-sépticos, anti-bioticoterapia específica	Gazes de algodão, Bactigras® e Inadine®
Tecido necrótico com placas de fibrina	Convencional, enzimas proteolíticas, soluções hipertônicas	Gazes, colagenase, papaína, açúcar, Dersani®, soluções salinas hipertônicas e Aquacel®
Lesão seca e dolorosa	Hidrogel	Intrasite gel® e Gelduoderm gel®
Boa granulação e pouca secreção	Hidrocolóide	Duoderm® e Comfeel®
Boa granulação e muita secreção	Alginatos, espumas de poliuretano	Kaltostat®, Allevyn® e Combiderm®
Odor fétido	Curativos com carvão e prata	Actisorb®, Carbonet® e Carboflex®
Úlceras neuropáticas superficiais	Fator de crescimento tópico	Regranex®
Úlceras crônicas de difícil cicatrização	Equivalente de pele humana	Apligraf® e Dermagraft®
Úlceras de estase	Curativos compressivos	Elásticos: atadura elástica Inelásticos: bota Deunna®, Flexidress®, Profore®, Viscopaste® e Theraboot®

Como se pode notar, a abordagem interdisciplinar é de fundamental importância para que haja o êxito do procedimento. Atualmente, os produtos mais comumente utilizados no tratamento de queimaduras são: sulfadiazina de prata associada ou não ao nitrato de cério, hidrocolóides, hidrogéis, ácido linoléico, ácido ricinoléico, *Aloe Vera*, elicina, papaína, albumina, gazes não-aderentes, membranas sintéticas (como por exemplo: Omiderm®, Tegaderm®, Dermafilm®, Opsite®, Praflex®, Granuflex®, Epigard® e Biobrane®) ou biológicas, matriz de regeneração dérmica e alginato, dentre outros.

Os curativos destinados ao uso em queimaduras possuem características particulares. Além do atendimento aos requisitos básicos de um curativo, deve-se ressaltar que a queimadura gera descompensações hídricas através da grande perda de líquido e que o organismo torna-se mais vulnerável aos agentes de agressão ambiental, permitindo assim, o estabelecimento e o crescimento de bactérias patogênicas (Ferreira e Matheus, 1995). Assim, duas características importantes de um curativo utilizado no tratamento de queimaduras referem-se à redução da perda de fluidos corpóreos pelo paciente e ao controle da infecção. Outras características importantes e que devem ser consideradas são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a ausência de antigenicidade (Ratner e col., 1996).

Conceitualmente, estes curativos podem ser classificados como temporários ou permanentes; epidérmicos, dérmicos ou compósitos; biológicos ou sintéticos (Sheridan e Tompkins, 1999). Os componentes biológicos podem ser do tipo xenogênicos, alogênicos ou autogênicos. Em termos práticos, os curativos são classificados em temporários ou permanentes, sendo os do tipo temporários subdivididos em biodegradáveis e não biodegradáveis. Os curativos permanentes são sempre do tipo não biodegradáveis e não serão abordados nesta revisão da literatura, visto que a grande maioria dos curativos atualmente disponíveis é do tipo temporário.

Os curativos temporários do tipo não biodegradáveis podem ser agrupados em duas categorias distintas: aqueles que não permitem o crescimento de células em suas superfícies podendo ser utilizados como recobrimentos (como por exemplo, algumas membranas poliméricas simples) ou aqueles que possuem poros em suas estruturas, permitindo assim, a migração celular. Tal característica permite a adesão do curativo à ferida havendo, portanto, a necessidade de sua retirada por intervenção cirúrgica. Tal procedimento pode ser suprimido caso seja utilizado conjuntamente ao curativo não biodegradável um outro de natureza biodegradável. Neste caso, as células podem aderir à camada biodegradável do curativo, que é absorvida pelo organismo ao longo do processo de cicatrização.

Os curativos temporários do tipo biodegradáveis podem ser classificados como suportes (*scaffolds*) ou como barreiras. No caso dos suportes, os curativos atuam como matrizes para o crescimento de células, sendo degradados (por enzimas ou pelo próprio meio fisiológico) ao longo do processo de cicatrização. Já os curativos do tipo barreira, diferentemente dos suportes, não devem favorecer a adesão de células em suas

superfícies e possuem como principais funções a proteção física e microbiológica do leito do ferimento além do controle da perda de fluidos corpóreos. Assim, para o bom desempenho destes curativos, características adequadas de flexibilidade, resistência mecânica e permeabilidade são fundamentais. Por serem biodegradáveis, estes curativos são degradados e absorvidos pelo organismo ao longo do processo de cicatrização, não sendo necessária a sua retirada.

Deve ser ressaltado que a produção nacional de curativos mais elaborados para a terapia de queimados é pouco significativa, sendo a maior parte dos curativos disponíveis para venda em balcão fabricada na Europa e nos Estados Unidos e comercializada a alto custo, conforme mostrado na Tabela 2.2.

Segundo informações fornecidas por profissionais da área médica que atuam no tratamento de queimados, os biomateriais não são efetivamente utilizados nos hospitais públicos da região de Campinas (SP) devido ao seu alto custo e também por não estarem incluídos nos protocolos padrões de atendimento. Porém, quando utilizados, estes biomateriais apresentam bons resultados na recuperação do paciente.

De acordo com consulta feita em algumas empresas da região de Campinas (SP) que atuam na revenda de curativos, os biomateriais utilizados para a terapia de queimados são mais freqüentemente adquiridos por particulares, destacando-se também que boa parte dos convênios médicos não oferece cobertura para este tipo de despesa. Ressalta-se ainda que, de maneira geral, não há no país uma política efetiva para que estes tipos de curativos sejam incluídos nos procedimentos básicos de atendimento nas unidades de terapia de queimados, uma vez que as indústrias locais não oferecem tais produtos a preços acessíveis.

Dentre os polímeros naturais mais comumente estudados para serem utilizados na obtenção de biomateriais destinados à utilização em processos de regeneração de pele, destaca-se a quitosana. Este polissacarídeo apresenta diversas características de interesse, como ação antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e redutora do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais, como por exemplo, ferimentos ou queimaduras (Craveiro e Craveiro, 2000). Em adição, a quitosana estimula a proliferação celular e a reorganização da arquitetura celular (Yosof e col., 2001; Muzzarelli e col., 1988) além de ser biodegradável (Lee e col., 1995), biocompatível (Rao e Sharma, 1997; Chandy e Sharma, 1990) e

conferir excelente resistência mecânica aos biomateriais produzidos a partir de seu uso (Mima e col., 1983).

Tabela 2.2 – Custo e origem de alguns curativos comumente comercializados para a terapia de queimados (Fontes: <http://www.qualitymedicalsupplies.com>; <http://www.medco-school.com> e <http://www.masune.com>, 2003).

Descrição	Produto	Fabricante	Dimensões	Preço/unidade (US\$)
Filme	Opsite®	Smith & Nephew, USA	5 ½" x 4"	1,67
			5 ½" x 10"	4,28
			11" x 6"	5,67
			11" x 11 ¾"	8,37
	Tegaderm®	3M, USA	4" x 4 ¾"	1,71
			4" x 5 ½"	1,76
			4" x 10"	3,55
			6" x 8"	3,85
	Bioclusive®	Johnson & Johnson, USA	4" x 5"	1,59
			5" x 7"	3,09
			8" x 10"	4,43
	Espuma	Allevyn®	Smith & Nephew, USA	4" x 4"
5" x 5"				13,70
6" x 6"				17,85
Alginato	Kallostat®	Convatec, Inglaterra	3" x 4 ¾"	6,88
			4" x 8"	14,99
			6" x 9 ½"	30,94
Biodegradável	Curativos esteréis	Masune, USA	1" x 36"	6,95
			3" x 36"	7,75
			8" x 36"	11,60
		Medco, USA	1" x 36"	7,30
			3" x 36"	8,15
			8" x 36"	11,80

2.3. Quitina e seus derivados

A quitina, segundo polímero mais abundante na natureza, é um polissacarídeo constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos do tipo β -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose(N-acetilglicosamina) possuindo, assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose. A diferença estrutural entre estas duas fibras se deve aos grupos hidroxila, localizados na posição dois, que são substituídos na quitina por grupos acetamino. Sua principal fonte natural de obtenção é a carapaça de crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris), podendo também ser encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. A quitina apresenta grande variedade de usos, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Entretanto, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, que pode ser utilizada em diversas aplicações.

A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição. Durante o curso da desacetilação alcalina, ligações N-acetil do polímero quitina são rompidas, formando-se a D-glicosamina, que contém um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 50% podem ser considerados como quitosana (Craveiro e col., 1999). As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. Assim sendo, um rígido controle das condições reacionais é essencial em um processo em escala industrial para que se obtenha um polímero de cadeia longa e com grau de desacetilação na faixa desejada. Outra opção de produção industrial de quitosana se faz através da desacetilação microbiológica, utilizando-se enzimas específicas ou microrganismos.

A quitosana é uma das poucas fibras naturais solúveis em meio ácido, como por exemplo, suco de limão, vinagre ou suco gástrico. As estruturas químicas da quitina e da quitosana podem ser comparadas na Figura 2.2.

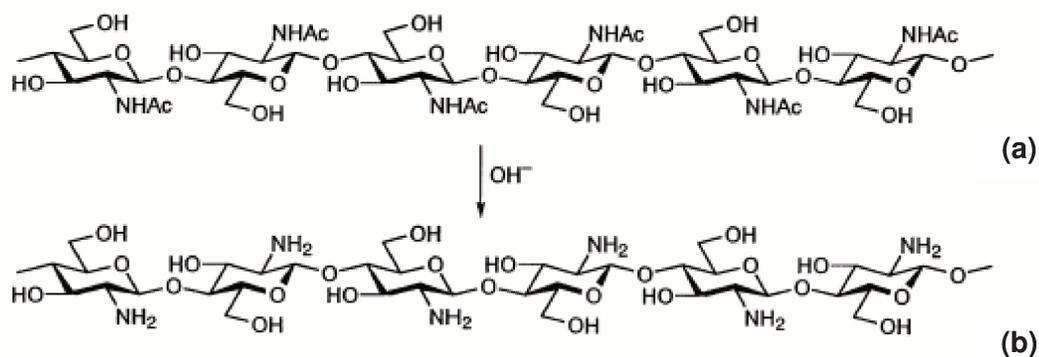


Figura 2.2 – Estruturas químicas dos polissacarídeos quitina (a) e quitosana (b).

A quitina e a quitosana são biologicamente sintetizadas em um total de aproximadamente um bilhão de toneladas anualmente (Craveiro e col., 1999), sendo biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza, através do ciclo da quitina, conforme ilustrado na Figura 2.3.

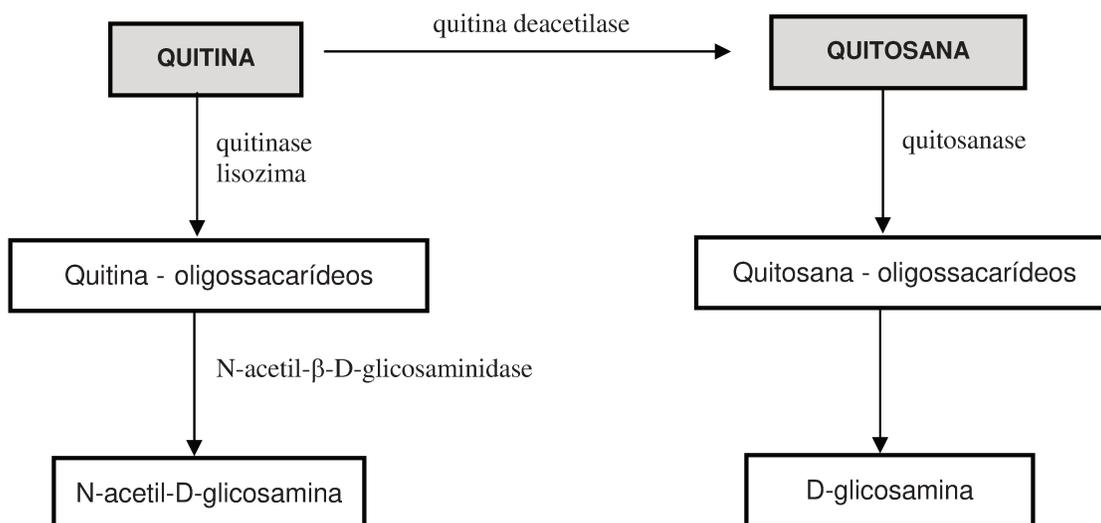


Figura 2.3 – Ciclo da quitina.

As enzimas hidrolíticas envolvidas neste processo (lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase) estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, nas plantas, além de também se encontrarem presentes em microrganismos do solo.

2.3.1. Propriedades e aplicações da quitosana

A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução é menor do que seis. Alguns ácidos inorgânicos e diluídos, tais como o nítrico, perclórico ou fosfórico, podem ser utilizados no preparo de soluções de quitosana, entretanto, a solução deve ser mantida sob agitação e aquecimento durante um longo período para que ocorra a completa dissolução do polissacarídeo.

Outro importante parâmetro a ser ressaltado refere-se à carga da quitosana em meio ácido. Este polímero se comporta como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga (uma carga positiva por unidade de glicosamina). Uma vez que biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, dentre outras, podem apresentar cargas negativas em suas superfícies, freqüentemente verifica-se apreciável interação destas com a quitosana, o que justifica sua atividade sobre elas.

A quitosana é um excelente floculante devido à presença do grande número de grupos amino (NH_3^+) em sua estrutura, os quais podem interagir com colóides carregados negativamente. Como exemplo, tem-se a facilidade de aderência da quitosana em polímeros naturais como o cabelo e a pele, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas. Outra importante propriedade da quitosana refere-se à sua capacidade de complexação com diversos íons metálicos, sendo, deste modo, útil na quelação do ferro, cobre e magnésio. Tal fato possibilita sua utilização em processos de remoção de íons de metais pesados tóxicos, tais como prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo que se encontrem em níveis acima dos limites de tolerância e/ou permitidos.

As aplicações e a produção industrial da quitosana experimentaram um elevado crescimento a partir da década de 70. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37% ao ano entre 1978 e 1983 (Craveiro e col., 1999). Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centralizadas na purificação da água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos. A tendência atual para aplicações industriais concentra-se em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos. Recentemente, foi relatado o grande potencial da quitosana na área de biotecnologia, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização

de células em meios de cultura. Um resumo das principais aplicações da quitosana na área industrial, nutricional e de saúde pode ser visualizado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Principais aplicações da quitosana.

Área industrial	Áreas de saúde e nutricional
Purificação de água residual de indústrias	Agente absorvedor de gorduras
Estabilizante de gorduras em preparações alimentícias	Redução de colesterol LDL
Estabilizante de aromas	Regeneração de pele
Meio de troca iônica	Antiácido
Aditivo de cosméticos e xampus	Auxiliar no controle na pressão arterial
Absorvente na remoção de metais pesados	Regenerador de estrutura óssea
Proteção bactericida de sementes	Redução do nível de ácido úrico
Estabilizante de frutas e verduras perecíveis	Promoção da perda de peso
Agente para a imobilização de microrganismos	Auxiliar do colesterol HDL
	Bactericida/antiviral
	Inibidor da formação de placas dentárias
	Auxiliar na absorção de cálcio
	Membrana artificial

2.3.2. Uso da quitosana como biomaterial

Sabendo-se que membranas à base de quitosana para serem utilizadas em processos de regeneração de pele são os objetos de estudo do presente trabalho, nos próximos itens são abordadas algumas das atuais aplicações da quitosana como biomaterial, destacando-se nestes casos, sua aplicação na manufatura de lentes de contato, como membranas artificiais, no tratamento de lesões de pele, como agente hemostático, bactericida, fungicida e cicatrizante.

Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizante e antimicrobiana, são totalmente absorvíveis pelo organismo. Tais propriedades,

associadas à excelente capacidade de formação de filmes, incentivaram pesquisadores (Markey e col., 1978 APUD Craveiro e col., 1999) a escolherem a quitosana como substrato para o desenvolvimento de lentes de contato, utilizando-a como película ocular protetora na recuperação de tecidos submetidos a cirurgias intra-oculares ou em casos de comprometimento crônico da córnea.

Em razão da capacidade da quitosana em formar filmes e membranas em soluções ácidas diluídas, diversas aplicações que exploram esta propriedade vêm sendo estudadas. A simples evaporação do solvente de uma solução de quitosana espalhada sobre uma placa de vidro é considerada como sendo a técnica mais simples para o preparo de filmes de quitosana, produzindo, geralmente, filmes flexíveis e resistentes. Um exemplo específico desta aplicação reside na obtenção de membranas para uso como rins artificiais, as quais apresentaram alta resistência mecânica aliada à alta permeabilidade à uréia e à creatina. Sendo impermeáveis às proteínas séricas, apresentam a vantagem única de evitar a liberação de metais tóxicos na corrente sanguínea, ao contrário do que ocorre normalmente com outras membranas (Craveiro e col., 1999).

A quitosana vem sendo regularmente utilizada em processos de regeneração de pele em clínicas no Japão (Craveiro e col., 1999). O tratamento consiste na combinação de três procedimentos: aplicação de uma solução de quitosana sobre a lesão cutânea, banhos de imersão contendo soluções diluídas de quitosana e ingestão oral de uma solução de quitosana.

Desde 1950, já se conhece a aptidão dos policátions 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 policátion, apresenta propriedades ligante e aglutinante. 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 (Malette, 1983 APUD Craveiro e col., 1999).

O mecanismo pelo qual a quitosana se liga às células tem sido alvo de diversas pesquisas (Malette, 1983 APUD Craveiro e col., 1999). É bem conhecido que a força repulsiva existente entre as células vermelhas do sangue deve-se à rede de cargas negativas das membranas celulares. Esta alta carga negativa na superfície das células deve-se principalmente à presença de resíduos de ácido neuramínico na membrana

celular. A formação do gel sobre as células vermelhas do sangue é decorrente da interação entre o polímero positivamente carregado (quitosana) e os receptores contendo resíduos do ácido neuramínico presentes na superfície da célula. Recentemente, na Guerra no Iraque (2003), o exército americano utilizou gazes recobertas com quitosana como agente hemostático visando, desta forma, estancar o sangramento dos soldados atingidos. Em território nacional, a Polymar lançou recentemente uma membrana de quitosana com ação hemostática, a Hemoband® (quitosana hemostática microfibrilar), a qual, entretanto, ainda não se encontra disponível no mercado.

A quitosana tem sido também utilizada no tratamento da acne, inibindo o crescimento de determinados tipos de bactérias responsáveis pelo processo inflamatório associado a esta doença (Shimai e col., 1992 APUD Craveiro e col., 1999). Mediante esta propriedade, a quitosana tem sido indicada por especialistas em formulações de cremes e loções de tratamento de pele. Além disso, a quitosana também apresenta propriedade fungicida e, quando utilizada como conservante de alimentos, apresenta atividade bactericida superior à do ácido láctico (Shahidi e col., 1999).

Experimentos utilizando aplicações tópicas de quitosana através de pomadas e bandagens mostraram que este biopolímero promove uma rápida cicatrização de ferimentos e abscesso infectados por *Staphylococcus*. Tais aplicações diminuíram o tempo de coagulação, que é de fundamental importância na cicatrização de ferimentos (Craveiro e col., 1999).

2.4. Métodos para a obtenção de membranas de quitosana

De um modo geral as membranas podem ser classificadas em duas categorias, densas e porosas. A Figura 2.4 ilustra as morfologias mais comumente observadas em membranas comerciais. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas anisotrópicas caracterizam-se por uma região superior muito fina (de cerca de 1 μm de espessura), mais fechada (com poros ou não) suportada em uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material, a membrana é do tipo anisotrópica integral. Caso materiais diferentes sejam empregados no preparo de cada região, a membrana será do tipo anisotrópica composta.

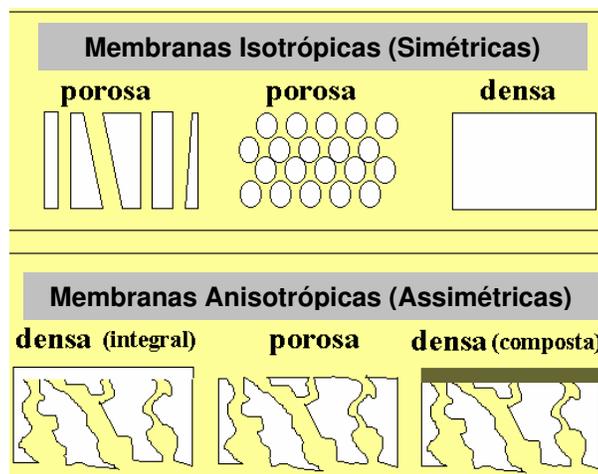


Figura 2.4 – Morfologias das membranas densas e porosas comumente observadas em membranas comerciais (Figura modificada de Habert e col., 1997).

A caracterização das membranas é realizada com base em dois tipos de parâmetros: os de natureza morfológica e aqueles relativos às propriedades de transporte da membrana. No caso das membranas porosas, características como a distribuição de tamanho de poros, a porosidade superficial e a espessura representam parâmetros morfológicos relevantes. Para as membranas densas, as características físico-químicas do polímero utilizado, bem como a espessura do filme polimérico, são parâmetros importantes. No caso de membranas compostas, as características do suporte poroso também devem ser consideradas. Independente do tipo de membrana, propriedades de transporte como a permeabilidade a gases e líquidos bem como a sua capacidade seletiva, são utilizadas como parâmetros característicos.

Em função do tipo de morfologia da membrana e do tipo de força motriz empregada, o transporte das diferentes espécies através da membrana pode ocorrer pelo mecanismo convectivo ou difusivo, conforme ilustrado na Figura 2.5.

Para as membranas porosas, dependendo do tipo de força motriz aplicada, o transporte das espécies pode ser tanto convectivo como difusivo. No caso de processos que empregam membranas densas, compostas ou não, o fluxo permeado é sempre de natureza difusiva, de maneira independente do tipo de força motriz aplicada, uma vez que a membrana não apresenta poros na interface com a solução a ser processada.

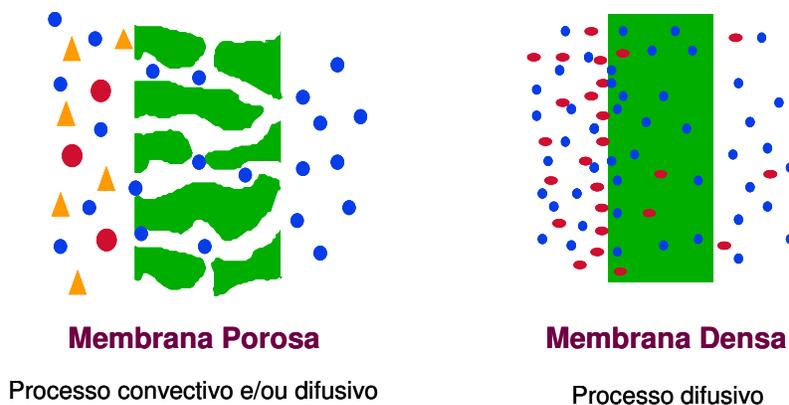


Figura 2.5 – Transporte em membranas densas e porosas (Figura modificada de Habert e col., 1997).

2.4.1. Membranas densas

Membranas densas de quitosana são preparadas utilizando-se a técnica conhecida como sol-gel, que pode ser dividida fundamentalmente em três etapas: dissolução da quitosana em uma solução ácida diluída e adição de outros componentes (caso necessário), transferência desta solução para moldes planos e secagem para que ocorra a evaporação do solvente e a formação da membrana propriamente dita.

As condições operacionais comumente utilizadas na obtenção em pequena escala de membranas densas, conforme publicadas por diversos autores, são sucintamente descritas na Tabela 2.4.

Pode-se observar que dentre as etapas comumente empregadas no processo sol-gel destacam-se o emprego de soluções de quitosana de 1 a 5% em ácido acético diluído, o uso de placas de Petri como moldes, a neutralização e/ou estabilização das membranas com hidróxido de sódio (NaOH) e a lavagem dos materiais com água destilada. Os procedimentos de desaeração (para reduzir a presença de bolhas de ar nas membranas) e acondicionamento, bem como o volume de solução de quitosana utilizada (que afeta a espessura da membrana) parecem ter pouca relevância no processo, uma vez que raramente são mencionados e/ou especificados. As condições utilizadas nas etapas de secagem (tempo e temperatura) e neutralização (concentração da solução de NaOH e tempo de exposição) diferem significativamente entre as referências consultadas, dificultando a seleção da condição mais apropriada para a síntese das membranas.

Tabela 2.4 – Condições para a obtenção de membranas densas de quitosana pelo processo sol-gel.

Molde	Solução de Quitosana (concentração, tipo de ácido e volume)	Etapas do Processo					Referência
		Desaeração	Secagem	Estabilização/Neutralização	Lavagem	Acondicionamento	
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 2% - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T = 45°C por 20 h	Tratamento: NaOH a 5% por 16 h	Sucessivas lavagens com água destilada	Não especificado	Canella e Garcia (2001)
Placas de Petri (φ = 5 cm)	- Solução de quitosana: 1,25% - Ácido acético: 1% - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T ambiente por 24 h	Tratamento: NH ₄ OH diluído em metanol	Não mencionada**	Não especificado	Chatelet e col. (2001)
Placas de Petri de vidro*	- Solução de quitosana: concentração não especificada. - Ácido acético: 2% - Acréscimo de quitina e glicerol - Volume em cada placa: não especificado	Repouso durante 2 h	T ambiente com circulação de ar por 24 h	Tratamento: NaOH a 1% por tempo não especificado	Sucessivas lavagens com água destilada	Não especificado	Craveiro e Craveiro (2000)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1,4% - Ácido: láctico: 1% ou acético: 2% - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T = 60°C por 24 h	Não mencionada**	Não mencionada**	Estocagem a 25±1°C e umidade relativa de 60-65% em dessecador.	Khan e col. (2000)
Placas de Petri de poliestireno (φ = 9 cm)	- Solução de quitosana: 1% - Solução de pectina: 2% - Solução de hidroxipropilmetilcelulose: 1% - Adição de glicerol - Ácido clorídrico: 0,1 M - Massa em cada placa: 50 g	Não mencionada**	T = 55°C por 40 h	Não mencionada**	Não mencionada**	Secagem no ar. As amostras foram armazenadas no dessecador à temperatura ambiente.	Kwabena e Fell (2001)
Placas de Petri de poliestireno*	- Solução: quitosana 5% e fibroína 5% - Ácido fórmico: concentração não especificada - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T ambiente por tempo não especificado	Não mencionada**	Não mencionada**	Não mencionada**	Kweon e col. (2001)
Placas de Petri de vidro* contendo suporte microporoso	- Solução de quitosana: 1% - Ácido: não especificado - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T = 40°C por 24 h (com circulação de ar)	Inexistente. Tratamento com ácido sulfúrico por 1 h à T ambiente	Sucessivas lavagens com etanol 100%	Não especificado	Lee e col. (1998)
Placa tipo ELISA: seis poços	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 3% - Volume em cada poço: 1 mL	Não mencionada**	T ambiente por tempo não especificado	Não mencionada**	Sucessivas lavagens com água destilada	Inexistente	Li e col. (1999)
Placas de Petri (φ = 10 cm)	- Solução de quitosana: 1,5% - Ácido acético: 0,5 M - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T ambiente (com circulação de ar) por tempo não especificado	Tratamento: NaOH a 1% por tempo não especificado	Sucessivas lavagens com água destilada	Secagem no ar. O acondicionamento não foi especificado.	Ma e col. (2001)

*diâmetro não especificado, **etapa ausente ou realizada em condições não especificadas.

Tabela 2.4 – Condições para a obtenção de membranas densas de quitosana pelo processo sol-gel (continuação).

Molde	Solução de Quitosana (concentração, ácido e volume)	Etapas do Processo					Referência
		Desaeração	Secagem	Estabilização/Neutralização	Lavagem	Acondicionamento	
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1,5% - Ácido acético: 0,5% - Volume em cada placa: 10 mL	Não mencionada**	T = 50°C por 1 h	Tratamento: solução de NaOH-Na ₂ CO ₃ por 24 h	Sucessivas lavagens com água deionizada	Não especificado	Mi e col. (2001)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1% - Volume em cada placa: não especificado	Não especificada	T = 60°C por tempo não especificado	Não mencionada**	Não mencionada**	Não especificado	Muzzarelli e col. (1988)
Lâminas de Microscópio	- Solução de quitosana: 2% - Ácido acético: 5% - Massa em cada lâmina: 0,6 g	Não mencionada**	T ambiente por tempo não especificado	Tratamento: 25 mL de solução NaOH a 1 M por 1 h.	Sucessivas lavagens com água destilada	Secagem ao ar em temperatura ambiente. O acondicionamento não foi especificado.	Payne e col. (1996)
Placas de Petri ($\phi = 3,5$ cm)	- Solução de quitosana: 2% - Ácido acético: 0,1 N - Adição de polivinilpirrolidona: 4% - Adição de glutaraldeído - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T = 30°C por 48 h em atmosfera estéril	Não mencionada**	Sucessivas lavagens com tampão PBS	Não especificado	Risbud e col. (2000)
Moldes planos de vidro (10 x 10 cm ²)	- Solução de quitosana: 4% - Ácido acético: 4% - Adição de drogas-modelo - Volume em cada molde: 40 mL	Sonicação	T = 37°C por 48 h e o restante da secagem foi realizada à vácuo em temperatura ambiente	Não mencionada**	Não mencionada**	Não especificado	Shu e col. (2001)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1% - Volume em cada placa: não especificado	Não mencionada**	T ambiente por tempo não especificado	Tratamento: NaOH a 3% contendo uma solução de etanol 50% por tempo não especificado	Sucessivas lavagens com água destilada	Não especificado	Tomihata e Ikada (1997)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1 M - Volume em cada placa: 10 mL	Não mencionada**	T = 60°C por tempo não especificado	Tratamento: NaOH a 1M por 24 h à temperatura de 25°C.	Sucessivas lavagens com água destilada.	Secagem a 25°C sob vácuo. O acondicionamento não foi especificado.	Uragami e col. (1997)
Placas de Petri de vidro*	- Solução de quitosana: 2% - Ácido acético: 2% - Volume em cada placa: não especificado	Vácuo: 700 mmHg T = 35°C por 6 h	Em estufa: 60°C por 24 h	Tratamento: NaOH (condições não especificadas)	Não mencionada**	Não especificado	Varma e col. (1999)

*diâmetro não especificado, **etapa ausente ou realizada em condições não especificadas.

2.4.2. Membranas porosas

Membranas porosas de quitosana têm sido bastante estudadas, ocupando atualmente um lugar de destaque devido às suas diversas aplicações como, por exemplo, em sistemas de liberação controlada de medicamentos, como suportes para a imobilização de enzimas, na adsorção de metais de transição e na área de engenharia de tecidos (Chow e Khor, 2000). As duas técnicas mais comumente empregadas na obtenção de membranas de quitosana do tipo micro e macroporosas são as de inversão e de separação de fases.

A técnica de inversão de fases pode ser dividida em basicamente três etapas. A primeira delas engloba o preparo da solução de quitosana contendo o agente formador de poros, transferência desta solução para um molde e remoção parcial do solvente por secagem. A segunda etapa consiste da transformação do polímero do estado de sol para o estado de gel e a obtenção dos poros pela adição de um não-solvente para o material formador da membrana, mas um solvente para o agente porogênico. E, a terceira e última etapa compreende o aquecimento do sistema para que ocorra a estabilização da estrutura polimérica e melhoria nas propriedades mecânicas dos biomateriais obtidos (Zeng e Ruckenstein, 1996a). No caso da obtenção de membranas do tipo microporosas, os agentes porogênicos mais comumente utilizados são compostos orgânicos de baixa massa molecular como a acetona, a dimetil formamida, o dimetil sulfóxido e o benzeno, dentre outros (Zeng e Ruckenstein, 1996a). Para a obtenção de macroporos, moléculas de maior massa molecular como, por exemplo, o polietilenoglicol ($M = 35.000 \text{ g/mol}$), podem ser utilizadas (Zeng e Ruckenstein, 1996b). Outra alternativa pode ser o uso de um composto inorgânico, como, por exemplo, a sílica-gel, sendo o diâmetro dos poros controlado pelo tamanho da própria partícula de sílica (Zeng e Ruckenstein, 1996a).

A técnica de separação de fases, assim como no caso da de inversão de fases, pode ser utilizada na obtenção de membranas do tipo micro ou macroporosas, sendo o diâmetro dos poros dependente das condições utilizadas no processo. Esta técnica pode ser dividida nas seguintes etapas: preparo da solução de quitosana (contendo ou não substâncias como a sacarose, a glicose e o cloreto de sódio), transferência da mesma para moldes apropriados, congelamento dos moldes contendo a solução e liofilização do sistema. Os poros são formados a partir da sublimação dos cristais de água presentes na estrutura polimérica e originados no processo de congelamento (Nettles e Elder, 2001; Madihally e Matthew, 1999; Biagini e col., 1991). Quando do uso da sacarose, da glicose

ou do cloreto de sódio, a formação dos poros se faz de forma diferenciada, sendo possível a obtenção de poros com diâmetro superior a 150 μm (Ma e col., 2001). Um resumo das condições utilizadas por diversos autores na obtenção de membranas porosas de quitosana pode ser visualizado na Tabela 2.5.

Similarmente ao observado para as membranas densas, nota-se que dentre as etapas comumente utilizadas para a obtenção de membranas porosas de quitosana destacam-se o emprego de soluções de quitosana de 1 a 3% em ácido acético diluído, o uso de placas de Petri como moldes, a neutralização e/ou estabilização das membranas com NaOH e a lavagem dos materiais com água destilada. E, assim como no caso das membranas densas, as etapas de desaeração e acondicionamento e o volume de solução de quitosana utilizado para a produção dos biomateriais não são suficientemente abordados. O processo de obtenção das membranas porosas bem como as condições utilizadas nas etapas de secagem (tempo e temperatura) e neutralização (concentração da solução de NaOH e tempo de exposição) diferem entre si.

Como se pode notar há muitas lacunas quanto aos processos de fabricação de membranas de quitosana destinadas à regeneração de pele. Algumas etapas do processo não são mencionadas, ficando a dúvida quanto à sua existência ou falta de especificação, resultando daí, a dificuldade na obtenção das condições reais de processamento e, possivelmente de reprodutibilidade do processo. Nota-se também que nenhum dos métodos mencionados parece ser adequado para o escalonamento direto do processo de produção das membranas.

Deve-se salientar que tanto no processo de obtenção de membranas densas como no de obtenção de membranas porosas, a quitosana pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com outros compostos, visando uma melhoria das características físicas, mecânicas e/ou biológicas destes biomateriais. Alguns dos agentes utilizados em conjunto com a quitosana são: polivinilpirrolidona (Risbud e col., 2000), glicosaminoglicanos (Chupa e col., 2000), sulfato de dextrana (Chupa e col., 2000), alginato (Wang e col., 2002), heparina (Kweon e col., 2003; Madihally e Matthew, 1999), gelatina (Cheng e col., 2003; Mu e col., 1999; Arvanitoyannis e col., 1998), etóxido de sílica (Suzuki e Mizushima, 1997), fibroína (Kweon e col., 2001), soluções antimicrobianas (Loke e col., 2000), fator de crescimento de fibroblastos (Mizuno e col., 2003), queratina (Tanabe e col., 2002), *pullulan* (Shalaby, 1994), cartilagem de tubarão (Craveiro e Craveiro, 2000), celulose (Craveiro e Craveiro, 2000) e quitina (Craveiro e Craveiro, 2000; Tomihata e Ikada, 1997), dentre outros componentes.

Tabela 2.5 – Condições para a obtenção de membranas porosas de quitosana.

Molde	Solução de Quitosana (concentração, tipo de ácido e volume)	Tipo de Processo	Etapas do Processo					Referência
			Desaeração	Secagem	Estabilização/Neutralização	Lavagem	Acondicionamento	
Moldes (10x20 x0,5 cm)	- Solução de N-carboxilquitosana: concentração não especificada - Ácido: não especificado - Volume em cada molde: não especificado	Separação de fases	Não mencionada**	Congelamento e liofilização	Não mencionada**	Não mencionada**	Não especificado	Biagini e col. (1991)
Placas de Petri ($\phi = 10$ cm)	- Solução de quitosana: 1,5% - Ácido acético: 0,5 M - Uso conjunto de sacarose, glicose ou cloreto de sódio - Adição sobre uma membrana densa de quitosana - Volume em cada placa: não especificado	Separação de fases	Não mencionada**	Congelamento (T = -28°C) e liofilização	Tratamento: NaOH (concentração e tempo de exposição não especificados)	Sucessivas lavagens com água destilada	Congelamento e liofilização para formação de uma estrutura em bicamada (filme – esponja).	Ma e col. (2001)
Placas de Petri de poliestireno ($\phi = 10$ cm)	- Solução de quitosana: 1, 2 e 3% - Ácido acético: 0,2 M - Volume em cada placa: 25 a 50 mL	Separação de fases	Não mencionada**	Congelamento e liofilização	Tratamento: - NaOH a 0,05 M por 10 min - Série de etanol: 100% etanol por 1 h ; 70% etanol por 30 min e 50% etanol por 30 min	Duas lavagens com água destilada e duas lavagens com tampão PBS.	Não especificado	Madhally e Matthew (1999)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1,5% - Ácido acético: 0,5% - Volume em cada placa: 10 mL	Inversão de fases	Não mencionada**	T = 50°C por 10 - 40 min	Tratamento: solução de NaOH-Na ₂ CO ₃ por 24 h	Sucessivas lavagens com água deionizada	Congelamento	Mi e col. (2001)
Placas de Petri*	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1% - Volume em cada placa: não especificado	Inversão de fases	Não especificada	T = 60°C por tempo não especificado	Não mencionada**	Não mencionada**	Não especificado	Muzzarelli e col. (1988)
Placas de Petri ($\phi = 3,5$ cm)	- Solução de quitosana: 2% - Ácido acético: 0,2 M - Volume em cada placa: até atingir a profundidade de 5 mm	Separação de fases	Não mencionada**	Congelamento (T = -20°C por 24 h) e liofilização	Tratamento: - Série de etanol: 100% etanol por 1 h ; 70% etanol por 30 min e 50% etanol por 30 min	Não mencionada**	Estocagem em tampão PBS contendo antibiótico.	Nettles e Elder (2001)
Placas de Petri ($\phi = 10$ cm)	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1% - Sílica: agente formador de poros - Volume em cada placa: não especificado	Inversão de fases	Não mencionada**	Não especificada	Tratamento: NaOH por 2 h à temperatura de 80°C	Sucessivas lavagens com água destilada.	Imersão em uma solução de glicerol (20%) por 30 min. Secagem em condições não especificadas.	Zeng e Ruckenstein (1996a)
Placas de Petri de poliestireno ($\phi = 5$ cm)	- Solução de quitosana: 1% - Ácido acético: 1% - Polietilenoglicol: agente formador de poros - Membrana microporosa de poliéter sulfona - Volume em cada placa: 2 mL	Inversão de fases	Não mencionada**	T ambiente por 1 h e 30 min	Tratamento: NaOH a 3% por 12 h (temperatura não especificada)	Sucessivas lavagens com água destilada.	Não especificado	Zeng e Ruckenstein (1996b)

*diâmetro não especificado, **etapa ausente ou realizada em condições não especificadas.

Especificamente para a obtenção de melhorias nas propriedades mecânicas das membranas, alguns plastificantes podem ser utilizados. O mais comumente empregado é o glicerol (Cervera e col., 2004; Casariego e col., 2002; Tanabe e col., 2002; Craveiro e Craveiro, 2000; Guerreiro-Beltrán e col., 1999; Mu e col., 1999; Arvanitoyannis e col., 1998; Shalaby, 1994) entretanto, o sorbitol (Cervera e col., 2004; Casariego e col., 2002; Arvanitoyannis e col., 1998), o eritrol (Cervera e col., 2004), o ácido láurico (Guerreiro-Beltrán e col., 1999), o ácido láctico (Khan e col., 2000) ou o polietilenoglicol (Zhang e col., 2002; Caner e col., 1998) também podem ser utilizados. Em alguns casos, o glicerol vem sendo usado como componente de banhos de imersão das membranas após sua obtenção visando desta forma a redução do encolhimento das mesmas (Mu e col., 1999; Zeng e Ruckenstein, 1996a).

2.5. Métodos para a caracterização de membranas de quitosana

A caracterização física, química, mecânica e biológica de membranas de quitosana utilizadas em processos de regeneração de pele, portanto, atuando como biomateriais, envolve três sistemas interligados de técnicas complexas progressivas, onde se avaliam as propriedades intrínsecas do material em si, de sua superfície e algumas implicações biológicas decorrentes de seu uso. De uma maneira geral, esta análise é realizada em dois níveis. Os testes de nível I são considerados mínimos para a análise do biomaterial enquanto que os de nível II fornecem informações mais detalhadas sobre as suas propriedades (Lyman e Rowland, 1989).

2.5.1. Caracterização física, química e mecânica

De acordo com a literatura pesquisada, ainda não há uma padronização para a caracterização física, química e mecânica de membranas de quitosana a serem utilizadas na área de regeneração de pele. Dentre os diversos artigos pesquisados na literatura, os testes normalmente realizados referem-se à determinação das propriedades mecânicas das mesmas pelo ensaio de tensão versus deformação utilizando-se Máquina Universal de Ensaio (Khan e col., 2000; Madihally e Matthew, 1999; Tomihata e Ikada, 1997; Zeng e Ruckenstein, 1996a,b); das características de hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície dos materiais através da medida do ângulo de contato (Li e col., 1999; Suzuki e

Mizushima, 1997) e do potencial zeta (Suzuki e Mizushima, 1997); do grau de hidratação dos materiais quando da imersão em água destilada ou em tampão fosfato (Lima, 2002; Suh e Matthew, 2000; Kweon e col., 2001; Ma e col., 2001; Tomihata e Ikada, 1997; Uragami e col., 1997); da permeabilidade dos filmes ao vapor d'água (Kweon e col., 2001; Mi e col., 2001; Khan e col., 2000) e ao oxigênio (Kweon e col., 2001; Mi e col., 2001); da morfologia da superfície dos materiais por microscopia (Lima, 2002; Kweon e col., 2001; Mi e col., 2001; Shu e col., 2001; Varma e col., 1999; Zeng e Ruckenstein, 1996a,b), da área superficial (Nettles e Elder, 2001; Zeng e Ruckenstein, 1996a,b) e da porosidade (Nettles e Elder, 2001; Zeng e Ruckenstein, 1996a,b).

2.5.2. Caracterização biológica

Assim como para a caracterização física, química e mecânica de membranas de quitosana a serem utilizadas em processos de regeneração de pele, não há uma regra geral para a realização dos ensaios biológicos, entretanto, devido à sua importância, estes ensaios têm sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa, seja pela realização de testes *in vitro* (Lima, 2002; Ma e col., 2001; Mi e col., 2001; Nettles e Elder, 2001; Khan e col., 2000; Risbud e col., 2000; Li e col., 1999; Tomihata e Ikada, 1997) ou *in vivo* (Khan e col., 2000; Tomihata e Ikada, 1997). Nesta revisão da literatura só serão abordadas as técnicas *in vitro*, uma vez que estas são as de interesse direto e mais imediato para este trabalho.

2.5.2.1. Ensaios biológicos *in vitro*

A cultura de células de mamíferos constitui-se em uma ferramenta muito útil para a avaliação biológica dos biomateriais, seja na determinação de possíveis efeitos citotóxicos ou da influência destes no processo de adesão, crescimento e diferenciação celular, sempre com o objetivo de promover a melhoria de seu desempenho (Santos Jr., 2001). Sabendo-se que os testes *in vivo*, embora indispensáveis, apresentam custo elevado e grande demanda de tempo, os testes *in vitro* são recomendados principalmente quando se tem um grande número de amostras, as quais necessitam ser analisadas sob condições altamente controladas. Tal fato permite com que se faça uma rápida pré-seleção de materiais, os quais serão posteriormente avaliados através dos testes *in vivo*.

Os testes de citotoxicidade representam a fase inicial do ensaio de avaliação da biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas. Assim, são utilizados em uma pré-seleção para a detecção se o material em questão promove a morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares (Black, 1992). Para que um biomaterial seja considerado não citotóxico, este, necessariamente, não deve causar a morte de células e nem mesmo afetar suas funções. Desta maneira, a avaliação da citotoxicidade pode ser realizada através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pelo uso de métodos com corantes que indiquem ou não atividade metabólica), da proliferação celular e da atividade biossintética, dentre outras (Freshney, 1989).

Um resultado negativo de citotoxicidade indica que o material está livre de componentes danosos ou que os têm em quantidade insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Entretanto, deve-se considerar que o teste de citotoxicidade é apenas o primeiro passo. Por outro lado, um resultado positivo indica que o material contém uma ou mais substâncias que são extraídas e que podem ter importância clínica. Nestes casos, outras investigações se fazem necessárias para a determinação da utilidade do material.

Pode-se dizer que existem dois tipos de testes de citotoxicidade *in vitro*: os de contato direto e os de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente inoculadas sobre o material na forma de uma suspensão celular. Já os de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e aqueles em que substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente, e colocadas em contato com as células.

Os testes de citotoxicidade podem ser realizados baseando-se em protocolos padrões, conforme descrito nas normas ASTM (F 813-83, método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células e F 895-84, método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade) e ISO (10993-5E, para a avaliação biológica de dispositivos médicos, parte 5, categoria de testes para citotoxicidade, métodos *in vitro*).

Nos métodos padronizados, além de aspectos referentes ao procedimento, há também especificação quanto à linhagem celular, ao meio de cultura e às técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, eles prevêm o uso e especificam os materiais a

serem utilizados como controle positivo (substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível) e negativo (substância que não produz efeito citotóxico).

Normalmente são utilizadas nestes testes linhagens de células estabelecidas e bem caracterizadas, devido à facilidade de obtenção e manutenção em laboratório (Northup, 1986). Dentre as linhagens celulares recomendadas para os testes de citotoxicidade encontram-se a NTC, a Baalb/3T3, a MRC-5, a WI-38, a BHK-21, a V-79, a Vero e a L-929.

Depois de realizados os testes de citotoxicidade, outros ensaios deverão ser feitos para a aprovação do biomaterial como apto para o desempenho na área médica e/ou médico-cirúrgica. Assim sendo, materiais destinados a tais aplicações devem possuir não apenas características não citotóxicas como também apresentar boas características de funcionalidade, ou seja, devem promover processos biológicos que colaborem para a aplicação do biomaterial. Desta forma, os testes de avaliação biológica de um biomaterial podem ser divididos em duas categorias, os testes de biossegurança e os de biofuncionalidade (Kirkpatrick, 1992). Dentre os de biossegurança, encontram-se os de citotoxicidade e mutagênese/carcinogênese. Já dentre os de biofuncionalidade, encontram-se os de adesão e proliferação celular, reorganização citoesquelética e de biossíntese.

Tanto os ensaios de citotoxicidade como os de adesão e de proliferação celular podem ser realizados utilizando-se diferentes metodologias. Dentre as mais comumente empregadas encontram-se a de tripsinização, a de quantificação de DNA e a que utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo). Nesta técnica desenvolvida por Mosmann (1983), o MTT é clivado por todas as células vivas e metabolicamente ativas, mas não por células mortas. O produto formado, um precipitado azul denominado *formazan*, pode ser quantificado por espectrofotometria, sendo sua quantidade proporcional ao número de células vivas existentes, quando utilizada uma população homogênea de células. Este procedimento é substancialmente mais simples que o de tripsinização, permitindo a análise simultânea do comportamento de um maior número de amostras.

De acordo com a literatura pesquisada, a utilização desta técnica em ensaios com células vivas e na determinação de sua proliferação apresenta propriedades vantajosas, sendo a principal delas referente à velocidade com que as amostras são processadas (Mosmann, 1983). Os resultados podem ser determinados poucos minutos após a adição

de um agente solubilizante e de extração do *formazan* (como, por exemplo, uma solução de isopropanol ácido ou dimetil sulfóxido) e a coloração do produto formado continua estável durante algumas horas à temperatura ambiente. Tratando-se de uma técnica colorimétrica, os resultados podem ser facilmente visualizados, tornando a mesma, apropriada quando se deseja a obtenção de resultados qualitativos em um curto período de tempo.

Especificamente no estudo do comportamento biológico de materiais à base de quitina e seus derivados, o reagente MTT já foi utilizado para a realização de testes de citocompatibilidade (citotoxicidade direta), adesão e proliferação celular para a caracterização biológica de membranas de quitosana por Chatelet e col. (2001). Este reagente também foi utilizado em testes de citotoxicidade indireta e de proliferação de fibroblastos NIH3T3 e células epiteliais SiHa em hidrogéis de quitosana e polivinilpirrolidona (Risbud e col., 2000). Sua utilização também foi relatada no estudo dos efeitos da quitina e seus derivados na proliferação e produção de citocina por fibroblastos em ensaios *in vitro* (Mori e col., 1997) bem como no estudo realizado por Prasitsilp e col. (2000) quanto às respostas celulares *in vitro* causadas pela quitosana. Além destes pesquisadores, muitos outros também já utilizaram o MTT como técnica de caracterização biológica. Dentre eles pode-se citar Zabala e col. (2001), Hu e col. (1999), Miller e McDevitt (1991).

Deve-se salientar que qualquer tipo de avaliação biológica deve ser realizado em condição asséptica e, assim sendo, uma variável de grande importância refere-se à técnica de esterilização a ser utilizada.

2.6. Esterilização de biomateriais

Materiais utilizados como biomateriais devem ser esterilizados a fim de se prevenir infecções subseqüentes que podem acarretar em problemas de natureza simples ou complexa, podendo até mesmo levar o paciente à morte (Ratner e col., 1996).

A esterilização é uma etapa fundamental no processamento de biomateriais, e a funcionalidade de qualquer sistema de esterilização deve ser determinada através de sua eficácia em exterminar organismos, além de sua habilidade em não prejudicar ou de não afetar de forma negativa as propriedades funcionais dos dispositivos médicos (Sanders, 2002). Os principais agentes de esterilização de biomateriais são os vapores seco e

úmido, o óxido de etileno e a radiação, os quais serão sucintamente descritos a seguir, assim como sua aplicabilidade em membranas de quitosana.

2.6.1. Esterilização a vapor

Através deste método, a esterilização é alcançada pela exposição do biomaterial ao vapor saturado à temperatura de 121°C. Assim, os microrganismos são destruídos pela ação combinada do calor, da pressão e da umidade, os quais promovem a termo-coagulação das proteínas celulares. Normalmente este processo tem a duração de 15 a 30 minutos após todas as superfícies dos materiais terem atingido a temperatura de 121°C.

Atualmente, este método é comumente utilizado em hospitais para a esterilização de instrumentos cirúrgicos metálicos e suprimentos cirúrgicos resistentes ao calor como, por exemplo, suturas.

Dentre as principais vantagens deste método encontram-se: a eficácia, a velocidade, a simplicidade do processo e a ausência de resíduos tóxicos. Dentre as limitações pode-se citar a utilização de altas temperaturas e pressões, que limitam os tipos de biomateriais e embalagens compatíveis com este processo.

2.6.2. Óxido de Etileno

O óxido de etileno (EtO) é um agente químico gasoso de alta eficiência no que se refere à esterilização de artigos médico-hospitalares. Age em baixas temperaturas e possui alto poder de penetração, sem ser corrosivo (Demarzo e Silva, 1997).

A ação letal do óxido de etileno é atribuída à alquilação, reação de substituição, por radicais C_nH_{2n+1} , de átomos de hidrogênio dos grupos sulfidril (HS-) e hidroxila (HO-) existentes em proteínas, ácidos nucleicos, peptídeos, aminoácidos e enzimas. Admite-se que a reação envolva principalmente os ácidos nucleicos, impedindo desta forma a síntese de proteínas específicas (Possari, 2003; Zanon, 1987). Assim sendo, a esterilização pelo óxido de etileno é sempre realizada na presença de vapor de água. A água é um solvente ionizante que inicia a reação de alquilação através da formação de um complexo ativado, com grupos funcionais não protonados e as moléculas do óxido de

etileno são solubilizadas pela camada de água que envolve os microrganismos, facilitando o contato com os sítios de reação.

Para uso comercial, os biomateriais juntamente com suas embalagens (permeáveis ao óxido de etileno) são colocados na câmara de esterilização. O ar é removido e ocorre a injeção de EtO na concentração de 600 a 1200 mg/L. Para ser eficiente, é mantida uma certa umidade na câmara, que deve estar entre 40 e 90%. A temperatura também deve ser controlada (normalmente entre 30 e 50°C) para que seja alcançado o nível de segurança de esterilidade conhecido como SAL (*Sterility Assurance Level*) de 10^{-6} , estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). A partir deste momento, o óxido de etileno é removido da câmara e ar é introduzido no interior do sistema para remoção do óxido de etileno residual e de seus subprodutos (etilenocloridrina e etilenoglicol), a fim de que se alcance os limites de segurança. Algumas vezes, aerações complementares, utilizando-se altas temperaturas, se fazem necessárias. A duração de um ciclo de esterilização varia entre duas e 48 horas, dependendo do tempo de aeração da amostra.

Atualmente, o óxido de etileno é empregado principalmente na esterilização de produtos médico-hospitalares que não podem ser expostos ao calor ou agentes esterilizantes líquidos como, por exemplo, instrumentos de uso intravenoso e de uso cardiopulmonar em anestesiologia, aparelhos de monitoramento invasivo, instrumentos telescópicos (citoscópios e broncoscópios), materiais elétricos (eletrodos e fios elétricos), máquinas (marcapassos), motores e bombas, além de muitos outros. É também muito utilizado na esterilização de diversos implantes médicos. Devido à sua toxicidade e potencial carcinogênico, os resíduos e subprodutos deste processo têm sido alvo de diversas pesquisas (Glaser, 1979). Além disso, seu uso na forma pura não é recomendado já que apresenta alta inflamabilidade e explosividade ao atingir a concentração de 3% no ar (Possari, 2003). Para uso prático, faz-se necessária a mistura do óxido de etileno com gases inertes como o dióxido de carbono ou hidrocarbonetos fluorados como o diclorofluormetano.

Como vantagens da utilização do óxido de etileno como agente de esterilização de materiais podem ser citadas a eficiência (mesmo utilizando-se baixas temperaturas), alta penetração e biocompatibilidade com diversos conjuntos biomateriais/embalagens. A ação letal do óxido de etileno é irrestrita, e este composto atua, portanto, como bactericida, fungicida, viruscida e esporicida, permitindo a esterilização do artigo já embalado (em envelopes ou rolos de papel grau cirúrgico, combinado ou não com filme

plástico), além de poder substituir os processos físicos de esterilização (calor seco e calor úmido) e processos químicos a frio (glutaraldeído e formaldeído). Como desvantagens destacam-se: a necessidade de supervisão bacteriológica e de pessoal técnico especializado, a formação de bolhas quando em contato com alguns polímeros, o alto custo (aparelhagem e cilindros) e o alto tempo despendido na esterilização e na aeração. Entretanto, a principal desvantagem refere-se à formação de resíduos tóxicos, os quais são prejudiciais tanto para o desempenho do biomaterial quanto para as pessoas e o meio ambiente.

2.6.3. Radiação

A esterilização por radiação ionizante é uma técnica altamente eficiente, econômica e segura, que teve um rápido crescimento na indústria médica nos últimos quinze anos. Duas fontes de radiação podem ser utilizadas neste processo: raios gama de uma fonte de ^{60}Co ou feixes de elétrons de aceleradores de alta energia. A radiação ionizante atua quebrando cadeias moleculares e induzindo reações dos fragmentos com o oxigênio atmosférico ou com compostos oxigenados, destruindo, portanto, os microrganismos e prevenindo sua reprodução.

A radiação gama tem amplo uso em aplicações industriais, tais como na esterilização de materiais médico-cirúrgico, odontológico e de laboratório, frascos, embalagens, fármacos, cosméticos, matérias-primas, fitoterápicos e chás; na descontaminação de produtos; no processamento de alimentos, especiarias, condimentos e corantes; na coloração de vidros e pedras preciosas; na melhoria de fibras sintéticas e de polímeros; na produção de inoculantes para a agricultura; na impregnação de madeiras e outros materiais, dentre outras aplicações.

Neste método, a dose de radiação geralmente validada para esterilizar produtos médicos é de 25 kGy. O decaimento da quantidade de ^{60}Co contida na amostra (meia-vida de 5,3 anos) resulta na formação do ^{60}Ni e eliminação de um elétron e de raios gama. Estes raios causam a ionização de importantes componentes celulares, especialmente os ácidos nucléicos, resultando na morte dos microrganismos (Hutchinson, 1961). O elétron eliminado não possui energia suficiente para penetrar na amostra e, portanto, não participa do processo de esterilização.

A técnica de esterilização utilizando-se a radiação gama aproxima-se bastante da técnica ideal de esterilização. Dentre as inúmeras vantagens do uso da radiação gama como agente de esterilização podem ser destacadas: a confiabilidade do processo; o fácil monitoramento, onde a única variável de controle do processo é o tempo; a viabilidade econômica para pequenos e grandes volumes; a possibilidade de validação do processo segundo as normas internacionais ISO 11137 e EN 552; a ausência do período de quarentena, pois não há resíduos; a ausência da necessidade de embalagem em papel grau cirúrgico, uma vez que a radiação penetra em qualquer embalagem, além da ausência de manuseio durante o processamento, pois a radiação penetra em todas as porções do produto. Suas principais desvantagens são o custo relacionado à manutenção de uma sala de esterilização e a incompatibilidade de alguns materiais. Outra desvantagem refere-se ao contínuo decaimento do isótopo, que resulta em longos períodos de processamento e adição periódica de cargas adicionais deste isótopo.

Os materiais médicos também podem ser esterilizados através de uma máquina geradora de elétrons acelerados. Através desta técnica, os materiais a serem esterilizados devem passar por um feixe de elétrons suficientemente grande para acumular a dose requerida (usualmente 25 kGy). Assim como para os raios gama, a eficiência do processo (medida em termos de morte de microrganismos) está relacionada com a ionização de componentes celulares importantes.

Diferentemente da radiação gama, os elétrons acelerados possuem menor poder de penetração, o que torna o uso deste método inadequado no caso da necessidade de esterilização de produtos densos ou de grande espessura. Este método possui uma área de abrangência e compatibilidade semelhantes às da radiação gama, entretanto, devido ao seu menor poder de penetração, apresenta limitações.

2.7. Esterilização de membranas de quitosana

Cabe ao profissional, dentre os diversos métodos de esterilização disponíveis, a escolha daquele que melhor se enquadre em suas necessidades específicas. As principais características a serem observadas são: eficácia, rapidez, penetrabilidade, compatibilidade, atoxicidade, resistência, adaptabilidade, monitoração e custo (Ferraz, 1995). Para o caso de biomateriais, a escolha do método de esterilização envolve basicamente duas características, a compatibilidade entre o biomaterial (e sua

embalagem) com o agente de esterilização, bem como o cumprimento do limite máximo de microrganismos exigido pela SAL.

A esterilização com EtO dominou o segmento do mercado de esterilização de produtos médicos descartáveis por muito tempo. Entretanto, sua natureza tóxica e a emissão de poluentes ao meio ambiente fizeram com que a *Occupational Safety and Health Association* (OSHA) a declarasse uma técnica agressiva, adotando uma política rígida em sua aplicação. Atualmente, diversas empresas mundiais estão substituindo este processo de esterilização pela radioesterilização.

O grande desafio nesta área é o desenvolvimento de biomateriais que possuam estabilidade física e biológica frente aos métodos de esterilização, podendo ser esterilizados a um baixo custo e trazendo efeitos negativos mínimos para seu desempenho, para o paciente, trabalhadores e meio-ambiente (Jorkasky, 1987).

Dentre os diversos trabalhos consultados na literatura sobre membranas de quitosana a serem utilizadas em processos de regeneração de pele, pouco se discute sobre o processo de esterilização utilizado no preparo das amostras para a realização dos testes biológicos *in vitro* ou *in vivo*. Alguns dos agentes relatados para a esterilização destas membranas em escala laboratorial foram: calor seco (Lim e col., 1999; Lim e col., 1998), calor úmido (Lim e col., 1999; Lim e col., 1998; Rao e Sharma, 1997), óxido de etileno (Mi e col., 2001; Lim e col., 1998; Tomihata e Ikada, 1997; Ohashi e Karube, 1995), radiação gama (Wang e col., 2002; Lim e col., 1998), radiação ultravioleta (Cheng e col., 2003; Mu e col., 1999) e soluções alcoólicas a 70% (Chatelet e col., 2001; Ma e col., 2001; Chupa e col., 2000; Madihally e Matthew, 1999), 75% (Li e col., 1999) ou 80% (Suzuki e Mizushima, 1997). Alguns dos trabalhos publicados não especificam o agente utilizado (Risbud e col., 2000; Biagini e col., 1991) e outros, nem sequer mencionam a etapa de esterilização (Zhang e col., 2002; Kweon e col., 2001; Khan e col., 2000; Muzzarelli e col., 1988), conforme ilustrado na Figura 2.6.

Como se pode notar, o assunto é polêmico e nenhum consenso foi alcançado. Já para as membranas poliméricas comercialmente disponíveis, os agentes de esterilização utilizados encontram-se listados na Tabela 2.6.

Apesar das variadas citações na literatura referente a membranas de quitosana comercialmente disponíveis (Shalaby, 1994), apenas a Chitoderm®, produzida pela Oligopharm Co. Ltd., foi identificada através de anúncios pela internet. Dentre suas

principais características encontra-se a esterilização, citada como sendo realizada pela exposição do material à radiação, porém, de natureza não especificada. Entretanto, a etapa de esterilização é de fundamental importância na área biomédica e a escolha inadequada do agente de esterilização pode prejudicar o desempenho do biomaterial por afetar suas propriedades físicas, químicas e/ou biológicas e vir a comprometer os resultados almejados.

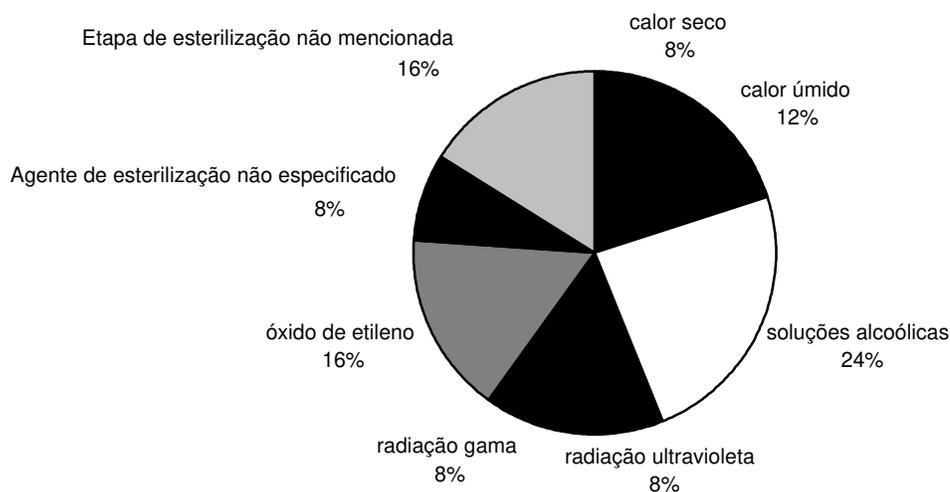


Figura 2.6 – Distribuição percentual do uso de diferentes agentes de esterilização de membranas de quitosana para uso biomédico.

Tabela 2.6 – Algumas membranas comercialmente disponíveis para o tratamento de queimaduras e os agentes utilizados para a sua esterilização.

Nome comercial da membrana	Fabricante	Agente de esterilização
Tegaderm®	3M Health Care Ltd.	Radiação gama
Vigilon®	Bard	Óxido de etileno
Geliperm®	Geistlich Sons Ltd.	Óxido de etileno
Granuflex®	ConvaTec Ltd.	Radiação gama
Opsite®	Smith & Nephew Medical Ltd.	Óxido de etileno
Chitoderm®	Oligopharm Co. Ltd.	Radiação
Omiderm®	Omiderm Ltd.	Radiação gama

Dentre os agentes encontrados na literatura para a esterilização de membranas de quitosana, destaca-se a utilização de soluções alcoólicas (Figura 2.6), entretanto, o álcool possui uma ação desinfetante e não esterilizante. O álcool, apesar de não ser um agente esterilizante propriamente dito, é considerado um bom desinfetante devido à sua ação desidratante e coaguladora de proteínas. O álcool não somente rompe as membranas pela solubilização de lipídios como também desnatura as proteínas. No entanto, o álcool não tem ação sobre formas de resistência tais como os endosporos de diversas bactérias. Este fato limita seu emprego como esterilizante de superfície. As principais vantagens e desvantagens do álcool como agente desinfetante podem ser visualizadas na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Principais vantagens e desvantagens do álcool como agente desinfetante.

Vantagens	Desvantagens
Possui ação bactericida, viruscida e fungicida	Não é esporicida
Possui odor agradável	Possui atividade questionável perante vírus
Evapora-se sem formação de resíduos	Em alguns casos pode provocar irritação na pele e mucosas (desidratação e queimaduras)
Não colore os materiais	Possui alta volatilidade e inflamabilidade
Geralmente não é tóxico	Possui certa incompatibilidade com borrachas e materiais plásticos
É estável (quando guardado adequadamente)	Não é registrado como desinfetante pelo <i>Environmental Protection Agency</i> (EPA)
Normalmente não é irritante nem provoca alergia	
Possui baixo custo	
Material de fácil obtenção e utilização	

2.8. Considerações finais

Com base na revisão da literatura efetuada e com o propósito de se obter membranas a serem utilizadas em processos de regeneração de pele lesada por queimaduras, propôs-se o projeto de doutorado em questão, utilizando-se a quitosana

como a matéria-prima principal para a obtenção destes biomateriais. Tal escolha é fundamentada nos fatores descritos a seguir.

Os monômeros D-glucosamina e N-acetilglucosamina da quitosana são substâncias que ocorrem amplamente nos tecidos animais, sendo de grande importância em diversos processos metabólicos. O processo de degradação dos biomateriais à base de quitosana é realizado por enzimas largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, nas plantas, além de estarem presentes em microrganismos do solo. A quitosana possui alta solubilidade em alguns ácidos orgânicos, permitindo, portanto, a obtenção de filmes e membranas (combinadas ou não com outras substâncias), apresentando também propriedade de formar um gel em soluções ácidas, o que possibilita seu uso como veículo em formulações farmacêuticas. Devido à compatibilidade da quitosana com os tecidos animais, as membranas produzidas com este polissacarídeo podem ser absorvidas pelo organismo durante a recuperação da pele desde que quitosana com grau de desacetilação adequado seja empregada, evitando, portanto, a retirada do curativo e, possivelmente, danos ao tecido recuperado, ainda sensível. Em adição, tais membranas apresentam atividade antimicrobiana e cicatrizante, além de serem facilmente esterilizáveis, podendo ser utilizadas em substituição à gaze e ao algodão (Craveiro e Craveiro, 2000).

Foi ainda proposta a avaliação dos efeitos do glicerol e da quitina quando presentes na composição das membranas de quitosana. O glicerol foi utilizado como agente plastificante, esperando-se, portanto, melhoria nas características mecânicas dos materiais (flexibilidade e elasticidade), já que sua presença promove redução nas forças coesivas entre as cadeias poliméricas, resultando no aumento de sua mobilidade. A quitina foi selecionada como matéria-prima para a obtenção das membranas, uma vez que, além de possuir características biológicas adequadas para a utilização como biomaterial na área de regeneração de pele, ainda apresenta custo reduzido quando comparado ao da quitosana. Acrescida a estas características, a quitina possui a vantagem de ser mais facilmente biodegradada por enzimas hidrolíticas presentes no organismo humano que a quitosana (Madhally e Matthew, 1999), fator este de grande relevância no caso do uso em queimaduras onde a retirada do curativo pode acarretar em danos ao tecido em processo de cicatrização e, portanto, ainda frágil.

Quanto à caracterização das membranas, propôs-se para as avaliações das propriedades físicas e mecânicas, o uso das técnicas mais comumente descritas na literatura. Para a avaliação física foram analisadas a espessura (nos estados seco e

úmido), a morfologia, o grau de hidratação (em água destilada e tampão PBS) e o de degradação em tampão PBS. Outras variáveis também analisadas foram a cristalinidade, a degradação térmica e a estabilidade em soluções aquosas. Quanto às propriedades mecânicas, foram avaliadas a resistência mecânica e a ductilidade dos materiais sintetizados.

Já para a avaliação biológica, na concepção do projeto, a técnica de caracterização biológica escolhida foi a de tripsinização, conforme proposto por Suzuki e Mizushima (1997). Entretanto, fazendo-se uma nova busca na literatura, foram encontrados diversos artigos (Chatelet e col., 2001; Zabala e col. 2001; Prasitsilp e col., 2000; Risbud e col., 2000; Hu e col., 1999; Mori e col., 1997; Miller e McDevitt, 1991), que utilizaram a técnica colorimétrica conhecida como ensaio com o indicador de metabolismo celular MTT, para a realização de ensaios biológicos com membranas de quitosana. Em adição, na UNICAMP, no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia, onde os testes biológicos foram realizados, este procedimento já vinha sendo utilizado com êxito na realização de ensaios de caracterização de biomateriais. Assim, esta foi a técnica selecionada para a avaliação de citotoxicidade, adesão e proliferação celular das membranas à base de quitosana. Outra variável biológica também analisada foi a degradação das membranas quando da exposição à enzima lisozima.

Outro fator a ser considerado refere-se à etapa de esterilização de membranas à base de quitosana, a qual, apesar de ser de fundamental importância para o processo de obtenção do biomaterial, é pouco abordada na literatura. A falta de consenso verificada na literatura consultada incentivou-nos a propor um conjunto de experimentos para a avaliação do efeito de três diferentes agentes de esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas: álcool etílico a 70%, óxido de etileno e radiação gama. Dentre os agentes mais comumente empregados, foram selecionados os três em estudo por apresentarem menor potencial de afetar a estrutura das membranas em decorrência do princípio de atuação dos mesmos.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Neste item estão descritos os materiais utilizados para a obtenção e para a caracterização das membranas de quitosana.

3.1.1. Obtenção das membranas

Para a obtenção das membranas foram utilizados como reagentes quitosana 85% desacetilada (código C3646), quitina grau prático (código C7170) e glicerol (código G7893) adquiridos da Sigma Chemical Co., ácido acético glacial e óleo de silicone (350 cp) obtidos da Synth e hidróxido de sódio (NaOH) adquirido da Ecibra. Todos os reagentes utilizados possuem qualidade analítica certificada. A água utilizada nos ensaios é destilada e deionizada em sistema Milli-Q (Millipore).

Membranas porosas de quitosana, sintetizadas pelo Prof. Dr. Eduardo José Arruda do Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco e a membrana comercial Omiderm® (Omiderm Ltd.), doada pelo Sr. Mário Cabral da empresa Literal Mercantil Ltda também foram utilizadas ao longo deste trabalho.

3.1.2. Caracterização das membranas

Para os ensaios de caracterização biológica foram utilizadas células Vero provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil) e cultivadas no Laboratório de

Cultura de Células Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP); meio de cultura Ham-F10, soro fetal bovino (SFB), tripsina-EDTA e tampão fosfato (PBS) obtidos da Nutricell Nutrientes Celulares; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT), fenol, ácido clorídrico (HCl), álcool isopropílico, dimetil sulfóxido (DMSO), N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico (HEPES), glicina e cloreto de sódio (NaCl) fornecidos pela Sigma Chemical Co.; álcool etílico e hidróxido de sódio obtidos da Ecibra. Para a avaliação das superfícies dos materiais inoculados com as células Vero por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados os reagentes paraformaldeído, glutaraldeído e tetróxido de ósmio fornecidos pela Sigma Chemical Co.; álcool etílico fornecido pela Ecibra e tampão fosfato (PBS) obtido da Nutricell Nutrientes Celulares. As amostras foram recobertas com uma liga de ouro-paládio fornecida pela Polaron.

Para o ensaio de avaliação da ocorrência de microrganismos contaminantes em membranas não estéreis foram utilizados os meios de cultura caseína-soja e tioglicolato fluido, disponibilizados pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP).

Para o ensaio de degradação enzimática foram utilizados a enzima lisozima fornecida pela Sigma Chemical Co. e o tampão fosfato obtido da Nutricell Nutrientes Celulares.

Para os ensaios de hidratação, estabilidade em soluções aquosas e caracterização mecânica foi utilizado o tampão fosfato obtido da Nutricell Nutrientes Celulares e água destilada.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das membranas

Soluções de quitosana de 1,0 a 2,5% (m/m) foram preparadas a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1,0% (v/v).

As soluções de quitosana de menor concentração foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas, enquanto que as soluções mais concentradas, devido à sua alta viscosidade, foram mantidas em repouso a baixas temperaturas (em torno de 5°C) por 72 horas. Após a dissolução do material, as soluções foram filtradas em placa de

vidro sinterizado com tamanho de poro G1 (Merse), para a eliminação das impurezas insolúveis da quitosana. As soluções filtradas foram então desaeradas sob pressão reduzida.

Para o preparo das membranas contendo quitina e/ou glicerol, após a desaeração das soluções de quitosana, foi feita a adição das quantidades necessárias destes compostos, seguida pela homogeneização do sistema.

Alíquotas da solução de quitosana contendo aditivos, quando requeridos, foram transferidas para placas de Petri de vidro com 11 cm de diâmetro, previamente silanizadas. No caso dos ensaios de estudo do efeito de três diferentes agentes de esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas, foram adicionados 45 gramas de solução em todas as condições estudadas, mantendo-se a quantidade de quitosana constante em todos os ensaios (1,125 g). Já para o estudo do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel, quantidades diferentes de solução foram adicionadas para cada condição experimental do planejamento estatístico, sendo mantida constante, em 1,125 g, a quantidade de sólidos totais do sistema, conforme descrito na Tabela 3.1.

A silanização das placas utilizadas como moldes foi efetuada utilizando-se óleo de silicone aplicado com papel absorvente, de modo a recobrir uniformemente a superfície interna das placas, que foram então mantidas em estufa por duas horas a 200°C. As placas foram cuidadosamente lavadas com uma esponja macia umedecida com água e detergente (comercial) e imersas em água corrente por dois minutos. Após este procedimento, as placas permaneceram imersas em água destilada por 12 horas, sendo secas à temperatura ambiente antes de seu uso.

Após a transferência das soluções de quitosana para as placas de Petri, estas foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar. No caso das soluções mais concentradas, após a desaeração, as placas foram armazenadas em geladeira por um período de quatro dias.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar (modelo 410, Nova Ética) à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante.

Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual.

Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

As membranas produzidas foram secas à temperatura ambiente sob prensagem entre duas folhas de papel de filtro, sendo, então, envoltas em papel vegetal e armazenadas à temperatura ambiente.

3.2.2. Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas

Para a realização do estudo do efeito da esterilização nas características das membranas foram selecionadas quatro diferentes composições de membranas densas, obtidas a partir da dissolução dos componentes em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), nas seguintes concentrações mássicas: quitosana a 2,5% (Q); quitosana a 2,5% contendo 0,5% de glicerol (Q+g); quitosana a 2,5% contendo 0,5% de quitina (Q+q); quitosana a 2,5% contendo 0,5% de glicerol e 0,5% de quitina (Q+q+g).

Esta seleção visou abranger os possíveis efeitos da esterilização sobre as diferentes classes de membranas a serem sintetizadas na próxima etapa do estudo (puras, contendo somente quitosana ou então, contendo outras matérias-primas), sendo que cada um dos tipos de materiais foi submetido às três diferentes técnicas de esterilização: exposição à radiação gama, imersão em álcool etílico a 70% (v/v) e exposição ao óxido de etileno.

Para a utilização do álcool como agente de esterilização, as amostras foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v) e mantidas em geladeira por 48 horas, quando então foram lavadas exaustivamente com tampão PBS estéril (pH 7,4) antes do início dos ensaios de caracterização.

A esterilização com óxido de etileno (Oxyfume-30) foi realizada na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP) sob as seguintes condições: vácuo de 400 mmHg, tempo de exposição das amostras ao gás de 8 horas, pressão de 0,5 kgf/cm², umidade entre 40 e 50%, temperatura de 40°C e aeração de três trocas com nitrogênio. Antes de sua utilização, as amostras esterilizadas foram armazenadas por um período mínimo de 72 horas, conforme recomendação da empresa

de esterilização. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens apropriadas constituídas por uma face plástica e outra de papel, fornecidas pela própria empresa de esterilização, sendo seladas à quente.

A terceira técnica de esterilização avaliada foi realizada no Instituto de Pesquisas e Energia Nuclear (IPEN, São Paulo, SP) através da exposição das amostras à radiação gama por 5 horas (taxa constante de 5 kGy/h), totalizando uma dose de 25 kGy. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens plásticas, que foram seladas à quente.

As membranas, antes e após a esterilização, foram avaliadas quanto às características de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV), quanto ao comportamento mecânico (resistência mecânica e ductilidade) e com relação à citotoxicidade (indireta e direta) visando a detecção do possível efeito de resíduos tóxicos decorrentes do preparo e da esterilização das membranas. O fluxograma de realização deste conjunto de ensaios pode ser visualizado na Figura 3.1.

3.2.3. Avaliação do tempo para a eliminação dos resíduos do processo de esterilização quando utilizado o óxido de etileno como agente esterilizante

Foram realizados ensaios para a determinação do tempo mínimo de armazenamento das membranas para que fossem atingidos os limites máximos de resíduos irritantes resultantes da esterilização com o óxido de etileno (o próprio óxido de etileno residual, a etilenocloridrina e o etilenoglicol) em dispositivos que entram em contato com o sangue, como é o caso de curativos utilizados em queimaduras, conforme determinado pela Portaria Interministerial nº 482 (1999).

Os materiais foram avaliados depois de transcorridas seis e doze horas do processo de esterilização. Para isto, as membranas esterilizadas (2 x 1 cm²) foram pesadas e colocadas em frascos fechados contendo 1 mL de água destilada. Após 90 minutos de agitação constante, foram realizadas as análises cromatográficas dos resíduos utilizando-se um cromatógrafo a gás modelo CG-37 equipado com dois detectores de ionização de chama, uma coluna CG nº 5122 (Porapak Q – 1,8 m de vidro), uma coluna CG nº 5152 (3% OV 225 chr 101 – 1,8 m de vidro) e um integrador/processador CG-300. Esta análise foi realizada na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda.

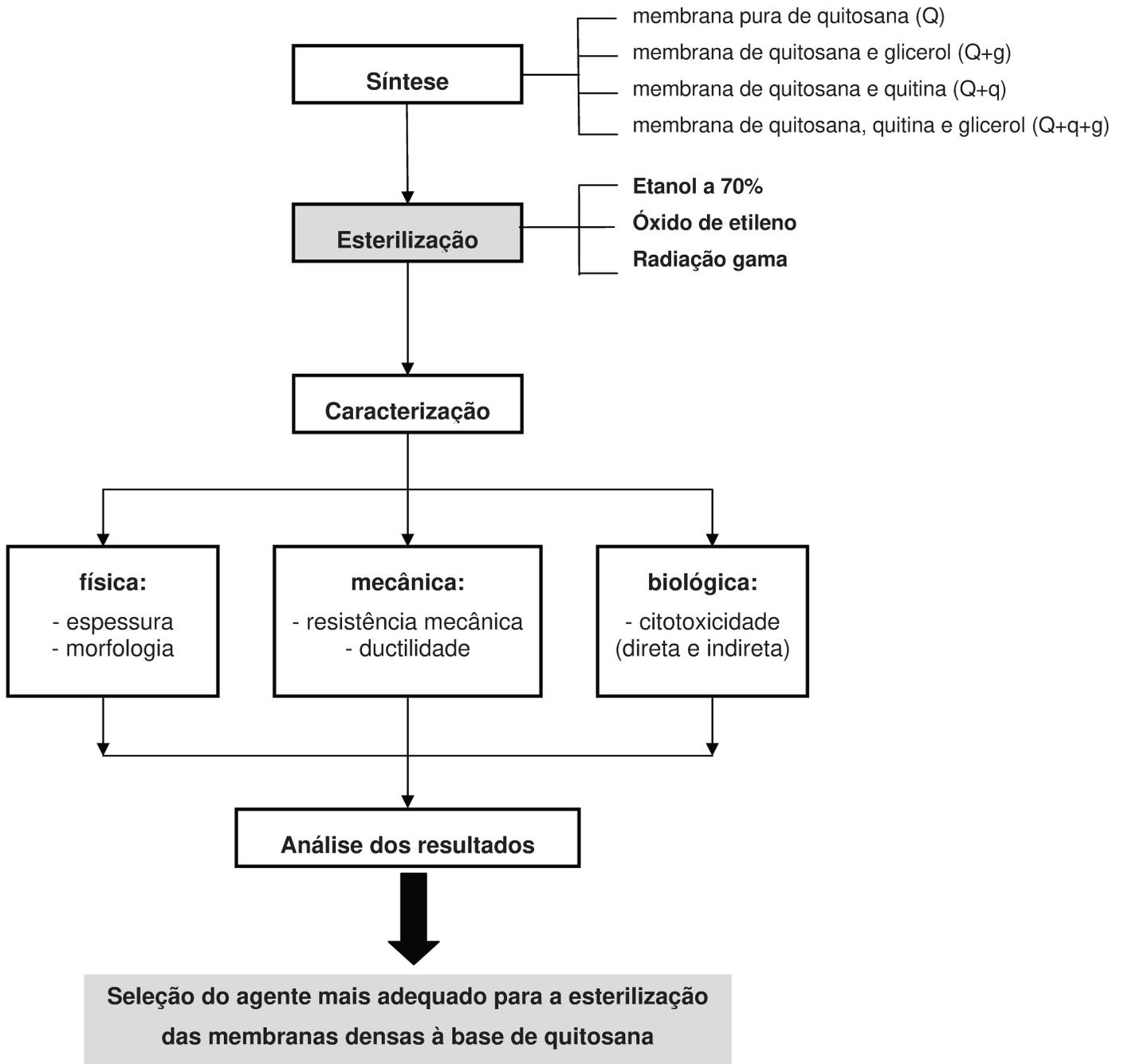


Figura 3.1 – Fluxograma dos ensaios de estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana.

3.2.4. Determinação do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel

Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de planejamento estatístico descritas por Barros Neto e col. (2002) para o estudo da influência da composição nas características de membranas densas à base de quitosana.

Para a síntese das membranas densas foram selecionadas como variáveis de estudo as quantidades e os tipos de matérias-primas utilizadas, mantendo-se as condições de processo constantes. Os níveis estabelecidos para as variáveis são sumarizados na Tabela 3.1. Deve-se salientar que os ensaios do ponto central (média de cada uma das variáveis em estudo) foram realizados em triplicata, visando a determinação do erro associado aos experimentos.

Tabela 3.1 – Planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais e as respectivas massas por membrana de solução de quitosana contendo ou não outros componentes, mantendo-se constante a quantidade de sólidos totais no sistema em 1,125 g.

Ensaio	Variáveis de estudo*			Massa total de solução/membrana (g)
	Quitosana	Quitina	Glicerol	
1	1,0%	0%	0%	112,50
2	2,5%	0%	0%	45,00
3	1,0%	0,5%	0%	75,00
4	2,5%	0,5%	0%	37,60
5	1,0%	0%	0,5%	75,00
6	2,5%	0%	0,5%	37,60
7	1,0%	0,5%	0,5%	56,25
8	2,5%	0,5%	0,5%	32,14
9	1,75%	0,25%	0,25%	50,00
10	1,75%	0,25%	0,25%	50,00
11	1,75%	0,25%	0,25%	50,00

*porcentagens mássicas dos reagentes nas soluções de partida.

As variáveis-resposta deste planejamento estatístico foram o custo das membranas, as espessuras nos estados seco e úmido, o grau de hidratação em água destilada e em tampão PBS, a resistência mecânica, a ductilidade e a degradação enzimática. As membranas também foram caracterizadas quanto à morfologia de suas superfícies e seções transversais, cristalinidade, adesão, proliferação celular e estabilidade em soluções aquosas. A composição com características mais adequadas para uso na função destinada foi ainda caracterizada quanto à permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio. O fluxograma para a realização deste conjunto de ensaios pode ser visualizado na Figura 3.2.

Deve-se salientar que após os ensaios de estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas, definiu-se o óxido de etileno como o agente mais apropriado para a esterilização das membranas densas à base de quitosana, sendo este, portanto, utilizado no decorrer do restante do trabalho.

3.2.5. Caracterização das membranas e de seus componentes

Neste item são abordadas as técnicas que foram empregadas na caracterização das membranas e de seus componentes, utilizadas tanto no estudo do efeito da esterilização nas características dos materiais quanto na determinação do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel.

3.2.5.1. Diâmetro das partículas de quitina

Algumas das membranas densas sintetizadas neste trabalho têm em sua composição a matéria-prima quitina. Uma vez que o diâmetro das partículas de quitina é uma variável importante para a caracterização do material, sua determinação foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP) em espectrofotômetro de espalhamento de laser (Malvern, modelo S – MAM 5005 Mastersizer S), ajustado para análise de materiais polidispersos suspensos em água.

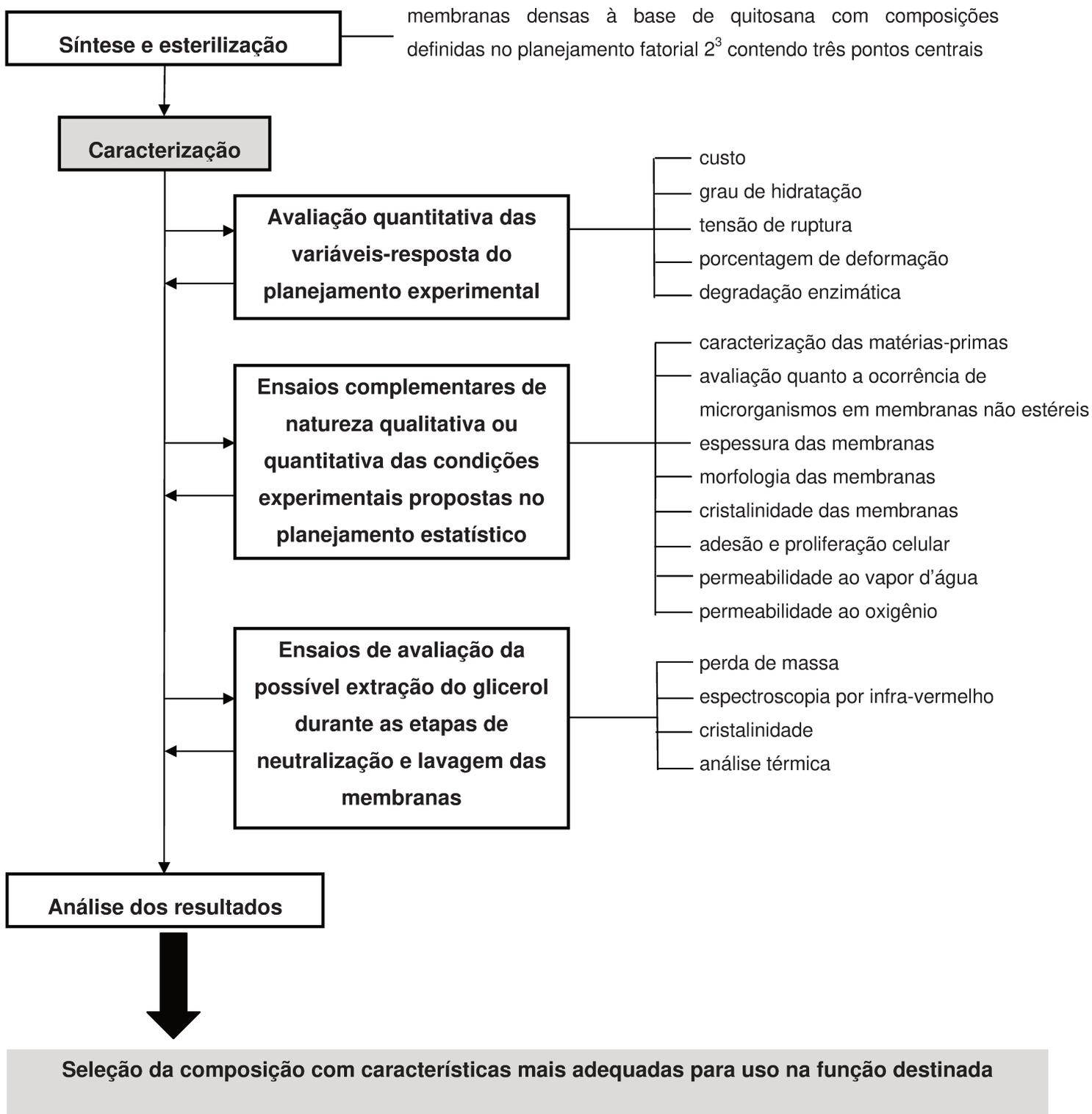


Figura 3.2 – Fluxograma dos ensaios de determinação do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel.

3.2.5.2. Avaliação da ocorrência de microrganismos contaminantes em membranas não estéreis

A fim de se verificar a carga contaminante inicial de microrganismos, bem como a necessidade de esterilização das membranas densas à base de quitosana, foram realizados ensaios de incubação direta dos materiais não estéreis nos meios de cultura caseína-soja e tioglicolato fluido.

A incubação dos materiais no meio de cultura caseína-soja foi realizada buscando o possível crescimento de leveduras, fungos e microrganismos aeróbicos. Já o meio tioglicolato fluido foi utilizado visando o possível crescimento de principalmente microrganismos anaeróbicos embora também possa ocorrer o crescimento de microrganismos aeróbicos, leveduras e até mesmo, fungos. Assim, as membranas (2 x 1 cm²) foram incubadas em estufa para cultura bacteriológica (Olidex CZ) por 14 dias à temperatura de 20 - 25°C no caso do meio caseína-soja, e à temperatura de 30 - 35°C, no caso do meio de tioglicolato fluido, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (4ª Edição, 1988). O crescimento de microrganismos foi considerado como existente quando se verificava a turvação dos meios de cultura. Estes ensaios foram realizados na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio de Indústria Ltda.

3.2.5.3. Espessura das membranas

A espessura das membranas foi determinada pela utilização de um micrômetro digital (Digimess modelo 110.200 com precisão de 0,01 mm) por quatro medições, de 90 em 90°, ao longo da extensão da membrana.

3.2.5.4. Grau de hidratação das membranas

Visando a determinação da capacidade de absorção de líquidos, ou seja, do grau de hidratação das membranas, as mesmas foram cortadas nas dimensões de 1 x 6 cm², secas, pesadas em balança analítica, esterilizadas com Oxyfume-30 e expostas aos solventes água destilada (pH 3,05) e tampão PBS (pH 7,4) por 24 horas à temperatura de 37°C. Após este período, as membranas foram secas à temperatura ambiente, sob compressão entre duas folhas de papel de filtro por um minuto, e imediatamente pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o

ensaio forneceram os resultados referentes aos graus de hidratação dos materiais. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.5.5. Propriedades mecânicas

O comportamento mecânico das membranas durante o ensaio de tensão *versus* deformação foi determinado com base no método ASTM D 882-95A (1995), que engloba a determinação de propriedades mecânicas de plásticos na forma de membranas, incluindo filmes com espessura inferior a 1,0 mm, entretanto, algumas adequações quanto às dimensões das amostras e quanto à forma de acondicionamento dos corpos de prova foram realizadas.

Devido ao custo do material, foram utilizados corpos de prova com dimensões inferiores ao estabelecido na norma-base, que descreve três parâmetros de controle das amostras: comprimento, largura e a relação largura/espessura. De acordo com a norma, o comprimento dos corpos de prova deve ser, no mínimo, 50 mm maior que a distância estabelecida entre as garras do equipamento; a largura nominal das amostras deve estar compreendida entre cinco e 25,4 mm e, a relação entre a largura e a espessura das mesmas não deve ser inferior a oito. Quanto ao acondicionamento das amostras, a norma descreve a manutenção das mesmas por um período mínimo de 40 horas em atmosfera com umidade de 50%. Tal valor foi ultrapassado no presente estudo, visando a simulação de condições quando da lesão de pele por queimaduras, uma vez que a quantidade de fluidos corpóreos na região lesada é muito elevada. Para isto, os corpos de prova foram imersos durante um período de 24 a 30 horas em tampão PBS estéril, à temperatura ambiente, antes da realização dos ensaios mecânicos.

Os corpos de prova utilizados nos ensaios de estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas foram obtidos pela compressão dos materiais contra um molde metálico Tipo I, conforme mostrado na Figura 3.3. Para os ensaios definidos no planejamento estatístico para a determinação do efeito da composição nas características das membranas obtidas pelo método sol-gel, foi utilizado um outro molde metálico, de largura superior ao anterior (conforme ilustrado na Figura 3.4), devido ao rompimento das membranas quando do uso do molde metálico Tipo I.

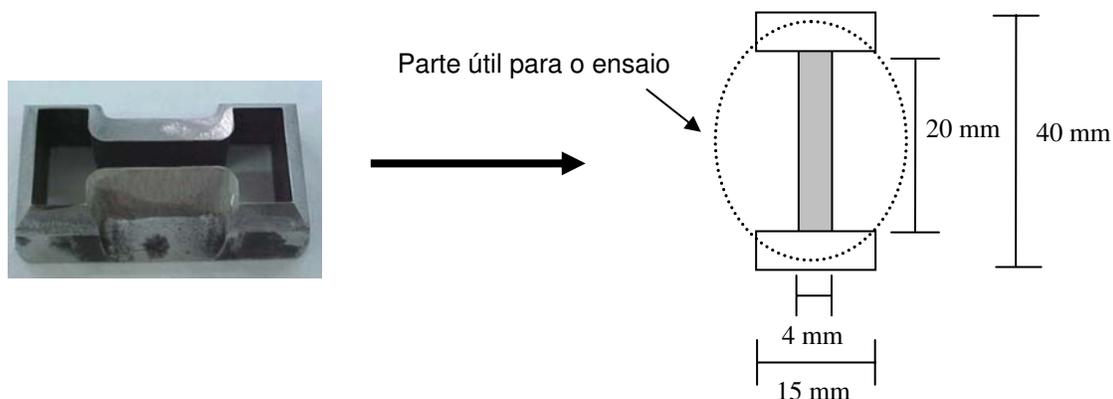


Figura 3.3 – Molde metálico tipo I construído para o corte dos corpos de prova utilizados no ensaio mecânico de tensão *versus* deformação.

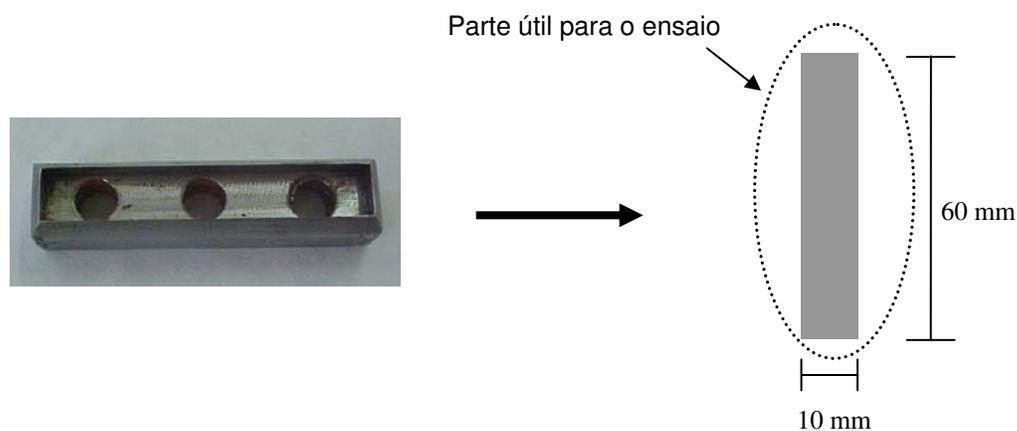


Figura 3.4 – Molde metálico alternativo utilizado para o corte das membranas de quitosana para a realização do ensaio mecânico de tensão *versus* deformação.

Antecedendo o início dos ensaios, as amostras tiveram suas espessuras medidas no ponto central dos corpos de provas, conforme descrito anteriormente.

Para a realização do ensaio mecânico de tensão *versus* deformação, o corpo de prova foi fixado nos cabeçotes da Máquina Universal de Ensaio e alongado a uma taxa de deformação constante, produzindo desta forma, forças longitudinais que foram controladas no medidor de carga da mesma. Obteve-se assim, uma curva de força *versus* deformação que foi utilizada como base para a obtenção da curva de tensão *versus*

porcentagem de alongamento. Tal conversão foi realizada para que houvesse independência entre os resultados obtidos e as dimensões dos corpos de prova. Através deste ensaio, foram obtidos dados relativos à resistência mecânica (medida da capacidade em suportar carga até a ruptura) e à ductilidade (capacidade de deformação permanente anterior à fratura) dos materiais referente ao seu estiramento.

A caracterização mecânica das membranas densas 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.

3.2.5.6. Citotoxicidade indireta

Em termos biológicos, sabe-se que um curativo ideal não deve liberar produtos tóxicos e nem mesmo causar reações adversas, o que pode, em primeira instância, ser avaliado através de testes de citotoxicidade *in vitro*.

Para este ensaio foi utilizada uma cultura de células Vero (fibroblastos provenientes de macacos da espécie *Cercopithecus aethiops*). De acordo com a literatura pesquisada (ISO 10993-5E, 1992 e Kirkpatrick, 1992), esta linhagem é recomendada para os estudos de citotoxicidade e de interações entre biomateriais e células. O meio de cultura utilizado foi o Ham-F10 suplementado com 10% de SFB. A técnica empregada no ensaio de citotoxicidade indireta, desenvolvida por Mosmann (1983), utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo), que é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas, formando o precipitado azul denominado *formazan*, detectável espectrofotometricamente.

Inicialmente, extratos das membranas foram obtidos após a manutenção das mesmas no meio de cultura Ham-F10 contendo 10% de SFB durante 48 horas à temperatura de 37°C em estufa para cultura de células (Microprocessador CO₂ incubator, Lab-Line), a uma concentração de 0,2 g de material seco por mililitro de meio de cultivo, conforme estipulado pela ISO 10993-5E (1992). Paralelamente, 100 µL de uma suspensão contendo 1x10⁵ células/mL de meio Ham-F10 suplementado com 10% de SFB foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços (Iwaki), que foi mantida por 24 horas à temperatura de 37°C em estufa para cultura de células. Após este período, os

sobrenadantes foram retirados; 100 μ L dos extratos das membranas foram adicionados em cada poço e a placa foi mantida novamente em estufa por 24 horas à temperatura de 37°C. Os extratos foram então removidos e cada poço foi lavado duas vezes com 100 μ L de tampão PBS estéril. Após esta lavagem, foram adicionados em cada poço, 100 μ L de meio de cultura contendo 10% de SFB seguida da adição de 10 μ L de uma solução de MTT a 5 mg/mL de tampão PBS estéril. A placa foi mantida em estufa à temperatura de 37°C por quatro horas e após este período, foram adicionados 100 μ L de isopropanol ácido (30 μ L de HCl em 10 mL de isopropanol) em cada poço. Após incubação por uma hora, a leitura das absorvâncias foi feita em espectrofotômetro de placas ELISA (Packard Bioscience Company Fusion contendo o Software Fusion Robotics Interface) a 540 nm.

Foram utilizados como controles negativo e positivo o extrato de fragmentos da própria placa de cultura de células e uma solução de fenol a 0,5%, respectivamente. Os valores médios de absorvância de cada uma das condições experimentais foram obtidos da média de oito amostras e a análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o teste t-Student.

3.2.5.7. Citotoxicidade direta, adesão e proliferação celular

A metodologia utilizada para a realização dos ensaios de citotoxicidade direta, adesão e proliferação celular foi a mesma, diferindo apenas no tempo de incubação dos materiais com as células. Para os ensaios de adesão e citotoxicidade, os tempos de incubação foram de duas e vinte e quatro horas, respectivamente. Já para os ensaios de proliferação celular, acompanhou-se o crescimento celular por aproximadamente dez dias.

Assim como para o ensaio de citotoxicidade indireta, para a realização dos ensaios de citotoxicidade direta, adesão e proliferação celular foi utilizada uma cultura de células Vero e o ensaio colorimétrico empregando-se o reagente MTT. Estes ensaios tiveram por objetivo o estudo do comportamento das células Vero quando do contato direto com as membranas.

Para a realização destes ensaios, primeiramente, as membranas (amostras com 6 ou 7 mm de diâmetro) previamente esterilizadas foram incubadas em placas de 96 poços contendo meio de cultura Ham-F10 sem SFB durante 24 horas à temperatura de

37°C em estufa para cultura de células. Após este período, o meio foi retirado e em cada poço foram adicionados 100 µL de uma suspensão contendo 2×10^5 células/mL de meio Ham-F10 suplementado com 10% de SFB. O sistema foi mantido à temperatura de 37°C em estufa para cultura de células pelo tempo desejado (24 horas para o teste de citotoxicidade, duas horas para o ensaio de adesão e por 24 horas ou mais para a avaliação da proliferação celular) quando então, os sobrenadantes foram retirados e os poços lavados (duas vezes) com 100 µL de meio Ham-F10 contendo ou não 10% de SFB. Após a lavagem, foram adicionados 200 µL de meio Ham-F10 contendo 10% de SFB e 10 mM de tampão HEPES (pH 7,4) em cada poço seguida da adição de 50 µL de MTT a 5 mg/mL de tampão PBS estéril. As placas foram então envoltas em papel alumínio e mantidas por quatro horas à temperatura de 37°C em estufa para cultura de células. A etapa seguinte consistiu na retirada dos sobrenadantes e lavagem dos poços (três vezes) com tampão PBS. A extração e solubilização do produto formado (*formazan*) foram realizadas pela adição, em cada poço, de 200 µL de DMSO seguida de 25 µL de tampão glicina Sorensen (glicina a 0,1 M contendo NaCl a 0,1 M equilibrado para pH 10,5 com NaOH a 0,1 M). Foram então transferidos 180 µL das soluções contidas em cada poço para uma nova placa e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de placas ELISA a 540 nm. Os valores médios de absorbância de cada uma das condições experimentais foram obtidos da média de oito amostras e a análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o teste t-Student.

Deve-se salientar que inicialmente, empregou-se o isopropanol ácido para a extração e solubilização do *formazan*, conforme descrito no ensaio de citotoxicidade indireta (item 3.2.5.6). Entretanto, pelo fato do reagente DMSO mostrar-se mais eficiente nesta etapa do processo, deu-se preferência por sua utilização nos ensaios posteriores.

Como controles negativo e positivo de citotoxicidade direta foram utilizados a própria placa de cultura de células e um material conhecidamente citotóxico (no caso, um adesivo de silicone utilizado para a vedação de embarcações), respectivamente. No caso do ensaio de adesão, como controles negativo e positivo foram utilizados discos de Teflon® e a própria placa de cultura de células, respectivamente. Para o ensaio de proliferação celular, a própria placa de cultura de células foi utilizada como controle positivo, não sendo utilizado um controle negativo.

3.2.5.8. Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas

A morfologia da superfície e da seção transversal de membranas não expostas às células Vero foi analisada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Leica, modelo LEO 440i. Para a realização deste ensaio, as membranas foram cortadas na dimensão de 5 x 5 mm². Para a obtenção das imagens, as amostras foram primeiramente liofilizadas, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) pela deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies. Deve-se ressaltar que, para a análise da seção transversal das membranas, as mesmas foram fraturadas utilizando-se nitrogênio líquido.

3.2.5.9. Morfologia da superfície das membranas após exposição às células Vero

A morfologia da superfície das membranas após incubação na presença de células Vero foi analisada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia (IB/UNICAMP) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Jeol, modelo JSM-5800 LV. Para a realização deste ensaio, células Vero a uma concentração de 2×10^5 células/mL de meio de cultura Ham-F10 suplementado com 10% de SFB foram cultivadas sobre a superfície dos materiais estéreis (membranas com diâmetro de 7 mm) em placas de cultura de células de 96 poços (Corning Co., Cambrigne, MA, USA) durante 24 e 72 horas. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas com uma solução contendo 4% (v/v) de paraformaldeído e 2,5% (v/v) de glutaraldeído em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4. Posteriormente, as membranas foram lavadas por duas vezes com tampão fosfato, pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4 por 15 minutos e mantidas em geladeira. Após este período, as membranas foram lavadas por duas vezes com tampão fosfato, sendo o tempo de cada lavagem de dez minutos. Para a secagem em ponto crítico, as membranas foram desidratadas por uma seqüência de cinco imersões (15 minutos por imersão) em soluções alcoólicas: álcool etílico a 50; 70; 95; 100 e 100%. Para a obtenção das imagens, as amostras foram levadas ao ponto crítico (Balzers CPDO 030), fixadas em um suporte adequado e metalizadas (Balzers 050) pela deposição de uma fina camada de ouro em suas superfícies. Como controles positivos de adesão e de proliferação celular foram utilizadas lâminas de vidro.

As morfologias das superfícies das membranas translúcidas (ensaios 1, 2, 5 e 6 do planejamento estatístico) incubadas com as células Vero também foram avaliadas no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia (IB/UNICAMP) em microscópio invertido de contraste de fases (Olympus IX50) acoplado a um sistema fotográfico automático (Olympus PM20).

3.2.5.10. Cristalinidade das membranas

O espalhamento de raios-X é uma das técnicas mais antigas, porém ainda bastante utilizada no estudo da estrutura dos polímeros. As análises das membranas por difração de raios-X foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP) em um difratômetro de raios-X Phillips Analytical, modelo X'Pert PW 3050 sob as seguintes condições: voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, 2θ variando de 5 a 60°, velocidade de varredura de 0,05°/s, passo de 0,02°, radiação Cu- $k\alpha$ ($\lambda=1,5406 \cdot 10^{-10}$ m) e modalidade *spinning*. Para a realização dos ensaios, as amostras foram fixadas em um suporte metálico.

A cristalinidade das membranas densas à base de quitosana foi estimada pela medida da intensidade difratada relativa às regiões cristalinas (para 2θ de aproximadamente 20° nos casos estudados), com base no procedimento descrito por Signini e Campana Filho (2001) para a análise de quitosana. Para tal, tomou-se como linha base de referência o início e o final dos difratogramas e traçou-se uma reta perpendicular à linha base no ângulo 2θ , correspondente à máxima difração verificada.

3.2.5.11. Estabilidade em soluções aquosas

Para a realização do ensaio de estabilidade em soluções aquosas, foram sintetizadas 12 membranas em cada condição experimental descrita no planejamento estatístico proposto neste trabalho, utilizando-se um grama de solução. Destas, seis foram imersas em solução de hidróxido de sódio após a etapa de secagem na estufa formando-se assim, dois conjuntos de membranas: um que sofreu o processo de neutralização pelo tratamento dos materiais com NaOH e outro que não passou por este tratamento. Tal procedimento teve como objetivo o estudo da estabilidade das

membranas de quitosana quando do contato com a água destilada e com o tampão PBS quando as mesmas são neutralizadas ou não com uma solução de NaOH a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente. Antes do ensaio, as membranas foram pesadas em balança analítica e após o contato com o solvente (água destilada ou tampão PBS) as membranas foram lavadas (três vezes) com água destilada, secas por 24 horas em estufa à temperatura de 50°C e novamente pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas em soluções aquosas. O registro do aspecto das membranas após o contato com os solventes água destilada e tampão PBS foi efetuado através de uma máquina fotográfica digital.

3.2.5.12. Degradação enzimática

A metodologia empregada utilizou como base a norma ASTM F 1635-95, que se refere à degradação *in vitro* de resina de poliácido láctico utilizada em aplicações cirúrgicas.

As membranas secas foram cortadas na dimensão de 1 x 1 cm², pesadas em balança analítica e esterilizadas utilizando-se o óxido de etileno (Oxyfume-30). As membranas estéreis foram então, isoladamente, colocadas em placas de 24 poços (Corning Co., Cambrigne, MA, USA) e, em cada poço, adicionou-se 3 mL de uma solução de lisozima a 5 mg/mL de tampão fosfato estéril, pH 7,4. As amostras foram incubadas por até dois meses à temperatura de 37°C em estufa umidificada de cultura de células (Microprocessor CO₂ incubator, Lab-Line). A cada 30 dias, um lote de amostras foi analisado. Para tal, as membranas foram lavadas (três vezes) com água destilada, secas por 24 horas em estufa a 50°C e pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação enzimática das membranas. Deve-se salientar que o ensaio foi realizado em triplicata e que para cada condição avaliada foi realizado um ensaio controle que correspondeu à exposição das membranas somente ao tampão fosfato.

3.2.5.13. Permeabilidade ao vapor d'água

A taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) das membranas de quitosana, assim como da membrana comercial Omiderm®, foi determinada para a condição de 35°C/40%UR, conforme proposto por Mi e col. (2001) e por Wu e col. (2004), por meio do método gravimétrico, baseado na metodologia ASTM E 96-00. Este ensaio foi realizado no Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP, Brasil).

O método utilizado consistiu no preenchimento de uma cápsula de alumínio com água deionizada, fixação da membrana-teste no topo desta cápsula, pesagem do sistema e manutenção no mesmo em ambiente com temperatura e umidade controladas. A taxa de permeabilidade do filme ao vapor d'água foi determinada a partir da redução da massa do sistema devido à passagem do vapor d'água pela membrana-teste do interior da cápsula para o ambiente de acondicionamento. A área efetiva de permeação de cada corpo de prova foi de 50 cm², a qual foi determinada pela própria dimensão da célula de difusão. O acondicionamento das cápsulas de alumínio foi realizado em uma câmara Vötsch – VC0033, com controle de temperatura a 35°C e umidade relativa de 40% UR. A perda de massa do sistema, devido à passagem do vapor d'água para o ambiente de acondicionamento, foi quantificada em balança analítica (Mettler AT 400, resolução de 10⁻⁴ g) até que fosse atingido o equilíbrio.

Com os dados de perda de massa e com o tempo de ensaio, foram construídas curvas, nas quais a região linear correspondente ao equilíbrio foi ajustada a uma reta. O coeficiente angular desta reta foi dividido pela área de permeação e assim, associado à taxa de permeabilidade das membranas ao vapor d'água, na temperatura e umidade relativa do ensaio. Deve-se ressaltar que a determinação da permeabilidade dos filmes ao vapor d'água foi realizada com os mesmos em seus estados úmidos após dez minutos de imersão em água deionizada. Uma cápsula de difusão aberta foi utilizada para a simulação de uma pele humana com exudato (pele lesada) e não recoberta com um curativo. Além disso, uma cápsula de difusão vazia recoberta com o material analisado em seu estado úmido foi utilizada como ensaio controle, sendo o valor obtido deste ensaio subtraído do obtido para cada membrana.

3.2.5.14. Permeabilidade ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) das membranas de quitosana, assim como da membrana comercial Omiderm® foi determinada segundo o procedimento descrito na norma ASTM F 1927 e realizado no Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP, Brasil).

O equipamento utilizado foi o Oxtran (Mocon 2/20), sendo os corpos-de-prova fixados nas células de difusão de gás do aparelho. Inicialmente, a umidade relativa das amostras foi de 30% UR na face externa e 90% UR na face interna, sendo o ensaio finalizado a 65% UR na face externa e 93% UR na face interna. Durante a realização do ensaio, o fluxo de gás de arraste (mistura de nitrogênio e hidrogênio) foi mantido a 20 mL/min em um dos lados do filme, e do outro, foi mantido um fluxo de oxigênio puro de 40 mL/min à temperatura de 35°C. Apesar do uso de membranas com área superficial superior a 150 cm², a área efetiva de permeação de cada corpo-de-prova foi de 5 cm² devido à necessidade de uso de um dispositivo para a fixação das amostras no equipamento. Não houve acondicionamento dos corpos de prova e os resultados obtidos foram corrigidos para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio, pelo próprio equipamento, que tem um sensor de pressão barométrica conectado à estação de trabalho e expressos em cm³(CNTP)/m².dia a 35°C e 1 atm.

3.2.5.15. Decomposição térmica das membranas

Foram realizadas análises termogravimétricas das membranas compostas somente por quitosana e por quitosana e glicerol visando a detecção da possível extração do glicerol durante e após as etapas de neutralização e lavagem dos materiais. Esta mesma técnica foi utilizada para a caracterização do comportamento térmico das matérias-primas utilizadas neste trabalho: a quitina, a quitosana e o glicerol. Para isto, utilizou-se o analisador termogravimétrico Shimadzu TGA 50 do Departamento de Termofluidodinâmica (DTF) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP). O aquecimento foi feito na velocidade de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio (20 mL/min), utilizando-se aproximadamente 5 mg de amostra, em uma faixa de temperatura que variou desde a ambiente até 400°C para a análise do glicerol e até 900°C para as demais análises. As amostras que foram analisadas por espectrometria por dispersão de energia de raios-X (EDX) foram primeiramente avaliadas por análise termogravimétrica. Neste caso, a quantidade de amostra utilizada foi de aproximadamente 10 mg.

3.2.5.16. Técnicas alternativas de detecção de glicerol nas membranas

Visando ainda a obtenção de informações sobre a possível extração do glicerol das membranas durante e após as etapas de neutralização e lavagem dos materiais foram utilizadas as seguintes técnicas de caracterização: infravermelho por transformada de Fourier acoplada a reflectância total atenuada (FTIR – ATR), análise dinâmico-mecânica (DMA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Pela análise de FTIR-ATR foram obtidos espectros das membranas compostas somente por quitosana ou por quitosana e glicerol em seus estados seco e úmido utilizando-se o equipamento FT-IR da Perkin Elmer modelo Lambda 9 do Departamento de Processos Biotecnológicos (DPB) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP) em uma faixa de comprimento de onda de 4000 a 450 cm^{-1} . A análise de DMA foi realizada no Departamento de Materiais (DEMA) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP), utilizando-se o equipamento Netzsch DMA 242. A análise por DSC foi realizada no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) utilizando-se o calorímetro Mettler Toledo, modelo DSC 822e. A faixa de operação de temperatura foi de -65°C a 700°C e a faixa de medição foi de $\pm 350 \text{ mW}$.

3.2.5.17. Determinação de elementos inorgânicos

A presença de elementos inorgânicos nas matérias-primas quitosana e quitina e nas membranas de quitosana foi analisada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP) por espectrometria por dispersão de energia de raios-X (EDX) em microscópio Leica, modelo LEO 440i acoplado ao integrador de EDX (Link Isis, modelo 7060 da Oxford). Para a obtenção das imagens, as amostras foram liofilizadas, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) pela deposição de uma fina camada de carbono (Bal-Tec) em suas superfícies.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das matérias-primas

A fim de se obter informações sobre as matérias-primas utilizadas neste trabalho, as mesmas foram caracterizadas empregando-se quatro diferentes técnicas: espectroscopia de espalhamento de laser, difração de raios-X, espectroscopia por dispersão de energia de raios-X e análise termogravimétrica, sendo os resultados obtidos detalhadamente descritos nos itens a seguir.

4.1.1. Determinação do diâmetro das partículas de quitina

Sabendo-se que a quitina, diferentemente da quitosana, é insolúvel em soluções ácidas diluídas, e que, portanto, se faria presente nas membranas sob a forma de partículas, fez-se pertinente a determinação do diâmetro destas partículas, que foi realizada por espectroscopia de espalhamento de laser.

Os resultados obtidos mostraram que as partículas de quitina utilizadas na obtenção das membranas densas à base de quitosana são monodispersas, apresentando diâmetro médio de $256,18 \pm 0,65 \mu\text{m}$, não sendo observados diâmetros superiores a $1000 \mu\text{m}$. Um perfil típico de distribuição de diâmetro destas partículas pode ser visualizado na Figura 4.1.

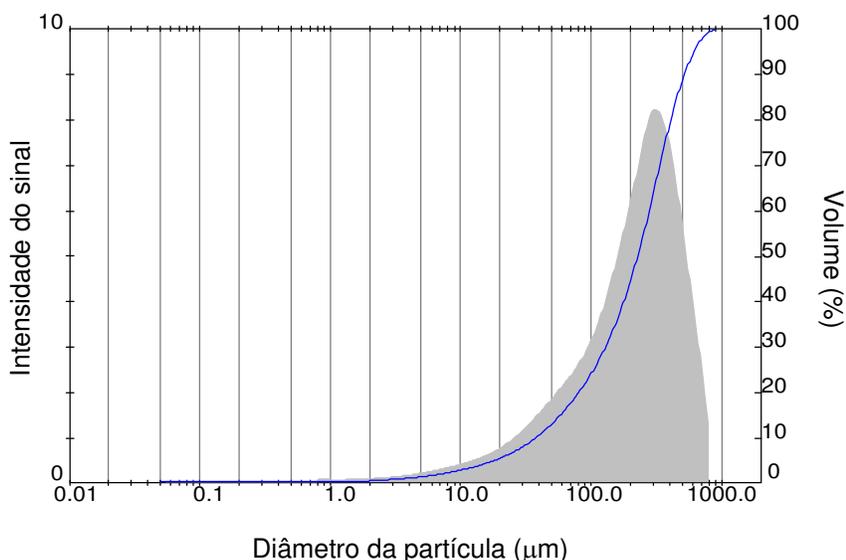


Figura 4.1 – Perfil típico de distribuição de diâmetro das partículas de quitina determinado por espectroscopia de espalhamento de laser.

4.1.2. Determinação da cristalinidade da quitina e da quitosana

A caracterização das matérias-primas quitina, quitosana e glicerol quanto à cristalinidade se faz de grande relevância, uma vez que a ela estão associadas diversas propriedades importantes das membranas como, por exemplo, a solubilidade em soluções aquosas, o grau de hidratação, as propriedades mecânicas e a degradação enzimática (Tomihata e Ikada, 1997), facilitando assim, o entendimento dos comportamentos apresentados pelos materiais quando da realização dos ensaios físicos, mecânicos e biológicos.

A fim de se caracterizar os polissacarídeos utilizados neste trabalho, foram realizados ensaios de difração de raios-X para a obtenção de informações sobre as estruturas das matérias-primas quitina em pó e quitosana em flocos. Os difratogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 4.2.

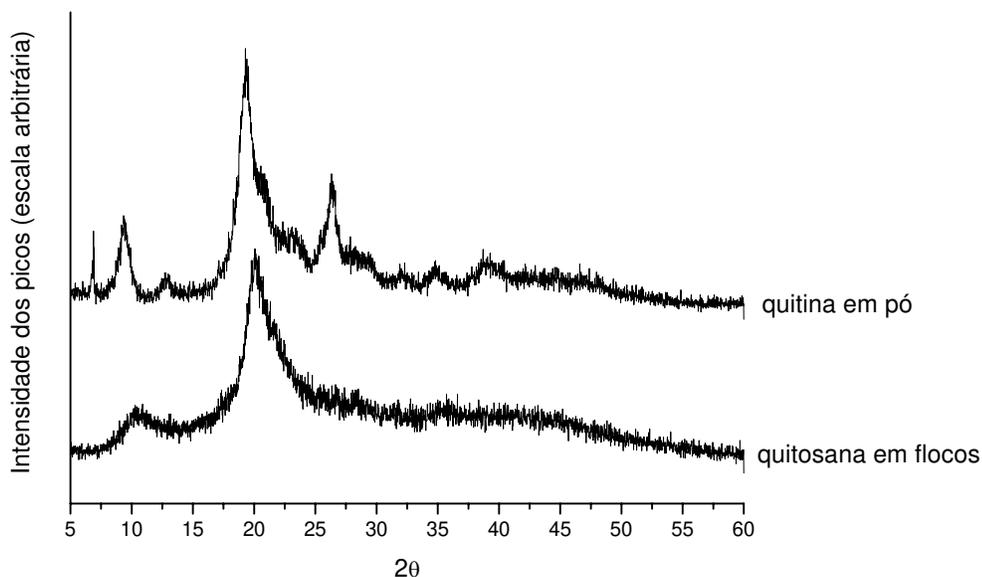


Figura 4.2 – Difratogramas de raios-X da quitina em pó e da quitosana em flocos utilizadas neste trabalho para a obtenção das membranas densas à base de quitosana.

Conforme descrito na literatura (Senel e McClure, 2004; Kurita, 2001; Madihally e Matthew, 1999; Tomihata e Ikada, 1997) e ilustrado na Figura 4.2, os polissacarídeos quitina e quitosana são polímeros semicristalinos, já que apresentam em seus difratogramas de raios-X, picos definidos. No caso da quitosana, foi observado um pico bem definido em 2θ igual a 20° e um outro pico menos definido em 2θ igual a $10,6^\circ$, valores estes que corroboram com os obtidos por Xu e col. (2005). Já para o caso da quitina, foram observados três picos bem definidos em 2θ igual a $9,3^\circ$, $19,2^\circ$ e $25,5^\circ$. Deve-se ressaltar que não foi realizada a análise de difração de raios-X para o glicerol, entretanto segundo Cervera e col. (2004), este plastificante apresenta estrutura amorfa.

4.1.3. Avaliação quanto à presença de elementos inorgânicos na quitina e na quitosana

Sabendo-se que as matérias-primas quitina e quitosana utilizadas neste trabalho na síntese das membranas densas à base de quitosana são comercializadas sem prévia purificação e que o exoesqueleto de crustáceos possui minerais e corantes em sua composição (Kurita, 2001), fez-se pertinente a análise quanto à presença de elementos inorgânicos nestes polissacarídeos. As análises de espectrometria por dispersão de

energia de raios-X (EDX) obtidas podem ser visualizadas nas Tabelas 4.1 e 4.2. Deve-se ressaltar que foram avaliadas três diferentes amostras de cada matéria-prima.

Tabela 4.1 – Análise da quitina quanto à presença de elementos inorgânicos.

Elemento	Composição média de elementos inorgânicos (%)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Cálcio (Ca)	35,25 ± 2,95	32,29 ± 3,70	31,31 ± 1,77
Silício (Si)	23,77 ± 5,98	22,06 ± 0,97	24,57 ± 2,05
Sódio (Na)	17,26 ± 0,43	19,09 ± 2,59	18,04 ± 1,24
Fósforo (P)	7,26 ± 0,95	7,71 ± 0,88	7,98 ± 0,30
Magnésio (Mg)	4,70 ± 0,60	5,26 ± 0,35	5,55 ± 0,57
Cloro (Cl)	3,83 ± 0,45	4,88 ± 1,09	3,51 ± 0,47
Ferro (Fe)	3,68 ± 1,05	3,30 ± 0,60	3,10 ± 0,64
Potássio (K)	2,48 ± 0,91	2,69 ± 0,66	2,87 ± 0,73
Enxofre (S)	1,99 ± 0,52	2,71 ± 0,33	3,07 ± 1,30

Tabela 4.2 – Análise da quitosana quanto à presença de elementos inorgânicos.

Elemento	Composição média de elementos inorgânicos (%)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Cálcio (Ca)	53,56 ± 12,35	53,72 ± 13,01	51,84 ± 2,52
Sódio (Na)	29,70 ± 9,31	17,34 ± 13,70	34,34 ± 6,63
Cloro (Cl)	8,00 ± 1,90	10,19 ± 3,96	4,95 ± 3,65
Silício (Si)	4,99 ± 3,54	5,42 ± 1,76	6,96 ± 1,44
Fósforo (P)	3,76 ± 4,60	13,33 ± 8,21	1,32 ± 2,64

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 4.1 não mostrou diferenças significativas entre as composições das três amostras de quitina analisadas, em um intervalo de confiabilidade de 95%. Dentre os elementos inorgânicos presentes em maiores quantidades destacam-se, o cálcio, o silício e o sódio. A presença do cálcio, muito provavelmente, é decorrente do carbonato de cálcio (CaCO_3) presente no exoesqueleto dos crustáceos (Kurita, 2001), enquanto que o silício e o sódio podem ter sido extraídos do meio onde os crustáceos foram retirados (areia e água salgada). Os demais elementos (P, Mg, Cl, Fe, K e S) foram encontrados em pequenas proporções.

Assim como para a quitina, na análise estatística dos resultados mostrados na Tabela 4.2, não foram observadas diferenças significativas entre as composições das três amostras de quitosana analisadas, em um intervalo de confiabilidade de 95%. Para este polissacarídeo, foram encontrados os seguintes elementos inorgânicos em sua composição: cálcio, sódio, cloro, silício e fósforo. A presença de cálcio pode ser explicada, assim como no caso da quitina, como decorrência do carbonato de cálcio existente no exoesqueleto dos crustáceos. Já os elementos sódio e cloro foram identificados, muito provavelmente, como resíduos do próprio processo de obtenção da quitosana a partir da quitina, que utiliza hidróxido de sódio, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio (Queiroz e Craveiro, 1998). Os demais elementos (Si e P) foram encontrados em pequenas proporções.

4.1.4. Estudo da estabilidade térmica da quitosana, da quitina e do glicerol por análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das matérias-primas utilizadas neste trabalho foi determinada por análise termogravimétrica. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 4.3 a 4.5.

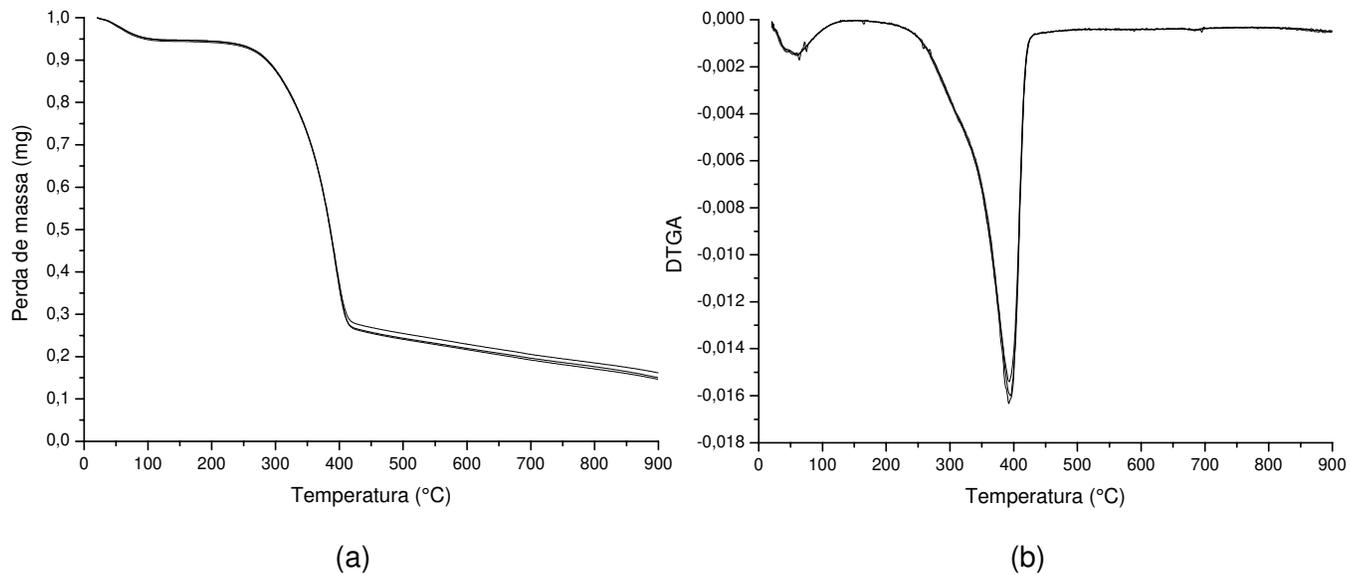


Figura 4.3 – Curvas termogravimétricas para a quitina em pó: (a) TG e (b) DTGA. Análise feita em triplicata.

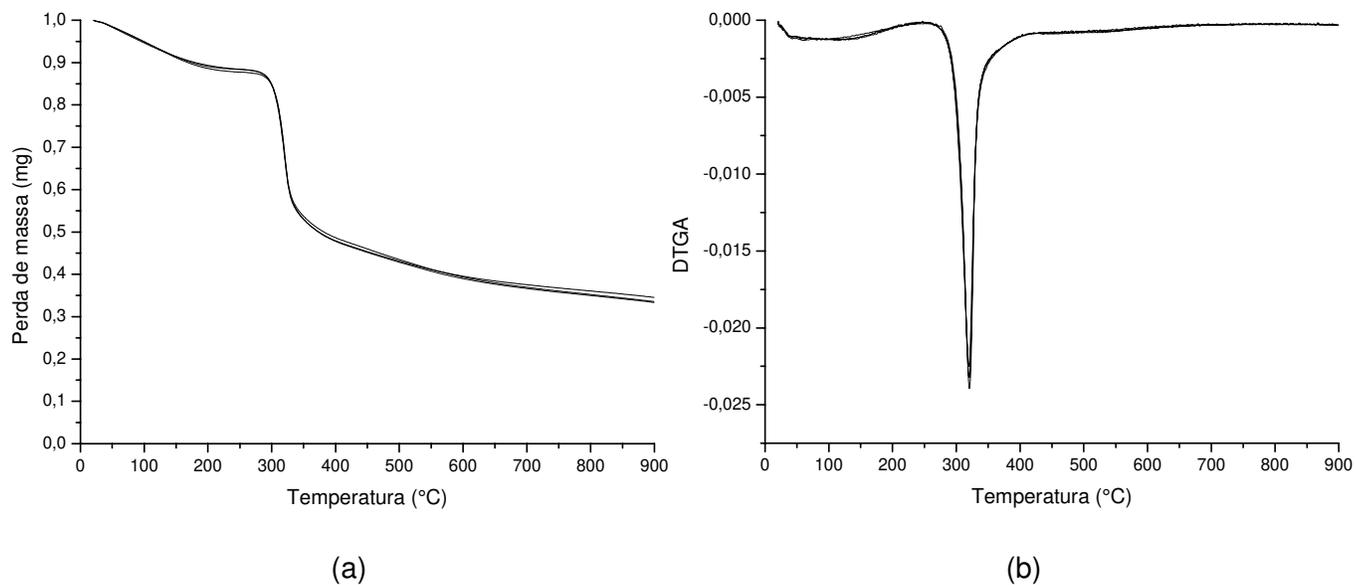


Figura 4.4 – Curvas termogravimétricas para a quitosana em flocos: (a) TG e (b) DTGA. Análise feita em triplicata.

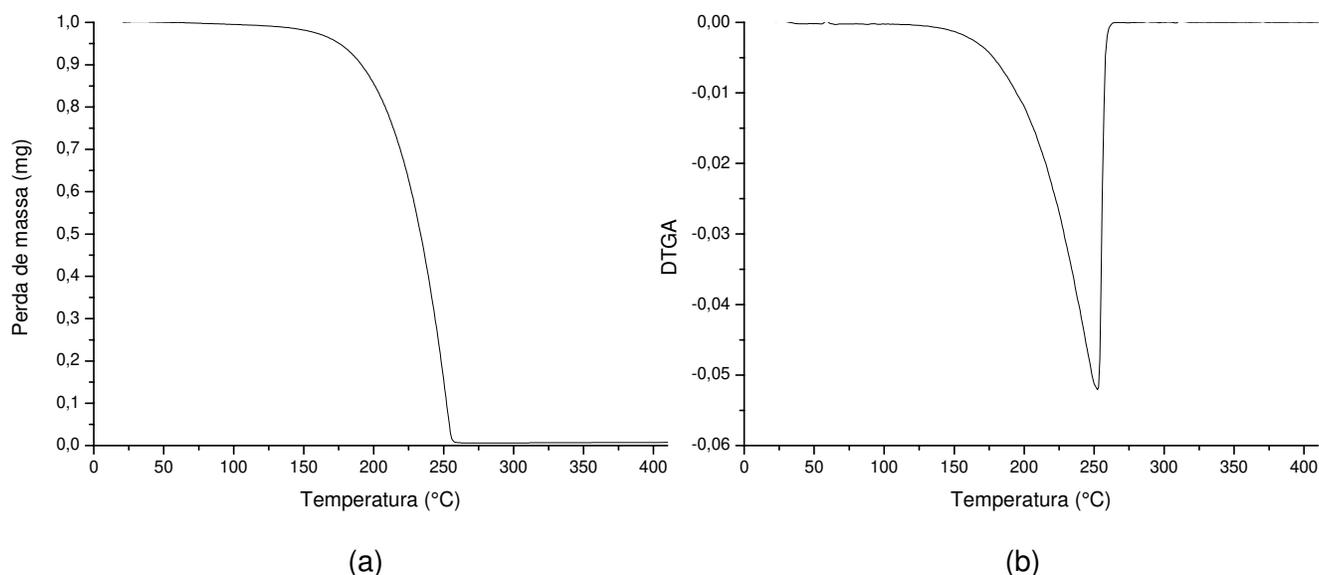


Figura 4.5 – Curvas termogravimétricas para o glicerol: (a) TG e (b) DTGA.

Os comportamentos de decomposições térmicas dos polissacarídeos quitina e quitosana (Figuras 4.3 e 4.4) corroboraram com os resultados descritos na literatura (Zohuriaan e Shokrolahi, 2003). Ambos os polissacarídeos apresentaram dois estágios de decomposição térmica. O primeiro deles ocorreu na faixa de temperatura de 60 a 125°C e corresponde à perda de água ainda contida na estrutura polimérica. O segundo e mais importante estágio de decomposição ocorreu na faixa de temperatura de 275 a 400°C para a quitina e na faixa de temperatura de 250 a 320°C para a quitosana, estando envolvidos neste estágio processos como a desidratação, depolimerização e decomposição pirolítica, as quais resultam da transformação da estrutura polissacarídea em compostos mais simples como a água, o dióxido de carbono, o metano e a amônia (Zohuriaan e Shokrolahi, 2003). A maior estabilidade térmica apresentada pela quitina sugere que a mesma está associada ao grau de acetilação da amostra, ou seja, está associada à presença dos grupamentos N-acetil e aos efeitos estruturais deles decorrentes. Já para o glicerol, a degradação térmica se fez em uma única etapa, iniciando na temperatura de 120°C e finalizando em 260°C.

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que, a fim de se minimizar a degradação das membranas à base de quitosana, o preparo das amostras deve ser realizado utilizando-se temperaturas inferiores àquela observada como a mínima na qual já se verifica a degradação de um dos componentes da membrana. No caso de membranas compostas somente por quitosana ou por quitosana e quitina, o processamento dos materiais deve ser realizado em temperaturas inferiores a 250°C,

temperatura na qual se inicia a decomposição térmica do polissacarídeo quitosana. Já para as membranas formadas por quitosana e glicerol ou por quitosana, quitina e glicerol, o processamento dos materiais deve ser realizado em temperaturas inferiores a 120°C, temperatura esta na qual se inicia a decomposição térmica do plastificante utilizado.

4.2. Ensaios preliminares de determinação das condições experimentais para a obtenção das membranas

Conforme já explicitado na revisão da literatura, muitas das etapas do processo de síntese e caracterização das membranas à base de quitosana não são descritas na literatura, destacando-se a ausência de dados das próprias condições de processo e das metodologias para a esterilização dos biomateriais. Assim, foram realizados diversos testes para o estabelecimento das condições a serem utilizadas na obtenção de membranas densas à base de quitosana.

A reprodução de muitos dos procedimentos descritos na literatura resultou na obtenção de amostras não adequadas para o uso. Dentre as principais dificuldades encontradas destacaram-se a obtenção de membranas que não se desprendiam dos moldes, obtidas quando da ausência da etapa de silanização das placas de Petri de vidro utilizadas na síntese de membranas densas; a obtenção de membranas enrugadas obtidas quando a etapa de secagem final era realizada sem prensagem e a obtenção de membranas com presença de bolhas de ar em suas estruturas quando a desaeração não era realizada, conforme ilustrado na Figura 4.6.



Figura 4.6 – Ilustrações de membranas densas de quitosana sintetizadas a partir de condições descritas na literatura, porém não apropriadas para o uso: (a) membranas que não se desprenderam dos moldes, enrolando-se após o tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 1 M, (b) membrana não plana e enrugada, após secagem à temperatura ambiente sem prensagem e (c) membrana com presença de bolhas, produzida a partir de uma solução não desaerada.

Depois de definidas as condições para a obtenção de membranas densas, explicitadas no item 3.2.1, foi iniciada a etapa de definição da técnica de esterilização a ser adotada ao longo do trabalho.

4.3. Avaliação da ocorrência de microrganismos contaminantes em membranas não estéreis

Conforme já mencionado ao longo deste trabalho, todo biomaterial deve ser esterilizado antes de sua utilização pelo paciente, ou seja, deve estar totalmente livre de quaisquer microrganismos, em todas as suas formas de vida, seja esporulada ou vegetativa (Possari, 2003). Entretanto, a quitosana, por suas características biológicas, poderia conferir aos materiais médicos ou dispositivos produzidos a partir desta matéria-prima, ação bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática, fazendo com que se pudesse eventualmente considerar com sendo desnecessária a etapa de esterilização.

A fim de se certificar sobre a necessidade da esterilização das membranas à base de quitosana, foi selecionada a composição formada por quitosana, quitina e glicerol (as três matérias-primas utilizadas neste trabalho) e a mesma foi incubada em meios de cultura (tioglicolato fluido e caseína-soja), sendo observado diariamente o aspecto visual da amostra durante 14 dias, conforme determinado na Farmacopéia Brasileira (4ª Edição, 1988).

Os resultados, contidos nos laudos fornecidos pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, mostraram que não houve contaminação do meio tioglicolato fluido durante o período de teste, não ocorrendo, portanto, o crescimento de microrganismos anaeróbicos. O mesmo comportamento não foi verificado para o meio caseína-soja, que se mostrou turvo no décimo dia de incubação com a membrana, indicando, portanto, crescimento de microrganismos neste meio, porém de natureza não analisada. Assim, pôde-se concluir que, apesar da quitosana possuir características biológicas particulares, a esterilização é essencial e deve ser considerada como uma das etapas do processo de obtenção de um biomaterial, mesmo que este seja à base de quitosana.

4.4. Estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas

Uma vez que os resultados mostraram claramente a necessidade quanto à esterilização das membranas, nesta etapa do trabalho, avaliou-se o efeito de três diferentes agentes de esterilização (etanol a 70%, óxido de etileno e radiação gama) nas características físicas (espessura e morfologia), mecânicas (comportamento tensão *versus* deformação) e biológicas (citotoxicidade *in vitro* direta e indireta) de quatro diferentes composições de membranas densas à base de quitosana, quando da adição de quitina e/ou glicerol à solução de partida de quitosana a 2,5%. Deve-se ressaltar que em todas as composições analisadas a quantidade de quitosana utilizada foi a mesma, sendo este valor de 1,125 g. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos em detalhes a seguir.

4.4.1. Efeito da variação da composição na espessura das membranas

As espessuras nos estados seco e úmido das quatro composições de membranas densas sintetizadas, antes e após a esterilização, podem ser visualizadas nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

Tabela 4.3 – Espessuras no estado seco das quatro diferentes composições de membranas densas à base de quitosana sintetizadas, antes dos processos de esterilização.

Composição*	Espessura (mm)
Q	0,10 ± 0,03
Q+g	0,16 ± 0,02
Q+q	0,23 ± 0,03
Q+q+g	0,22 ± 0,03

*Q = membranas contendo somente quitosana em suas composições; Q+g = membranas de quitosana contendo glicerol; Q+q = membranas de quitosana contendo quitina e Q+q+g = membranas de quitosana contendo quitina e glicerol.

Tabela 4.4 – Espessuras no estado úmido das quatro composições de membranas densas à base de quitosana sintetizadas, antes e após os processos de esterilização.

Composição ^a	Espessura das amostras no estado úmido (mm) ^b			
	Antes da esterilização	Após esterilização por óxido de etileno	Após esterilização por etanol a 70%	Após esterilização por radiação gama
Q	0,25 ± 0,07	0,21 ± 0,08	0,23 ± 0,08	0,22 ± 0,06
Q+g	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,09	0,47 ± 0,11	0,29 ± 0,07
Q+q	0,27 ± 0,03	0,34 ± 0,11	0,31 ± 0,06	0,32 ± 0,05*
Q+q+g	0,30 ± 0,08	0,33 ± 0,13	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,07

^aQ = membranas contendo somente quitosana em suas composições; Q+g = membranas de quitosana contendo glicerol; Q+q = membranas de quitosana contendo quitina e Q+q+g = membranas de quitosana contendo quitina e glicerol.

^bMédia ± desvio padrão (n = 5).

* valores estatisticamente diferentes da amostra não esterilizada na mesma composição (p < 0,05).

No caso das membranas secas, observa-se que o uso isolado do glicerol promoveu um aumento de aproximadamente 60% nos valores das espessuras das membranas de quitosana, fato este, muito provavelmente, decorrente da ação plastificante do glicerol, que promove a separação das cadeias poliméricas com conseqüente redução nas forças intermoleculares da quitosana. Já no caso do uso conjunto do glicerol com a quitina, nota-se que o efeito da presença do glicerol é suplantado pela presença da quitina, uma vez que as membranas formadas por quitosana e quitina ou por quitosana, quitina e glicerol apresentaram espessuras secas sem diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05). Além disso, as espessuras destas membranas (0,22 a 0,23 ± 0,03 mm) assemelharam-se ao valor do diâmetro médio da própria partícula de quitina determinado por espectrofotometria de espalhamento de laser, podendo-se afirmar que a presença desta matéria-prima determina a espessura no estado seco das membranas de quitosana.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos das espessuras das membranas no estado úmido para as diferentes composições antes da exposição aos agentes de esterilização. Pode-se inferir que a quantidade de quitosana (que é a mesma para todas as composições) define o grau de hidratação da

membrana, possivelmente não havendo efeito de limitações de transporte de massa ou cinéticas nestas condições, pois o período de hidratação foi longo, de 24 horas.

Exceto no caso da membrana de quitosana contendo quitina em sua composição (Q+q) e esterilizada por radiação gama, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nas espessuras no estado úmido das diferentes composições de membranas densas à base de quitosana entre as amostras não estéreis e as esterilizadas em todas as demais condições. No caso da amostra formulada com quitosana e quitina e esterilizada por radiação gama, a membrana esterilizada mostrou-se 18,5% mais espessa que a não estéril. Entretanto, este resultado não deve ser diretamente associado ao uso da radiação, já que a causa mais provável deve ser a variação nas espessuras das membranas decorrente do próprio processo para a obtenção das mesmas. Da maneira como foi efetuada a determinação das espessuras das membranas úmidas, em cinco corpos de prova em cada condição de composição e esterilização, foram observadas variações nos resultados de 9,4 a 39,4%. Dentre as prováveis causas das diferenças nas espessuras entre as amostras de mesma composição encontra-se a dificuldade no nivelamento do sistema empregado, que provoca o indesejado depósito preferencial de material em somente um dos lados do molde.

4.4.2. Avaliação da morfologia das membranas

As morfologias das diferentes composições de membranas densas à base de quitosana, antes e após as esterilizações utilizando-se uma solução aquosa de etanol a 70%, óxido de etileno ou radiação gama, podem ser visualizadas nas Figuras 4.7 a 4.10.

Como se pode notar nas Figuras 4.7 e 4.8, nas membranas de quitosana onde a quitina não se encontra presente, a superfície é aparentemente lisa, com ausência de poros visíveis, característica de membranas densas. As membranas que contêm quitina (Figuras 4.9 e 4.10) também apresentaram ausência de poros, entretanto, suas superfícies mostraram-se irregulares ao longo de toda sua extensão. Contudo, a quitina parece estar homogeneamente distribuída ao longo de toda a extensão da membrana.

Apesar do processo de obtenção das membranas incluir a etapa de desaeração, visando a eliminação das bolhas de ar contidas nas soluções de preparo das amostras, estas ainda se mostraram presentes quando a quitina é utilizada como matéria-prima para a obtenção das membranas, conforme constatado nas Figuras 4.9 e 4.10. A quitina parece dificultar a saída das bolhas de ar, já que nas membranas que não continham este composto não se verificou a presença de tais imperfeições.

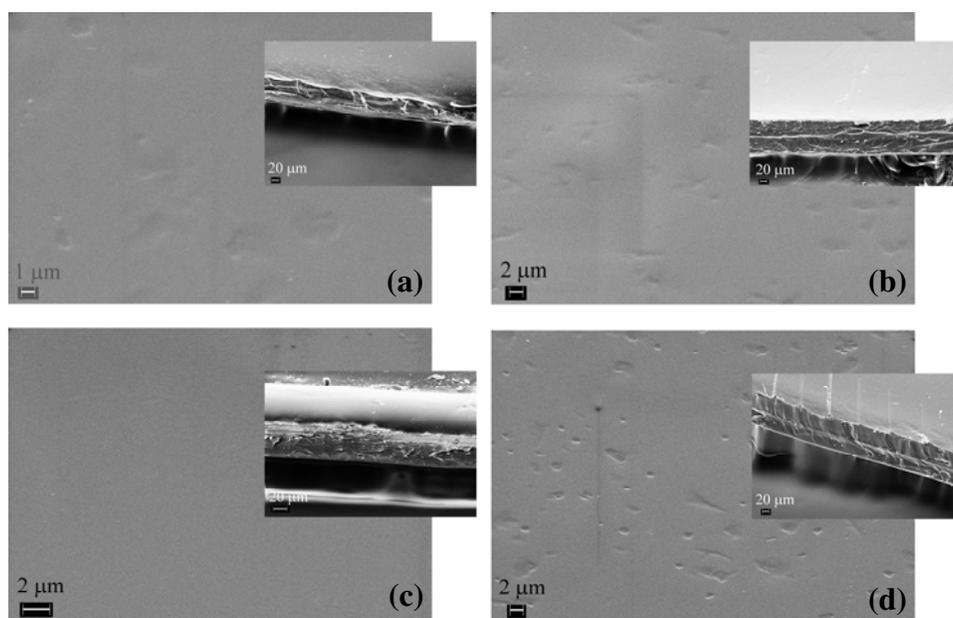


Figura 4.7 – Morfologia das membranas densas de quitosana: (a) não estéril e esterilizadas por: (b) imersão em etanol a 70%, (c) exposição ao óxido de etileno, (d) exposição à radiação gama. As micrografias de maior dimensão correspondem à superfície das amostras e as de menor dimensão referem-se à seção transversal das membranas.

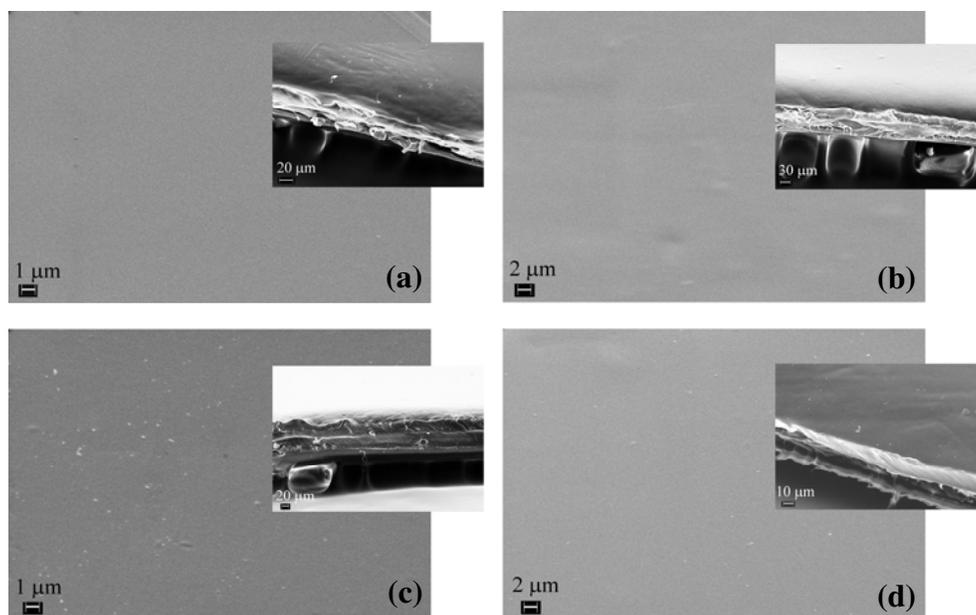


Figura 4.8 – Morfologia das membranas densas de quitosana contendo glicerol em suas composições: (a) não estéril e esterilizadas por: (b) imersão em etanol a 70%, (c) exposição ao óxido de etileno, (d) exposição à radiação gama. As micrografias de maior dimensão correspondem à superfície das amostras e as de menor dimensão referem-se à seção transversal das membranas.

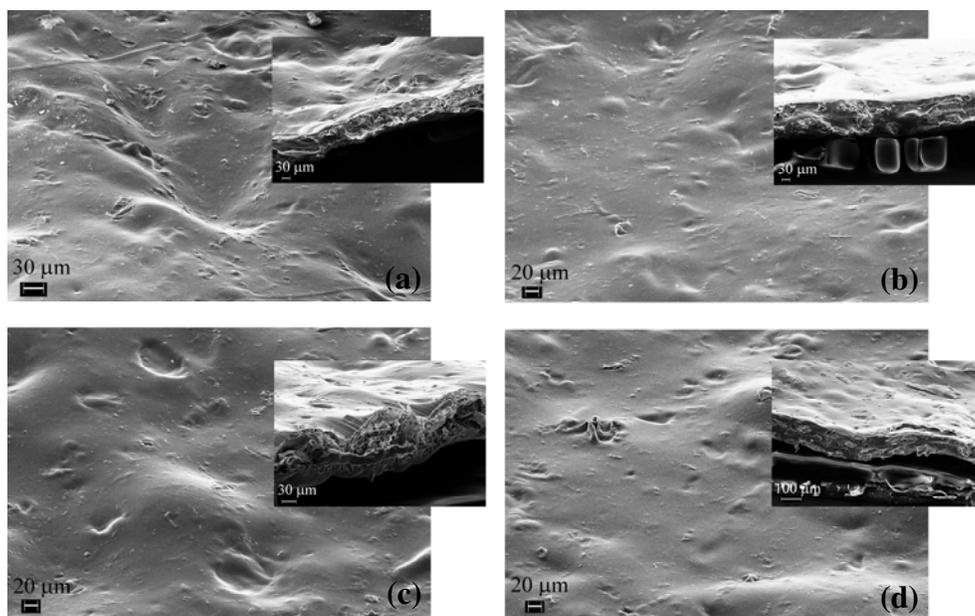


Figura 4.9 – Morfologia das membranas de quitosana contendo quitina em suas composições: (a) não estéril e esterilizadas por: (b) imersão em etanol a 70%, (c) exposição ao óxido de etileno, (d) exposição à radiação gama. As micrografias de maior dimensão correspondem à superfície das amostras e as de menor dimensão referem-se à seção transversal das membranas.

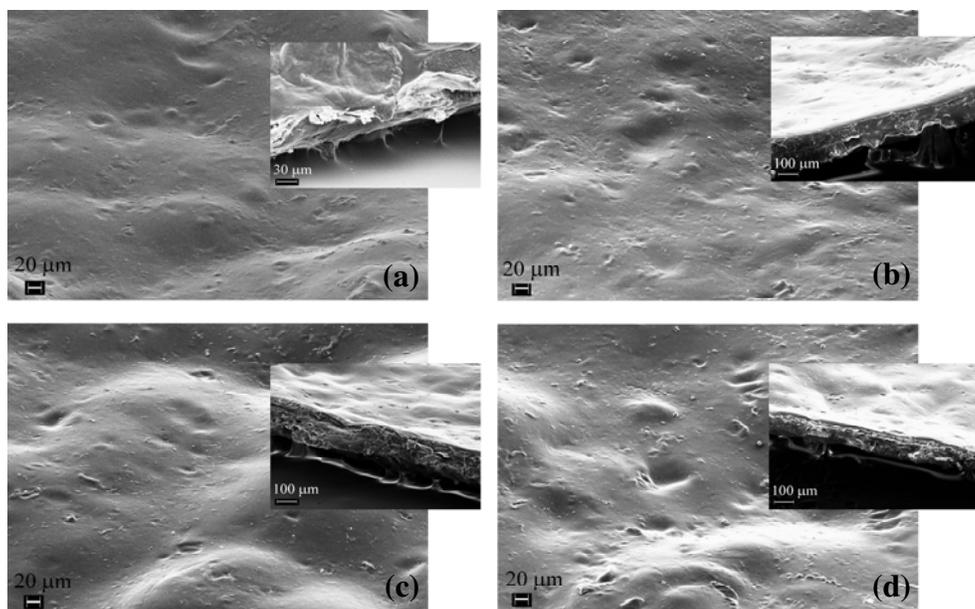


Figura 4.10 – Morfologia das membranas de quitosana contendo quitina e glicerol em suas composições: (a) não estéril e esterilizadas por: (b) imersão em etanol a 70%, (c) exposição ao óxido de etileno, (d) exposição à radiação gama. As micrografias de maior dimensão correspondem à superfície das amostras e as de menor dimensão referem-se à seção transversal das membranas.

Fazendo-se uma análise comparativa entre as morfologias das membranas não estéreis e as esterilizadas pode-se observar que a membrana não estéril que contém somente quitosana em sua composição (Figura 4.7a) possui algumas imperfeições em sua superfície, as quais são mais freqüentemente detectadas após a esterilização das amostras com etanol a 70% (Figura 4.7b), mas, principalmente após o uso da radiação gama como agente de esterilização (Figura 4.7d).

Diferentemente do observado para as membranas compostas somente por quitosana, no caso das membranas formadas por quitosana e glicerol não foram observadas imperfeições na superfície das amostras não estéreis (Figura 4.8a). Deve-se ressaltar que após a esterilização, também não foi verificado qualquer tipo de imperfeição na superfície das membranas, nem mesmo quando do uso da radiação gama (Figura 4.8d), sugerindo uma ação protetora do glicerol contra os possíveis efeitos negativos deste agente de esterilização na morfologia dos materiais. As eventuais manchas detectadas nas membranas esterilizadas por óxido de etileno (Figura 4.8c) são decorrentes do processo de preparo das amostras para a microscopia eletrônica de varredura (que não é realizado em ambiente livre de partículas), não estando relacionadas à ação do agente de esterilização sobre a morfologia do material.

Não foram observadas diferenças nas morfologias das membranas de quitosana que contém quitina em suas composições (Figuras 4.9 e 4.10), antes e após os diferentes processos de esterilização.

Deve-se ressaltar que as membranas preparadas somente com quitosana ou contendo glicerol mostravam-se transparentes após suas obtenções. Já as membranas contendo quitina apresentavam coloração amarelada. Após a esterilização, as membranas tratadas com radiação gama tiveram sua coloração alterada. As amostras transparentes tornaram-se amarelas e as de coloração amarelada tiveram sua cor acentuada. Este comportamento não foi observado quando da utilização do etanol a 70% e do óxido de etileno como agentes de esterilização das membranas. De acordo com Skiens (1980), o amarelamento de materiais poliméricos associado ao uso da radiação gama pode ser decorrente do aparecimento de insaturações ou da formação de complexos coloridos durante a irradiação, o que eventualmente pode alterar as características da membrana e causar a deterioração progressiva de suas propriedades, incluindo seu aspecto visual e suas propriedades mecânicas (módulo elástico, resistência ao impacto e alongamento).

Os dois maiores mecanismos de degradação ou alteração da estrutura polimérica quando um polímero é exposto à radiação gama são a cisão da cadeia, no qual ocorre uma ruptura aleatória de ligações que reduzem a massa molecular média do polímero, e o surgimento de reticulações, que resultam na formação de redes tridimensionais no polímero aumentando, assim, sua massa molecular. Como consequência das cisões de cadeia, fragmentos de baixa massa molecular, insaturações e a evolução de gases podem ocorrer. Já no caso das reticulações, são formadas redes tridimensionais que resultam na formação de um gel polimérico insolúvel. Com o aumento da dose de irradiação, o número de reticulações se eleva e o polímero pode tornar-se mais insolúvel. Freqüentemente ambos os mecanismos ocorrem quando um material polimérico é exposto à radiação gama, porém, a natureza do polímero bem como as condições em que a radiação é realizada podem fazer com que um destes mecanismos predomine.

4.4.3. Influência nas propriedades mecânicas das membranas

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 e técnica de esterilização, podem ser visualizados nas Tabelas 4.5 e 4.6.

O comportamento típico das membranas densas à base de quitosana durante a realização dos ensaios de tensão *versus* deformação encontra-se ilustrado na Figura 4.11.

A discussão dos resultados indicados nas Tabelas 4.5 e 4.6 foi dividida em dois blocos. Primeiramente foram avaliados os resultados por composição das membranas e posteriormente, por método de esterilização. Além disso, uma vez que os ensaios mecânicos foram realizados com as membranas em seus estados úmidos, fez-se necessária uma análise conjunta dos resultados de espessura úmida e das propriedades mecânicas.

Tabela 4.5 – Tensão de ruptura das quatro composições de membranas densas à base de quitosana, antes e após as esterilizações com óxido de etileno, etanol a 70% ou radiação gama.

Composição ^a	Tensão de ruptura ^b (MPa)			
	Antes da esterilização	Após esterilização por óxido de etileno	Após esterilização por etanol a 70%	Após esterilização por radiação gama
Q	6,53 ± 1,49	5,78 ± 1,87	4,20 ± 0,51*	5,82 ± 1,67
Q+g	6,07 ± 1,63	5,11 ± 1,75	5,71 ± 1,51	5,86 ± 1,26
Q+q	4,33 ± 0,68	3,00 ± 0,58*	3,73 ± 0,43	4,95 ± 0,43
Q+q+g	3,89 ± 0,35	3,03 ± 0,62*	3,92 ± 0,55	3,89 ± 0,60

^aQ = membranas contendo somente quitosana em suas composições; Q+g = membranas de quitosana contendo glicerol; Q+q = membranas de quitosana contendo quitina; Q+q+g = membranas de quitosana contendo quitina e glicerol.

^bMédia ± desvio padrão (n = 5).

* valores estatisticamente diferentes da amostra não esterilizada na mesma composição (p < 0,05).

Tabela 4.6 – Porcentagem de deformação após o alongamento das quatro composições de membranas à base de quitosana, antes e após as esterilizações com óxido de etileno, etanol a 70% ou radiação gama.

Composição ^a	Porcentagem de deformação das membranas ^b			
	Antes da esterilização	Após esterilização por óxido de etileno	Após esterilização por etanol a 70%	Após esterilização por radiação gama
Q	89,83 ± 16,46	96,67 ± 22,44	86,67 ± 13,09	69,17 ± 16,17
Q+g	177,1 ± 26,31	169,3 ± 32,87	172,3 ± 24,91	109,5 ± 28,17*
Q+q	50,24 ± 6,020	51,67 ± 9,340	55,42 ± 8,740	52,14 ± 5,670
Q+q+g	51,25 ± 7,150	50,42 ± 10,09	63,45 ± 3,980*	39,40 ± 7,950*

^aQ = membranas contendo somente quitosana em suas composições; Q+g = membranas de quitosana contendo glicerol; Q+q = membranas de quitosana contendo quitina; Q+q+g = membranas de quitosana contendo quitina e glicerol.

^bMédia ± desvio padrão (n = 5).

* valores estatisticamente diferentes da amostra não esterilizada na mesma composição (p < 0,05).

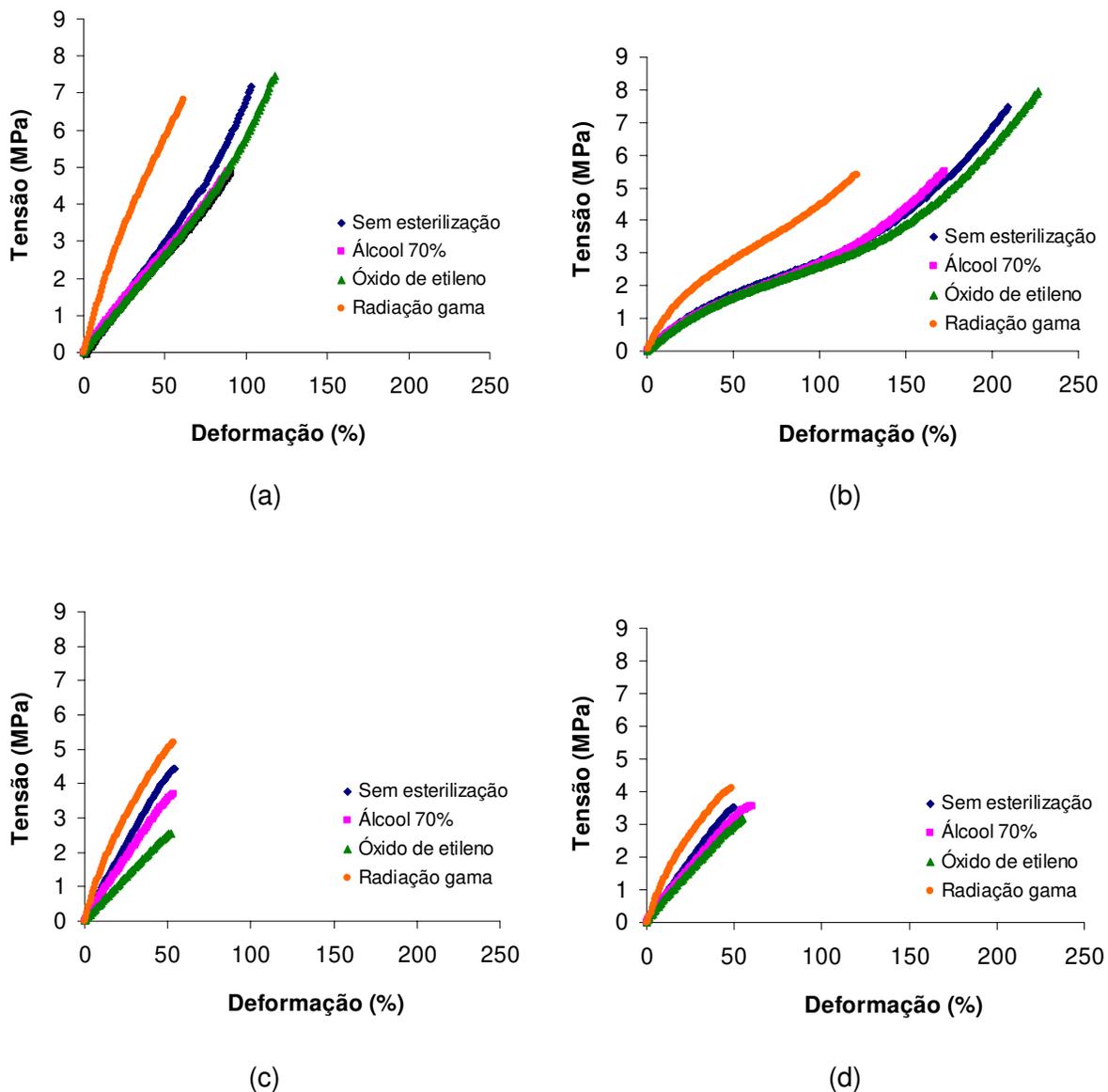


Figura 4.11 – Comportamento típico das membranas densas à base de quitosana durante o ensaio de tensão *versus* deformação: (a) membranas de quitosana; (b) membranas de quitosana contendo glicerol; (c) membranas de quitosana contendo quitina e (d) membranas de quitosana contendo quitina e glicerol.

Como se pode notar na Tabela 4.5, as membranas constituídas somente por quitosana 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 somente por quitosana 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 4.6). Neste momento, deve-se ressaltar que a quitosana pertence ao grupo dos polímeros hidrogéis e como tal, ela possui a capacidade de absorver desde dezenas até centenas de vezes sua massa seca em água, estando suas cadeias unidas por interações moleculares e/ou forças secundárias incluindo as forças iônicas, pontes de hidrogênio ou forças hidrofóbicas. Particularmente no caso da quitosana, dentre as diversas interações intra e intermoleculares existentes, destacam-se as pontes de hidrogênio intermoleculares, que lhe conferem uma estrutura semicristalina (Kurita, 2001). A hidratação deste polímero, assim como de outros hidrogéis, ocorre em três etapas. Primeiramente, são hidratados os grupos hidrofílicos, seguidos dos grupamentos hidrofóbicos, sendo as águas de hidratação conhecidas como primárias e secundárias, respectivamente. Após um longo período de hidratação, a estrutura polimérica incorpora uma maior quantidade de água, que preenche os espaços existentes entre as cadeias poliméricas e/ou o centro dos poros, caso existentes. De acordo com Barnes e col. (1988) e Corkhill e Thigie (1990 APUD Cheng e col., 2003), a água livre pode ser considerada um agente plastificante, influenciando portanto, nas propriedades mecânicas dos filmes poliméricos. Deve-se ainda salientar que, além do ensaio de avaliação das propriedades mecânicas das membranas ter sido realizado 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.

Para o caso das membranas de quitosana contendo somente glicerol em suas composições, o plastificante influenciou nas deformações das membranas após seus alongamentos, apresentando valores 58,31 a 98,80% superiores aos encontrados para as membranas constituídas somente por quitosana. Durante esta etapa do trabalho, acreditou-se que o triálcool glicerol, ao ser utilizado como matéria-prima para a obtenção das membranas densas à base de quitosana, alojou-se entre as cadeias poliméricas da quitosana, tornando-as mais distantes entre si, justificando assim, uma redução nas

forças coesivas entre as cadeias, o que resultou no aumento da mobilidade dos grupamentos poliméricos e conseqüentemente, no aumento da ductilidade dos materiais. Entretanto, considerando-se também a possível perda de parte do glicerol incorporado durante as etapas de neutralização e lavagem das amostras, o aumento nas porcentagens de deformação das membranas quando da utilização do glicerol foi justificado não apenas pela possível presença de uma pequena parte do glicerol adicionado à solução de partida de quitosana para a obtenção dos materiais, mas também pela modificação na organização da estrutura polimérica durante a etapa de síntese dos biomateriais. Já para o caso da tensão de ruptura, apesar de na maioria dos casos a adição de um plastificante reduzir a cristalinidade do polímero e, conseqüentemente, sua resistência mecânica, não foi observada diferença significativa entre o valor obtido para as membranas de quitosana e aquelas que contêm glicerol em suas composições. Entretanto, sabendo-se que a quantidade de quitosana presente nas amostras constituídas somente por quitosana (Q) e por quitosana e glicerol (Q+g) era a mesma e que parte do glicerol poderia ter sido extraída durante as etapas de neutralização e lavagem dos materiais, os resultados obtidos tornam-se plenamente compreensíveis.

Para o caso das membranas formadas por quitosana e quitina, pode-se dizer que a quitina promoveu uma redução significativa tanto na resistência mecânica quanto na ductilidade das membranas. Tal fato está associado à forma física da quitina na composição da membrana, uma vez que a mesma é insolúvel em soluções ácidas diluídas e se faz presente no biomaterial final sob a forma de partículas. Assim, sua presença causou uma desorganização local no empacotamento das cadeias de quitosana, promovendo, uma redução na capacidade da membrana em suportar tensões. Desta forma, a estrutura polimérica se rompe mais facilmente próximo aos pontos onde a quitina se encontra inserida, reduzindo não somente a resistência mecânica do material como também a porcentagem de alongamento das membranas quando comparada às deformações observadas para as membranas formadas somente por quitosana.

As membranas contendo quitosana, quitina e glicerol em suas composições apresentaram comportamento semelhante ao observado para as membranas de quitosana contendo somente quitina, ou seja, apresentaram redução dos valores da tensão de ruptura e de alongamento quando comparados aos valores obtidos para as membranas constituídas somente por quitosana. Comparando-se as membranas nas quais a quitina encontrava-se presente, nota-se que o glicerol não afetou as variáveis mecânicas analisadas, e assim como no caso das espessuras no estado seco, a quitina

parece suplantam a ação plastificante do glicerol, definindo as características mecânicas das membranas. Mais uma vez, deve-se ressaltar que tal fato pode estar associado à extração parcial do glicerol quando das etapas de neutralização e lavagem dos materiais.

Apesar dos menores valores encontrados de resistência mecânica e de ductilidade das membranas quando da utilização da quitina, os valores de ruptura observados encontram-se na faixa de tensão de ruptura da pele humana normal e os valores de deformação após o alongamento, com exceção da membrana de quitosana contendo quitina e glicerol esterilizada por radiação gama, ficaram acima de 50%, não sendo justificável, pelo menos nesta etapa do trabalho, o simples descarte da quitina como componente das membranas.

A análise comparativa entre os valores de tensão de ruptura e de deformação obtidos para as membranas densas à base de quitosana sintetizadas nesta etapa do trabalho e os valores existentes na literatura foi realizada apenas como ferramenta de verificação de conformidade dos resultados. Apesar das propriedades mecânicas se constituírem em variáveis de caracterização muito utilizadas no caso de biomateriais, a avaliação dos resultados é dificultada pelas diferenças nas condições de preparo das membranas e de realização dos ensaios mecânicos, e influenciam diretamente os resultados obtidos. Dentre estas diferenças destacam-se a concentração da solução de quitosana utilizada para o preparo das membranas, as condições de acondicionamento das amostras (temperatura e umidade), a taxa de deformação dos corpos de prova e o tipo de equipamento utilizado. Neste contexto, fez-se a comparação dos resultados obtidos com o de membranas de quitosana comerciais cujo ensaio de tensão *versus* deformação foi realizado com a membrana no estado úmido (Shalaby, 1994). A literatura apresenta valores de tensão de ruptura e alongamento de $0,5 \pm 0,6$ MPa e $61,8 \pm 15,5\%$, respectivamente, e os resultados correspondentes obtidos neste trabalho para as membranas não estéreis contendo somente quitosana em suas composições foram de $6,53 \pm 1,49$ MPa e $89,83 \pm 16,46\%$. Como as espessuras das membranas são diferentes (0,038 mm para as membranas descritas na literatura e 0,10 mm 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.

Quanto à análise dos resultados obtidos quando utilizados os diferentes tipos de esterilização para uma mesma composição de membranas (Tabela 4.5), pode-se afirmar

que, no caso das membranas que contêm somente quitosana em suas composições, aquelas esterilizadas por óxido de etileno e por radiação gama não apresentaram valores de tensão de ruptura estatisticamente diferentes do encontrado para a membrana não estéril. Já as membranas esterilizadas com etanol a 70% apresentaram uma redução de 35,7% na tensão de ruptura. Para as membranas de quitosana contendo somente o glicerol, as esterilizadas seja por etanol a 70%, óxido de etileno ou radiação gama não apresentaram valores de tensão de ruptura estatisticamente diferentes do encontrado para as membranas não estéreis. Para as membranas de quitosana contendo quitina (Q+q e Q+q+g), apenas as esterilizadas com óxido de etileno apresentaram valores de tensão de ruptura estatisticamente menores que o das membranas não estéreis. Nas membranas de quitosana contendo somente quitina, a redução foi de 30,7% enquanto que nas membranas de quitosana contendo quitina e glicerol, a redução foi de 22,1%.

Deve-se salientar que o óxido de etileno reage com grupamentos nucleofílicos como, por exemplo, as hidroxilas, as sulfidrilas e as aminas. Assim, levantou-se a seguinte hipótese para a explicação dos resultados de redução da tensão de ruptura das membranas quando da utilização da quitina: as partículas de quitina, que se encontram distribuídas uniformemente ao longo de toda a membrana, facilitaram a penetração do óxido de etileno na estrutura polimérica, permitindo a reação deste composto principalmente com os grupamentos amino da quitosana, os quais faziam pontes de hidrogênio intermoleculares. Entretanto, estas ligações são as responsáveis pela organização estrutural das cadeias poliméricas da quitosana. Uma vez rompidas, houve perda de parte da organização estrutural do polímero, o que refletiu diretamente na cristalinidade e conseqüentemente, na resistência mecânica das membranas. O glicerol, mesmo em pequenas quantidades, ao se posicionar entre as cadeias poliméricas das membranas de quitosana formadas por quitosana e quitina, pode ter preenchido alguns pontos de imperfeição destas estruturas, dificultando assim, a penetração do óxido de etileno. Desta maneira, o efeito da esterilização sobre a resistência mecânica do material foi sentido de maneira mais amena.

Analisando-se a porcentagem de deformação das membranas após seu alongamento (Tabela 4.6), pode-se afirmar que para as membranas de quitosana contendo somente quitosana (Q) e para aquelas que contêm quitosana e quitina (Q+q), os processos de esterilização não afetaram esta variável, já que os valores encontrados para as membranas esterilizadas, seja por qualquer um dos métodos de esterilização, foram estatisticamente iguais aos obtidos para as membranas não estéreis. Para as membranas de quitosana contendo glicerol (Q+g e Q+q+g) observou-se uma redução significativa na

porcentagem de deformação quando utilizada a radiação gama fato este, muito provavelmente, decorrente da reticulação do glicerol ainda presente nos materiais quando da aplicação da radiação de alta energia. No caso das membranas de quitosana contendo somente glicerol (Q+g), a redução foi de 38,2% e para as membranas de quitosana contendo glicerol e quitina (Q+q+g), a redução foi de 23,1%. Apenas no caso das membranas de quitosana contendo glicerol e quitina, constatou-se um aumento significativo de 23,8% no alongamento quando utilizado o etanol como agente de esterilização.

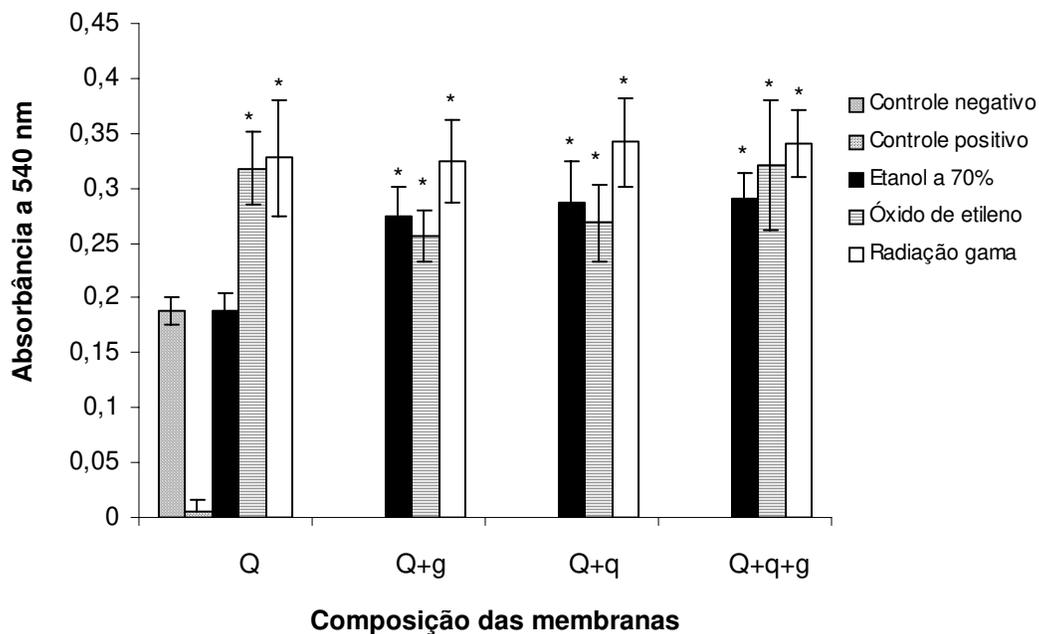
Analisando-se o comportamento dos materiais poliméricos ilustrado na Figura 4.11, pode-se notar que as membranas que não possuem quitina em suas composições (Q e Q+g) apresentaram comportamento diferenciado quando do uso da radiação gama como agente de esterilização. Os demais processos de esterilização não promoveram mudanças significativas no comportamento dos polímeros durante o alongamento dos materiais. Outra importante observação se faz com relação ao comportamento das membranas quando utilizado o plastificante isoladamente na composição das membranas de quitosana. Neste caso, as membranas apresentaram comportamento característico de materiais elastômeros, enquanto que as demais composições apresentaram comportamentos de materiais resistentes, porém, frágeis. Durante esta etapa do trabalho, atribuiu-se tal fato à ação plastificante do glicerol, que facilita o escoamento das cadeias poliméricas, tornando o polímero mais flexível. Entretanto, na fase seguinte do desenvolvimento deste trabalho, constatou-se que as etapas de neutralização e lavagem dos materiais promovem a extração parcial ou total do glicerol. Assim, o comportamento ilustrado na Figura 4.11b deve ser decorrente da ação isolada de uma pequena fração do glicerol que não foi extraído durante a neutralização e a lavagem das membranas e, portanto, ainda se faz presente na composição dos materiais atuando como plastificante ou, no caso da extração ter sido total, da formação de uma organização diferenciada das cadeias poliméricas da quitosana quando da utilização do glicerol durante a fase de síntese dos biomateriais. Quando da presença da quitina, a ação do glicerol é prejudicada, sendo a quitina o componente que aparentemente define as características mecânicas dos materiais.

4.4.4. Avaliação da citotoxicidade das membranas

Em termos biológicos, sabe-se que um curativo ideal não deve liberar produtos tóxicos e nem mesmo causar reações adversas, o que pode, em primeira instância, ser

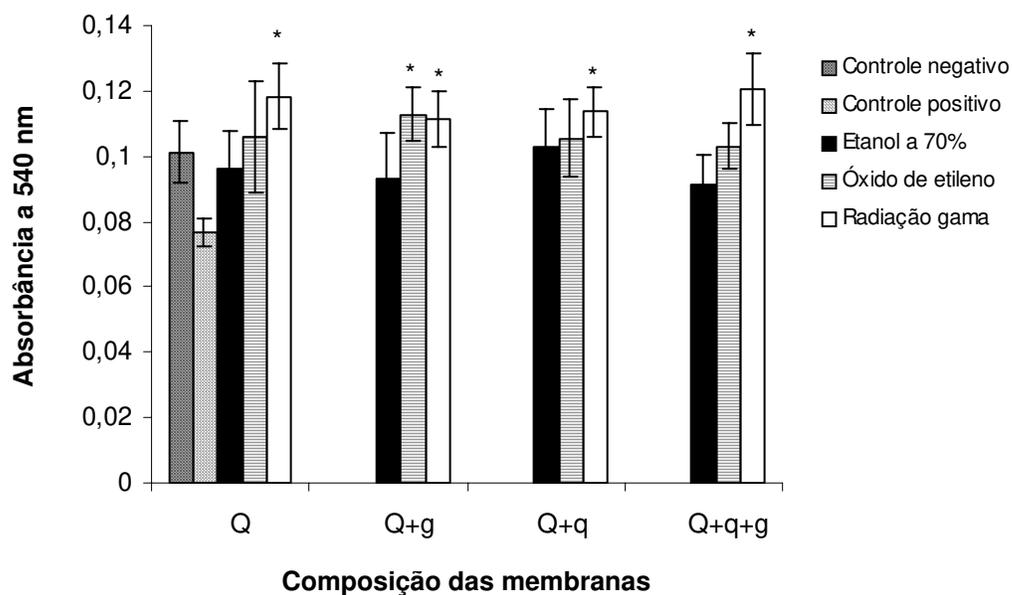
avaliado através de testes de citotoxicidade *in vitro*. Os resultados dos ensaios biológicos de citotoxicidade realizados com os quatro diferentes tipos de composições de membranas densas à base de quitosana, após as esterilizações com etanol a 70%, óxido de etileno ou radiação gama, são mostrados nas Figuras 4.12 e 4.13, empregando-se células Vero. A concentração do produto da reação do MTT, o composto colorido *formazan*, pode ser diretamente associada ao número de células viáveis, uma vez que a transformação dos cristais de MTT em *formazan* ocorre pela ação das enzimas mitocondriais das células viáveis e ativas.

A análise estatística dos resultados de citotoxicidade indireta apresentados na Figura 4.12, os quais correspondem às médias das absorbâncias de oito amostras, mostrou que todas as membranas de quitosana apresentaram valores de absorbância estatisticamente superiores ao encontrado para o controle positivo (solução de fenol a 0,5%) e iguais ou superiores ao encontrado para o controle negativo de citotoxicidade (fragmentos da própria placa de cultura de células) indicando, portanto, ausência da liberação de compostos tóxicos quando do contato das membranas com o meio de cultura. Além disso, com exceção da membrana de quitosana (Q) esterilizada com etanol a 70%, cuja absorbância foi estatisticamente igual à encontrada para o controle negativo, todas as demais membranas parecem estimular a proliferação celular, comportamento este que corrobora com a descrição das propriedades biológicas da quitosana encontrada na literatura (Paul e Sharma, 2004; Yosof e col., 2001; Muzarelli e col., 1988). Para as membranas contendo somente quitosana, as amostras esterilizadas com óxido de etileno ou radiação gama não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. O tratamento com etanol, apesar de não ter fornecido resultados de um possível estímulo do crescimento celular como nas demais condições citadas acima, também não revelou ação citotóxica, já que o resultado de absorbância para esta condição foi estatisticamente igual ao encontrado para o controle negativo. No caso das membranas de quitosana contendo somente glicerol em suas composições ou somente quitina, aquelas esterilizadas com etanol a 70% ou óxido de etileno não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. O maior valor de absorbância foi obtido para as amostras esterilizadas por radiação gama. Para as membranas de quitosana contendo em suas composições as matérias-primas quitina e glicerol, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nas absorbâncias das amostras esterilizadas com óxido de etileno e radiação gama, mas sim, quando comparados ao valor encontrado para as amostras esterilizadas com etanol a 70%, cabendo aos primeiros os maiores resultados de absorbância observados para este tipo de membrana.



* valores estatisticamente superiores ao valor encontrado para o controle negativo ($p < 0,05$).

Figura 4.12 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade indireta das quatro diferentes composições de membranas densas à base de quitosana sintetizadas, após a esterilização.



* valores estatisticamente superiores ao valor encontrado para o controle negativo ($p < 0,05$); n° amostras/composição=8.

Figura 4.13 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade direta das quatro diferentes composições de membranas à base de quitosana sintetizadas, após a esterilização.

Conforme ilustrado na Figura 4.13, assim como na citotoxicidade indireta, todos os valores de absorvância obtidos no teste de citotoxicidade direta, ou seja, quando do contato direto dos materiais-teste com as células Vero, foram estatisticamente superiores ao encontrado para o controle positivo, indicando, portanto, ausência da liberação de compostos tóxicos para o meio de cultura. Além disso, as quatro diferentes composições de membranas quando esterilizadas com a radiação gama e as membranas de quitosana contendo glicerol em suas composições (Q+g) esterilizadas por óxido de etileno apresentaram valores de absorvância estatisticamente superiores ao do controle negativo, indicando, portanto, nestes casos, um possível estímulo da proliferação das células Vero quando do contato direto com estes materiais. Para as demais condições, os valores de absorvância foram estatisticamente iguais ao valor obtido para o controle negativo, indicando, portanto, ausência de citotoxicidade.

4.4.5. Comparação dos resultados obtidos na caracterização das membranas pelos diferentes métodos empregados

Para que fossem comparados simultaneamente os resultados obtidos pelas técnicas de caracterização das membranas densas à base de quitosana esterilizadas por etanol a 70%, óxido de etileno ou radiação gama, estabeleceu-se uma escala de cores, conforme ilustrado nas Tabelas 4.7 a 4.10. Nesta escala, encontram-se presentes as cores branco, cinza e preto. A cor branca indica os melhores resultados qualitativos em termos de morfologia da superfície das membranas (superfícies aparentemente lisas), maiores valores de tensão de ruptura, de porcentagem de deformação da membrana após o alongamento e de absorvância nos testes de citotoxicidade. A cor cinza indica valores intermediários e a cor preta, os resultados menos promissores em termos de morfologia da superfície das membranas, menores valores de tensão de ruptura, de porcentagem de deformação da membrana após o alongamento e de absorvância nos testes de citotoxicidade.

Diz-se que não há correlação entre os métodos quando ao se comparar seus resultados, há presença das cores branca e preta, que representam os dois extremos na escala de cores. Isto indica divergência nos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização utilizadas.

Tabela 4.7 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de caracterização das membranas contendo somente quitosana em suas composições: morfologia das membranas (MEV), ensaios para determinação de propriedades mecânicas (tensão de ruptura e porcentagem de deformação) e citotoxicidade.

Métodos de esterilização	Caracterização das membranas de quitosana (Q)				
	Morfologia	Tensão de ruptura	Porcentagem de deformação	Citotoxicidade indireta	Citotoxicidade direta
Sem esterilização				-	-
Óxido de etileno					
Etanol a 70%					
Radiação gama					

□ Nível mais alto

■ Nível intermediário

■ Nível mais baixo

Tabela 4.8 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de caracterização das membranas de quitosana contendo glicerol em suas composições: morfologia das membranas (MEV), ensaios para determinação de propriedades mecânicas (tensão de ruptura e porcentagem de deformação) e citotoxicidade.

Métodos de esterilização	Caracterização das membranas de quitosana (Q+g)				
	Morfologia	Tensão de ruptura	Porcentagem de deformação	Citotoxicidade indireta	Citotoxicidade direta
Sem esterilização				-	-
Óxido de etileno					
Etanol a 70%					
Radiação gama					

□ Nível mais alto

■ Nível intermediário

■ Nível mais baixo

Tabela 4.9 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de caracterização das membranas de quitosana contendo quitina em suas composições: morfologia das membranas (MEV), ensaios para determinação de propriedades mecânicas (tensão de ruptura e porcentagem de deformação) e citotoxicidade.

Métodos de esterilização	Caracterização das membranas de quitosana (Q+q)				
	Morfologia	Tensão de ruptura	Porcentagem de deformação	Citotoxicidade indireta	Citotoxicidade direta
Sem esterilização				-	-
Óxido de etileno					
Etanol a 70%					
Radiação gama					

□ Nível mais alto

■ Nível intermediário

■ Nível mais baixo

Tabela 4.10 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de caracterização das membranas de quitosana contendo quitina e glicerol em suas composições: morfologia das membranas (MEV), ensaios para determinação de propriedades mecânicas (tensão de ruptura e porcentagem de deformação) e citotoxicidade.

Métodos de esterilização	Caracterização das membranas de quitosana (Q+q+g)				
	Morfologia	Tensão de ruptura	Porcentagem de deformação	Citotoxicidade indireta	Citotoxicidade direta
Sem esterilização				-	-
Óxido de etileno					
Etanol a 70%					
Radiação gama					

□ Nível mais alto

■ Nível intermediário

■ Nível mais baixo

Dentre os ensaios realizados constatou-se divergência em apenas dois blocos de experimentos, os quais envolvem as membranas que contêm somente quitosana em suas composições ou quitosana, quitina e glicerol. Em ambos os casos, as amostras foram esterilizadas por radiação gama. Todas as demais condições indicaram convergência nos resultados, indicando uma boa correlação entre as técnicas de caracterização utilizadas.

Considerando-se os resultados obtidos dos ensaios para o estudo da influência do método de esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana pode-se dizer que nenhuma das técnicas de esterilização utilizadas pode ser considerada totalmente imprópria para o uso em membranas de quitosana. Entretanto, apesar da exposição das amostras à radiação gama ser uma das técnicas mais comumente descritas na literatura para esta finalidade e em muitos casos, ter apresentado os resultados mais promissores, segundo as técnicas de caracterização utilizadas, também revelou causar modificações na estrutura da membrana, sendo tal fato observado mesmo a olho nu pela mudança na coloração do material. Além disso, o uso da radiação gama também forneceu os resultados menos promissores em termos de morfologia e porcentagem de deformação nas membranas compostas somente por quitosana (Q) e nas membranas que possuem glicerol em suas composições (Q+g e Q+q+g), respectivamente.

O uso do etanol a 70% como agente de esterilização forneceu resultados adequados quanto à manutenção das características morfológicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana, entretanto, sua utilização nos parece inviável frente à procura de uma técnica de esterilização a ser utilizada em grande escala.

O uso do óxido de etileno, além de ter fornecido resultados adequados em termos de manutenção das características físicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana em todas as condições analisadas, ainda é uma metodologia facilmente escalonável. Assim, diante dos resultados apresentados, selecionou-se o óxido de etileno como agente de esterilização para se dar continuidade ao trabalho.

Deve-se ressaltar que os dados obtidos neste segmento do trabalho foram publicados em 2004 na revista *Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials*, com autoria de Paula R. M. Dallan, Patrícia L. Moreira, Selma C. Genari e Ângela M. Moraes e podem ser visualizados no volume 71B, nº2, páginas 268 a 277.

4.5. Avaliação do tempo para a eliminação dos resíduos do processo de esterilização quando utilizado o óxido de etileno como agente esterilizante

A etapa final do processo de esterilização por óxido de etileno é a aeração, que tem como principal objetivo, a remoção do óxido de etileno residual (EtO) e de seus subprodutos (etilenocloridrina e etilenoglicol) dos materiais esterilizados, visando assim, atingir os níveis máximos de resíduos permitidos e estabelecidos pela legislação brasileira, os quais estão indicados na Tabela 4.11. No caso de curativos a serem utilizados no tratamento de queimaduras, portanto, que entrarão em contato direto com o sangue, os níveis máximos estabelecidos para o óxido de etileno, etilenocloridrina e etilenoglicol são de 25, 25 e 250 ppm, respectivamente.

Tabela 4.11 – Limites máximos de resíduos em dispositivos médico-cirúrgicos, conforme determinado pela Portaria Interministerial nº 482 (1999).

Dispositivo	Limite máximo (ppm)		
	EtO*	ETCH*	ETG*
Implantes pequenos (até 10 g)	250	250	5000
Implantes médios (10 a 100 g)	100	100	2000
Implantes grandes (superior a 100 g)	25	25	25
Dispositivos intra-uterinos	5	10	10
Lentes intra-oculares	25	25	500
Dispositivos que entram em contato com a mucosa	250	250	5000
Dispositivos que entram em contato direto com o sangue	25	25	250
Dispositivos que entram em contato com a pele	250	250	5000
Esponjas cirúrgicas	25	250	500

* EtO – óxido de etileno, ETCH – etilenocloridrina e ETG – etilenoglicol.

De acordo com o recomendado na embalagem do produto esterilizado por óxido de etileno, a utilização dos materiais estéreis deve ser feita depois de transcorridas pelo menos 72 horas do processo de esterilização, entretanto, é de conhecimento geral que o coeficiente de difusão do óxido de etileno em diferentes artigos médico-hospitalares é

variável. Portanto, o tempo de aeração necessário para um determinado artigo médico-hospitalar ou dispositivo depende de diversas variáveis como: composição, forma, tamanho, espessura e massa do dispositivo, tipo de esterilização (utilizando-se óxido de etileno puro ou em mistura) e embalagem, dentre outros (Possari, 2003).

A fim de se avaliar a influência dos aditivos utilizados na obtenção das membranas densas à base de quitosana (glicerol e/ou quitina) no tempo para a eliminação dos resíduos decorrentes do processo de esterilização utilizando-se o óxido de etileno, foram analisadas as quatro diferentes composições de membranas propostas nos ensaios de estudo da influência da técnica de esterilização nas características dos materiais (Q, Q+g, Q+q e Q+q+g). A análise quanto à presença de óxido de etileno e de seus subprodutos foi inicialmente programada para ser realizada desde seis horas após a esterilização até sete dias, pois, de acordo com Costa e col. (1993), este é o tempo requerido de aeração para se atingir os limites de resíduos permitidos e estabelecidos pela legislação. Entretanto, os ensaios foram interrompidos 12 horas após a realização da esterilização, já que na primeira análise (seis horas), a quantidade de resíduos observada nas amostras foi nula, conforme mostraram os resultados contidos no laudo fornecido pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. Assim, pôde-se concluir que o tempo requerido para o armazenamento das amostras antes de sua utilização foi de seis horas.

4.6. Determinação do efeito da composição nas propriedades das membranas obtidas pelo método sol-gel

Nesta etapa do trabalho foi efetuado um estudo sistemático da influência da concentração da solução de partida de quitosana nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas, bem como do efeito da substituição de parte da quitosana utilizada por quitina e/ou glicerol. Tal estratégia de estudo visou a redução do custo final dos biomateriais, sem, entretanto, prejudicar as características físicas, mecânicas e biológicas das membranas.

Este estudo foi feito com base em um planejamento fatorial 2^3 contendo três pontos centrais, sendo mantida a quantidade de sólidos totais de todas as condições experimentais constante em 1,125 g, diferentemente da estratégia utilizada nos ensaios de estudo da influência da esterilização nas características das membranas, no qual a quantidade de quitosana foi mantida constante em 1,125 g para todas as composições avaliadas.

Para a melhor compreensão dos resultados obtidos ao longo desta etapa do trabalho foi montada a Tabela 4.12, que além de indicar as proporções de cada componente nas soluções aquosas de ácido acético (soluções de partida), conforme estabelecido no planejamento estatístico utilizado, também mostra as proporções de cada componente nas membranas formadas.

Tabela 4.12 – Proporções de cada componente nas soluções aquosas de ácido acético a 1% bem como nas membranas densas secas sintetizadas.

Ensaio	Proporção na solução (%)			Proporção na membrana (%)		
	quitosana	quitina	glicerol	quitosana	quitina	glicerol
1	1,00	0,00	0,00	100,0	0,000	0,000
2	2,50	0,00	0,00	100,0	0,000	0,000
3	1,00	0,50	0,00	66,67	33,33	0,000
4	2,50	0,50	0,00	83,33	16,67	0,000
5	1,00	0,00	0,50	66,67	0,000	33,33
6	2,50	0,00	0,50	83,33	0,000	16,67
7	1,00	0,50	0,50	50,00	25,00	25,00
8	2,50	0,50	0,50	71,43	14,29	14,29
9	1,75	0,25	0,25	77,78	11,11	11,11
10	1,75	0,25	0,25	77,78	11,11	11,11
11	1,75	0,25	0,25	77,78	11,11	11,11

Os resultados obtidos dos ensaios de caracterização das membranas densas à base de quitosana cujas condições experimentais foram definidas no planejamento estatístico ilustrado na Tabela 4.12 são apresentados e discutidos em detalhes a seguir.

4.6.1. Custo das membranas

Os custos das membranas densas à base de quitosana, de composições definidas no planejamento experimental proposto neste trabalho, foram determinados

considerando-se apenas os custos das matérias-primas utilizadas para a obtenção dos biomateriais. Os preços em dólares americanos das matérias-primas quitosana, quitina, glicerol e ácido acético são aqueles disponíveis no catálogo da Sigma Chemical Co. e correspondem a US\$ 0,4552/g, US\$ 0,0698/g, US\$ 0,03304/g e US\$ 0,03220/g, respectivamente. O custo da água deionizada foi estimado em US\$ 0,00076/g. Os custos finais das membranas podem ser visualizados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Custos das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental utilizado neste trabalho.

Ensaio	Custo estimado por membrana de 95 cm² (US\$)
1	0,66
2	0,61
3	0,50
4	0,53
5	0,46
6	0,52
7	0,38
8	0,46
9	0,51
10	0,51
11	0,51

A análise estatística desta variável-resposta resultou nos dados mostrados na Tabela 4.14 e na Figura 4.14.

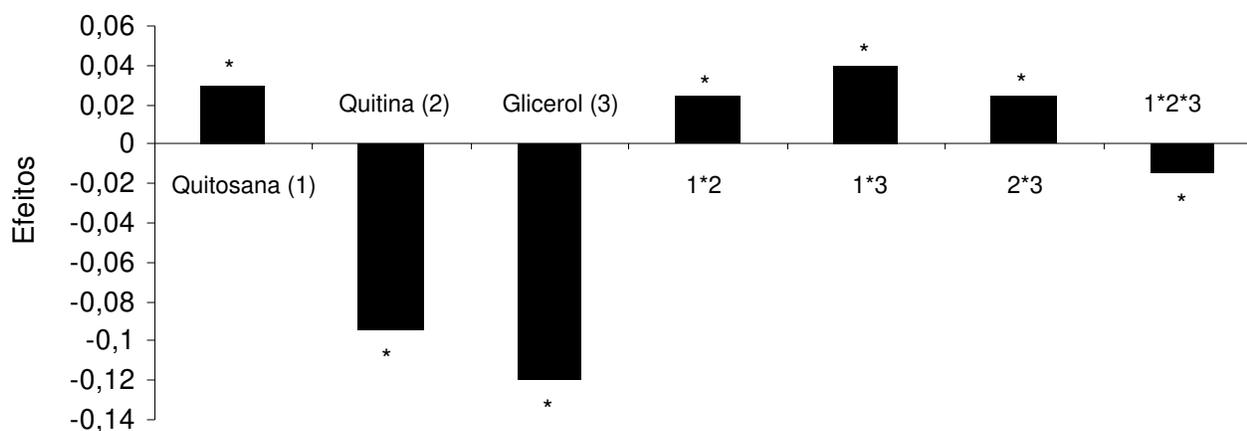
Deve-se ressaltar que, apesar do conhecimento de que a análise estatística não é a ferramenta mais adequada para a avaliação desta variável-resposta, a mesma foi realizada uma vez que através dela, houve a possibilidade de se observar claramente os efeitos específicos de cada matéria-prima utilizada na formulação das membranas na redução de custo das mesmas, já que suas proporções variam segundo as diferentes composições.

Tabela 4.14 – Análise estatística da variável custo das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(3)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 95,00%	+ 95,00%
Média	0,5136*	0,0013	399,52	3,458E-08	0,5095	0,5177
(1) Quitosana	0,030*	0,0030	9,9499	0,0022	0,0204	0,0396
(2) Quitina	-0,095*	0,0030	-31,508	7,025E-05	-0,1046	-0,0854
(3) Glicerol	-0,120*	0,0030	-39,799	3,490E-05	-0,1296	-0,1104
1 * 2	0,025*	0,0030	8,2916	0,0037	0,0154	0,0346
1 * 3	0,040*	0,0030	13,266	0,001	0,0304	0,0496
2 * 3	0,025*	0,0030	8,2916	0,0037	0,0154	0,0346
1*2*3	-0,015*	0,0030	-4,9749	0,0156	-0,0246	-0,0054

OBS: desvios calculados a partir da média quadrática dos resíduos = 0,0000182.

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).



* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Figura 4.14 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta custo.

Como se pode notar, a substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol reduz significativamente o custo do produto final, daí a motivação do planejamento estatístico proposto neste trabalho. Além disso, pode-se observar que as variáveis de estudo apresentam interação entre elas, ou seja, cada uma delas tem influência direta na ação das demais, na faixa experimental estudada. Assim, pode-se concluir que a utilização de uma solução de partida de quitosana mais concentrada (2,5%) tende a aumentar o custo do biomaterial, sendo este aumento dependente da presença de quitina e/ou glicerol na solução.

Apesar da análise fornecer resultados de aumento de custo dos biomateriais quando da utilização de uma solução de partida de quitosana mais concentrada (2,5%), tal comportamento não é observado para as membranas que contêm apenas quitosana em suas formulações (ensaios 1 e 2). Fazendo-se a comparação entre uma membrana sintetizada a partir de uma solução de partida a 1,0% e outra sintetizada a partir de uma solução de partida a 2,5%, aquela obtida da solução mais concentrada apresenta um custo inferior de 0,05 dólares, o que representa uma redução de 7,6% no custo final do biomaterial. Tal fato deve-se à maior quantidade de solução de quitosana utilizada na formulação da membrana referente ao ensaio 1. Neste caso, são utilizados 112,5 g de solução, enquanto que para o ensaio 2 são utilizados apenas 45,0 g (vide item 3.2.4). Assim, apesar da quantidade de quitosana ser a mesma em ambos os casos, no cálculo do custo final das membranas estão incluídos os custos das matérias-primas ácido acético e água deionizada, os quais são os responsáveis pelo aumento do custo total do produto.

Deve-se ressaltar que as diferentes composições das soluções de quitosana propostas neste trabalho permitiram uma redução de custo final das membranas que variaram de 13,1 a 42,4%, quando comparados aos custos das membranas compostas somente por quitosana (ensaios 1 e 2). Assim, a membrana cuja substituição de parte da quitosana por outras matérias-primas promoveu uma maior redução no custo final do biomaterial foi aquela formada por 50% de quitosana, 25% de quitina e 25% de glicerol (ensaio 7). Em contrapartida, a substituição menos promissora foi a da membrana composta por 83,33% de quitosana e 16,67% de quitina (ensaio 4).

4.6.2. Caracterização física das membranas

A caracterização física das membranas densas à base de quitosana foi feita pela avaliação das seguintes variáveis: morfologia (superfície e seção transversal), espessura (nos estados seco e úmido), grau de hidratação (em água destilada e em tampão PBS) e cristalinidade. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

4.6.2.1. Efeito da variação da composição na morfologia das membranas

As morfologias da superfície e da seção transversal das membranas densas à base de quitosana, de composições definidas no planejamento experimental proposto neste trabalho, podem ser visualizadas nas Figuras 4.15 e 4.16, respectivamente.

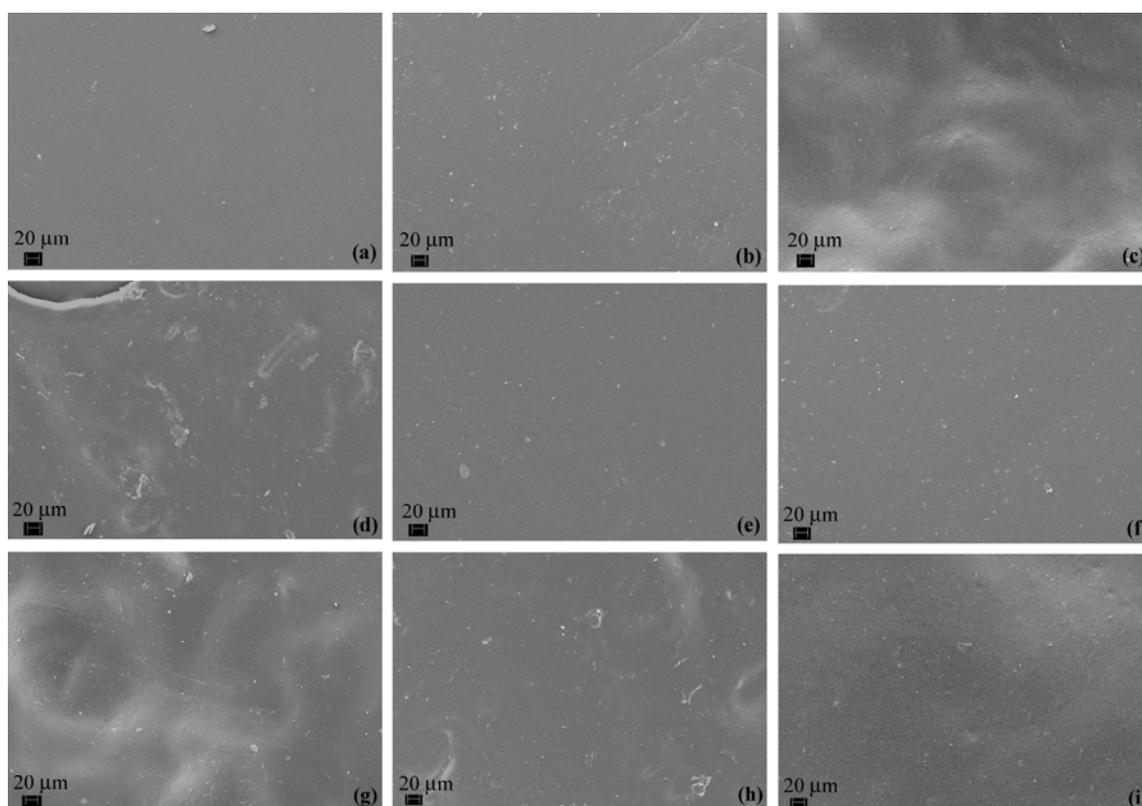


Figura 4.15 – Morfologia da superfície das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental proposto neste trabalho: (a-i) ensaios de 1 a 9.

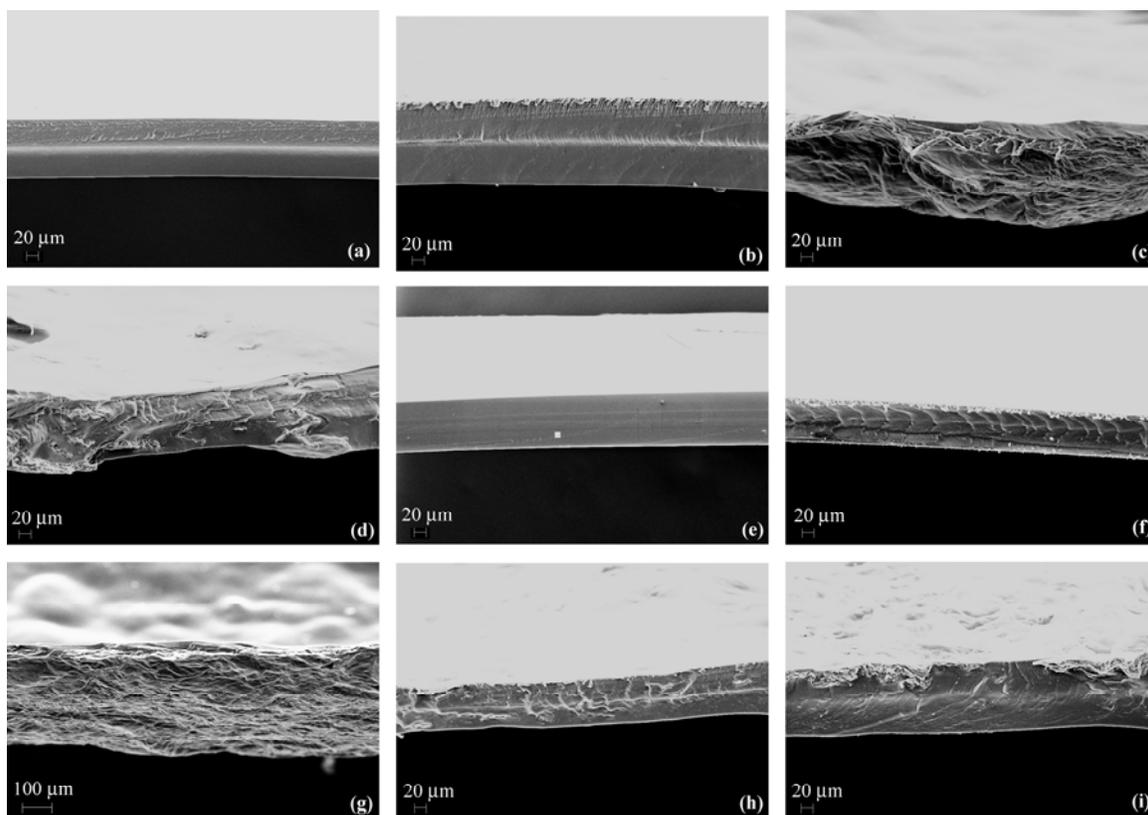


Figura 4.16 – Morfologia da seção transversal das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental proposto neste trabalho: (a-i) ensaios de 1 a 9.

Como se pode observar pelas micrografias mostradas na Figura 4.15, a morfologia da superfície das membranas não diferiram daquelas obtidas quando da realização dos ensaios do estudo do efeito da esterilização nas características físicas, mecânicas e biológicas destes biomateriais (Figuras 4.7 a 4.10). As membranas que não possuíam quitina em suas composições (Figura 4.15a,b,e,f) apresentaram superfícies aparentemente lisas enquanto que aquelas que possuíam este polissacarídeo (Figura 4.15c,d,g,h,i) apresentaram superfícies irregulares. Entretanto, todas as composições apresentaram ausência de poros em suas superfícies, caracterizando estes materiais como densos. A concentração da solução de partida de quitosana não mostrou influência na morfologia da superfície das membranas sintetizadas.

Diferentemente do observado na análise da morfologia da superfície das membranas densas à base de quitosana, a concentração da solução de partida mostrou influência na morfologia da seção transversal dos materiais, quando da utilização da quitina como matéria-prima para a obtenção das membranas (Figura 4.16c,d,g,h,i).

Enquanto que a seção transversal das membranas obtidas quando do uso da solução de partida de quitosana mais concentrada (Figura 4.16d,h) mostrou-se relativamente homogênea e contínua, a seção transversal das membranas obtidas quando do uso da solução mais diluída (Figura 4.16c,g) mostrou-se rugosa, descontínua e fibrosa. A concentração da solução de partida de quitosana não mostrou influência sobre a seção transversal das membranas compostas exclusivamente por quitosana (Figura 4.16a,b) e aquelas compostas por quitosana e glicerol (Figura 4.16e,f), as quais mostraram-se relativamente lisas e uniformes.

4.6.2.2. Efeito da variação da composição na espessura das membranas

As espessuras nos estados seco e úmido das membranas propostas no planejamento estatístico utilizado neste trabalho podem ser visualizadas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Valores das espessuras das composições de membranas densas à base de quitosana propostas no planejamento experimental, secas e hidratadas com água destilada.

Ensaio	Espessura (mm)	
	Membrana seca	Membrana úmida
1	0,14 ± 0,06	0,18 ± 0,03
2	0,13 ± 0,06	0,21 ± 0,05
3	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,02
4	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,02
5	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,03
6	0,12 ± 0,04	0,19 ± 0,02
7	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,01
8	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,03
9	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,02
10	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,02
11	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,02

As análises estatísticas destas duas variáveis foram feitas utilizando-se o software Statistica e podem ser visualizadas nas Tabelas 4.16 e 4.17 e na Figura 4.17.

Tabela 4.16 – Análise estatística da variável espessura no estado seco das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	0,171*	0,0034	49,0900	0,0004	0,1559	0,1859
(1) Quitosana	-0,005	0,0082	-0,6124	0,6026	-0,0401	0,0301
(2) Quitina	0,080*	0,0082	9,7980	0,0103	0,0449	0,1151
(3) Glicerol	-0,010	0,0082	-1,2247	0,3453	-0,0451	0,0251
1 * 2	0,005	0,0082	0,6124	0,6026	-0,0301	0,0401
1 * 3	0,005	0,0082	0,6124	0,6026	-0,0301	0,0401
2 * 3	0,000	0,0082	0,0000	1,0000	-0,0351	0,0351
1*2*3	0,005	0,0082	0,6124	0,6026	-0,03013101	0,0401

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 0,0001333.

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

Analisando-se os resultados obtidos pela análise estatística da variável-resposta espessura das membranas no estado seco (Tabela 4.16 e Figura 4.17), conclui-se que dentre as três variáveis de estudo analisadas (concentração da solução de partida de quitosana e a ausência ou a presença das matérias-primas quitina e/ou glicerol na solução de quitosana), apenas a quitina mostrou efeito estatisticamente significativo na faixa experimental estudada. Neste caso, sua adição à solução de quitosana promoveu um aumento de 0,08 mm na espessura seca do biomaterial não havendo qualquer tipo de interação entre esta variável de estudo e as demais. Assim, o uso de uma solução de partida de quitosana mais concentrada (2,5%) ou mais diluída (1,0%) bem como a presença ou a ausência de glicerol não interferiram nos resultados obtidos, sendo a espessura seca da membrana definida pela presença da quitina. Este fato já havia sido observado nos ensaios de estudo da influência da esterilização nas características das

membranas densas à base de quitosana, sendo o valor da espessura no estado seco das membranas que possuíam quitina em suas composições semelhante ao valor do diâmetro médio da própria partícula de quitina.

Tabela 4.17 – Análise estatística da variável espessura no estado úmido das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

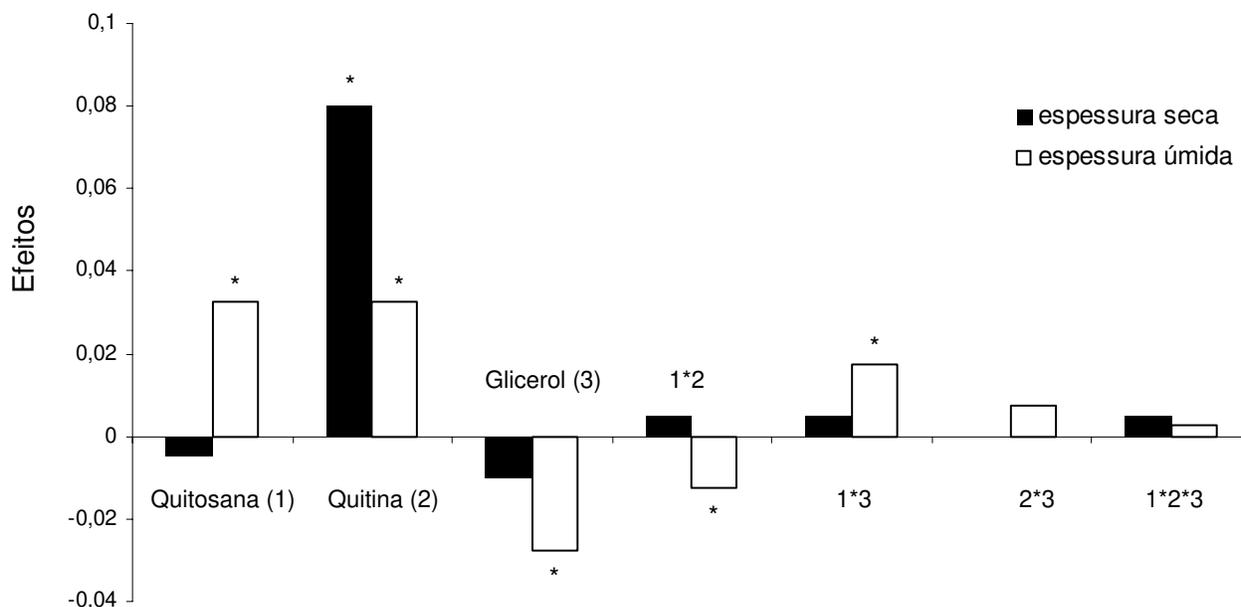
Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	0,1955*	0,0017	111,7579	8,0056E-05	0,1895	0,1996
(1) Quitosana	0,0325*	0,0041	7,9608	0,0154	0,0206	0,0444
(2) Quitina	0,0325*	0,0041	7,9608	0,0154	0,0206	0,0444
(3) Glicerol	-0,0275*	0,0041	-6,7361	0,0213	-0,0394	-0,0156
1 * 2	-0,0125*	0,0041	-3,0619	0,0922	-0,0244	-0,0006
1 * 3	0,0175*	0,0041	4,2866	0,0503	0,0056	0,0294
2 * 3	0,0075	0,0041	1,8371	0,2076	-0,0044	0,0194
1*2*3	0,0025	0,0041	0,6124	0,6026	-0,0094	0,0144

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 0,0000333.

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

A análise estatística das espessuras das membranas no estado úmido mostrou que as três variáveis de estudo apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre os resultados obtidos, existindo ainda interação entre as variáveis na faixa experimental estudada. Pode-se dizer que o uso de uma solução de partida de quitosana mais concentrada e a substituição de parte da quitosana por quitina na composição da membrana promoveu um aumento nas espessuras dos materiais no estado úmido. Já a substituição de parte da quitosana por glicerol causou uma redução na variável-resposta quando comparada à das membranas formadas somente por quitosana (ensaios 1 e 2). Tal fato deve-se, muito provavelmente, à extração parcial ou total do plastificante durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas, já que a composição na qual a substituição de quitosana por glicerol foi de 33,33% (ensaio 5) foi aquela que apresentou menor valor de espessura no estado úmido, valor este discrepante daqueles obtidos para

esta mesma variável-resposta nas demais condições experimentais. Com a sua extração, além da pequena quantidade de glicerol presente (caso a extração tenha sido parcial) ou de sua ausência (caso a extração tenha sido total), ainda a quantidade de quitosana presente na membrana é inferior àquela presente nas membranas formadas exclusivamente por quitosana, justificando assim, os menores valores obtidos de espessura dos materiais no estado úmido.



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

Figura 4.17 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta espessura das membranas secas e hidratadas com água destilada.

4.6.2.3. Efeito da variação da composição no grau de hidratação das membranas

Sabendo-se que as queimaduras geram descompensações hídricas no organismo humano pela grande perda de líquido, uma característica importante dos biomateriais destinados à regeneração de pele lesada por este agente refere-se à redução da perda de fluidos corpóreos pelo paciente. Esta característica pode ser indiretamente determinada pela avaliação da capacidade de absorção de líquidos juntamente com a determinação da permeabilidade destes materiais ao vapor d'água.

Os graus de hidratação das membranas em água destilada e em tampão PBS podem ser visualizados na Tabela 4.18. As análises estatísticas destas duas variáveis

foram feitas utilizando-se o software Statistica e podem ser visualizadas nas Tabelas 4.19 e 4.20 e na Figura 4.18.

Tabela 4.18 – Valores dos graus de hidratação das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental utilizado neste trabalho.

Ensaio	Grau de hidratação (%)	
	Água destilada (pH 3,05)	Tampão PBS (pH 7,4)
1	110,8 ± 0,6	107,6 ± 0,4
2	108,4 ± 1,2	107,3 ± 0,9
3	89,3 ± 1,8	89,5 ± 1,4
4	102,7 ± 1,4	101,0 ± 0,7
5	101,6 ± 2,7	112,9 ± 0,4
6	109,7 ± 0,6	108,8 ± 2,8
7	88,8 ± 0,2	89,9 ± 1,6
8	92,5 ± 1,0	101,9 ± 1,0
9	93,7 ± 1,0	99,2 ± 1,2
10	96,1 ± 3,1	97,2 ± 0,7
11	100,2 ± 0,8	105,8 ± 1,1

Analisando-se os resultados obtidos pela análise estatística da variável-resposta grau de hidratação das membranas em água destilada, pode-se observar que apenas a quitina apresentou efeito estatisticamente significativo na faixa experimental estudada, reduzindo neste caso, quando da sua inclusão na formulação das soluções para a obtenção das membranas, o grau de hidratação dos materiais em 14,3%. Deve-se salientar que esta variável não mostrou interação com as demais variáveis estudadas na faixa experimental investigada, assim, o uso de uma solução de partida de quitosana mais concentrada (2,5%) ou mais diluída (1,0%) bem como a presença ou a ausência de glicerol não interferiram nos resultados obtidos.

Tabela 4.19 – Análise estatística da variável grau de hidratação em água destilada das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 95,00%	+ 95,00%
Média	99,44*	0,9910	100,3374	9,9314E-05	95,1723	103,7004
(1) Quitosana	5,70	2,3241	2,4525	0,1337	-4,3000	15,7000
(2) Quitina	-14,30*	2,3241	-6,1528	0,0254	-24,3000	-4,3000
(3) Glicerol	-4,65	2,3241	-2,0007	0,1834	-14,6500	5,3500
1 * 2	2,85	2,3241	1,2263	0,3449	-7,1500	12,8500
1 * 3	0,20	2,3241	0,0861	0,9393	-9,8000	10,2000
2 * 3	-0,70	2,3241	-0,3012	0,7917	-10,7000	9,3000
1*2*3	-5,05	2,3241	-2,1728	0,1619	-15,0500	4,9500

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 10,8033.

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Assim como para o grau de hidratação em água destilada, no caso da hidratação em tampão PBS, a única variável de estudo que apresentou influência estatisticamente significativa na resposta na faixa experimental estudada foi a quitina. Entretanto, além do efeito isolado desta variável, a mesma apresentou interação com a concentração da solução de partida de quitosana. A inclusão de quitina na formulação das soluções para a obtenção das membranas promoveu uma redução no grau de hidratação das membranas, sendo tal comportamento mais pronunciado quando do uso de uma solução de quitosana menos concentrada (-18,1% contra -4,6%).

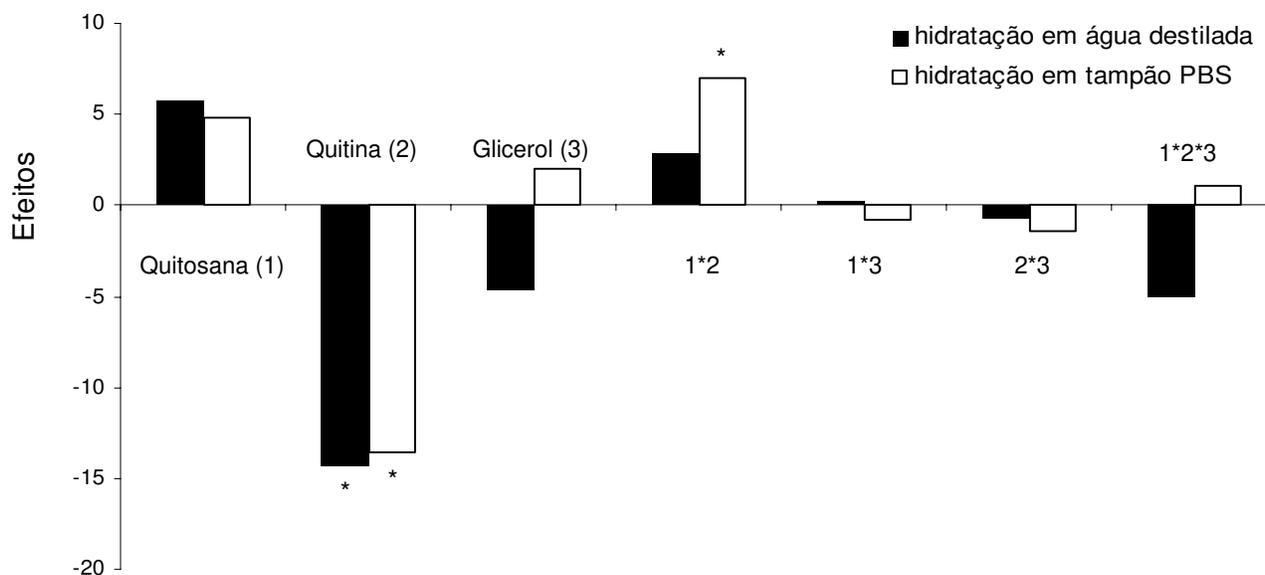
Apesar da influência negativa no grau de hidratação das membranas, seja em água destilada, seja em tampão PBS, quando da presença da quitina na solução de quitosana, todos os valores de hidratação mostrados na Tabela 4.18 ficaram acima de 88%, mostrando, portanto, um alto grau de hidratação das membranas em todas as composições analisadas.

Tabela 4.20 – Análise estatística da variável grau de hidratação em tampão PBS das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(3)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	101,918*	1,1845	86,0457	3,4600E-06	99,1307	104,7057
(1) Quitosana	4,775	2,7778	1,7190	0,1841	-1,7622	11,3122
(2) Quitina	-13,575*	2,7778	-4,8869	0,0164	-20,1122	-7,0378
(3) Glicerol	2,025	2,7778	0,7290	0,5188	-4,5122	8,5622
1 * 2	6,975*	2,7778	2,5110	0,0869	0,4378	13,5122
1 * 3	-0,825	2,7778	-0,2970	0,7858	-7,3622	5,7122
2 * 3	-1,375	2,7778	-0,4950	0,6546	-7,9122	5,1622
1*2*3	1,075	2,7778	0,3870	0,7246	-5,4622	7,6122

OBS: desvios calculados a partir da média quadrática dos resíduos = 15,43254.

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



* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$ e $p < 0,10$ para a variável-resposta grau de hidratação das membranas em água destilada e em tampão PBS, respectivamente).

Figura 4.18 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta grau de hidratação de membranas em água destilada e em tampão PBS.

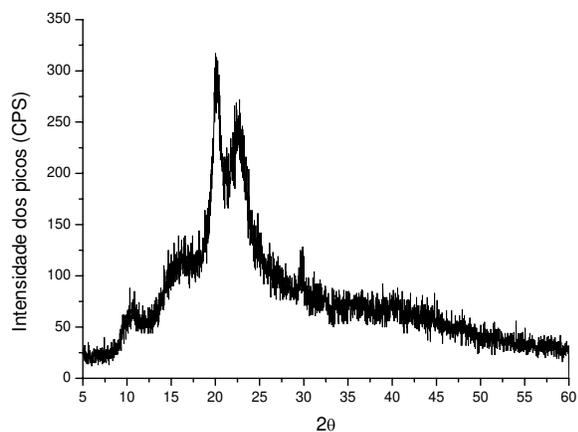
4.6.2.4. Efeito da variação da composição na cristalinidade das membranas

Sabendo-se que as propriedades mecânicas dos materiais bem como algumas de suas propriedades biológicas, como a degradação quando em presença da enzima lisozima, estão diretamente relacionadas à cristalinidade dos mesmos, fez-se de grande relevância o estudo desta variável, sendo tal caracterização realizada por ensaios de difração de raios-X. Os espectros de difração de raios-X obtidos para todas as condições experimentais do planejamento estatístico proposto neste trabalho podem ser visualizados nas Figuras 4.19 e 4.20 e as cristalinidades, calculadas a partir destes espectros, encontram-se reunidas na Tabela 4.21.

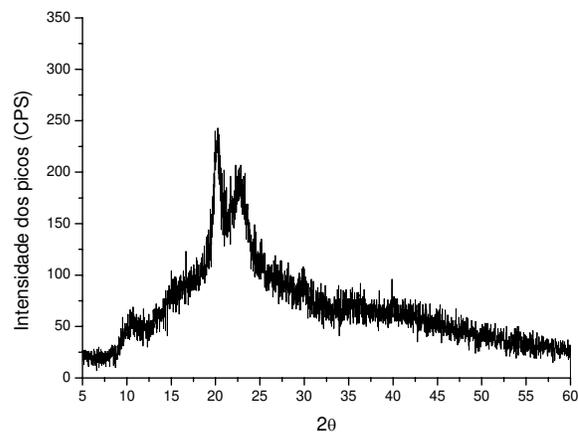
Tabela 4.21 – Cristalinidade estimada das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental utilizado neste trabalho.

Ensaio	Cristalinidade (CPS)
1	294,70
2	239,50
3	139,10
4	221,20
5	120,00
6	188,00
7	118,50
8	137,80
9	165,00
10	180,70
11	145,40

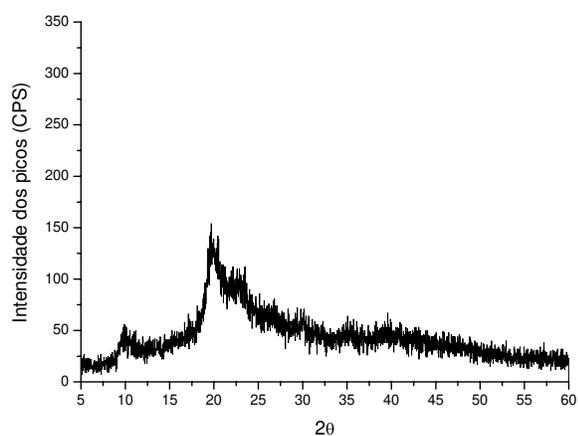
A análise estatística desta variável-resposta é indicada na Tabela 4.22 e na Figura 4.21.



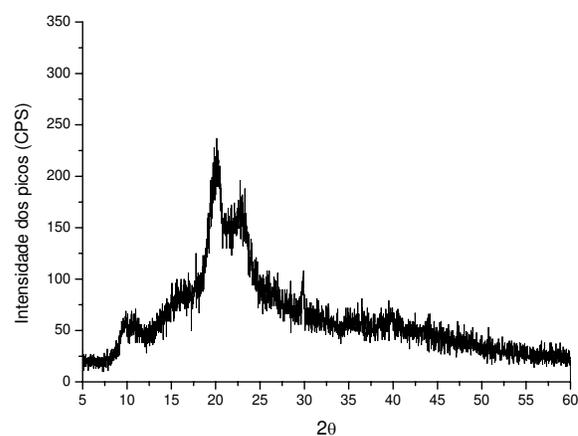
(a)



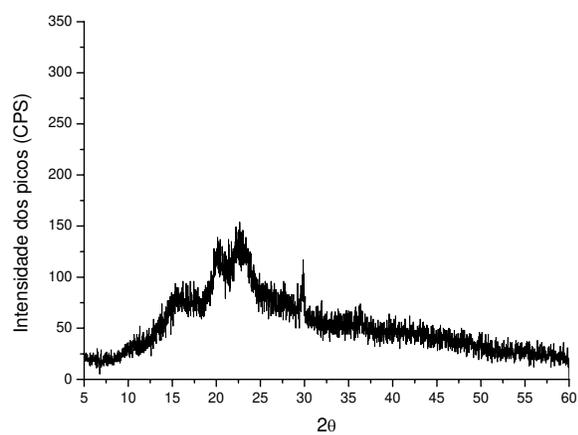
(b)



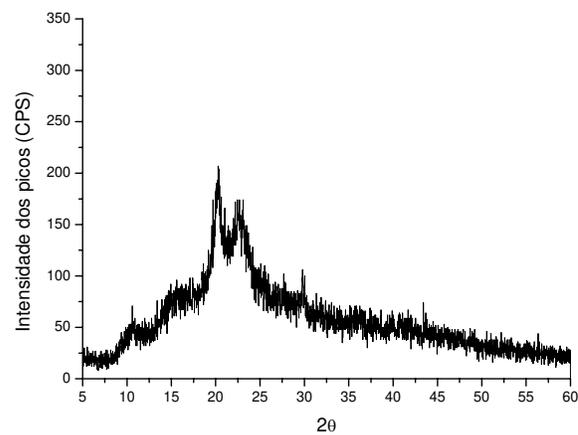
(c)



(d)

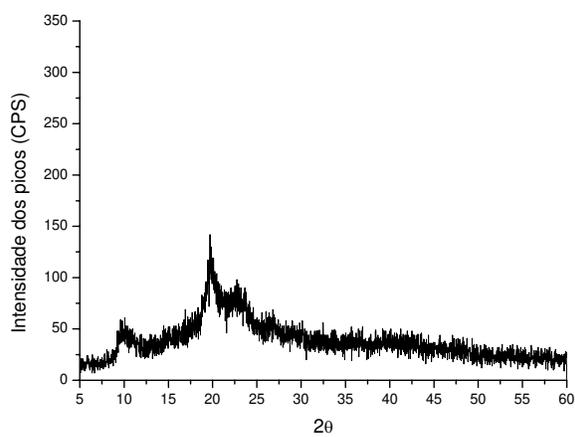


(e)

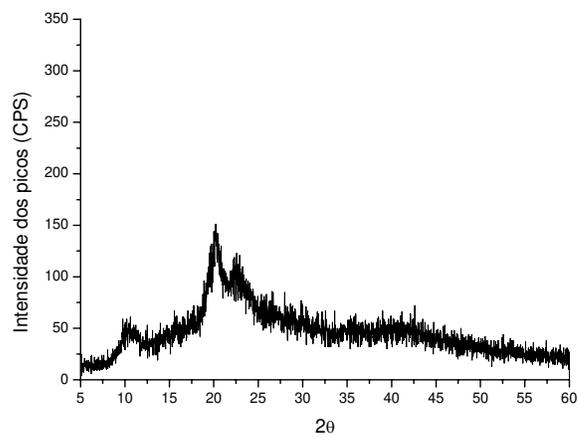


(f)

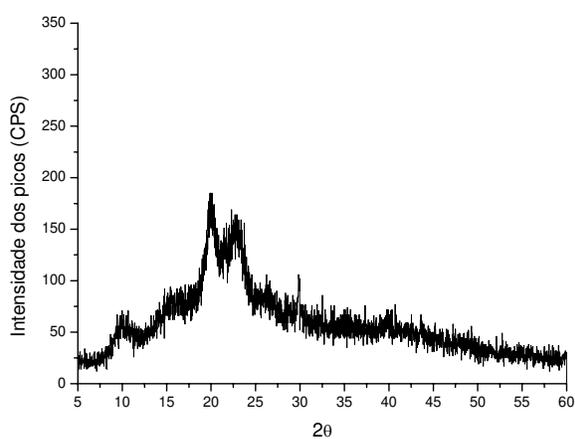
Figura 4.19 – Difratoigramas de raios-X das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento estatístico utilizado neste trabalho: (a - f) ensaios de 1 a 6, respectivamente.



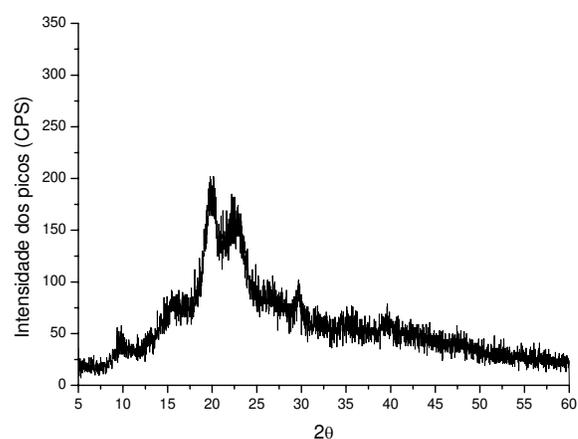
(g)



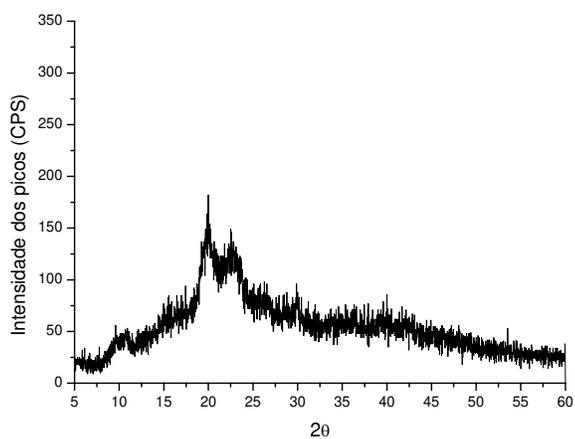
(h)



(i)



(j)



(k)

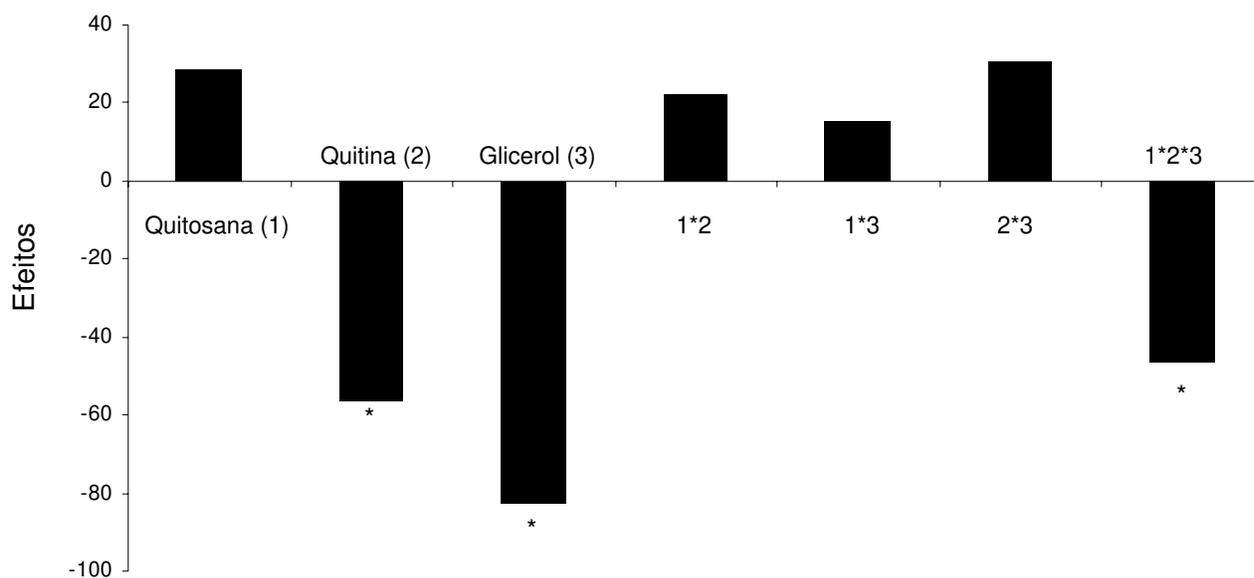
Figura 4.20 – Difratoigramas de raios-X das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento estatístico utilizado neste trabalho: (g - k) ensaios de 7 a 11, respectivamente.

Tabela 4.22 – Análise estatística da variável cristalinidade das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	177,26*	5,3325	33,2422	0,0009	161,6928	192,8344
(1) Quitosana	28,55	12,5058	2,2829	0,1499	-7,9668	65,0668
(2) Quitina	-56,40*	12,5058	-4,5099	0,0458	-92,9168	-19,8833
(3) Glicerol	-82,55*	12,5058	-6,6010	0,0222	-119,0668	-46,0333
1 * 2	22,15	12,5058	1,7712	0,2185	-14,3668	58,6668
1 * 3	15,10	12,5058	1,2074	0,3507	-21,4168	51,6168
2 * 3	30,55	12,5058	2,4429	0,1346	-5,9668	67,0668
1*2*3	-46,50*	12,5058	-3,7183	0,0653	-83,0168	-9,9832

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 312,79.

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



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

Figura 4.21 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta cristalinidade.

Como se pode notar, a concentração da solução de partida de quitosana não influenciou significativamente na cristalinidade dos materiais enquanto que a substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol promoveu uma redução significativa nesta variável-resposta na faixa experimental estudada, sendo constatada ainda, interação entre as três variáveis estudadas.

A redução na cristalinidade das membranas quando da utilização do glicerol pode ser decorrente de dois motivos. Caso o glicerol não tenha sido totalmente extraído durante as etapas de neutralização e lavagem e se faça presente na composição das membranas mesmo que em pequenas quantidades, o mesmo é um plastificante, de estrutura amorfa (Cervera e col., 2004), que atua de maneira a enfraquecer as ligações intermoleculares do polímero, e conseqüentemente, dificulta o empacotamento das cadeias moleculares, que no caso, se reflete na redução da cristalinidade do produto final (Agnelli, 1994). Caso tal composto tenha sido totalmente extraído, sua presença durante a síntese das membranas teve influência na organização da estrutura polimérica, a qual se mostrou menos organizada que a observada quando da obtenção de uma membrana formada somente por quitosana. Já a quitina, apesar de ser um polímero semicristalino (Senel e McClure, 2004; Kurita, 2001; Madihally e Matthew, 1999; Tomihata e Ikada, 1997), encontra-se inserida nas membranas sob a forma de partículas, perturbando assim, a estrutura polimérica da quitosana, polissacarídeo responsável pela formação da membrana. Como resultado desta perturbação, tem-se a redução da cristalinidade dos materiais nos quais a quitina se faz presente.

4.6.3. Caracterização mecânica das membranas

Um biomaterial deve possuir características mecânicas adequadas para sua aplicação, além de permitir seu fácil manuseio e armazenamento. Assim, foram avaliadas duas características mecânicas das membranas densas à base de quitosana, a tensão de ruptura e a porcentagem de deformação após o alongamento das amostras. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.23.

As análises estatísticas destas duas variáveis foram feitas utilizando-se o software Statistica e podem ser visualizadas nas Tabelas 4.24 e 4.25 e nas Figuras 4.22 e 4.23.

Tabela 4.23 – Valores de tensão de ruptura e porcentagem de deformação após o alongamento das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental utilizado neste trabalho.

Ensaio	Propriedades mecânicas	
	Tensão de ruptura (MPa)	% de deformação
1	7,16 ± 2,91	154,84 ± 32,02
2	8,12 ± 2,10	187,50 ± 18,57
3	2,48 ± 0,30	24,67 ± 6,41
4	3,00 ± 0,28	51,17 ± 9,16
5	5,00 ± 2,87	127,22 ± 42,98
6	8,61 ± 2,12	154,56 ± 18,58
7	2,43 ± 0,43	21,33 ± 3,43
8	4,10 ± 0,27	70,27 ± 12,64
9	3,73 ± 0,39	69,22 ± 15,15
10	3,32 ± 0,32	60,00 ± 7,92
11	3,32 ± 0,35	56,44 ± 8,52

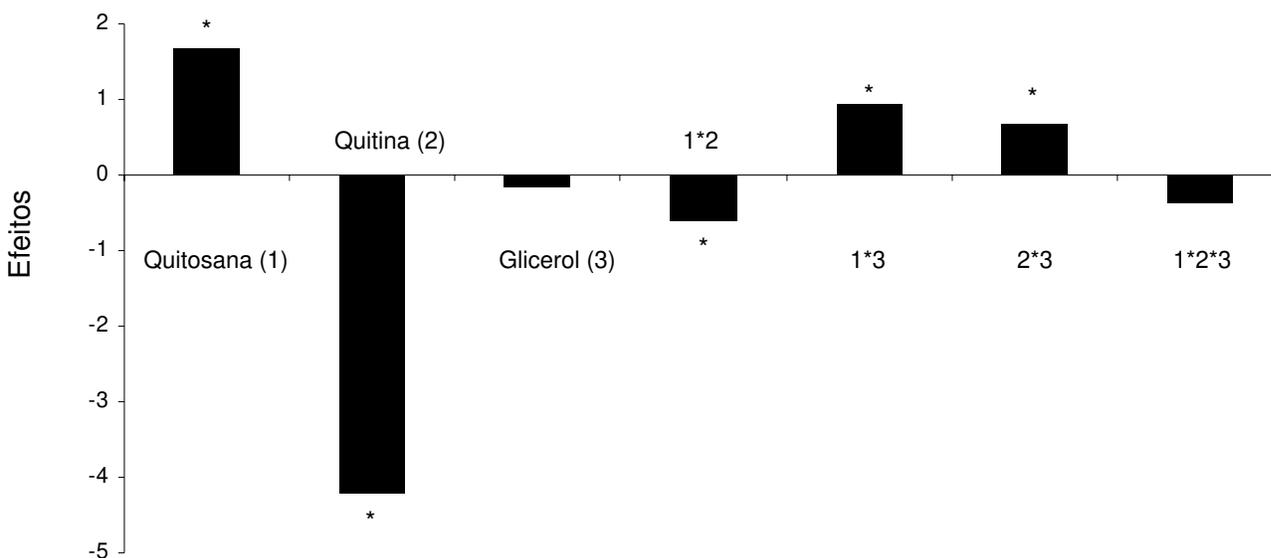
Pode-se observar que o uso de soluções mais concentradas de quitosana aumentou significativamente a resistência mecânica dos biomateriais enquanto que a inclusão de quitina nas soluções apresentou efeito contrário, ou seja, sua presença na solução promoveu uma redução na tensão de ruptura dos materiais, sendo ainda observada interação entre as três variáveis analisadas na faixa experimental estudada. A influência isolada do glicerol, pela análise estatística, foi considerada não significativa apesar deste componente ter mostrado influência sobre as demais variáveis.

Tabela 4.24 – Análise estatística da variável tensão de ruptura das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	4,661*	0,0714	65,3046	0,0002	4,4525	4,8693
(1) Quitosana	1,690*	0,1674	10,0967	0,0097	1,2012	2,1788
(2) Quitina	-4,220*	0,1674	-25,2118	0,0016	-4,7088	-3,7312
(3) Glicerol	-0,155	0,1674	-0,9260	0,4522	-0,6438	0,3338
1 * 2	-0,595*	0,1674	-3,5547	0,0708	-1,0838	-0,1062
1 * 3	0,950*	0,1674	5,6756	0,0297	0,4612	1,4388
2 * 3	0,680*	0,1674	4,0626	0,0556	0,1912	1,1688
1*2*3	-0,375	0,1674	-2,2404	0,1544	-0,8638	0,1138

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 0,0560333.

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



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

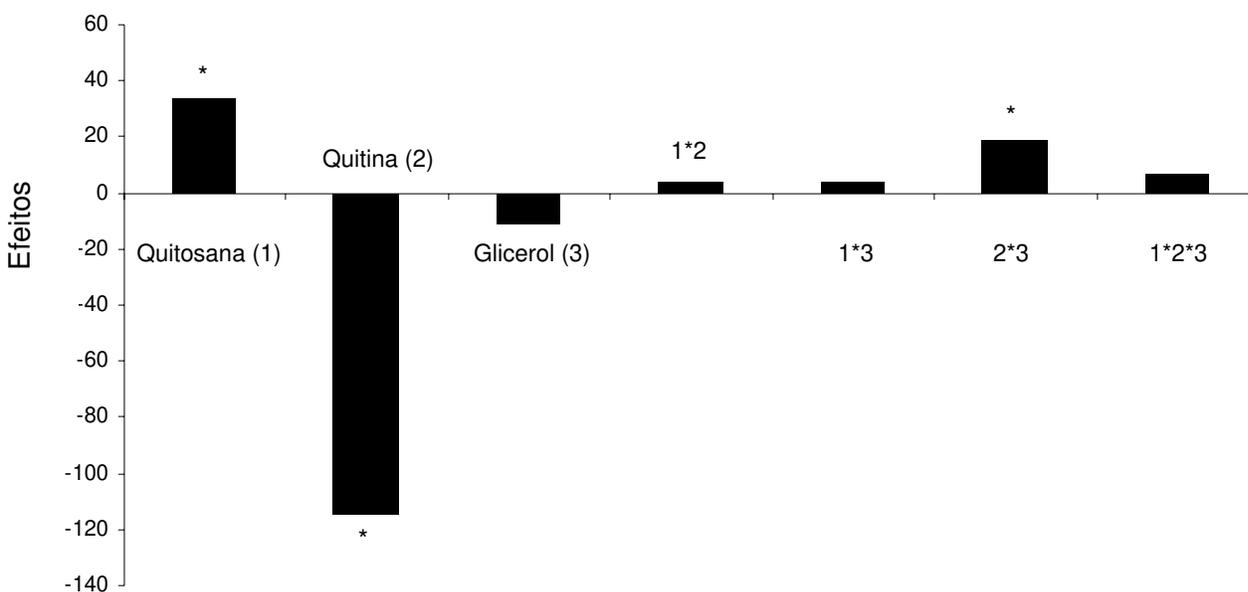
Figura 4.22 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta tensão de ruptura.

Tabela 4.25 – Análise estatística da variável porcentagem de deformação após o alongamento das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	88,84*	1,9886	44,6728	0,0005	83,0314	94,6450
(1) Quitosana	33,86*	4,6638	7,2602	0,0184	20,2418	47,4782
(2) Quitina	-114,17*	4,6638	-24,4801	0,0017	-127,7882	-100,5518
(3) Glicerol	-11,20	4,6638	-2,4015	0,1383	-24,8182	2,4182
1 * 2	3,86	4,6638	0,8277	0,4949	-9,7582	17,4782
1 * 3	4,28	4,6638	0,9177	0,4556	-9,3382	17,8982
2 * 3	19,08*	4,6638	4,0911	0,0549	5,4618	32,6982
1*2*3	6,94	4,6638	1,4881	0,2751	-6,6782	20,5582

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 43,50173.

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



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

Figura 4.23 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta porcentagem de deformação.

Para a variável-resposta porcentagem de deformação após o alongamento das membranas, pode-se observar que, assim como para a tensão de ruptura, o uso de soluções mais concentradas de quitosana aumentou a ductilidade dos biomateriais enquanto que a inclusão de quitina nas soluções teve efeito contrário, sendo ainda observada interação entre esta variável e a presença ou a ausência de glicerol na solução. A concentração da solução de partida de quitosana não mostrou interação com as demais variáveis estudadas na faixa experimental investigada.

Uma possível explicação para os maiores valores de resistência mecânica e ductilidade das membranas quando do uso de soluções mais concentradas de quitosana está relacionada às interações inter e intramoleculares formadas quando da obtenção da membrana, já que as quantidades de soluções utilizadas para a síntese dos materiais são diferentes. No caso das membranas obtidas a partir de soluções mais concentradas, as quantidades de soluções são muito inferiores àquelas utilizadas quando do uso de soluções mais diluídas (como exemplo tem-se que a massa de solução do ensaio 1 é 150% maior que a utilizada no ensaio 2). Assim, durante a etapa de evaporação do solvente e formação das membranas, no caso do uso das soluções mais concentradas, a distância entre as moléculas do sistema é pequena quando comparada àquela observada quando do uso de soluções mais diluídas, favorecendo assim a formação de um maior número de interações e talvez, de maior intensidade. Deve-se ainda ressaltar que, no caso das soluções mais diluídas, devido ao uso de quantidades maiores de solução, as moléculas do sistema encontram-se mais afastadas entre si, a evaporação se faz mais lentamente e muito provavelmente, o arranjo das moléculas poliméricas se faz de forma mais organizada do que quando do uso de soluções mais concentradas. Entretanto, pela hipótese levantada, a influência da organização polimérica se mostra menos relevante que o número e intensidade de interações inter e intra moleculares, as quais parecem ter papel fundamental na determinação da resistência e ductilidade dos materiais.

Sabendo-se que a pele humana normal apresenta tensão de ruptura que varia de 2,5 a 16 MPa (Silver, 1994 APUD Wang e col., 2002) e elasticidade de 70% (Hansen e Jemec, 2002), pode-se dizer que dentre todas as composições sintetizadas, apenas as correspondentes aos ensaios 3 e 7 não foram consideradas adequadas para uso no tratamento de lesões de pele, já que ambas apresentaram tensões de ruptura inferiores a 2,5 MPa e deformações inferiores a 50%. Em ambas as composições, parte da quitosana foi substituída pela quitina que, por estar inserida nas membranas sob a forma de partículas, provavelmente, causou desorganização local no empacotamento das cadeias de quitosana, promovendo a redução na capacidade dos materiais em suportar tensões.

Desta forma, a estrutura polimérica se rompe mais facilmente próximo aos pontos onde a quitina se encontra inserida, reduzindo não somente a resistência mecânica dos materiais como também a porcentagem de alongamento dos mesmos. No caso do ensaio 3, a substituição foi de 33,3% e para o ensaio 7, a substituição foi de 25%. A substituição de 16,67% de quitosana por quitina (ensaio 4) permitiu a obtenção de membranas com características mecânicas em níveis aceitáveis de tensão de ruptura ($3,00 \pm 0,28$ MPa) e porcentagem de deformação ($51,17 \pm 9,16\%$).

4.6.4. Caracterização biológica das membranas

A caracterização biológica das membranas densas à base de quitosana foi feita pela avaliação das seguintes variáveis: adesão, proliferação celular e degradação enzimática. Os resultados obtidos são discutidos nos itens que se seguem.

4.6.4.1. Efeito da variação da composição das membranas na adesão e na proliferação celular

Assim como para os ensaios de avaliação da citotoxicidade das membranas densas à base de quitosana sintetizadas para o estudo da influência da esterilização nas características destes materiais, os ensaios de adesão e de proliferação celular deste novo conjunto de experimentos foram realizados utilizando-se o reagente MTT. Os resultados obtidos para a adesão das células Vero após duas horas de contato com os materiais encontram-se ilustrados na Figura 4.24.

Como se pode observar, todas as composições de membranas densas apresentaram valores de absorvância estatisticamente inferiores ao valor de absorvância obtido para o controle positivo de adesão celular (placa de poliestireno utilizada para a cultura de células) e apenas as membranas formadas por 77,78% de quitosana, 11,11% de quitina e 11,11% de glicerol (ensaios 10 e 11) apresentaram valores de absorvância estatisticamente superiores ao valor obtido para o controle negativo de adesão celular (placas de Teflon®), em um intervalo de confiabilidade de 95%. Assim, pode-se concluir que os materiais sintetizados não favoreceram a adesão das células Vero em suas superfícies.

Sabendo-se que as membranas de quitosana não apresentam efeito citotóxico para as células Vero (vide item 4.4.4), os baixos valores de adesão poderiam ser decorrentes do curto tempo de exposição dos materiais às células. Assim, novos ensaios

de adesão foram realizados, utilizando-se um tempo de exposição de 24 horas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 4.25.

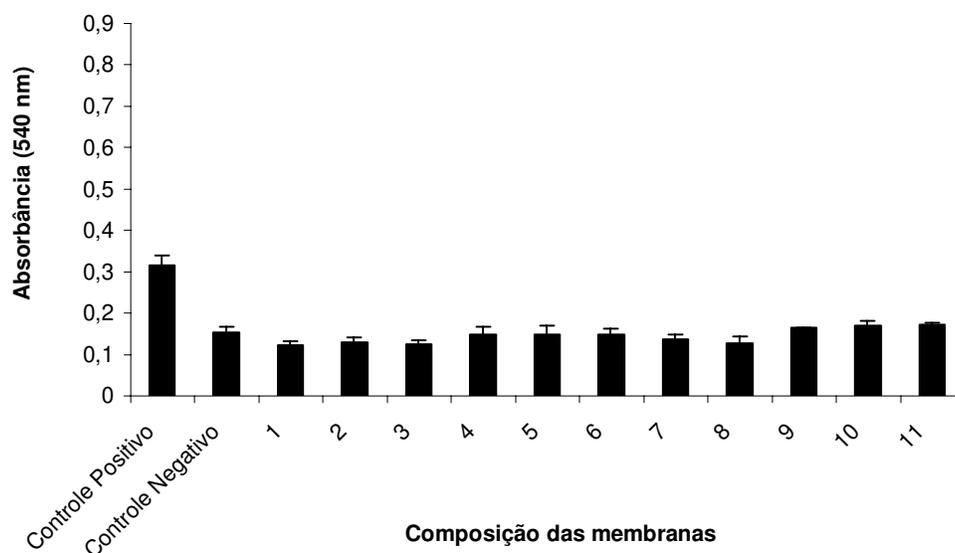


Figura 4.24 – Resultados do ensaio de adesão das células Vero após duas horas de contato com as membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento estatístico utilizado neste trabalho.

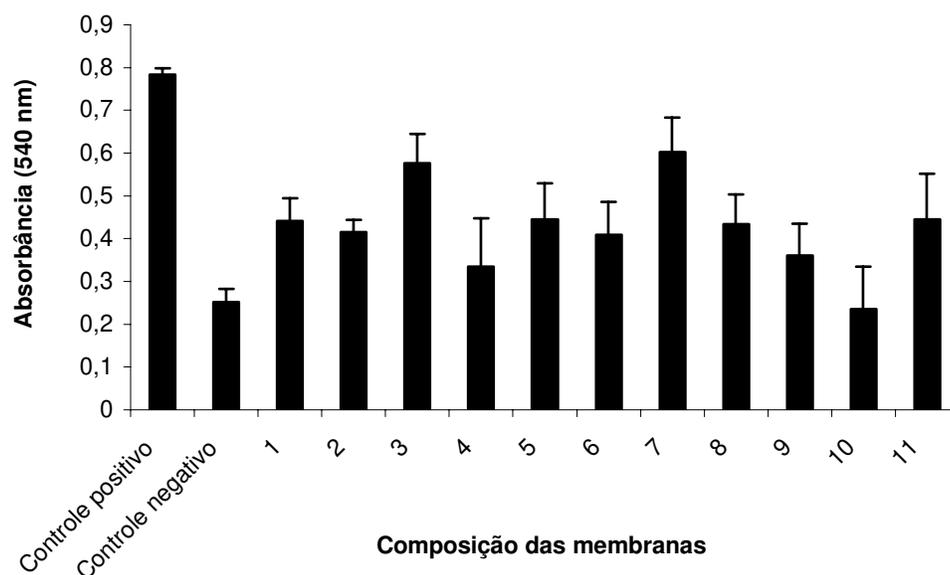


Figura 4.25 – Resultados do ensaio de adesão das células Vero após 24 horas de contato com as membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento estatístico utilizado neste trabalho.

Pode-se observar que o aumento do tempo de exposição das células Vero às membranas densas à base de quitosana para 24 horas forneceu valores de absorvância, para as diferentes composições analisadas, superiores aos obtidos quando da exposição das células Vero às diferentes composições de membranas por duas horas, entretanto, o comportamento observado continuou indicando que os materiais não se mostraram favoráveis à adesão celular, já que todos os valores de absorvância obtidos foram inferiores ao valor de absorvância observado para o controle positivo de adesão. Deve-se ressaltar que, diferentemente do comportamento mostrado na Figura 4.24, com o aumento do tempo de exposição das células aos materiais, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorvância obtidos para a maioria das diferentes composições de membranas analisadas e o controle negativo de adesão, em um intervalo de confiabilidade de 95%.

Uma vez que a técnica colorimétrica utilizada nestes ensaios é uma medida indireta do comportamento das células, para um melhor entendimento dos resultados obtidos, fez-se necessária a realização de um novo conjunto de ensaios, onde o comportamento celular foi monitorado por microscopia. No caso das membranas translúcidas (materiais formados quando da ausência da quitina), a quantidade de células existentes sobre os materiais após o tempo de exposição de 24 horas assim como a morfologia das mesmas foram observadas em microscópio invertido de contraste de fases e em microscópio eletrônico de varredura. Já para as membranas não translúcidas, as mesmas variáveis foram analisadas apenas por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 4.26 e 4.27.

Como se pode observar na Figura 4.26, a quantidade de células presente na superfície das membranas após o período de 24 horas é inferior à quantidade de células existente sobre a superfície do controle positivo de adesão para um ensaio de mesma duração. Estes resultados corroboram com os baixos valores de absorvância obtidos no ensaio colorimétrico utilizando-se o reagente MTT (Figura 4.25). Além disso, a morfologia das células presentes sobre as superfícies dos materiais mostra-se também diferenciada.

De acordo com a literatura (Lombello e col., 2000; Genari e col., 1996), as células Vero, por serem dependentes de ancoragem para que haja sua reprodução, se ligam às superfícies dos materiais, apresentando morfologia alongada (Figura 4.26a). Caso as condições ambientais não sejam adequadas, tal comportamento não é observado e as células apresentam morfologia arredondada (Figura 4.26b,c,d,e), estando presas às superfícies dos materiais apenas por poucos pontos de contato ou seja, por ligações de fraca intensidade. Segundo Angelova e Hunkeler (1999) e Ratner e col. (1996), dentre os

diversos fatores que podem influenciar a adesão das células às superfícies dos materiais destacam-se o tipo de célula utilizada (fibroblasto ou queratinócito), características físico-químicas da superfície dos materiais (energia livre superficial, carga superficial e topografia, destacando-se rugosidade, textura e porosidade) e no caso de materiais à base de quitosana, o grau de desacetilação, que segundo Chatelet e col. (2001), pode ser considerado o fator majoritário. De acordo com os últimos autores mencionados, para quitosanas com grau de desacetilação de até 47% e células do tipo fibroblastos e queratinócitos, quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, menor a capacidade de adesão das células à superfície dos materiais e conseqüentemente, menor a proliferação celular. Já segundo Prasitsilp e col. (2000), que estudaram o comportamento biológico de fibroblastos (L929 e BHK21) quando do contato com membranas sintetizadas a partir de quitosanas com graus de desacetilação que variaram de 76 a 90%, o aumento do grau de desacetilação favoreceu a adesão celular. Como se pode observar, há controvérsia e a comparação entre os resultados mostrados na literatura é muitas vezes dificultada pelo uso de quitosanas de diferentes fontes, das diferenças entre as condições de obtenção dos biomateriais e das técnicas de caracterização utilizadas, as quais interferem diretamente nos resultados obtidos.

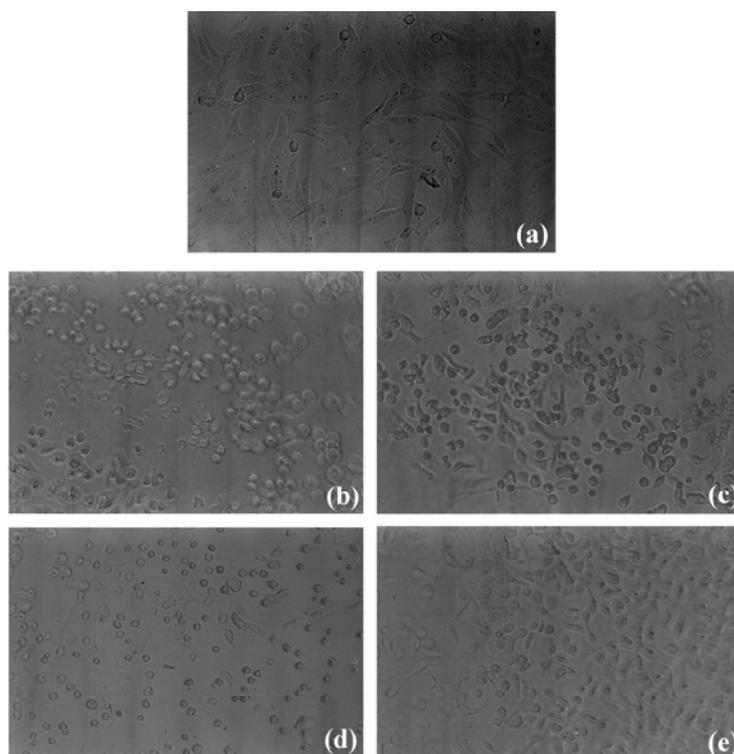


Figura 4.26 – Análise em microscópio invertido de contraste de fases do comportamento das células Vero após 24 horas de contato com os materiais: (a) controle positivo, (b) ensaio 1, (c) ensaio 2, (d) ensaio 5 e (e) ensaio 6. Aumento das fotos de 20 vezes.

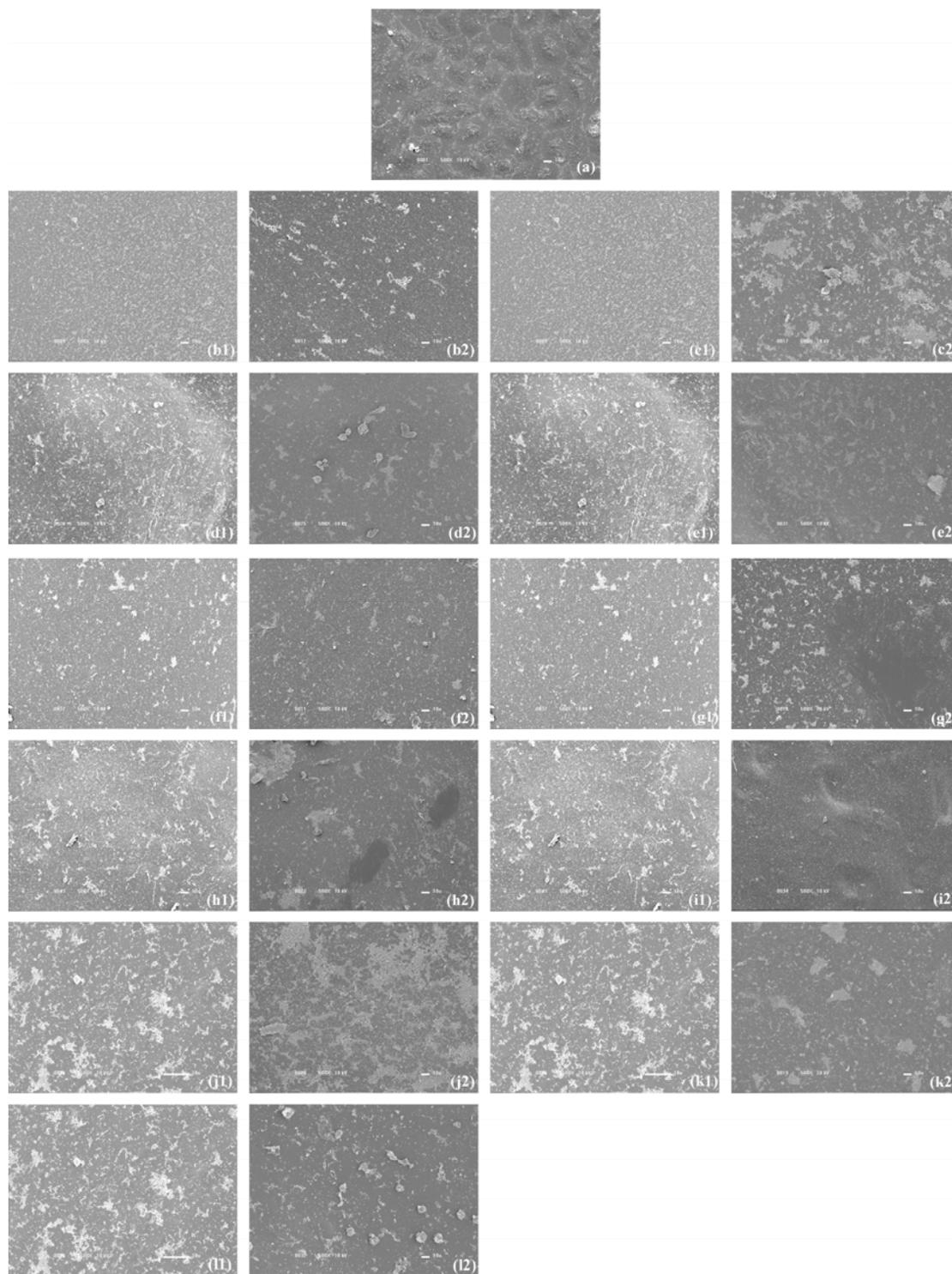


Figura 4.27 – Análise em microscópio eletrônico de varredura do comportamento das células Vero após 24 horas de contato com os materiais: (a) controle positivo, (b1 a l1) brancos dos materiais correspondentes aos ensaios 1 a 11, respectivamente, (b2 a l2) materiais correspondentes aos ensaios 1 a 11, respectivamente, após exposição às células Vero. Barras correspondentes a 10 μm .

Já na Figura 4.27, enquanto que o controle positivo de adesão (no caso, lâminas de vidro) encontra-se repleto de células com morfologia normal, não foi observada a presença de células na superfície dos biomateriais. Em alguns casos, apenas fragmentos de células foram detectados (Figura 4.27c2,d2,e2,h2,j2,l2). Tal fato deve estar associado, muito provavelmente, às ligações de fraca intensidade entre as células Vero e as superfícies dos materiais, conforme discutido no parágrafo anterior. Como a análise por microscopia eletrônica exige o preparo das amostras (fixação das células, lavagem com tampão, pós-fixação, nova lavagem com tampão, desidratação e secagem das amostras ao ponto crítico), pode ter ocorrido o desprendimento das células das superfícies dos materiais quando da realização deste preparo, justificando assim, a ausência das células nas micrografias ilustradas na Figura 4.27. Já no caso da análise por microscopia de contraste fases (Figura 4.26), os materiais são observados *in natura*, já que esta técnica não requer qualquer tipo de preparo das amostras.

Deve-se ressaltar que a baixa adesão das células Vero às superfícies das membranas à base de quitosana pode estar associada não somente ao grau de desacetilação da quitosana, mas também à própria morfologia das membranas. De acordo com a literatura consultada (Ratner e col., 1996), a ancoragem de um biomaterial ao tecido adjacente é influenciada pela presença de poros no material bem como pela morfologia e dimensão dos mesmos. Pesquisas realizadas por Campbell e von Recum (1989 APUD Ratner e col., 1996) mostraram que biomateriais com poros de dimensões inferiores a $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ causaram baixa adesão e estimularam processos inflamatórios. Por outro lado, poros com dimensões superiores, apesar de permitirem o crescimento e a ancoragem, causaram reações inflamatórias severas. Uma vez que, as membranas estudadas neste trabalho são do tipo densas, as mesmas não possuem poros que possam auxiliar na ancoragem das células.

Após a realização dos ensaios de adesão celular, foram ainda feitos os de proliferação das células Vero quando do contato com os materiais por um período de 10 dias. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 4.28.

Em todos os casos, observa-se queda significativa na absorvância após 72 horas de incubação, o que poderia ser atribuído à remoção, quando da troca do meio de cultura, das células fracamente aderidas. A partir deste período, supõe-se que as células aderidas tenham se adaptado ao ambiente e, por esta razão, nota-se uma elevação na absorvância. Entretanto, estes resultados não foram considerados conclusivos já que parte do meio utilizado para o cultivo das células foi absorvido pelas membranas e tal comportamento apresentou interferência diferenciada e não quantificável nos valores de

absorbância obtidos para cada condição experimental analisada. Assim, apesar de alguns trabalhos da literatura utilizarem a técnica colorimétrica que emprega o reagente MTT para a análise *in vitro* de proliferação celular em membranas de quitosana (Chatelet e col., 2001), a mesma não foi considerada adequada quando do contato direto entre as células e os materiais. No caso da utilização dos extratos dos materiais (ensaios indiretos), os problemas observados são suprimidos e assim, a técnica colorimétrica pode ser utilizada sem restrições. Deve-se ressaltar que, apesar do ensaio de citotoxicidade direta apresentado na primeira etapa deste trabalho também ter sido realizado utilizando-se o reagente MTT, tal metodologia foi considerada adequada uma vez que a duração do ensaio foi de apenas 24 horas, diferentemente do ensaio de proliferação celular que foi realizado por um longo período (dez dias), não apresentando as limitações anteriormente descritas.

Visando-se a obtenção de alguma informação (mesmo que qualitativa) sobre a proliferação das células Vero nas superfícies dos materiais, foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura das membranas densas à base de quitosana 72 horas após a inoculação com as células. Entretanto, assim como para o tempo de exposição de 24 horas, não foram observadas células sobre as superfícies dos materiais (Figura 4.29), fato este muito provavelmente, devido à baixa adesão das células às superfícies dos materiais, as quais foram facilmente removidas durante a etapa de preparo das amostras para as análises de microscopia.

Baseando-se nos resultados de adesão e proliferação celular obtidos, pode-se dizer que todas as composições de membranas densas à base de quitosana sintetizadas neste trabalho apresentaram baixos valores de adesão de células Vero em suas superfícies. Tal característica é favorável para biomateriais a serem utilizados como curativos do tipo barreira, já que os mesmos apresentam como funções principais a proteção física e microbiológica do ferimento, além do controle da perda de fluidos corpóreos. Para esta categoria de materiais, não é desejada a adesão celular, uma vez que a retirada do material para a troca do curativo pode acarretar em danos no tecido ainda em cicatrização e, portanto, frágil (Loke e col., 2000). Entretanto, deve-se salientar que a baixa adesão celular não é adequada para curativos do tipo *scaffold*, já que os mesmos são utilizados como suportes para o crescimento de células.

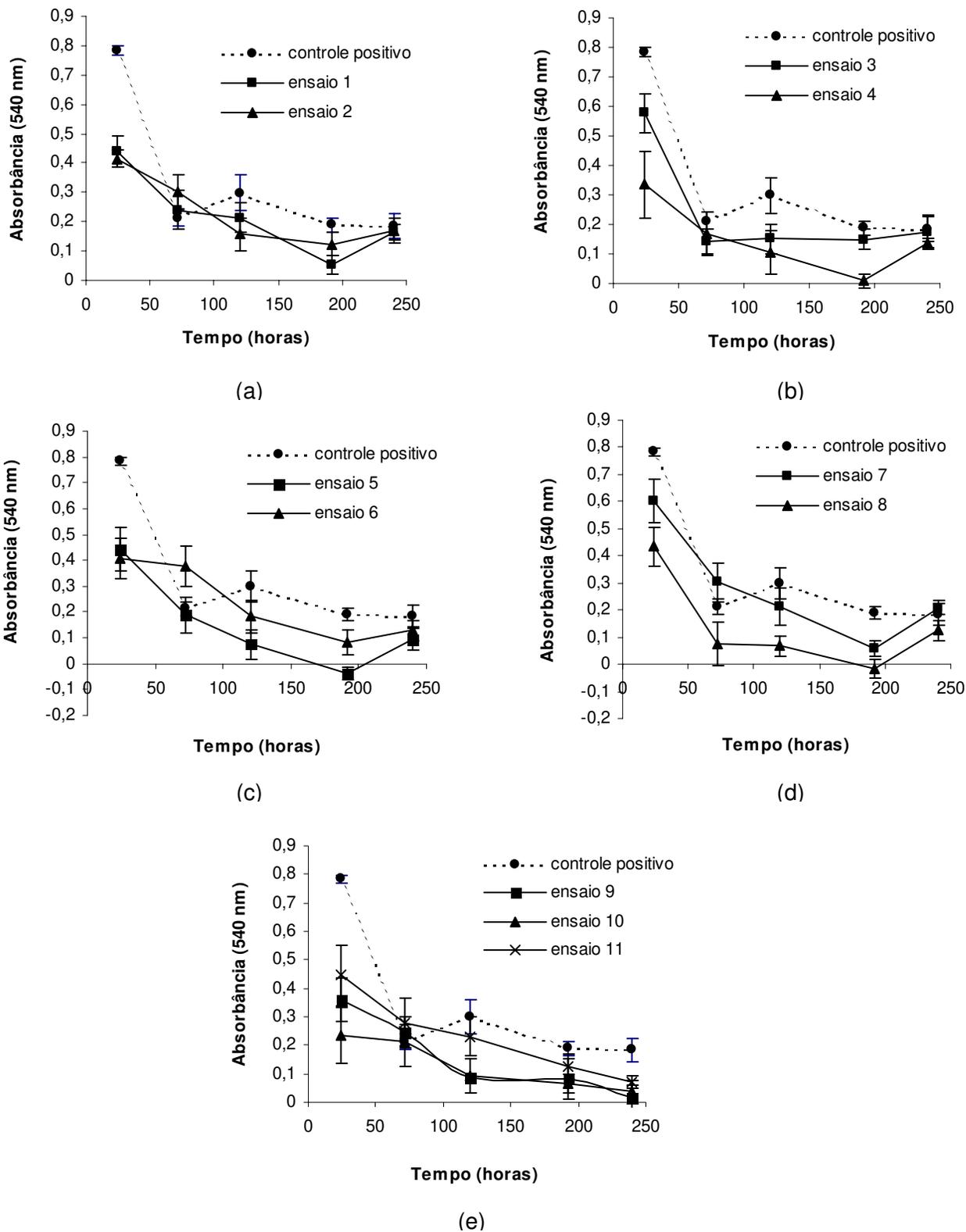


Figura 4.28 – Resultados do ensaio de proliferação das células Vero nas membranas densas à base de quitosana: (a) ensaios 1 e 2; (b) ensaios 3 e 4; (c) ensaios 5 e 6; (d) ensaios 7 e 8; (e) ensaios 9, 10 e 11.

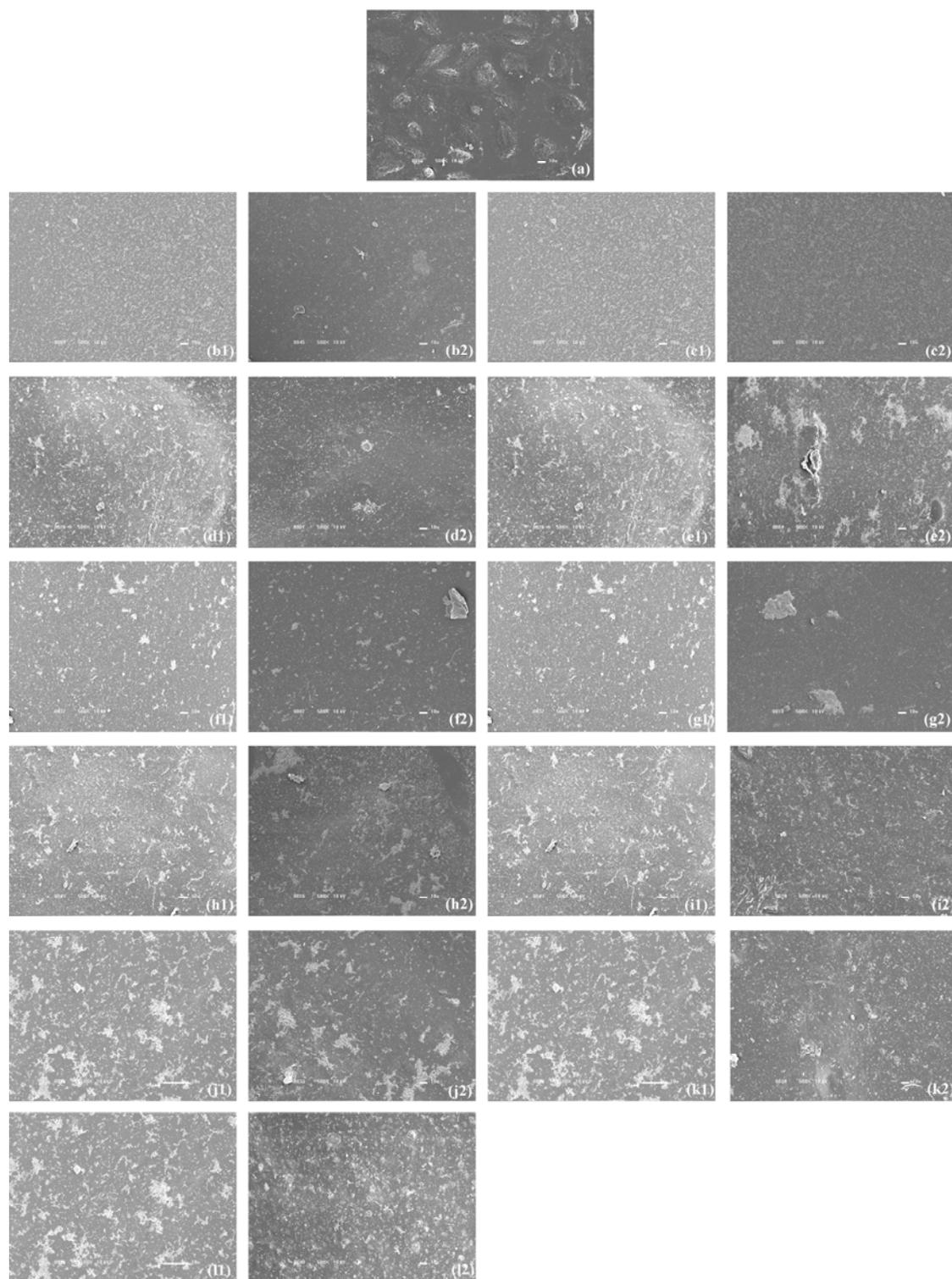


Figura 4.29 – Análise em microscópio eletrônico de varredura do comportamento das células Vero após 72 horas de contato com os materiais: (a) controle positivo, (b1 a l1) brancos dos materiais correspondentes aos ensaios de 1 a 11, respectivamente, (b2 a l2) materiais correspondentes aos ensaios de 1 a 11, respectivamente, após exposição às células Vero. Barras correspondentes a 10 μm .

4.6.4.2. Efeito da variação da composição na degradação enzimática das membranas

Conforme já abordado na revisão da literatura, a degradação de um biomaterial em meios biológicos é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente. Assim, é com base nesta característica que os materiais podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis.

Segundo Leverson e col. (1965 APUD Yannas e Burke, 1980), a biodegradação de um biomaterial utilizado como curativo do tipo temporário biodegradável para o tratamento de queimaduras deve ocorrer simultaneamente ao período requerido para a cicatrização da pele, que é de aproximadamente 25 dias.

A quitosana, por se tratar de um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução, sendo neste caso, quebradas as ligações do complexo polimérico, que se unem aos íons H^+ e OH^- da água (Qu e col., 2000). Outra via de degradação da quitosana no organismo ocorre pela ação da lisozima, que é uma enzima que auxilia o sistema imunológico, pois dissolve a parede mucopolissacarídea de bactérias pela hidrólise das ligações β (1 \rightarrow 4). Esta enzima está comumente presente em fluidos corpóreos como a saliva (<150 mg/100 mL) e a lágrima (18 a 80 mg/100 mL), além de ser encontrada livremente dissolvida em grande parte dos tecidos. Entretanto, sua concentração tecidual aumenta em uma reação inflamatória, pois esta é sintetizada pelos macrófagos e secretada nos lisossomos, auxiliando na remoção de restos celulares e bacterianos do local da infecção (Martini, 1995 APUD Rodas, 2004).

Com base nestas informações, foram realizados ensaios de degradação enzimática das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento estatístico proposto neste trabalho. Os resultados obtidos de degradação após um e dois meses de ensaio estão indicados na Tabela 4.26. Deve-se ressaltar que, sabendo-se da possível degradação da quitosana pelo próprio solvente utilizado para a dissolução da enzima (tampão PBS), paralelamente foi avaliada a influência desta variável na degradação das membranas.

A análise estatística da degradação das membranas quando do contato com a lisozima pelo período de um e dois meses pode ser visualizada nas Tabelas 4.27 e 4.28 e na Figura 4.30.

Tabela 4.26 – Degradação enzimática das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento experimental utilizado neste trabalho.

Ensaio	Degradação das membranas (%)			
	1 mês de ensaio		2 meses de ensaio	
	Tampão PBS	Lisozima	Tampão PBS	Lisozima
1	6,30 ± 0,27	6,21 ± 0,96	5,86 ± 0,82	7,97 ± 0,51
2	6,10 ± 0,11	5,19 ± 0,83	5,40 ± 0,35	8,29 ± 0,94
3	3,96 ± 0,63	6,37 ± 1,14	7,20 ± 0,39	11,41 ± 0,82
4	5,33 ± 0,34	6,62 ± 0,40	7,71 ± 1,79	9,18 ± 0,68
5	5,67 ± 1,70	6,57 ± 1,05	7,42 ± 0,48	13,31 ± 2,73
6	4,94 ± 0,27	6,09 ± 0,70	7,10 ± 0,38	8,97 ± 2,36
7	5,78 ± 1,98	8,34 ± 0,31	5,72 ± 2,08	14,33 ± 2,19
8	6,21 ± 0,88	7,32 ± 0,68	7,44 ± 1,17	8,83 ± 0,56
9	6,81 ± 1,25	7,15 ± 0,86	8,50 ± 0,77	9,23 ± 1,15
10	5,70 ± 0,78	6,26 ± 0,17	8,45 ± 0,93	8,28 ± 1,02
11	5,15 ± 1,20	5,98 ± 0,32	7,60 ± 0,87	9,47 ± 0,52

Analisando-se os resultados obtidos da análise estatística de degradação enzimática das membranas após um mês de ensaio (Tabela 4.27), observou-se uma redução no tempo de degradação das membranas quando da presença de quitina e/ou glicerol na composição dos materiais, não se verificando efeitos estatisticamente significativos de interação entre as três variáveis analisadas na faixa experimental estudada. Neste caso, não foi observada influência da concentração da solução de partida de quitosana na degradação das membranas. Já quando transcorridos dois meses de ensaio (Tabela 4.28), além da influência da quitina e do glicerol, observou-se também efeito significativo da concentração da solução de partida de quitosana na degradação das membranas. Entretanto, enquanto que o uso de quitina e/ou glicerol mostrou redução no tempo de degradação dos materiais, o uso de soluções mais concentradas de quitosana apresentou efeito contrário, ou seja, membranas obtidas a partir de soluções

mais concentradas de quitosana mostraram-se mais resistentes à ação da lisozima na faixa experimental estudada.

Tabela 4.27 – Análise estatística da variável degradação enzimática das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho após um mês de ensaio.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(3)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 95,00%	+ 95,00%
Média	6,5545*	0,1538	42,6122	2,8445E-05	6,1926	6,9165
(1) Quitosana	-0,5675	0,3607	-1,5732	0,2137	-1,4164	0,2814
(2) Quitina	1,1475*	0,3607	3,1810	0,0501	0,2986	1,9964
(3) Glicerol	0,9825*	0,3607	2,7236	0,0723	0,1336	1,8314
1 * 2	0,1825	0,3607	0,5059	0,6478	-0,6664	1,0314
1 * 3	-0,1825	0,3607	-0,5059	0,6478	-1,0314	0,6664
2 * 3	0,3525	0,3607	0,9772	0,4006	-0,4964	1,2014
1*2*3	-0,4525	0,3607	-1,2544	0,2985	-1,3014	0,3964

OBS: desvios calculados a partir da média quadrática dos resíduos = 0,2602617.

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Outras informações sobre a degradação das membranas puderam ser obtidas dos resultados mostrados na Tabela 4.26. Comparando-se os valores de degradação das membranas quando da exposição à enzima lisozima pelo período de um mês e quando da exposição somente ao tampão PBS, notou-se que, na maioria das composições, a degradação das membranas se deve basicamente à presença do tampão PBS e não à ação da lisozima. Tal comportamento só não foi verificado para as membranas compostas por quitosana e quitina (ensaios 3 e 4), para as quais a degradação enzimática foi estatisticamente superior à degradação das membranas quando do contato isolado com o tampão PBS. Já após dois meses de exposição à lisozima, houve um aumento da degradação das membranas, sendo que, diferentemente do contato por um mês, na maioria dos ensaios foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a degradação quando da presença e da ausência da enzima na solução. Apesar deste fato,

o maior valor de degradação observado foi de 14,33% (ensaio 7), valor este pequeno considerando-se o longo tempo de exposição dos materiais à enzima.

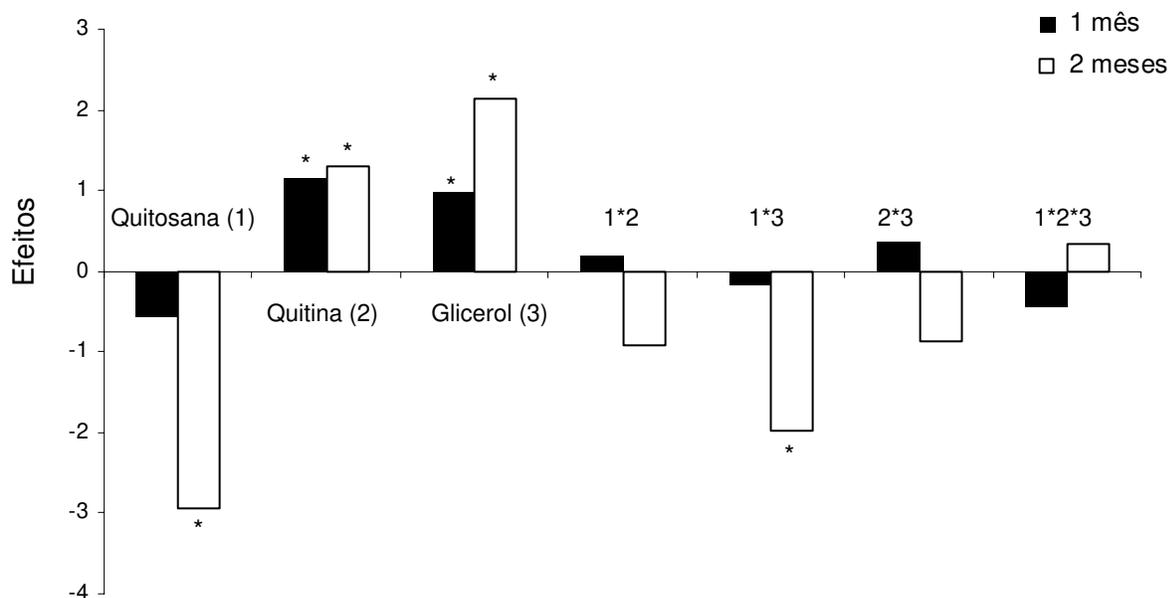
Tabela 4.28 – Análise estatística da variável degradação enzimática das membranas densas à base de quitosana cujas composições foram definidas no planejamento proposto neste trabalho após dois meses de ensaio.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	p	Intervalo de confiabilidade	
					- 90,00%	+ 90,00%
Média	9,9336*	0,1897	52,3527	0,0004	9,3796	10,4877
(1) Quitosana	-2,9375*	0,4450	-6,6013	0,0222	-4,2369	-1,6381
(2) Quitina	1,3025*	0,4450	2,9270	0,0996	0,00313	2,6019
(3) Glicerol	2,1475*	0,4450	4,8259	0,0404	0,8481	3,4469
1 * 2	-0,9275	0,4450	-2,0843	0,1725	-2,2269	0,3719
1 * 3	-1,9825*	0,4450	-4,4551	0,0469	-3,28187	-0,6831
2 * 3	-0,8625	0,4450	-1,9382	0,1922	-2,1619	0,4369
1*2*3	0,3475	0,4450	0,7809	0,5166	-0,9519	1,6469

OBS: desvios calculados a partir do erro puro = 0,3960333.

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

Assim, apesar da quitosana ser comumente conhecida como um polímero facilmente degradado pela ação da lisozima (Wisniewska-Wrona e col., 2002; Brown e col., 2001; Khan e col., 2000; Muzzarelli e col., 1988 APUD Risbud e col., 2000), o ensaio de degradação enzimática *in vitro* das membranas sintetizadas neste trabalho mostrou estabilidade física dos materiais quando do contato com a lisozima, mesmo quando a enzima se encontra em altas concentrações (5 mg/mL) e o tempo de exposição é prolongado (dois meses). Tal estabilidade pode ser constatada não apenas em valores numéricos como mostrado na Tabela 4.26, mas também em termos morfológicos, não sendo observadas diferenças entre as superfícies das membranas antes e após a exposição à enzima (vide Anexo 1). Deve-se ressaltar que, apesar da presença da quitina e/ou glicerol nas composições das membranas ter acelerado o processo de degradação enzimática das membranas, as mesmas tiveram suas massas reduzidas em valores inferiores a 9% e a 15% após um e dois meses de ensaio, respectivamente.



* valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$ e $p < 0,10$ para as degradações enzimáticas das membranas após os períodos de ensaio de um e dois meses, respectivamente).

Figura 4.30 – Efeitos estatísticos para a variável-resposta degradação enzimática após um e dois meses de ensaio.

De acordo com a literatura consultada (Senel e McClure, 2004; Chatelet e col., 2001; Suh e Matthew, 2000; Tomihata e Ikada, 1997), este comportamento pode ser explicado com base nas características da quitosana utilizada e nas características físicas das membranas sintetizadas. Apesar da quitosana ser considerada um polímero degradável pela lisozima, tal degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, já que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglucosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (Suh e Matthew, 2000). Segundo Varum e col. (1996 APUD Kurita e col., 2000), estes grupamentos apresentam um papel fundamental no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima. Segundo os resultados obtidos por Tomihata e Ikada (1997), quitosanas com grau de desacetilação de até 69% apresentam boa degradação enzimática mesmo em períodos curtos de exposição à lisozima, enquanto que as de grau de desacetilação superior a 69% são dificilmente degradadas. Além disso, as características morfológicas dos materiais também interferem na degradação enzimática dos mesmos. De acordo com Ratner e col. (1996), membranas porosas são mais facilmente degradadas do que as densas, comportamento este também verificado por Mi e col. (2001), já que após a exposição de

membranas assimétricas de quitosana à uma solução de lisozima, apenas a camada porosa apresentou degradação. A camada densa permaneceu praticamente intacta durante o período de ensaio.

Uma vez que a quitosana utilizada neste trabalho possui grau de desacetilação maior ou igual a 83% e as membranas sintetizadas são do tipo densas, o baixo grau de degradação dos materiais quando do contato com a lisozima é plenamente justificado.

4.6.5. Estabilidade das membranas em soluções aquosas

Na literatura consultada para a obtenção de membranas à base de quitosana a serem utilizadas em processos de regeneração de pele, constatou-se que muitas vezes a etapa de neutralização com uma solução de hidróxido de sódio não é mencionada (Cervera e col., 2004; Kweon e col., 2001; Shu e col., 2001; Khan e col., 2000; Caner e col., 1998).

No trabalho em questão, a metodologia adotada para a síntese das membranas, proposta por Craveiro e Craveiro (2000), inclui a etapa de neutralização do ácido acético residual ainda presente nos materiais após secagem utilizando-se, neste caso, uma solução de hidróxido de sódio. Uma vez que a proposta inicial deste trabalho era a síntese de membranas a serem utilizadas em tratamentos para queimados como curativos temporários do tipo biodegradáveis e os resultados de degradação dos materiais quando do contato com uma solução de lisozima ou somente com o tampão PBS não mostraram desempenho desejável, fez-se pertinente a avaliação da estabilidade das membranas em soluções aquosas (água destilada e tampão PBS) quando da ausência e da presença da etapa de neutralização durante a síntese dos materiais.

No caso das membranas que não foram neutralizadas, todas as amostras se desfizeram totalmente, exceto as preparadas nas condições 5 e 7, que resultaram em perdas de massa de $18,75 \pm 1,77\%$ e $12,65 \pm 1,20\%$ quando expostas à água destilada e de $14,80 \pm 0,59\%$ e $8,64 \pm 0,14\%$ quando expostas ao tampão PBS, respectivamente. Desta forma, o comportamento de acentuada instabilidade só não foi observado para as condições em que parte da quitosana presente na membrana foi substituída pelo glicerol nas proporções de 33,33 e 25% (ensaio 5 e 7, respectivamente). Segundo Brown e col. (2001) uma possível explicação para a maior estabilidade das membranas quando da adição de glicerol se faz pela facilidade quanto à retirada do ácido acético residual durante a etapa de secagem dos materiais, não ocorrendo, posteriormente, a dissolução das membranas quando da imersão em meios aquosos pela acidificação dos mesmos.

Além disso, foi constatado pelos pesquisadores que, quanto maior a quantidade de glicerol na composição das membranas, mais facilmente ocorre a saída do ácido acético. Outra importante observação se faz quanto às interações existentes entre a quitosana e o glicerol, que são do tipo pontes de hidrogênio.

Os resultados obtidos para as amostras neutralizadas são apresentados na Tabela 4.29 e o registro fotográfico do aspecto das membranas pode ser visualizado no Anexo 2.

Tabela 4.29 – Estabilidade das membranas densas à base de quitosana em soluções aquosas (água destilada e tampão PBS) quando da inclusão da etapa de neutralização com solução de NaOH a 1 M durante a síntese dos materiais.

Ensaio	Estabilidade das membranas (% de perda de massa)	
	Água destilada (pH 3,05)	Tampão PBS (pH 7,4)
1	0,78 ± 0,05	0,00 ± 0,00
2	0,00 ± 0,00	0,82 ± 0,08
3	1,31 ± 0,10	0,30 ± 0,05
4	0,29 ± 0,04	1,17 ± 0,09
5	0,43 ± 0,05	0,83 ± 0,07
6	0,00 ± 0,00	0,71 ± 0,06
7	0,31 ± 0,05	0,00 ± 0,00
8	0,44 ± 0,04	0,43 ± 0,05
9	0,63 ± 0,05	0,00 ± 0,00
10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
11	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,04

Como se pode notar, o tratamento com o hidróxido de sódio conferiu elevada estabilidade às membranas frente aos solventes analisados, sendo nestes casos observados como valores máximos de perda de massa das membranas após 24 horas de

exposição à água destilada e ao tampão PBS 1,31 e 1,17%, respectivamente, valores estes considerados não significativos.

Assim como nos ensaios de degradação enzimática, os resultados deste conjunto de experimentos mostraram que as membranas sintetizadas neste trabalho não apresentam boas características de biodegradabilidade, não sendo consideradas adequadas para uso como curativos temporários do tipo biodegradáveis, mas sim como curativos temporários do tipo não biodegradáveis.

Deve-se ressaltar que os dados obtidos neste segmento do trabalho foram submetidos para publicação na revista *Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials* em 31.05.05, com autoria de Paula R. M. Dallan, Patrícia L. Moreira, Leandro Petinari, Sônia M. Malmonge, Marisa M. Beppu, Selma C. Genari e Ângela M. Moraes.

4.7. Avaliação da possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas

Após a análise dos resultados de caracterização mecânica dos materiais cujas composições foram definidas no planejamento estatístico proposto neste trabalho, os menores resultados obtidos para as membranas densas à base de quitosana quando da substituição de parte da quitosana por glicerol sugeriram uma possível extração do glicerol nas etapas de neutralização e lavagem dos materiais durante sua síntese. Assim, um novo conjunto de ensaios para a análise da possível extração do glicerol se fez pertinente. Uma vez que, no conjunto de ensaios referente ao estudo da esterilização nas características das membranas, a adição de glicerol à composição da membrana (Q+g) resultou em melhoria significativa na porcentagem de deformação dos materiais, esta condição também foi analisada.

4.7.1. Análise qualitativa da flexibilidade das membranas

Visando a observação visual de diferenças quanto à flexibilidade dos materiais, antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem das membranas, as mesmas foram armazenadas por uma semana à temperatura ambiente em dessecador. Após este período, os materiais foram analisados, sendo classificados em quatro diferentes categorias: (0) membrana rígida, (+) pouco flexível, (++) flexível, (+++) muito flexível. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.30.

Tabela 4.30 – Análise qualitativa da flexibilidade das membranas, antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem.

Ensaio*	Análise qualitativa quanto à flexibilidade dos materiais	
	Antes das etapas de neutralização e lavagem	Após as etapas de neutralização e lavagem
1	+	0
2	+	0
5	+++	0
6	++	0
Q+g	++	0

* ensaios 1 e 2: membranas compostas somente por quitosana; ensaios 5 e 6: membranas obtidas a partir de soluções de quitosana contendo glicerol nas proporções definidas no planejamento estatístico proposto neste trabalho; Q+g: membranas compostas por quitosana e glicerol, sintetizadas na etapa de estudo da influência da esterilização nas características dos materiais.

Como se pode observar pelos resultados qualitativos mostrados na Tabela 4.30, as membranas formadas somente por quitosana (ensaios 1 e 2) antes das etapas de neutralização e lavagem apresentaram-se pouco flexíveis, característica esta que não foi muito modificada após o tratamento com o hidróxido de sódio. As membranas obtidas a partir de soluções de quitosana que possuíam glicerol em suas formulações apresentaram-se flexíveis antes do tratamento com o hidróxido de sódio, sendo que quanto maior a proporção de glicerol na composição da membrana, maior a flexibilidade observada. Entretanto, após a neutralização e lavagem dos materiais, todas as composições formadas por quitosana e glicerol (ensaio 5, 6 e Q+g), seja em maior ou menor proporção, tornaram-se rígidas. Sabendo-se que, a presença de plastificantes na composição de polímeros tende a aumentar a flexibilidade dos mesmos e esta característica foi reduzida após a realização das etapas de neutralização e lavagem, tal comportamento indica uma possível extração do plastificante, porém quantitativamente não identificada. Testes realizados por Brown e col. (2001) com membranas de quitosana contendo glicerol (1:1), PEG (polietilenoglicol) e GM-CSF (uma glicoproteína de massa molecular entre 14,5 e 19,5 kDa) mostraram que após dez minutos de imersão dos materiais em solução tamponante há total extração do plastificante.

4.7.2. Análise de perda de massa

Para a análise de perda de massa foram sintetizadas cinco diferentes composições de membranas densas, as que possuem apenas quitosana em suas composições (ensaios 1 e 2), as que possuem quitosana e glicerol (ensaios 5 e 6) e a composição Q+g do conjunto de ensaios referente ao estudo da influência da esterilização nas características dos biomateriais.

Nestes ensaios, as membranas sintetizadas foram pesadas em balança analítica antes e após as etapas de neutralização e lavagem, visando a obtenção da perda de massa percentual durante estas etapas do processo de síntese dos materiais. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31 – Perda percentual de massa das membranas densas à base de quitosana após as etapas de neutralização e lavagem.

Ensaio*	Perda de massa (%)
1	23,9
2	21,3
5	37,0
6	30,2
Q+g	30,0

* Composições das membranas:

Ensaio 1: membrana 100% de quitosana obtida a partir de uma solução a 1,0%. Sólidos totais de 1,125 g.

Ensaio 2: membrana 100% de quitosana obtida a partir de uma solução a 2,5%. Sólidos totais de 1,125 g.

Ensaio 5: membrana 66,67% de quitosana e 33,3% de glicerol obtida a partir de uma solução de quitosana a 1,0%. Sólidos totais teórico de 1,125 g.

Ensaio 6: membrana 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol obtida a partir de uma solução de quitosana a 2,5%. Sólidos totais teórico de 1,125 g.

Q+g: membrana 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol obtida a partir de uma solução de quitosana a 2,5%. Sólidos totais teórico de 1,344 g.

Como se pode observar, considerando-se os valores de massa obtidos da pesagem das membranas compostas somente por quitosana (ensaios 1 e 2), a perda percentual de massa observada após a neutralização e a lavagem dos materiais foi superior a 20,0% e no caso das membranas obtidas a partir de soluções que continham glicerol em suas formulações, os valores de perda de massa foram de 37,0% para o ensaio 5 e iguais ou superiores a 30,0% para os ensaios 6 e Q+g. Entretanto, a pesagem das membranas após a etapa de secagem na estufa e antes da neutralização e da

lavagem mostrou massas muito superiores aos valores teóricos (21,70%; 17,90%; 7,36%; 21,40 e 24,04% para os ensaios 1, 2, 5, 6 e Q+g, respectivamente) indicando que a remoção de água dos materiais não foi eficiente. Tal fato deve-se à alta hidrofiliabilidade da quitosana (Cervera e col., 2004; Yang e col., 2004), fazendo com que as membranas sintetizadas a partir deste polissacarídeo consigam reter água em suas estruturas, mesmo após longos períodos de secagem (no caso, 24 horas à temperatura de 50°C). Assim, visando a minimização da influência da água presente nas estruturas poliméricas, para o cálculo da perda percentual de massa durante a neutralização e a lavagem dos materiais, foram utilizados os valores teóricos de massa das membranas obtidos após a etapa de secagem (1,125 g para os ensaios 1, 2, 5, 6 e 1,344 g para a composição Q+g) e as massas obtidas após a neutralização e a lavagem dos materiais.

Desconsiderando-se a água firmemente ligada à estrutura da quitosana, observou-se que as membranas compostas somente por quitosana (ensaios 1 e 2) apresentaram perda de 7,2% da massa após a neutralização e a lavagem. A membrana em que 33,33% da quantidade de quitosana foi substituída por glicerol (ensaio 5) apresentou uma perda de 33,4% de massa. Já quando a substituição foi de 16,67% (ensaio 6), a perda de massa observada foi de 15,3%. Para a composição na qual se adicionou glicerol à solução, fazendo com que a quantidade de sólidos totais fosse de 1,344 g (composição Q+g), a perda foi de 13,2%. Assim, para as membranas formadas a partir de soluções que possuíam glicerol em suas formulações, considerando-se que 7,2% da massa das membranas foram perdidas durante a neutralização e a lavagem, mesmo quando da obtenção de materiais formados somente por quitosana (possivelmente com a remoção do ácido acético residual e de elementos inorgânicos ainda presentes na membrana, como, por exemplo, o cálcio), pode-se afirmar que muito possivelmente ocorre extração de glicerol durante as etapas de neutralização e de lavagem das membranas, sendo ela parcial ou total.

4.7.3. Espectroscopia por infravermelho (FTIR)

Outra análise utilizada para a avaliação da possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas foi a espectroscopia por infravermelho (FTIR), visando a comparação dos espectros obtidos para as membranas quando da presença e da ausência do glicerol. Os resultados obtidos para as membranas em seus estados úmidos encontram-se ilustrados na Figura 4.31.

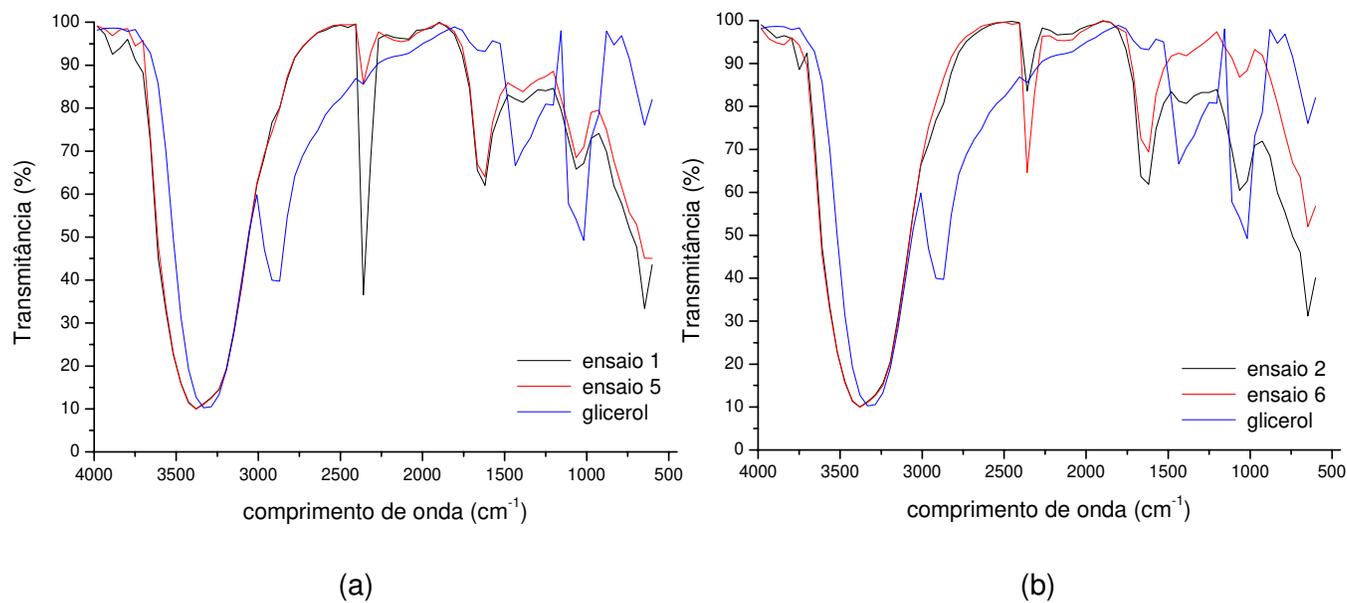


Figura 4.31 – Análise de espectroscopia por infravermelho para as membranas densas à base de quitosana: (a) ensaios 1 e 5, (b) ensaios 2 e 6.

Os espectros dos materiais no estado seco também foram obtidos, entretanto, não foram considerados satisfatórios, já que apresentaram interferência de outros fatores, dentre eles, a rugosidade dos materiais e o contato imperfeito entre o cristal de leitura e as membranas.

A análise comparativa entre os espectros obtidos para as membranas compostas somente por quitosana (ensaio 1 e 2), os obtidos para as membranas formadas a partir de soluções de partida de quitosana contendo glicerol (ensaios 5 e 6) e o espectro do glicerol (Figura 4.31) não apresentou resultados conclusivos quanto à possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem dos materiais. Os espectros obtidos para as diferentes composições foram muito semelhantes, diferindo apenas na intensidade da resposta, fato este decorrente da própria diferença na composição mássica das membranas. Além disso, deve-se salientar que o glicerol é um triálcool, que possui em sua estrutura apenas ligações carbono-hidrogênio, carbono-oxigênio, carbono-carbono e oxigênio-hidrogênio, as quais também podem ser encontradas na quitosana. Como a análise de espectroscopia por infravermelho permite a identificação de tipos de ligações e grupos funcionais de um composto e o glicerol não possui nenhum grupamento específico para sua caracterização, a análise não se mostrou conclusiva.

Segundo Brown e col. (2001), a presença de glicerol em membranas de quitosana que não passaram pelas etapas de neutralização e lavagem pode ser identificada através de espectroscopia por infravermelho (FTIR), uma vez que este plastificante facilita a retirada do ácido acético residual durante a etapa de secagem dos materiais e assim, tende a deslocar o pico localizado em 1560 cm^{-1} característico da ligação entre o grupamento amino da quitosana e os íons acetato do ácido acético residual ($\text{NH}_3^+\dots\text{CH}_3\text{COO}^-$) para 1590 cm^{-1} , sendo este deslocamento proporcional à quantidade de glicerol presente nas amostras. Entretanto neste trabalho, o tratamento de neutralização das membranas com hidróxido de sódio, antes da análise de espectroscopia por infravermelho, potencialmente elimina o ácido acético residual dos materiais e conseqüentemente a visualização de interações deste composto com grupamentos da quitosana.

4.7.4. Difração de raios-X

O glicerol é um plastificante de estrutura amorfa (Cervera e col., 2004) e sua presença nas membranas promove modificações na estrutura polimérica, uma vez que o mesmo se aloja entre as cadeias da quitosana, dificultando seu empacotamento. Como tal comportamento pode ser traduzido em uma redução da cristalinidade dos materiais nos quais este composto se faz presente, a difração de raios-X foi utilizada como uma medida indireta da possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas. Neste conjunto de ensaios foi avaliada a composição formada somente por quitosana (ensaio 2) e aquelas que foram obtidas a partir de soluções de quitosana contendo glicerol (ensaios 5, 6 e condição Q+g), antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem dos materiais. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas Figuras 4.32 a 4.35.

Na Figura 4.32 pode-se observar que antes das etapas de neutralização e lavagem o espectro de difração de raios-X da membrana formada somente por quitosana revelou a existência de outros picos bem definidos além dos comumente apresentados pela quitosana. Tal fato decorre, muito provavelmente, da presença de ácido acético residual na membrana e alguns elementos inorgânicos, como por exemplo, o cálcio, identificado por análise de espectrometria por dispersão de energia de raios-X. Entretanto, pode-se notar que as etapas de neutralização e lavagem não afetaram significativamente a cristalinidade desta membrana.

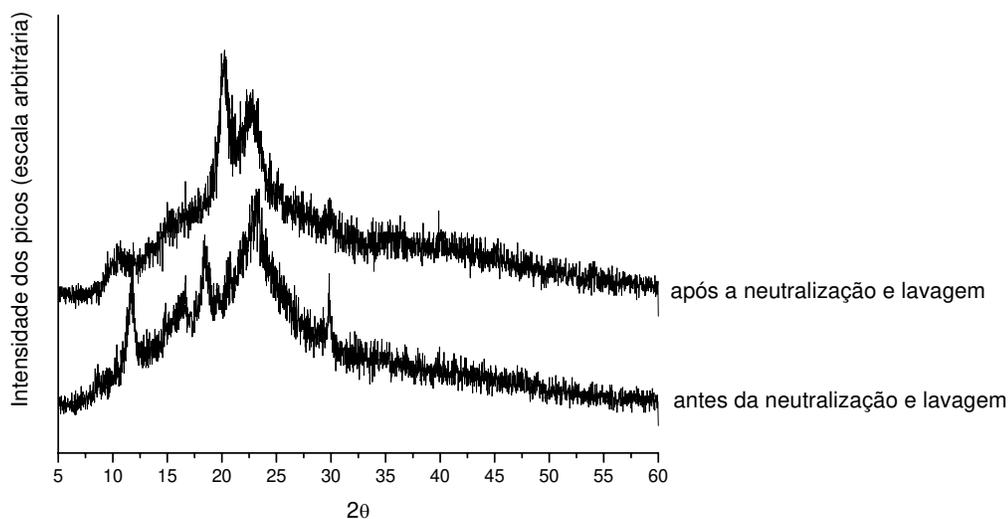


Figura 4.32 – Difratoograma de raios-X de uma membrana composta somente por quitosana (ensaio 2) antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio a 1 M.

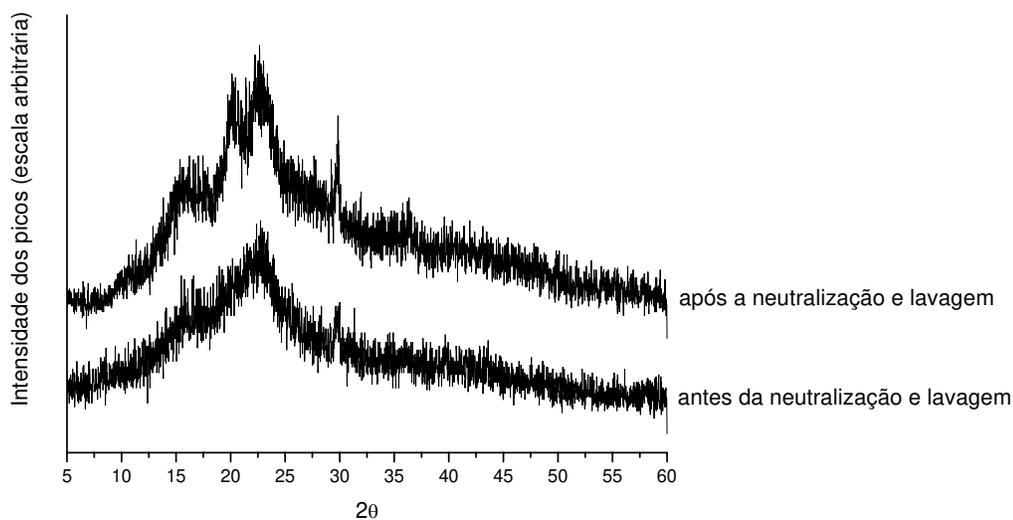


Figura 4.33 – Difratoograma de raios-X de uma membrana formada a partir de uma solução de partida de quitosana a 1,0% contendo 0,5% de glicerol (ensaio 5) antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio a 1 M.

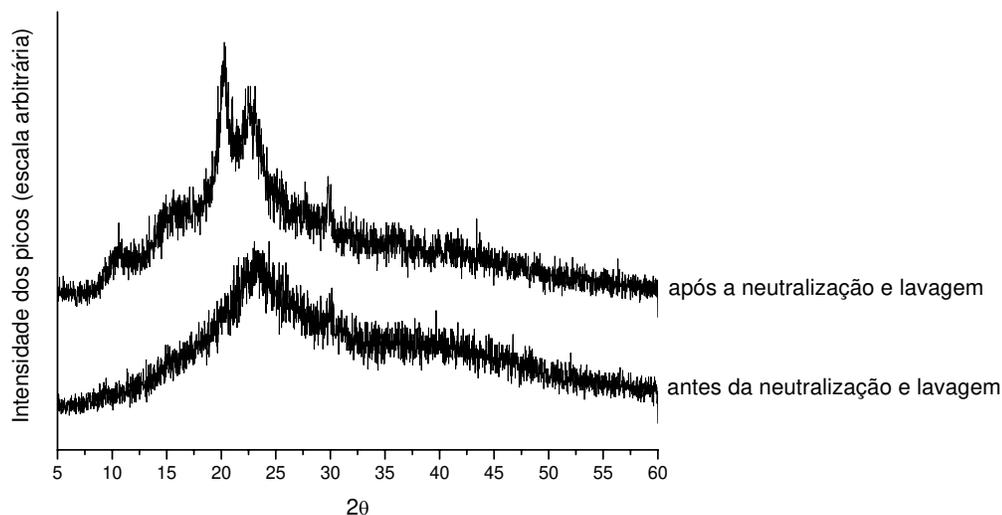


Figura 4.34 – Difratoograma de raios-X de uma membrana formada a partir de uma solução de partida de quitosana a 2,5% contendo 0,5% de glicerol (ensaio 6) antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio a 1 M.

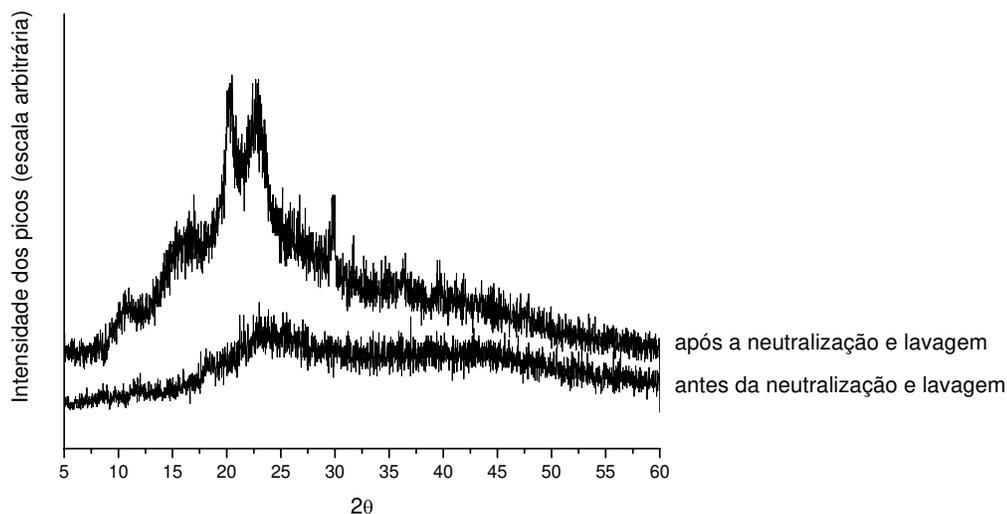


Figura 4.35 – Difratoograma de raios-X de uma membrana formada a partir de uma solução de partida de quitosana a 2,5% contendo 0,5% de glicerol (Q+g) antes e após a realização das etapas de neutralização e lavagem utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio a 1 M.

Já para o caso das membranas formadas a partir de soluções contendo quitosana e glicerol (Figuras 4.33 a 4.35), as etapas de neutralização e lavagem afetaram significativamente a cristalinidade das amostras, que apresentaram estruturas mais cristalinas após a realização destes procedimentos. Tal comportamento confirma os resultados anteriores e mostra que houve extração do glicerol, sendo ela parcial ou total.

4.7.5. Análise térmica

Sabendo-se que a análise térmica é uma técnica de caracterização bastante utilizada para a obtenção de informações sobre as propriedades físicas e químicas de materiais e a presença do glicerol promove modificações em algumas destas características (como por exemplo, redução da temperatura de transição vítrea), para a avaliação da possível extração do glicerol foram utilizadas três diferentes técnicas de análise térmica: a análise dinâmico-mecânica, a calorimetria diferencial exploratória e a análise termogravimétrica.

4.7.5.1. DMA

A análise dinâmico-mecânica (DMA) fornece dados sobre os fenômenos de transição térmica, temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão cristalina (T_m), bem como algumas informações sobre as propriedades mecânicas dos materiais. Sabendo-se que a adição de um plastificante tende a reduzir a temperatura de transição vítrea de um material, buscou-se por esta técnica a identificação da T_g das membranas compostas somente por quitosana e a comparação deste resultado com o obtido para as membranas que foram formadas a partir de soluções de quitosana contendo glicerol em suas formulações. Caso fosse constatada uma redução na temperatura de transição vítrea dos materiais que continham glicerol, ficaria comprovada a presença do plastificante nas membranas. Caso a temperatura de transição vítrea obtida para os materiais formados a partir de soluções de quitosana que continham glicerol em suas composições fosse a mesma dos materiais compostos somente por quitosana, ficaria comprovada a extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem. Entretanto, ao se fazer a análise dinâmico-mecânica da membrana formada somente por quitosana, não foi possível a detecção da T_g . Uma vez que a presença de água nas amostras poderia ser um dos fatores de interferência da análise, as membranas foram mantidas em estufa a 50°C por 24 horas e a análise, refeita. Mesmo assim, os resultados não foram satisfatórios. Outras tentativas foram feitas variando-se a amplitude, mas

nenhum resultado conclusivo foi obtido. Assim, o conjunto de ensaios previsto nesta etapa do trabalho foi interrompido. Os resultados obtidos nesta fase do trabalho podem ser visualizados no Anexo 3.

De acordo com a literatura (Peesan e col., 2003), a visualização da temperatura de transição vítrea em polímeros naturais não é simples, além dos valores obtidos por grupos distintos de pesquisa poderem diferir bastante já que a determinação da temperatura de transição vítrea é dependente de fatores como as condições experimentais utilizadas na síntese e no preparo dos materiais para a análise, bem como da técnica de caracterização empregada. Deve-se salientar que outros pesquisadores também não tiveram sucesso na obtenção da temperatura de transição vítrea da quitosana por DMA (Yang e col., 2004) e dentre os resultados localizados na literatura, pode-se citar os valores de 170 e 203°C, determinados, respectivamente, por Kim e col. (1996) e Sakurai e col. (2000).

4.7.5.2. DSC

Sabendo-se que a calorimetria diferencial exploratória (DSC) é uma técnica de análise térmica bastante utilizada para a obtenção de informações sobre as temperaturas de transição dos materiais como a temperatura de transição vítrea, a temperatura de cristalização e a temperatura de fusão cristalina, e que o uso de plastificantes em composições poliméricas tende a reduzir a temperatura de transição vítrea dos materiais, foi realizado um conjunto de ensaios visando a comparação entre o valor da temperatura de transição vítrea de uma membrana composta somente por quitosana e os das membranas formadas por quitosana e quitina e/ou glicerol. As membranas utilizadas nestes ensaios foram aquelas sintetizadas durante a fase de estudo da influência da esterilização nas características dos materiais.

Uma vez que a presença de água nas amostras interfere na visualização da temperatura de transição vítrea dos materiais (Sakurai e col., 2000), foram realizados dois ciclos de aquecimento e resfriamento com as membranas, sendo considerados apenas os segundos para a visualização da T_g . Os resultados obtidos do segundo ciclo de aquecimento das membranas encontram-se ilustrados na Figura 4.36.

Na análise por calorimetria diferencial exploratória, a temperatura de transição vítrea de um material pode ser visualizada por uma mudança na linha base, comportamento este não observado em nenhuma das condições analisadas (Figura 4.36).

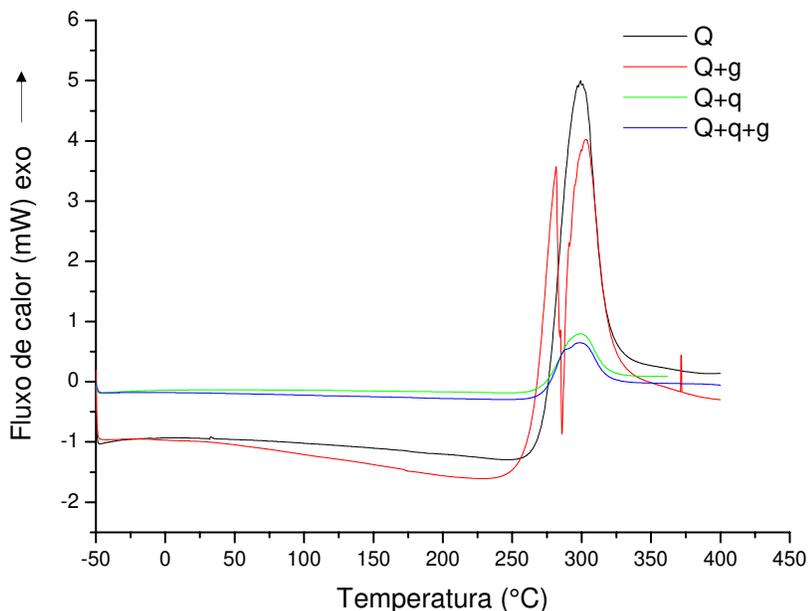


Figura 4.36 – Análise térmica por calorimetria diferencial exploratória das membranas densas à base de quitosana sintetizadas para o estudo da influência da esterilização nas características dos materiais.

De acordo com Lim e col. (1998), a temperatura de transição vítrea de membranas de quitosana obtida por DSC é de 52,2°C. Segundo Sakurai e col. (2000), esta mesma variável foi determinada em 203°C. Como se pode observar, esta propriedade gera ainda muita controvérsia.

4.7.5.3. TGA

O principal uso da análise termogravimétrica (TGA) na caracterização de polímeros está no estudo da estabilidade e decomposição térmica dos mesmos. Supondo-se que a degradação térmica dos materiais compostos somente por quitosana e aqueles compostos por quitosana e glicerol pudesse apresentar comportamentos diferenciados quanto às suas decomposições térmicas, foram realizados ensaios de análise termogravimétrica com os mesmos. Além disso, sabendo-se da possível extração do glicerol durante as etapas de neutralização e lavagem das membranas, foram avaliados os comportamentos dos materiais (contendo ou não glicerol) antes e após o tratamento com o hidróxido de sódio. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 4.37 a 4.42.

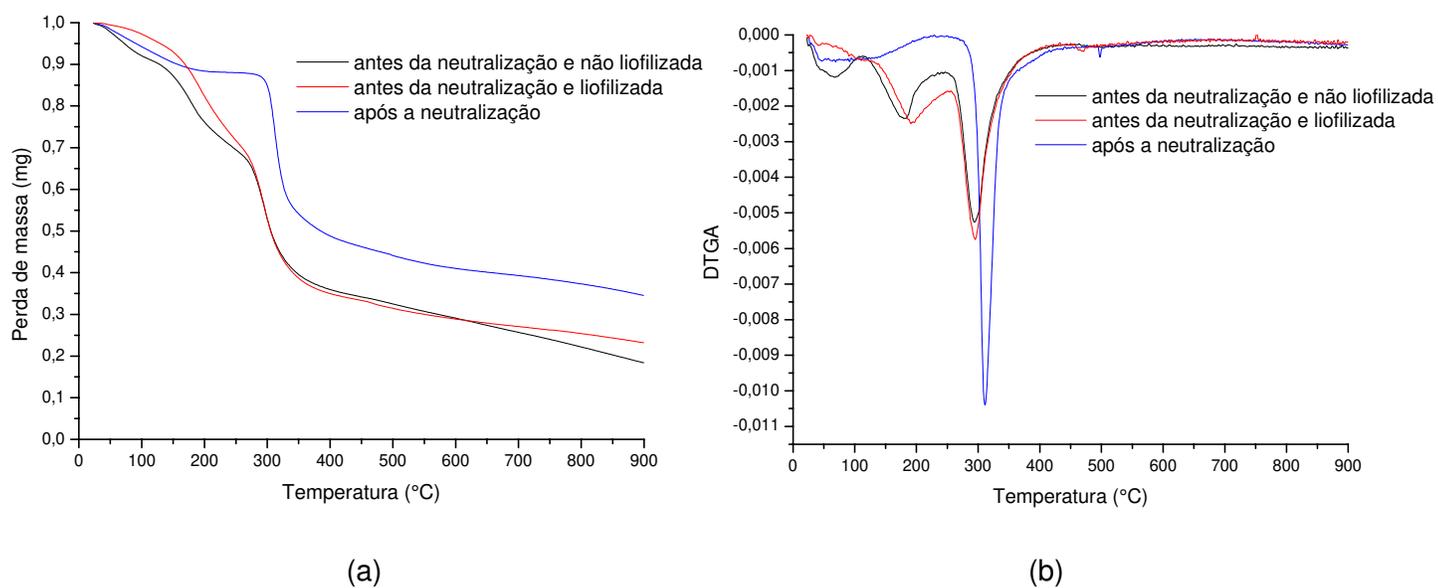


Figura 4.37 – Comportamento térmico da membrana densa à base de quitosana contendo 66,67% de quitosana e 33,33% de glicerol (ensaio 5 do planejamento estatístico proposto neste trabalho): (a) TGA, (b) DTGA.

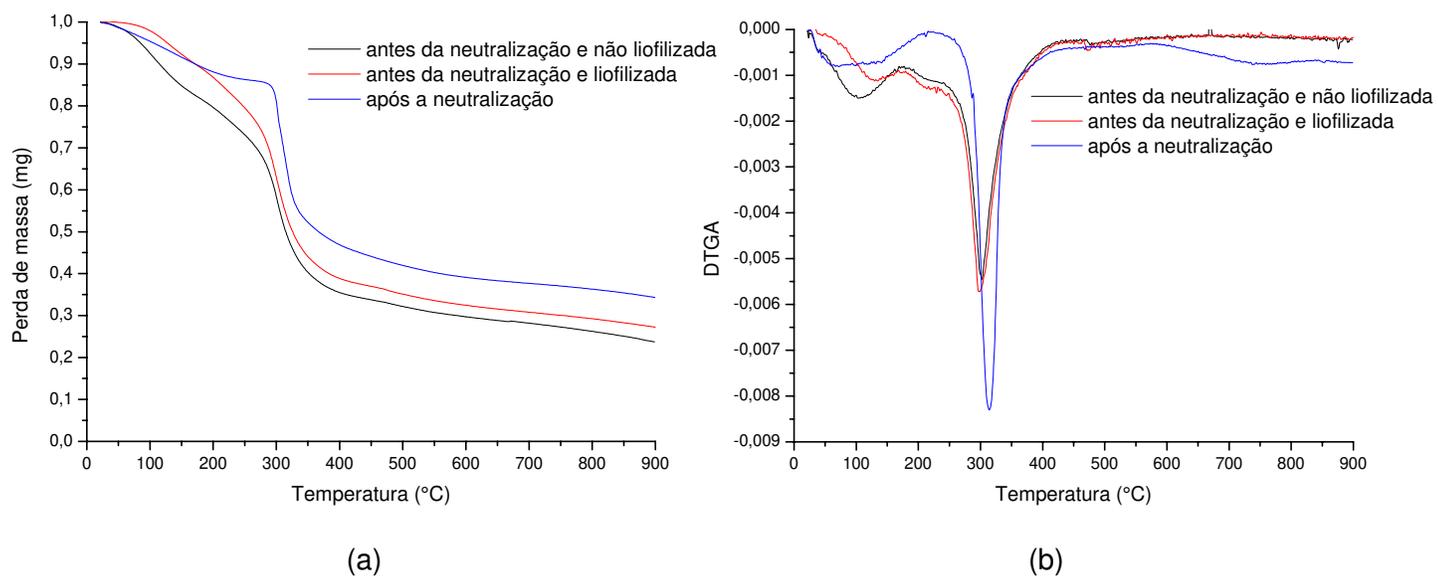


Figura 4.38 – Comportamento térmico da membrana densa à base de quitosana contendo 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol (ensaio 6 do planejamento estatístico proposto neste trabalho): (a) TGA, (b) DTGA.

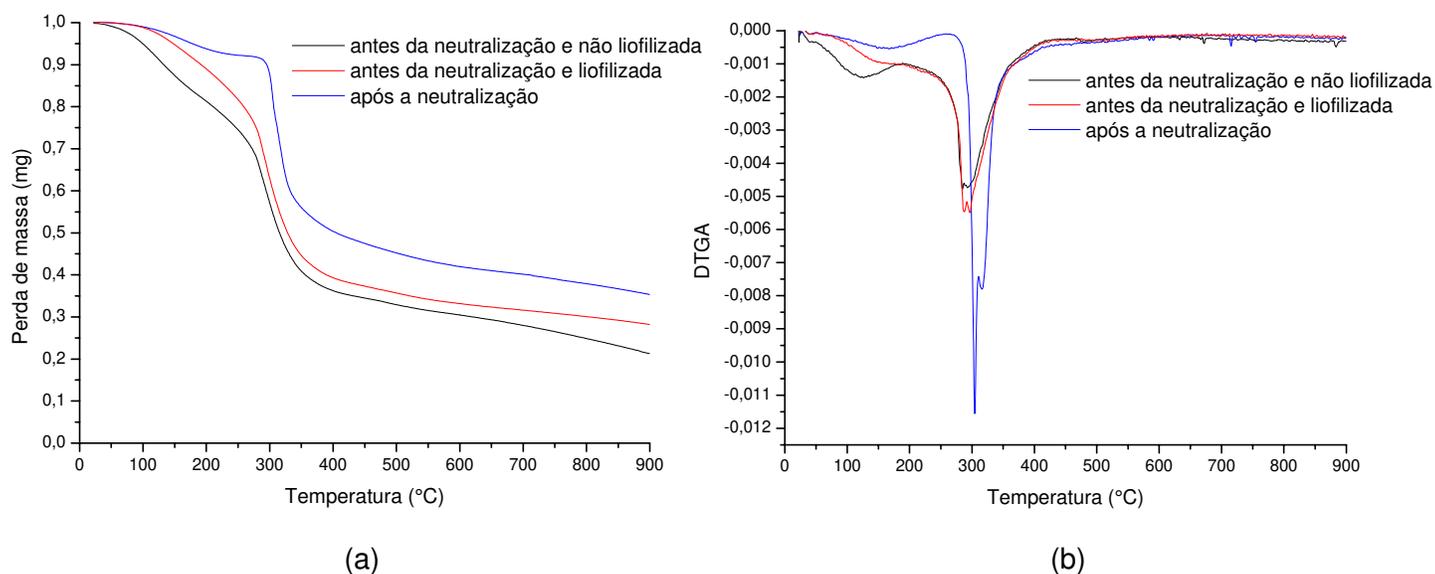


Figura 4.39 – Comportamento térmico da membrana densa à base de quitosana contendo 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol (composição Q+g do conjunto de ensaios de estudo da influência da esterilização nas características das membranas): (a) TGA, (b) DTGA.

Analisando-se as Figuras 4.37 a 4.39 são observadas diferenças entre os comportamentos térmicos das membranas que foram neutralizadas e aquelas que não foram tratadas com o hidróxido de sódio. Antes da neutralização e da lavagem, a degradação térmica das membranas que possuem glicerol em suas composições se fez em três etapas: a primeira delas correspondendo à perda da água contida nas amostras (68 a 156°C), a segunda, muito provavelmente, decorrente da degradação do plastificante (180 a 289°C) e a terceira decorrente da degradação da quitosana (288 a 303°C). Após a neutralização e a lavagem, para as membranas em que parte da quitosana foi substituída pelo glicerol (ensaios 5 e 6), a degradação das mesmas se fez em duas etapas: a primeira delas correspondendo à perda da água ainda contida nas amostras (63 a 132°C) e a segunda correspondendo à própria degradação da quitosana (311 a 314°C). Já para a membrana sintetizada para o conjunto de ensaios referente ao estudo da influência da esterilização nas características dos materiais (condição Q+g), a degradação continuou se fazendo em três etapas, sendo as duas últimas quase que simultâneas: a primeira decorrente da perda de água, a segunda, muito provavelmente, decorrente da degradação do glicerol e a terceira como consequência da degradação da quitosana.

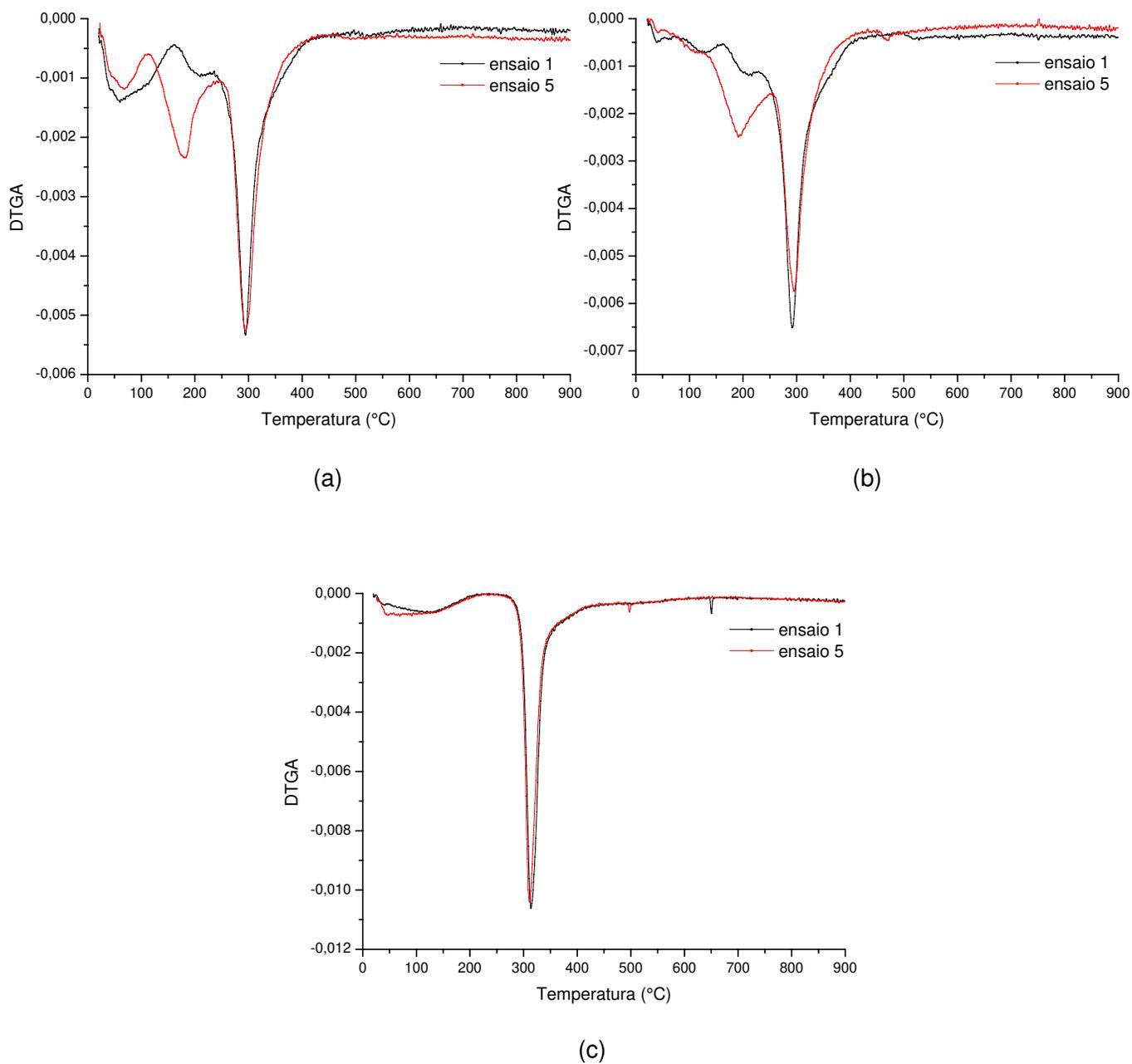


Figura 4.40 – Comparação entre os comportamentos térmicos (DTGA) da membrana densa formada somente por quitosana (ensaio 1) e aquela composta por quitosana e glicerol (ensaio 5): (a) membranas não liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (b) membranas liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (c) membranas neutralizadas.

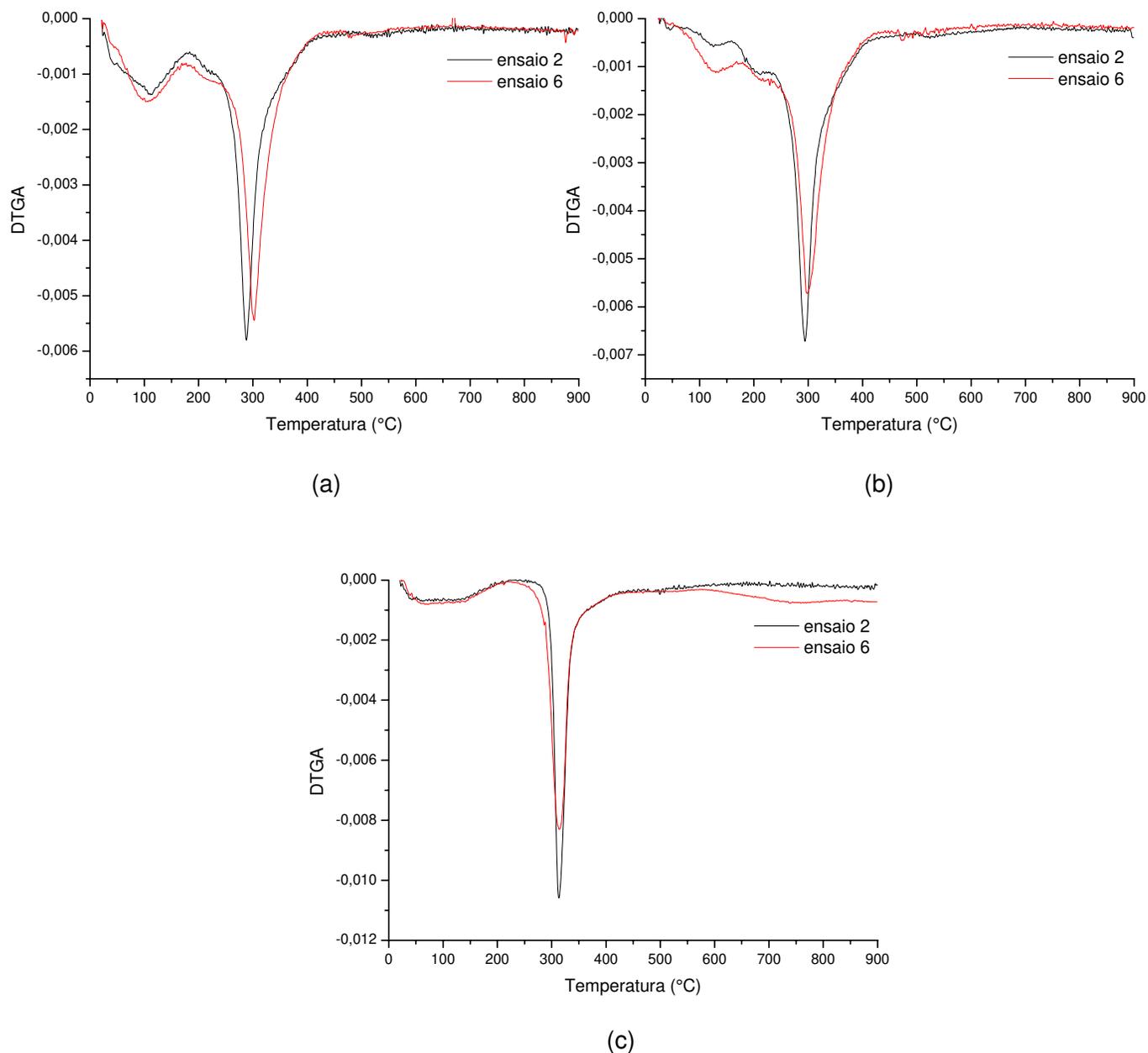


Figura 4.41 – Comparação entre os comportamentos térmicos (DTGA) da membrana densa formada somente por quitosana (ensaio 2) e aquela composta por quitosana e glicerol (ensaio 6): (a) membranas não liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (b) membranas liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (c) membranas neutralizadas.

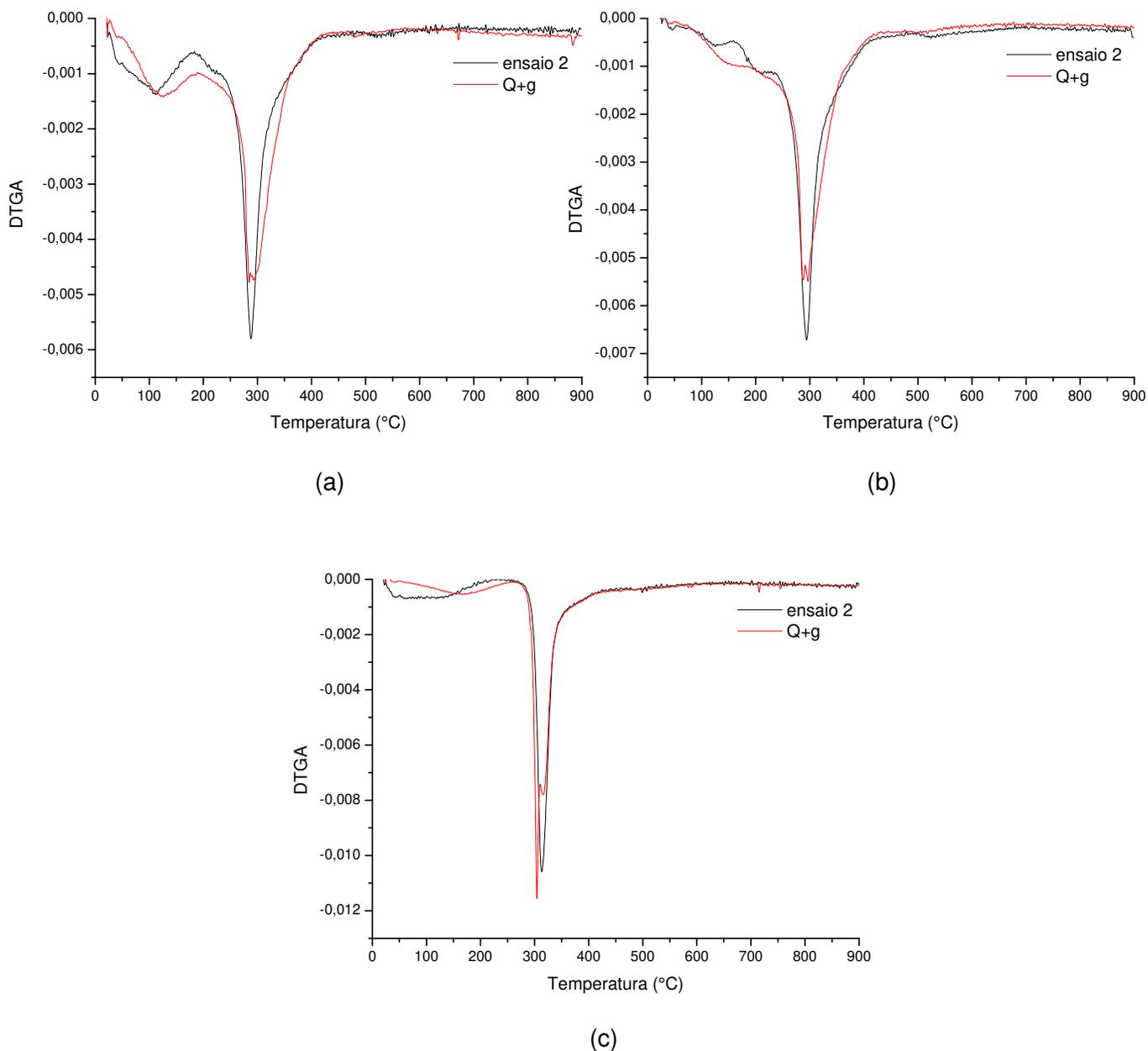


Figura 4.42 – Comparação entre os comportamentos térmicos (DTGA) da membrana densa formada somente por quitosana (ensaio 2) e aquela composta por quitosana e glicerol (Q+g): (a) membranas não liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (b) membranas liofilizadas e antes das etapas de neutralização e lavagem, (c) membranas neutralizadas.

A comparação da degradação térmica das membranas compostas somente por quitosana e aquelas formadas a partir de soluções de quitosana contendo glicerol mostra diferenças significativas entre os comportamentos térmicos dos materiais antes da realização das etapas de neutralização e lavagem (Figuras 4.40 e 4.41). Já após o tratamento com o hidróxido de sódio, o comportamento térmico das membranas se faz de forma muito semelhante, indicando a possível extração total do plastificante durante estas etapas do processo. No caso da composição Q+g (Figura 4.42), apesar da comparação entre o comportamento da membrana antes e após a neutralização e a lavagem mostrar diferenças (Figura 4.39), foi verificada a presença de três picos após o uso do hidróxido de sódio, indicando que possivelmente, para esta composição, a extração do glicerol durante a neutralização e a lavagem tenha sido parcial. Tal comportamento explica os maiores valores de ductilidade para esta composição (Q+g) quando em comparação com os obtidos para a membrana formada somente por quitosana e os menores resultados obtidos para as composições quando da substituição de parte da quitosana pelo glicerol (ensaios 5 e 6).

4.8. Análise comparativa do desempenho das membranas e seleção da composição com características mais adequadas para a função destinada

Após a realização dos ensaios de adesão celular, degradação enzimática e estabilidade em soluções aquosas, observou-se que as membranas sintetizadas neste trabalho não atendiam às características de biomateriais a serem utilizados como curativos temporários biodegradáveis já que as mesmas apresentaram baixa adesão celular em suas superfícies, baixa degradação quando em presença do tampão PBS ou da enzima lisozima mesmo após longos períodos de incubação (neste caso, dois meses) além de alta estabilidade em soluções aquosas, fato este decorrente da inclusão da etapa de neutralização das membranas. Assim, desconsiderou-se o uso destas membranas como curativos temporários biodegradáveis e iniciou-se o estudo quanto à possibilidade de utilização destes materiais como curativos temporários não biodegradáveis, já que as características apresentadas atendem aos requisitos necessários para classificá-los nesta categoria.

A análise comparativa do desempenho das membranas sintetizadas como curativos do tipo temporários não biodegradáveis e a seleção da composição com características mais promissoras foi realizada por uma avaliação conjunta dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização dos materiais, estabelecendo-se uma

escala de cores, conforme ilustrado na Tabela 4.32 e já efetuado anteriormente no estudo do efeito dos métodos de esterilização em membranas de diferentes composições.

Nesta escala encontram-se presentes as cores branco, cinza e preto. A cor branca indica o menor custo, as maiores porcentagens de hidratação em água destilada e em tampão PBS, os maiores valores de tensão de ruptura e de porcentagem de deformação, os menores valores de adesão celular e de degradação em tampão PBS e em solução de lisozima. A cor cinza indica os resultados intermediários e a cor preta, os resultados menos promissores em termos de custo, os menores valores de hidratação, tensão de ruptura e porcentagem de deformação, os maiores valores de adesão celular e de degradação quando em presença do tampão PBS e da enzima lisozima. A classificação das membranas foi obtida pela subtração do número de variáveis-resposta que foram classificadas com a cor branca daquelas que foram classificadas com a cor preta, para cada composição. Deve-se ressaltar que, apesar do grande número de técnicas utilizadas neste trabalho para a caracterização dos materiais, apenas algumas foram selecionadas para a escolha da membrana de características mais promissoras, variáveis estas consideradas de influência direta no desempenho dos biomateriais.

Como se pode observar, dentre as diferentes composições de membranas densas à base de quitosana sintetizadas neste trabalho, as que apresentaram um maior número de variáveis-resposta com características mais promissoras para serem utilizadas como curativos temporários não biodegradáveis foram aquelas compostas somente por quitosana (ensaios 1 e 2) e aquela formada a partir de uma solução de quitosana contendo 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol (ensaio 6). Segundo a metodologia adotada para a classificação das membranas, a composição formada a partir de uma solução de quitosana a 2,5% contendo somente quitosana em sua formulação (ensaio 2) foi aquela que apresentou o melhor resultado global, seguida da membrana composta somente por quitosana mas obtida de uma solução a 1,0% (ensaio 1) e daquela formada a partir de uma solução de quitosana contendo 83,33% de quitosana e 16,67% de glicerol (ensaio 6). Os resultados menos promissores foram obtidos pelas membranas formadas por 66,67% de quitosana e 33,33% de quitina (ensaio 3), seguida das membranas formadas por 50% de quitosana, 25% de quitina e 25% de glicerol (ensaio 7).

Tabela 4.32 – Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização das membranas densas à base de quitosana: custo, grau de hidratação em água destilada e em tampão PBS, tensão de ruptura, porcentagem de deformação, adesão celular, degradação em tampão PBS e em solução de lisozima a 5 mg/mL pelo período de dois meses.

Ensaio	Variável-resposta								Resultado predominante e Classificação
	Custo	Grau de hidratação		Tensão de ruptura	% de deformação	Adesão	Degradação		
		Água destilada	Tampão PBS				Tampão PBS	Lisozima	
1	■	□	■	□	□	□	□	□	2º
2	■	□	■	□	□	□	□	□	1º
3	■	■	■	■	□	■	■	■	7º
4	■	■	■	■	□	■	■	■	4º
5	■	■	□	■	□	■	■	■	4º
6	■	□	■	□	□	■	■	■	3º
7	□	■	■	■	□	□	■	■	6º
8	■	■	■	■	□	■	■	■	4º
9	■	■	■	■	□	■	■	■	5º
10	■	■	■	■	□	■	□	■	4º
11	■	■	■	■	□	■	■	■	4º

□ Nível mais alto

■ Nível intermediário

■ Nível mais baixo

Uma vez que a composição referente ao ensaio 2 foi aquela que apresentou os resultados mais promissores para uso como curativo do tipo temporário não biodegradável, para complementar sua caracterização, foram realizados ensaios de determinação de sua permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, conforme descrito a seguir.

4.9. Caracterização das membranas quanto à permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio

Conforme já mencionado ao longo deste trabalho, as queimaduras prejudicam a função normal da pele de controle do balanço de fluidos corpóreos, resultando em alta perda dos mesmos por evaporação. Neste contexto, os curativos são utilizados no controle da perda destes fluidos corpóreos. Acrescido a este fato, o uso de curativos auxilia na obtenção de um ambiente local úmido adequado para a aceleração do processo de cicatrização e para que isto seja possível, os curativos devem apresentar taxas de transmissão de vapor d'água adequadas.

Segundo Yannas e col. (1982), um curativo ideal deve possuir permeabilidade ao vapor d'água de 1.200 g/m²dia, já que a pele humana normal possui permeabilidade de 204 ± 12 g/m²dia e a pele lesada por queimaduras de primeiro grau ou quando da formação de tecido de granulação possuem permeabilidades de 279 ± 26 e 5.138 ± 202 g/m²dia, respectivamente (Ruiz-Cardona e col., 1996). Entretanto, de acordo com Wu e col. (2004) e Mi e col. (2001), o valor de permeabilidade ao vapor d'água de um curativo ideal deve ser superior ao descrito por Yannas e col. (1982). Segundo estes pesquisadores, o valor ideal é de 2.500 g/m²dia. Deve-se ressaltar que, alguns dos curativos disponíveis comercialmente apresentam valores de permeabilidade ao vapor d'água que variam de 90 a 2.892 g/m²dia (Wu e col., 1995).

Quanto à permeabilidade ao oxigênio, pode-se dizer sua importância reside na atuação direta na inibição do crescimento de bactérias anaeróbicas bem como na aceleração do processo de regeneração do tecido lesado (Kweon e col., 2001), não tendo sido encontrado na literatura pesquisada um valor tido como ideal para a permeabilidade ao oxigênio para curativos utilizados no tratamento de queimaduras.

Os resultados obtidos da análise de permeabilidade das membranas densas de quitosana obtidas a partir de uma solução a 2,5% (ensaio 2 do planejamento experimental

utilizado neste trabalho) e da membrana comercialmente disponível Omiderm® ao vapor d'água e ao oxigênio podem ser visualizados na Tabela 4.33.

Tabela 4.33 – Resultados obtidos da análise de permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio das membranas densas de quitosana e da membrana Omiderm®.

Tipo de membrana	Espessura (mm)	Permeabilidade ao vapor d'água TPVA (g/m²dia)	Permeabilidade ao oxigênio TPO₂ (cm³ de O₂ (CNTP)/m²dia)
Ensaio controle (copo aberto)	-	14.025 ± 1.138	-
Membrana densa de quitosana (ensaio 2)	0,13 ± 0,06	2.082 ± 117	43,58 ± 15,95
Omiderm®	0,040*	2.965 ± 55	82,32 ± 3,97

* valor fornecido pelo fabricante.

Os resultados ilustrados na Tabela 4.33 mostram que a membrana densa de quitosana obtida a partir de uma solução a 2,5% (ensaio 2 do planejamento experimental proposto neste trabalho) apresenta um valor de permeabilidade ao vapor d'água adequado para uso como curativo no tratamento de queimaduras (2.082 ± 117 g/m²dia), apesar de ser um pouco inferior ao valor de referência proposto por Wu e col. (2004) e Mi e col. (2001). Além disso, este tipo de membrana apresentou permeabilidade ao vapor d'água compatível com a da membrana comercial Omiderm® (2.965 ± 55 g/m²dia), apesar da membrana comercialmente disponível apresentar uma espessura 69,2% inferior à da membrana de quitosana. Os maiores valores de desvio padrão observados para as membranas de quitosana quando em comparação com a membrana comercial Omiderm® podem ser atribuídos à variação da espessura ao longo dos materiais, limitação intrínseca do próprio processo de obtenção das membranas em escala laboratorial.

Sendo a permeabilidade ao vapor d'água uma característica essencial de biomateriais a serem utilizados como curativos no tratamento de queimaduras, esta propriedade é comumente discutida na literatura científica. Porém, a comparação direta dos valores encontrados na literatura aos obtidos neste trabalho deve ser feita com cautela, uma vez que as condições experimentais utilizadas durante os ensaios

(metodologia, temperatura e umidade relativa) e as características das membranas (tipo de matéria-prima utilizada, composição, espessura e morfologia, dentre outras) não são mantidas constantes, variando significativamente entre os diferentes grupos de pesquisa. Apesar deste fato, pôde-se observar que os resultados obtidos neste trabalho e os encontrados na literatura (Xu e col., 2005; ; Wu e col., 2004; Kweon e col., 2001; Mi e col., 2001; Khan e col., 2000) são compatíveis.

Já no caso da permeabilidade ao oxigênio, o valor obtido para a membrana de quitosana, de $43,58 \pm 15,95 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \text{ (CNTP)/m}^2\text{dia}$, foi inferior ao valor observado para a membrana comercial Omiderm® ($82,32 \pm 3,97 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \text{ (CNTP)/m}^2\text{dia}$), não sendo considerado satisfatório no caso de uso contínuo da membrana de quitosana no tratamento de queimaduras pelo mesmo período de uso do curativo comercialmente disponível, que é de cinco a sete dias. Este resultado já era esperado, uma vez que, segundo a literatura consultada (Srinivasa e col., 2004; Butler e col., 1996 APUD Xu e col., 2005), filmes de quitosana agem como barreiras à passagem do oxigênio.

São diversas as implicações da limitação à passagem do oxigênio por curativos utilizados no tratamento de queimaduras. Tal característica impede a proliferação das células junto ao tecido em recuperação (Yannas e Burke, 1980 APUD Mi e col., 2003). Além disso, a troca gasosa através do curativo se faz de grande relevância já que a alta concentração de gás carbônico na área do ferimento promove acidificação do micro-ambiente, prejudicando o processo de cicatrização. Como complemento, a baixa concentração de oxigênio na área lesada reduz a capacidade de regeneração do tecido lesado e permite a possibilidade de proliferação de bactérias anaeróbicas no local (Mi e col., 2001).

Para suprir tal deficiência, alternativas como a freqüente troca do curativo de quitosana bem a produção de membranas de quitosana de menor espessura e do tipo porosas devem ser consideradas. Tais alternativas (redução da espessura e elevação da porosidade) foram avaliadas, sendo as membranas de quitosana do tipo porosas produzidas e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo José Arruda do Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco (Campo Grande, MS). As membranas porosas foram obtidas utilizando-se sílica-gel com diâmetro médio de partículas de 40 a 63 μm como agente formador de poros e a relação sílica:quitosana de 5:1 em termos de massa seca. Os resultados de permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.34.

Tabela 4.34 – Resultados obtidos da análise de permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio das membranas densas de quitosana com menor espessura e das membranas de quitosana do tipo porosas.

Tipo de membrana	Espessura (mm)	Permeabilidade ao vapor d'água TPVA (g/m²dia)	Permeabilidade ao oxigênio TPO₂ (cm³ de O₂ (CNTP)/m²dia)
Ensaio controle (copo aberto)	-	13.173 ± 1.365	-
Membrana densa de quitosana com menor espessura	0,03 ± 0,01	2.282 ± 100	44,76 ± 0,93
Membrana porosa de quitosana	0,11 ± 0,02	10.076 ± 289	superior a 1.000

Como se pode observar pela comparação dos resultados ilustrados nas Tabelas 4.33 e 4.34, enquanto a redução da espessura não afetou a permeabilidade das membranas densas de quitosana à passagem do vapor d'água, apresentando resultados estatisticamente iguais aos obtidos quando do uso de membranas mais espessas (em um intervalo de 95% de confiabilidade), a porosidade teve influência direta nesta mesma variável. As membranas do tipo porosas apresentaram valores de permeabilidade ao vapor d'água 3,8 vezes superiores aos observados para as membranas do tipo densas.

Sabendo-se que o processo de cicatrização deve ocorrer em um ambiente contendo uma certa umidade, um curativo que apresente uma taxa de permeabilidade ao vapor d'água muito elevada, pode não ser adequado para uso em processos de regeneração de pele. Uma alternativa para reduzir o alto valor de permeabilidade ao vapor d'água obtido para as membranas de quitosana do tipo porosas é a redução da proporção sílica:quitosana, a qual tem influência direta na porosidade dos materiais. Contudo, a escolha quanto à proporção a ser utilizada deve estar baseada em uma análise conjunta entre o tipo de lesão a ser tratada (contendo muito ou pouco exudato) e as propriedades das membranas diretamente afetadas pela porosidade como o grau de hidratação, a resistência mecânica, a ductilidade, as permeabilidades ao vapor d'água e ao oxigênio bem como a adesão celular e a degradação enzimática.

Fazendo-se ainda uma análise comparativa entre os resultados apresentados nas Tabelas 4.33 e 4.34, observa-se que apesar da literatura descrever a espessura da

camada densa de uma membrana de quitosana como sendo uma das variáveis que influencia na passagem do oxigênio pela mesma (Mi e col., 2003), tal comportamento não foi observado no estudo em questão já que os valores de permeabilidade ao oxigênio das membranas densas de quitosana de $0,13 \pm 0,06$ mm de espessura (Tabela 4.33) e aquelas de $0,03 \pm 0,01$ mm de espessura (Tabela 4.34) apresentaram resultados estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Já no caso das membranas do tipo porosas, o valor obtido ficou acima da capacidade de leitura do próprio sensor do equipamento utilizado, o qual era de 1.000 cm^3 de O_2 (CNTP)/ m^2dia , valor este muito superior ao obtido para as membranas de quitosana do tipo densas.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que para se obter maiores valores de permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, a variação da espessura das membranas não se mostrou a variável mais adequada de estudo. Neste caso, a variável de análise a ser considerada deve ser a porosidade do material.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. Conclusões

Na primeira etapa deste trabalho pôde-se concluir que apesar da quitosana possuir características bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática, a esterilização de biomateriais que a utilizam como matéria-prima principal é imprescindível. Dentre os três agentes de esterilização analisados, o óxido de etileno foi aquele que apresentou os resultados mais promissores em termos de manutenção das características físicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana. A solução de etanol a 70% também forneceu resultados adequados, entretanto, além deste agente não ser classificado como um agente esterilizante propriamente dito e sim como um desinfetante, seu uso se limita à esterilização em pequena escala. A radiação gama, apesar de ser um dos agentes mais comumente descritos para a esterilização de materiais à base de quitosana, apresentou influência negativa na morfologia e na ductilidade de algumas das composições analisadas.

Do estudo do efeito da composição nas características das membranas pôde-se observar que o uso de soluções mais concentradas de quitosana promoveu um aumento no custo das membranas em contrapartida, conferiu a estes materiais, maior espessura no estado úmido, resistência mecânica e ductilidade, além de dificultar a degradação dos mesmos quando em presença da enzima lizosima, característica esta importante quando do uso destes materiais como curativos temporários não biodegradáveis. Já a substituição de parte da quitosana utilizada na formulação das membranas por quitina permitiu a obtenção de materiais de menor custo, porém com capacidade de absorção de líquidos e propriedades mecânicas inferiores às observadas para as membranas formadas exclusivamente por quitosana. Tal substituição causou ainda aumento da espessura (seca e úmida) dos materiais bem como redução na cristalinidade dos mesmos, além de torná-

los mais susceptíveis à ação da lisozima. Assim como quando da substituição por quitina, o uso do glicerol reduziu o custo das membranas bem como a espessura úmida, a cristalinidade e o tempo de degradação das mesmas quando em presença da enzima lisozima. Deve-se ressaltar que, nenhuma das composições sintetizadas favoreceu a adesão das células Vero em suas superfícies.

A análise global dos resultados mostrou que a maioria das composições sintetizadas apresentou características adequadas para utilização como curativos temporários não biodegradáveis sendo as membranas compostas somente por quitosana e obtidas a partir de uma solução a 2,5%, aquelas que mostraram os resultados mais promissores de uso para esta finalidade. Contudo, ensaios complementares de determinação da permeabilidade das membranas obtidas nesta condição experimental mostraram que as mesmas apresentavam valores de permeabilidade ao vapor d'água adequados porém valores de permeabilidade ao oxigênio aquém do desejado. Para suprir tal deficiência, membranas menos espessas e do tipo porosas foram sintetizadas. Contudo, apenas a porosidade mostrou-se como sendo uma variável de estudo eficiente na busca de valores adequados de permeabilidade das membranas de quitosana ao oxigênio.

5.2. Sugestões para próximos trabalhos

Alguns dos trabalhos futuros propostos como continuação do estudo iniciado são:

1. Estudo da influência de diferentes condições de esterilização (temperatura, pressão e tempo) quando do uso do óxido de etileno nas características físicas, mecânicas e biológicas das membranas à base de quitosana;
2. Estudo de minimização dos efeitos negativos quando do uso da radiação gama como agente de esterilização em membranas à base de quitosana;
3. Análise comparativa das características físicas, mecânicas e biológicas das membranas quando do uso de diferentes tipos de quitosana (massa molar e grau de desacetilação) bem como quando do uso conjunto com outros compostos visando uma melhoria das características destes materiais;
4. Avaliação biológica dos materiais utilizando-se outras técnicas de caracterização como, por exemplo, a tripsinização e a quantificação por DNA;

5. Estudo quanto ao uso de diferentes tipos de plastificantes na formulação dos biomateriais;

6. Estudo de membranas do tipo porosas e quando do uso da sílica-gel como agente formador de poros, avaliação quanto à influência da relação sílica:quitosana nas características dos materiais;

7. Estudo da influência da composição das membranas bem como das condições de ensaio (temperatura, umidade relativa e procedimento experimental) na permeabilidade das mesmas ao vapor d'água e ao oxigênio;

8. Realização de ensaios *in vivo*.

Como se pode notar, o estudo quanto ao uso da quitosana em processos de regeneração de pele lesada por queimaduras é complexo e apesar do grande número de trabalhos publicados envolvendo o uso da quitosana nesta área, muitas vezes as informações são discrepantes ou então incompletas, dificultando sua reprodução em laboratório. Assim, novos estudos podem contribuir muito para o desenvolvimento de biomateriais à base de quitosana com características físicas, químicas, mecânicas e biológicas adequadas para a aplicação destinada.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELLI, J.A.M. **Introdução a materiais poliméricos – Materiais para produção industrial 2**. Apostila didática para o Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, 1994.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM D 882-95A. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**, 1995.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM E 96-00. **Standard test methods for water vapor transmission of materials**, 2000.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM F 1635-95. ***In vitro* degradation testing of poly (L-lactic acid) resin and fabricated form for surgical implants**, 1995.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM F 1927. **Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector**, 2004.
- ANGELOVA, N. e HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Tibtech**, v.17, p.409-421, 1999.
- ARVANITTOYANNIS, I.S.; NAKAYAMA, I. e AIBA, S-I. Chitosan and gelatine based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties, **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.371-382, 1998.

- 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.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 2002. 289p.
- BIAGINI, G.; BERTANI, A.; MUZZARELLI, R.; DAMADEI, A.; DIBENEDETTO, G.; BELLIGOLLI, A.; RICCOTTI, G.; ZUCCHINI, C. e RIZZOLI, C. Wound management with N-carboxybutyl chitosan. **Biomaterials**, v.12, p.281-286, 1991.
- BLACK, J. **Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility**, Marcel Dekker, New York, 1992. 463p.
- BROWN, C.D.; KREILGAARD, L.; NAKAKURA, M.; CARAM-LELHAM, N.; PETTIT, D.K.; GOMBOTZ, W.R. e HOFFMAN, A.S. Release of PEGylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from chitosan/glycerol films. **Journal of Controlled Release**, v.72, p.35-46, 2001.
- BURRI, C. Lesões tissulares causadas pelo calor. In: **Cirurgia do trauma**. Editora Pedagógica e Universidade Ltda. e Springer Ltda., São Paulo, SP, p.47-58, 1978.
- CAMPBELL, C.E. e VON RECUM, A.F. Microtopography and soft tissue response. **Journal of Investigative Surgery**, v.2, p.51-74, 1989.
- CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. Editora Senac, São Paulo, SP, 2001. 282p.
- CANELLA, A.M.N.C. e GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - Influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova On Line*, v.24, n.1, jan/fev 2001. Disponível em <http://www.s bq.org.br/publicacoes/quimicanova/qnol/2001/vol24n1>. Acesso em março de 2003.
- CANER, C.; VERGANO, P.J. e WILES, J.L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage, **Journal of Food Science**, v.63, n.6, p.1049-1053, 1998.

- CASARIEGO, A.; COSSIO, G.; DIAZ, R.; FERNANDEZ, S.A. e RAMIREZ, A. Propriedades ópticas de películas de quitosana elaboradas com ácido láctico: influencia de la concentración de ácido y el tipo y concentración de plastificante, **Alimentaria**, v.39, n.336, p.25-28, 2002.
- CERVERA, M.F.; KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RANTANEN, J.; KROGARS, K.; HEINAMAKI, J.; COLARTE, A.I e YLIRUUSI, J. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.69–76, 2004.
- CHANDY, T. e SHARMA, C.P. Chitosan as biomaterial. **Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs**, v.18, p.1-24, 1990.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O. e DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.
- 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.
- CHOW, K.S. e KHOR, E. Novel fabrication of open-pore chitin matrixes. **Biomacromolecules**, v.1, p.61-67, 2000.
- CHUPA, J.M.; FOSTER, A.M.; SUMNER, S.R.; MADIHALLY, S.V. e MATTHEW, H.W.T. Vascular cell responses to polysaccharide materials: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Biomaterials**, v.21, p.2315-2322, 2000.
- CORKHILL, H.P. e TIGHE, J.B. Synthetic hydrogels (7). High EWC semi-interpenetrating polymer networks based on cellulose esters and N-containing hydrophilic monomers. **Polymer**, v.31, p.1526-1537, 1990.
- COSTA, A.O.; CRUZ, E.A.; GALVÃO, M.S.S. e MASSA, N.G. **Esterilização e desinfecção: Fundamentos básicos, processos e controles**. Associação Brasileira de Enfermagem, Cortez Editora, São Paulo, SP, 1993. 77p.
- CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. e QUEIROZ, D.C. **Quitosana – A fibra do futuro**, Padetec, 1999. 124p.

- CRAVEIRO, A.A. e CRAVEIRO, A.C. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. Patente brasileira, **PI 9805480-5A**. 12/09/2000.
- DEMARZO, D. e SILVA, A. Esterilização por óxido de etileno: a utilização e serviços tercerizados. *Sobecc*, v.2, n.1, p.6-11, 1997. Disponível em [http:// www.Joãopossani.hpg.ig.com.br](http://www.Joãopossani.hpg.ig.com.br). Acesso em fevereiro de 2002.
- ERENO, D. Celulose na pele. **Revista FAPESP**, v.101, julho de 2004.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA**, 4ª edição, Atheneu Ltda, São Paulo, 1988.
- FERRAZ C.A. Sterrad, opte pelo futuro. *Enfoque* 1995, v.2, p.12-15. Disponível em [http:// www.Joãopossani.hpg.ig.com.br](http://www.Joãopossani.hpg.ig.com.br). Acesso em fevereiro de 2002.
- FERREIRA, S.E.M. e MATHEUS, M.G. Cuidados da enfermagem. In: GOMES D.R, SERRA, M.C. e PELLON, M.A. **Queimaduras**. Rio de Janeiro, RJ, p.15-285, 1995.
- FRESHNEY, R.I. **Animal cell culture – A practical approach**, IRL Press, 1989. 329p.
- GAWRYSZEWSKI, V.P. O impacto das causas externas nos custos hospitalares. **Prática Hospitalar**, v.33, maio-junho de 2004.
- 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.
- GENARI, S.C.; DOLDER, M.A.H. e WADA, M.L.F. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, v.28, n.4, p.565-572, 1996.
- GLASER, Z.R. Ethylene Oxide: toxicology review and field study results of hospital use. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v.2, p.173-208, 1979.
- GRUPO DE ESTUDOS DE FERIDAS. **Manual de Tratamento de Feridas**, Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 1999.
- GUERREIRO-BÉLTRAN, J.A.; SANCHEZ, Y.; ARGAIZ-JAMET, A. e WESHE-EBELING, P. Characteristics of chitosan film as affected by type and level of plastificant. **Institute of Food Technologists Annual Meeting**. Chicago, Illinois, USA, 1999.

- HABERT, A.C.; BORGES, C.P. e NOBREGA, R. Processos de Separação com Membranas. **Escola Piloto em Engenharia Química**. COPPE/UFRJ, 1997.
- 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.
- HU, S-J.; FERNADEZ, R. e JONES, J.W. Cyclosporine A stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells and enhances monocyte adhesion to vascular smooth muscle cells. **Transplantation Proceedings**, v.31, p.663-665, 1999.
- HUTCHINSON, F. Molecular basis for action of ionizing radiation injury. **Science**, v.134, p.533, 1961.
- INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION ISO 10993-5(E). **Biological evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods**, 1992.
- JORKASKY, J.F. Medical product sterilization changes and challenges. **Medical Device & Diagnostical Industry**, v.9, p.32-37, 1987.
- JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: **Histologia Básica**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, p.303-314, 1999.
- KHAN, T.A.; PEH, K.K. e CH'NG, H.S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.3, p.303-311, 2000.
- KIM, S.S.; KIM, S.H. e LEE, Y.M. Preparation, characterization and properties of β -chitin and N-acetylated β -chitin. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.34, p.2367-2374, 1996.
- KIRKPATRICK, C.J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. **Regulatory Affairs**, v.4, p.13-32, 1992.
- KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v.26, p.1921-1971, 2001.

- KURITA ,K.; KAJI, Y.; MORI, T. e NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.19-21, 2000.
- KWABENA, K.O. e FELL, J.T. Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, p.39-145, 2001.
- KWEON, H.; HA, H.C.; UM, I.C. e PARK, Y.H. Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.80, p.928-934, 2001.
- KWEON, D-K.; SONG, S-B. e PARK, Y-Y. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, p.1595-1601, 2003.
- LEE, K.Y.; HA, W.S. e PARK, W.H. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. **Biomaterials**, v.16, n.16, p.1211-1216, 1995.
- LEE, Y.M.; PARK, H.B. e NAM, S.Y. Effect of deacetylation degree in chitosan composite membranes on pervaporation performance. **Separation Science and Technology**, v.33, n.9, p.1255-1269, 1998.
- LEVERSON, S.M.; GEEVER, E.F.; CROWLEY, L.V.; OATES, J.F.; BERARD, C.W. e ROSEN, H. The healing of rat skin wounds. **Annals of Surgery**, v.161, p.293-308, 1965.
- LI, J.; ZHONG, Y.; GONG, Y.; ZHAO, N. e ZHANG, X. Chitosan conduit for peripheral nerve regeneration. **Tsinghua Science and Technology - Digital Periodical**, v.4, n.3, p.1515-1518, 1999.
- LIM, L.Y.; KHOR, E. e KOO, O. γ -irradiation of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v.43, p.282-290, 1998.
- LIM, L-Y.; KHOR, E. e LING, C-E. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v.48, p.111-116, 1999.

- LIMA, A.M.F. **Matrizes porosas de quitosana**. São Carlos: IQ, USP, 2002. Tese de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002. 75p.
- LOKE, W.K.; LAU, S.K.; YONG, L.L.; KHOR, E. e SUM, C.K. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v.53, p.8-17, 2000.
- LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M. e WADA, M.L.F. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates. **Cytobios**, v.101, p.115-122, 2000.
- LYMAN, D.J. e ROWLAND, S.M. Biomaterials. In: KROSCWITZ, J. I. **Polymers: Biomaterials and Medical Applications**, p.52-71, 1989.
- MA, J.; WANG, H.; HE, B. e CHEN, J. A preliminary *in vitro* study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v.22, p.331-336, 2001.
- MADIHALLY, S.V. e MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.20, p.1133-1142, 1999.
- MALETTE, W. Chitosan: a new hemostatic. **Annals of Thoracic Surgery**, v.36, p.55, 1983.
- 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.
- MARKEY, M.L.; BOWNAM, L.M. e BERGAMINI, M.V.M. Contact lenses made of chitosan. **1st International Conference Chitin/Chitosan**. Cambridge, MA, 1978.
- MARTINI, F.H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. New Jersey, A Simon & Schuster Company, 3^a edição, p.28, 1995.
- MCLOUGHLIN, E. A simple guide to burn epidemiology. **Burns**, v.21, p.217-225, 1995.
- MI, F-L.; SHYU, S-S.; WU, Y-B.; LEE, S-T.; SHYONG, J-Y. e HUANG, R-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v.22, p.165-173, 2001.

- MI, F-L.; WU, Y-B.; SHYU, S-S.; CHAO, A-C.; LAI, J-Y. e SU, C-C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry-wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. **Journal of Membrane Science**, v.212, p.237-254, 2003.
- MILLER, R.R. e McDEVITT, C.A. A quantitative microwell assay for chondrocyte cell adhesion. **Analytical Biochemistry**, v.192, p.380-383, 1991.
- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R. e YOSHIKAWA, S. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal Applied Polymers Science**, v.28, p.1909-1917, 1983.
- MIZUNO K.; YAMAMURA K.; YANO K.; OSADA, T.; SAEKI, S.; TAKIMOTO, N.; SAKURA, T. e NIMURA Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.64, p.177-181, 2003.
- MORI, T.; OKUMURA, M.; MATSUURA, M.; UENO, K.; TOKURA, S.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S. e FUJINAGA, T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v.18, n.13, p.947-951, 1997.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MU, Y.; LI, G.; RUAN, X.; GONG, Y.; ZHAO, N. e ZHANG, X. Interaction of protein and cell with different chitosan membranes. **Tsinghua Science and Technology - Digital Periodical**, v.4, n.3, p.1578-1582, 1999.
- MUZZARELLI, R.; BALDASSARRE, V.; CONTI, F.; FERRARA, P. e BIAGINI, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, v.9, p.247-252, 1988.
- NETTLES, D. e ELDER, S. Evaluation of chitosan as a cell scaffold for cartilage tissue engineering. **47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society**, February 25–28, San Francisco, Califórnia, 2001.

NORTHUP, S.J. Mammalian cell culture models in handbook of biomaterials evaluation. In: **Scientific, technical and clinical testing of implant material**. Ed: A.F. von Renun, p.209-225, 1986.

OHASHI, E. e KARUBE, I. Development of a thin membrane glucose sensor using β -type crystalline chitin for implantable biosensor. **Journal of Biotechnology**, v.40, p.13-19, 1995.

PAUL, W. e SHARMA, C.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Artificial Organs**, v.18, n.1, p.18-23, 2004.

PAYNE, G.F.; CHAUBAL, M.V. e BARBARI, T.A. Enzyme-catalysed polymer modification: reaction of phenolic compounds with chitosan films. **Polymer**, v.37, n.20, p.4643-4648, 1996.

PEESAN, M.; RUJIRAVANIT, R. e SUPAPHOL, P. Characterization of beta-chitin/poly(vinyl alcohol) blend films. **Polymer Testing**, v.22, p.381–387, 2003.

PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 482, 16 de abril de 1999.

POSSARI, J.F. **Esterilização por óxido de etileno**. Editora Iátria, São Paulo, SP, 2003. 134p.

PRASITSILP, M.; JENWITHISUK, R.; KONGSUWAN, K.; DAMRONGCHAI, N. e WATTS, P. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. **Journal of Materials Science - Materials in Medicine**, v.11, p.773-778, 2000.

QUEIROZ, D.C. e CRAVEIRO, A.A. Novo processo de obtenção de quitosana a partir de carapaças de crustáceos. Patente brasileira, **PI 9800375-5A**. 28/03/1998.

QU, X.; WIRSEN, A. e ALBERTSSON, A-C. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. **Polymer**, v.41, p.4841-4847, 2000.

RABEA, E.I.; BADAWEY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGHE, G. e STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1465, 1993.

- RAO, S.B. e SHARMA, C.P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.34, p.21-28, 1997.
- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J. e LEMONS, J.E. **Biomaterials science – An introduction to materials in medicine**. Academic Press, London, 1996. 484p.
- RISBUD, M.; HARDIKAR, A. e BHONDE, R. Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: Implications for wound management? **Journal of Bioscience**, v.25, n.1, p.25-31, 2000.
- RODAS, A.C.D. **Desenvolvimento de membranas como compósitos dérmico-epidérmicos**. São Paulo: IPEN, 2004. Tese de Doutorado – Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Nucleares, São Paulo, 2004. 149p.
- ROSSI, L.A.; FERREIRA, E.; COSTA, E.C.F.B.; BERGAMASCO, E.C. e CAMARGO, C. Prevenção de queimaduras: percepção de pacientes e de seus familiares. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v.11, n.1, p.36-42, 2003.
- RUIZ-CARDONA, L.; SANZGIRI, Y.D.; BENEDETTI, L.M.; STELLA, V.J. e TOPP, E.M. Application of benzyl hyaluronate membranes as potential wound dressings: evaluation of water vapour and gas permeabilities. **Biomaterials**, v.17, n.16, p.1639-1643, 1996.
- SANDERS, S.N. Esterilização de termossensíveis. Disponível em http://www.cenat.com.br/conteudo_informes.html. Acesso em fevereiro de 2002.
- 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.
- SAKURAI, K.; MAEGAWA, T. e TAKAHASHI, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends. **Polymer**, v.41, p.7051-7056, 2000.
- SENEL, S. e MCCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1467-1480, 2004.

- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V. e JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.37-51, 1999.
- SHALABY, W.S. **Biomedical Polymers – Designed-to-Degrade Systems**, Hanser Publishers, New York, 1994.
- SHERIDAN, R.L. e TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v.25, p.97-103, 1999.
- SHIMAI, Y.; TSUKUDA, K. e EINO, H. Antiacne preparations containing chitin, chitosan or their partial degradation products. Jpn. Kidai Tokkyo Koho. Patente Japonesa. **JP 04.288.017[92.288.017]**. Outubro de 1992.
- SHU, X.Z.; ZHU, K.J. e SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.212, p.19-28, 2001.
- SKIENS, W.E. Sterilizing radiation effects on selected polymers. **Radiation Physics and Chemistry**, v.15, p.47-57, 1980.
- SIGNINI, R. e CAMPANA FILHO, S.P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros**, v.11, n.2, São Carlos, 2001.
- 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.
- SRINIVASA, P.C.; RAMESH, M.N.; KUMAR, K.R. e THARANATHAN, R.N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.79-85, 2004.
- SUH, J.K.F. e MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, **Biomaterials**, v.21, p.2589-2598, 2000.

- SUZUKI, T. e MIZUSHIMA, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, n.2, p.128-132, 1997.
- TANABE, T.; OKITSU, N.; TACHIBANA, A. e YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. **Biomaterials**, v.23, p.817-825, 2002.
- TOMIHATA, K. e IKADA, Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v.18, n.7, p.567-575, 1997.
- 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.
- URAGAMI, T.; KATO, S. e MIYATA, T. Structure of N-alkyl chitosan membranes on water-permeability for aqueous ethanol solutions. **Journal of Membrane Science**, v.124, p.203-211, 1997.
- VARMA, H.K.; YOKOGAWA, Y.; ESPINOSA, F.F.; KAWAMOTO, Y.; NISHIZAWA, K.; NAGATA, F. e KAMEYAMA, T. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. **Biomaterials**, v.20, p.879-884, 1999.
- VARUM, K.M.; HOLME, H.K.; IZUME, M.; STOKKE, B.T. e SMIDSROD, O. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially *N*-acetylated chitosan. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1291, p.5-15, 1996.
- VASCONCELOS, Y. Alívio para queimaduras. **Revista FAPESP**, v.89, julho de 2003.
- 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.
- WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials. **Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**, v.4, 1987.

- WISNIEWSKA-WRONA, M.; NIEKRASZEWICZ, A.; STRUSZCZYK, H. e GUZINSKA, K. Estimation of polymer compositions containing chitosan for veterinary applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v.38, n.3, p.82-87, 2002.
- WU, P.; FISHER, A.C.; FOO, P.P.; QUEEN, D. e GAYLOR, J.D.S. In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings. **Biomaterials**, v.16, n.3, p.171-175, 1995.
- WU, Y-B.; YU, S-H.; MI, F-L.; WU, C-W.; SHYU, S-S.; PENG, C-K. e CHAO, A-C. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosana/cellulose blends. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p.435-440, 2004.
- XU, Y.X.; KIM, K.M.; HANNA, M.A. e NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.185-192, 2005.
- 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.
- YANG, J.M.; SU, W.Y.; LEU, T.L. e YANG, M.C. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. **Journal of Membrane Science**, v.236, p.39-51, 2004.
- YANNAS, I.V. e BURKE, J.F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.14, p.65-81, 1980.
- YANNAS, I.V.; BURKE, J.F.; WARPEHOSKI, J.F.; STASIKELIS, P.; SKRABUT, E.M. e ORGILL, D.P. Design principles and preliminary clinical performance of an artificial skin. In: COOPER, S.L. e PEPPAS, N.A. **Interfacial phenomena and applications**, p.476-481, 1982.
- 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.
- YOSOF, N.L.B.M.; LIM, L.Y. e KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.54, p.59-68, 2001.

- ZABALA, A.; MARTÍN, R.; HAZA, A.; FERNÁNDEZ, L.; MORALES, P. e RODRÍGUEZ, J.M. Inhibition of the proliferation of myeloma cells by the meta origin strain *Enterococcus faecium* CH3. **Meat Science**, v.59, p.79-85, 2001.
- ZANON, U. Esterilização. In: ZANON, U. e NEVES, J. Infecções Hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento. Editora Medsi, Rio de Janeiro, p.831-858, 1987. Disponível em [http:// www.Joãopossani.hpg.ig.com.br](http://www.Joãopossani.hpg.ig.com.br). Acesso em fevereiro de 2002.
- ZENG, X. e RUCKENSTEIN, E. (a) Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.35, p.4169-4175, 1996.
- ZENG, X. e RUCKENSTEIN, E. (b) Supported chitosan – dye affinity membranes and their protein adsorption. **Journal of Membrane Science**, v.117, p.271-278, 1996.
- 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.
- ZOHURIAAN, M.J. e SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v.23, p.575–579, 2003.

ANEXO 1

Neste anexo podem ser visualizadas as morfologias das membranas densas à base de quitosana (ensaios 2, 4, 6 e 8) após um e dois meses de exposição ao tampão PBS e à enzima lisozima.

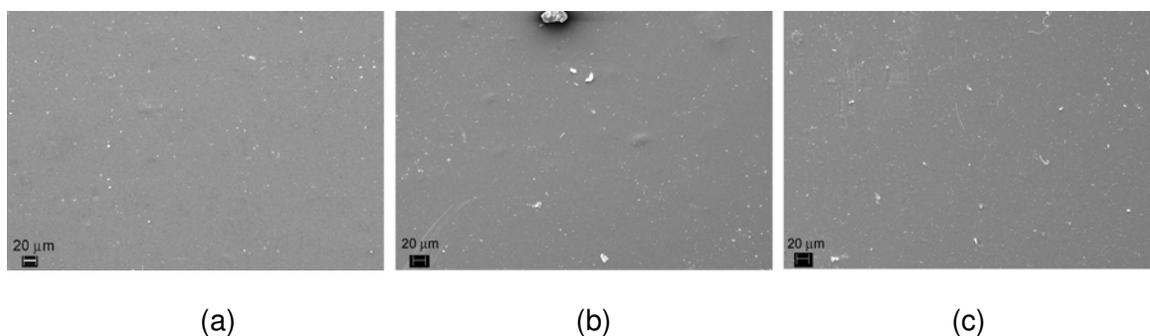


Figura A1.1 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de um mês.

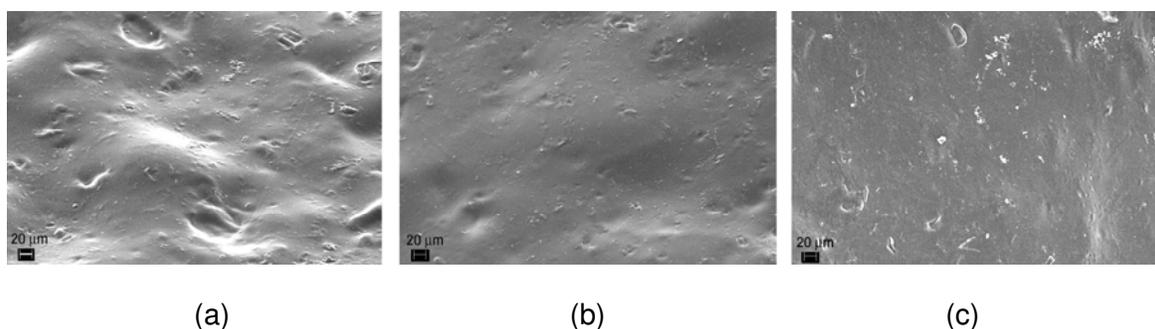


Figura A1.2 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 4 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de um mês.

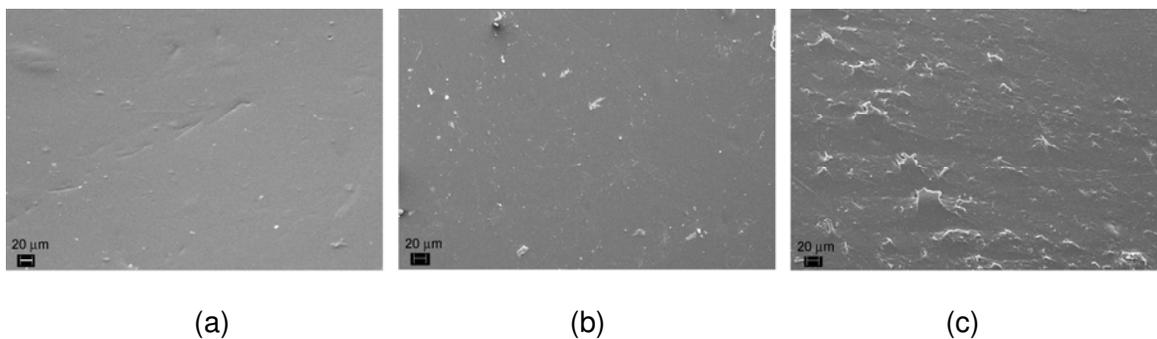


Figura A1.3 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 6 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de um mês.

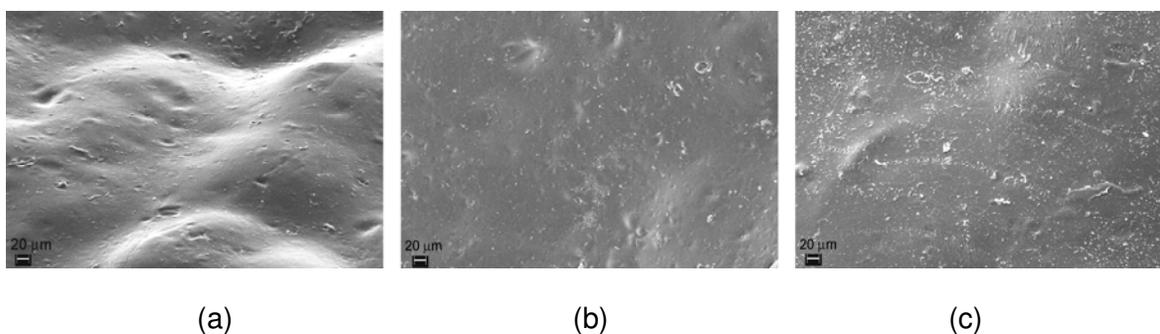


Figura A1.4 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 8 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de um mês.

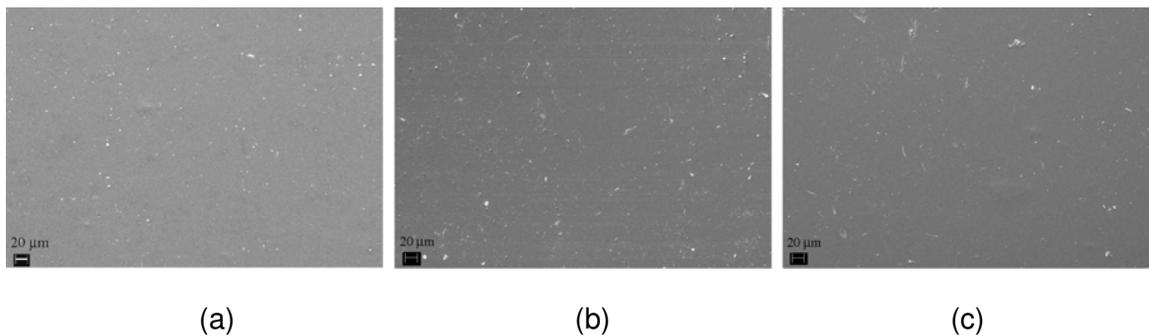


Figura A1.5 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de dois meses.

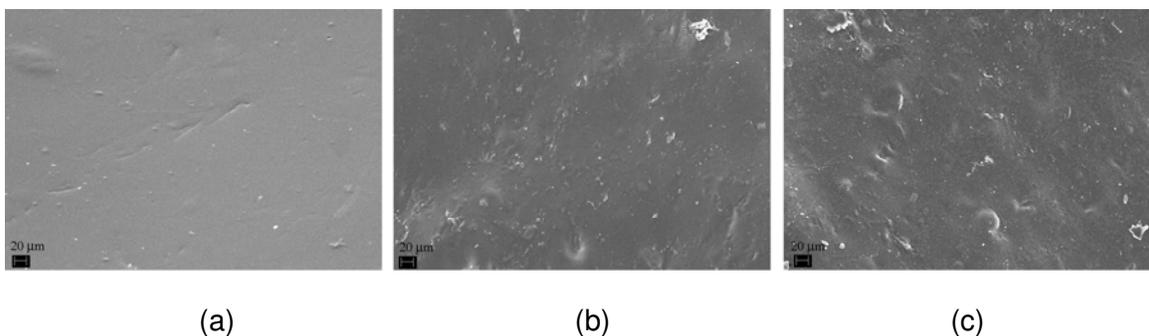


Figura A1.6 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 4 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de dois meses.

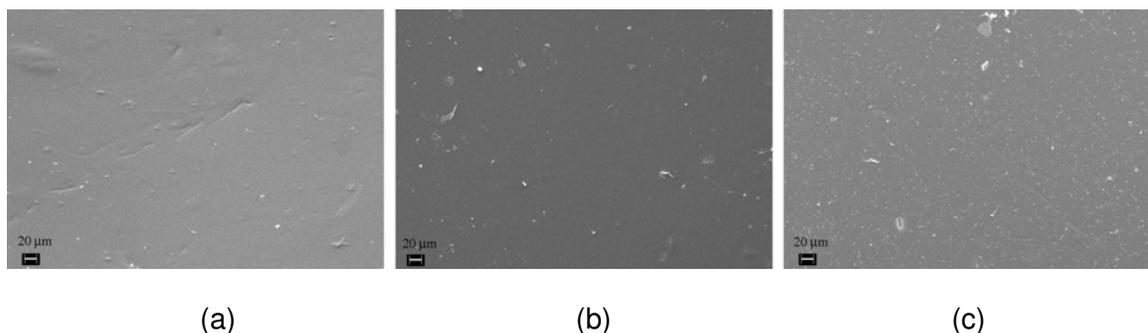


Figura A1.7 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 6 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de dois meses.

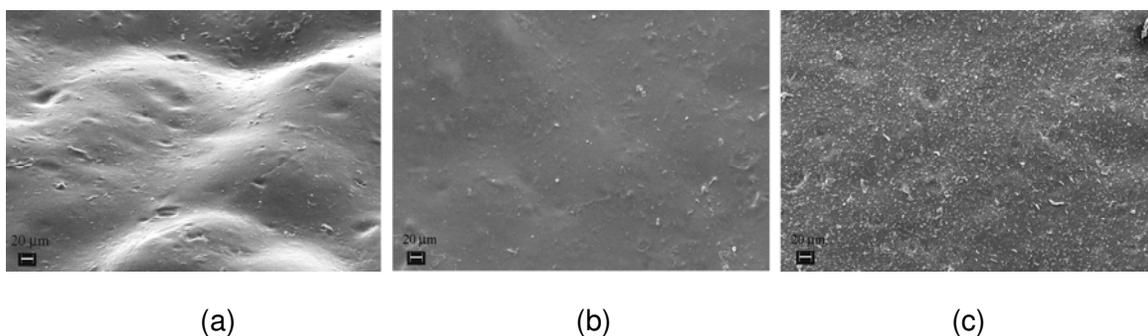


Figura A1.8 – Morfologia das membranas densas de quitosana correspondente ao ensaio 8 do planejamento estatístico proposto neste trabalho: (a) antes da exposição ao tampão PBS ou à solução de lisozima, (b) após a exposição ao tampão PBS, (c) após a exposição à solução de lisozima. Duração do ensaio de dois meses.

ANEXO 2

Neste anexo podem ser visualizadas as formas finais das membranas densas à base de quitosana, neutralizadas e não neutralizadas, após 24 horas de exposição aos solventes: água destilada e tampão PBS.

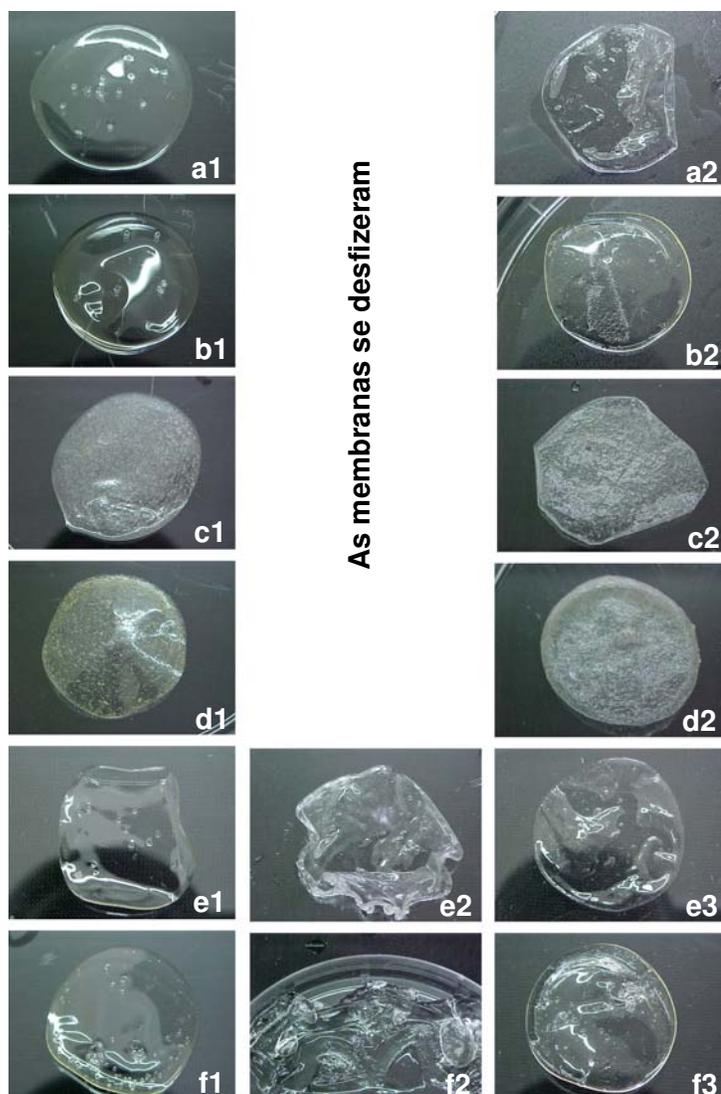


Figura A2.1 – Aspectos visuais das membranas densas à base de quitosana correspondentes aos ensaios de 1 a 6, respectivamente: (a1-f1) membranas após a secagem em estufa, (e2-f2) membranas não neutralizadas e após imersão em água destilada por 24 horas à temperatura ambiente, (a2-d2, e3-f3) membranas neutralizadas e após imersão em água destilada por 24 horas à temperatura ambiente.

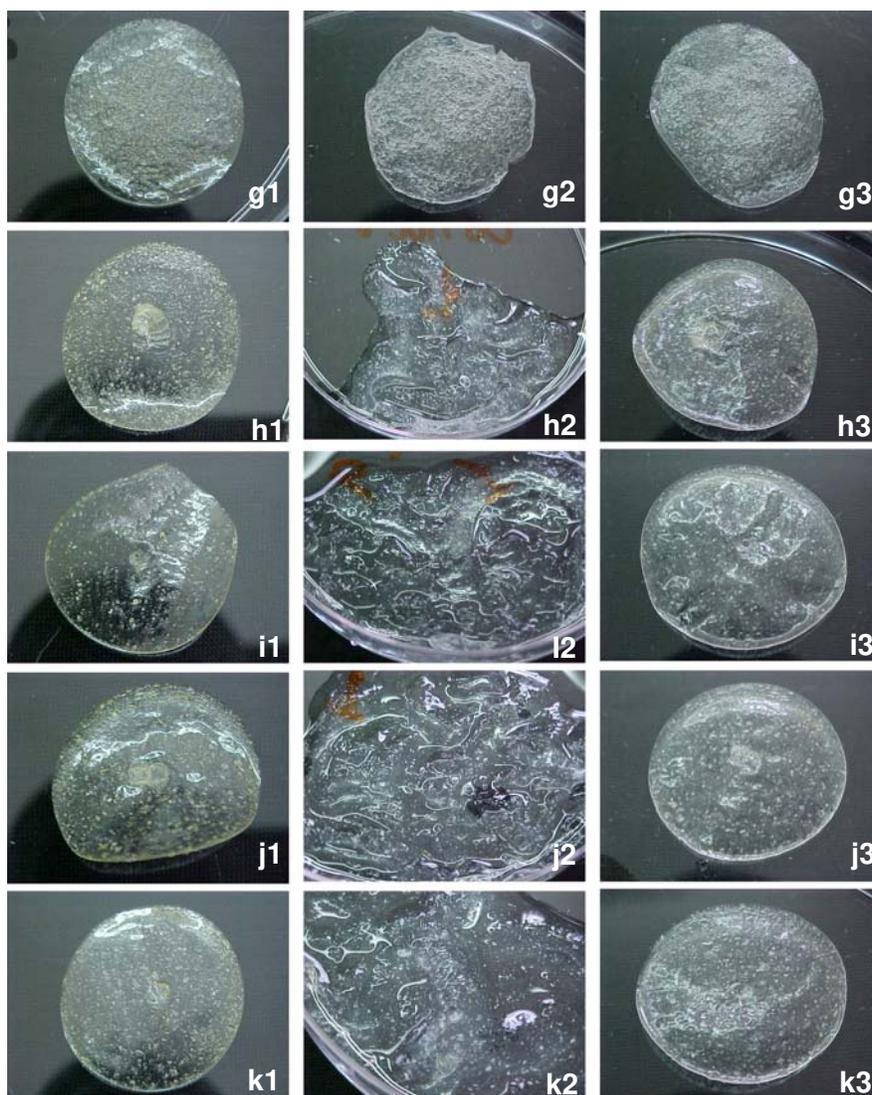


Figura A2.2 – Aspectos visuais das membranas densas à base de quitosana correspondentes aos ensaios de 7 a 11, respectivamente: (g1-k1) membranas após a secagem em estufa, (g2-k2) membranas não neutralizadas e após imersão em água destilada por 24 horas à temperatura ambiente, (g3-k3) membranas neutralizadas e após imersão em água destilada por 24 horas à temperatura ambiente.

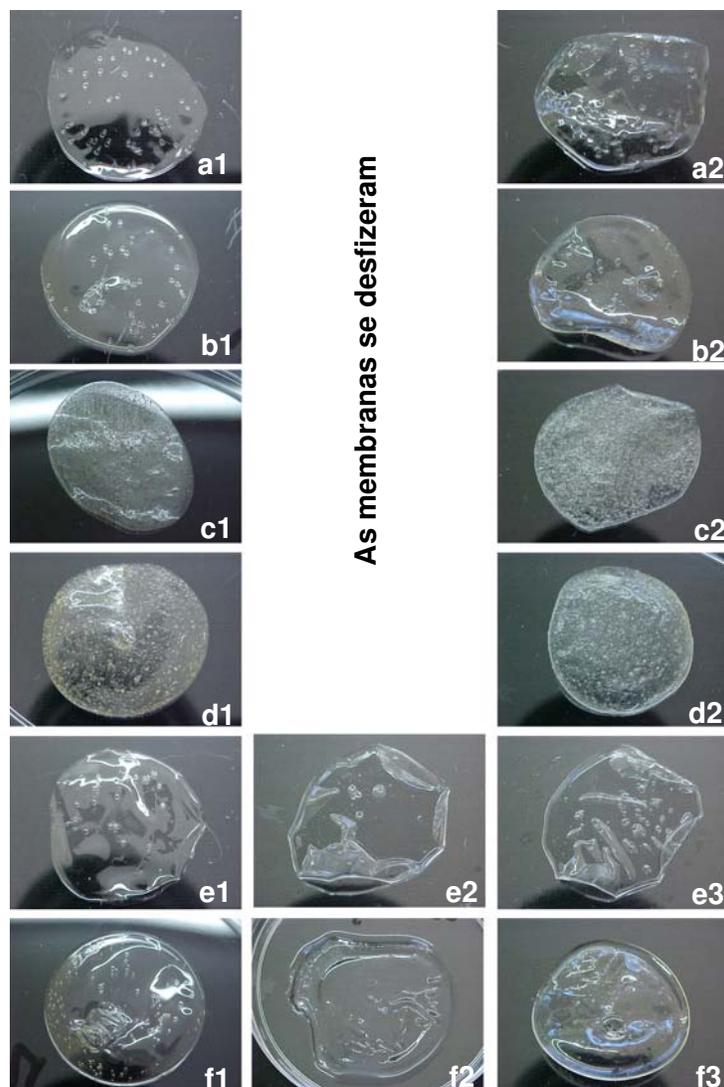


Figura A2.3– Aspectos visuais das membranas densas à base de quitosana correspondentes aos ensaios de 1 a 6, respectivamente: (a1-f1) membranas após a secagem em estufa, (e2-f2) membranas não neutralizadas e após imersão em tampão PBS por 24 horas à temperatura ambiente, (a2-d2, e3-f3) membranas neutralizadas e após imersão em tampão PBS por 24 horas à temperatura ambiente.

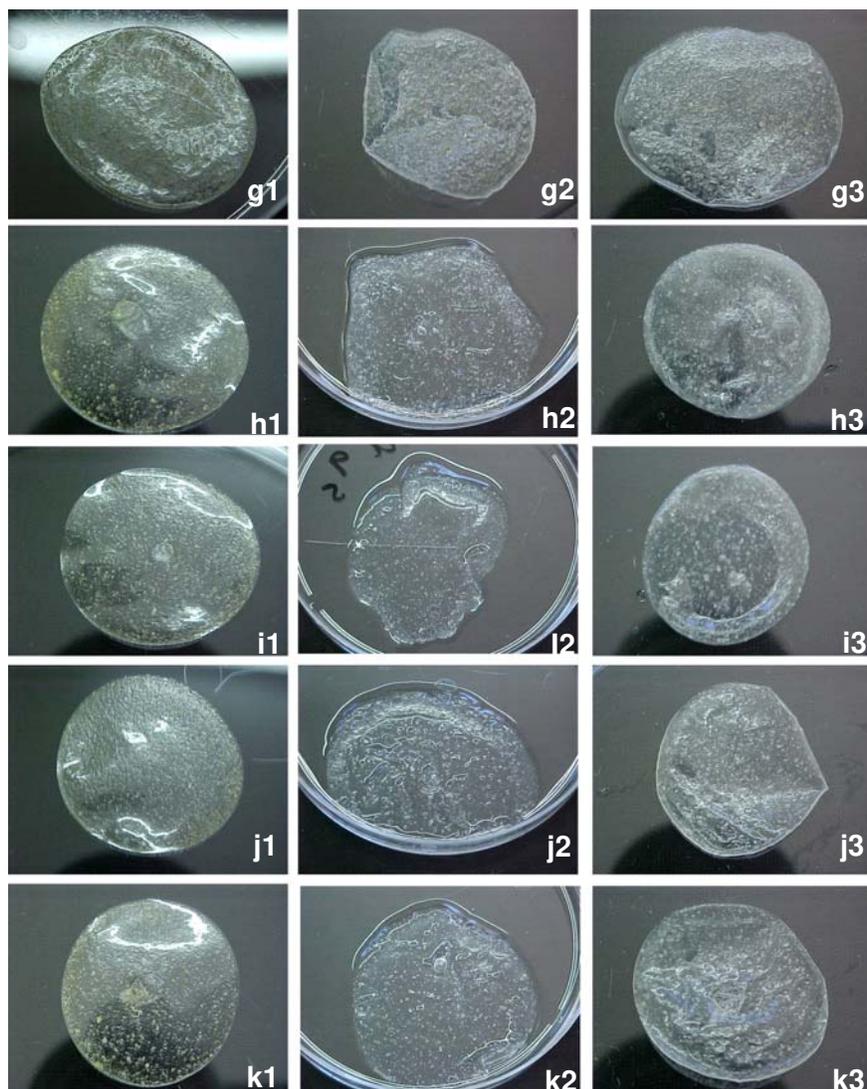


Figura A2.4 – Aspectos visuais das membranas densas à base de quitosana correspondentes aos ensaios de 7 a 11, respectivamente: (g1-k1) membranas após a secagem em estufa, (g2-k2) membranas não neutralizadas e após imersão em tampão PBS por 24 horas à temperatura ambiente, (g3-k3) membranas neutralizadas e após imersão em tampão PBS por 24 horas à temperatura ambiente.

ANEXO 3

Neste anexo podem ser visualizados os comportamentos das membranas densas de quitosana (ensaio 2) nos ensaios de análise mecânica diferencial (DMA). Dentre os diversos parâmetros a serem especificados para a análise, foram mantidos constantes: ensaio do tipo tensão, força dinâmica máxima de 1,0 N, taxa de aquecimento de 5,0 °C/min, frequência de 1,00 Hz e atmosfera não inerte (ar). A amplitude, a faixa de temperatura utilizada e as condições de preparo da amostra variaram e encontram-se descritas para cada ensaio.

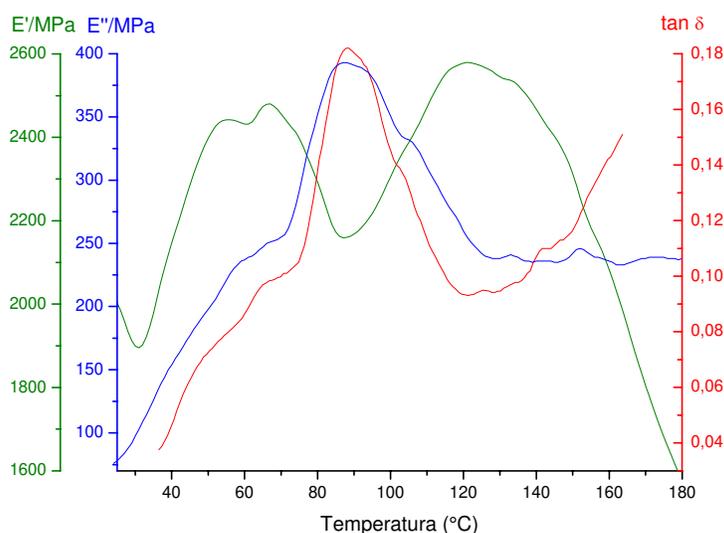


Figura A3.1 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e tanδ obtidas do DMA para as membranas densas de quitosana correspondentes ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de 60 μm e a faixa de temperatura de 25 a 200°C. A membrana não recebeu nenhum tratamento de secagem antes da realização deste ensaio.

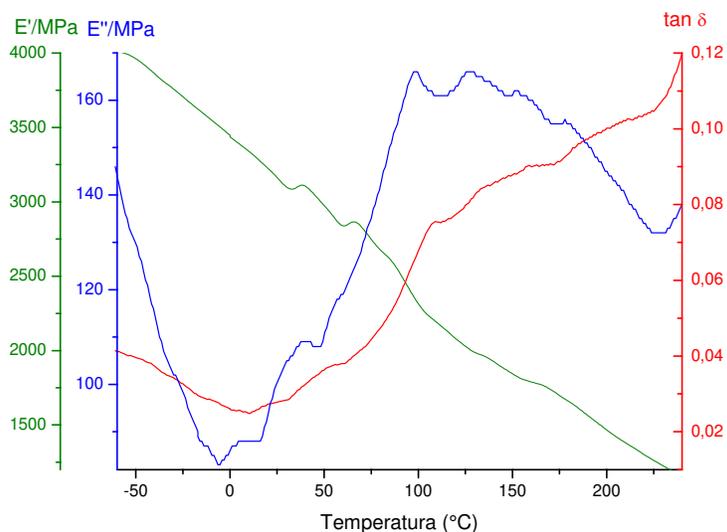


Figura A3.2 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan\delta$ obtidas do DMA para a membrana densa de quitosana correspondente ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de $120\ \mu\text{m}$ e a faixa de temperatura de -60 a 250°C . Para a realização deste ensaio, a membrana foi seca em estufa a 60°C por 24 horas.

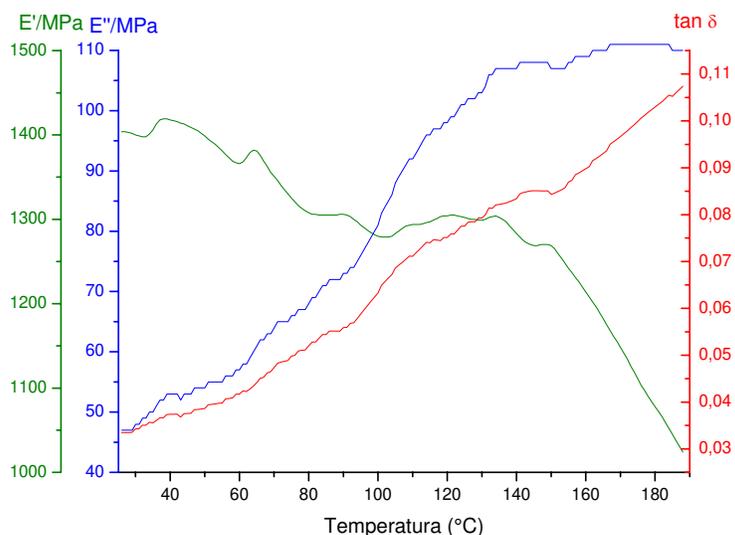


Figura A3.3 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan\delta$ obtidas do DMA para as membranas densas de quitosana correspondentes ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de $60\ \mu\text{m}$ e a faixa de temperatura de 25 a 200°C . Para a realização deste ensaio, a membrana foi seca em estufa a 60°C por 24 horas.

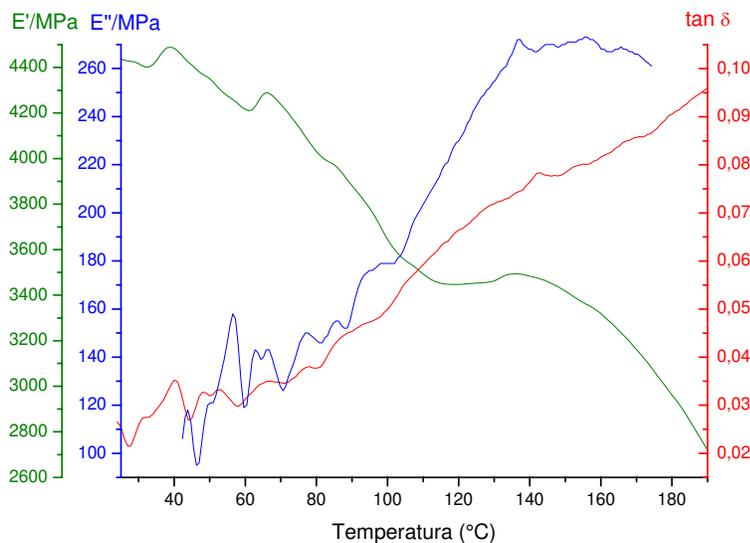


Figura A3.4 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan\delta$ obtidas do DMA para as membranas densas de quitosana correspondentes ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de $240\ \mu\text{m}$ e a faixa de temperatura de 22 a 250°C . Para a realização deste ensaio, a membrana foi seca em estufa a 60°C por 24 horas.

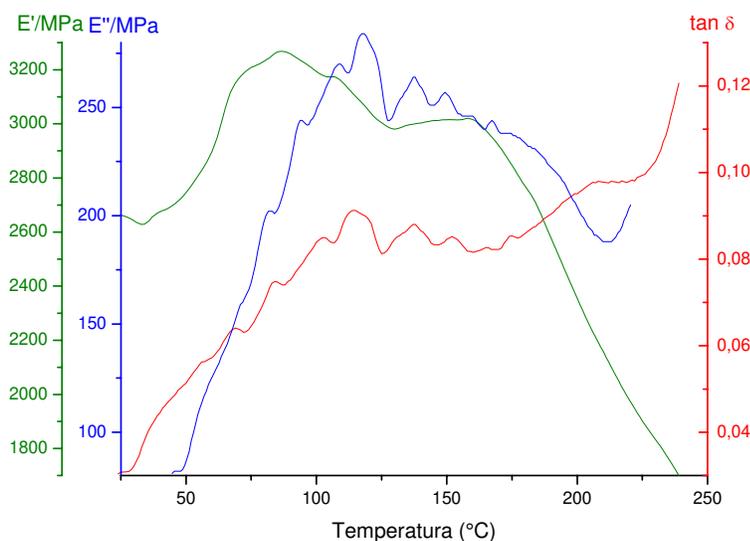


Figura A3.5 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan\delta$ obtidas do DMA para as membranas densas de quitosana correspondentes ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de $240\ \mu\text{m}$ e a faixa de temperatura de 22 a 250°C . A membrana não recebeu nenhum tratamento de secagem antes da realização deste ensaio.

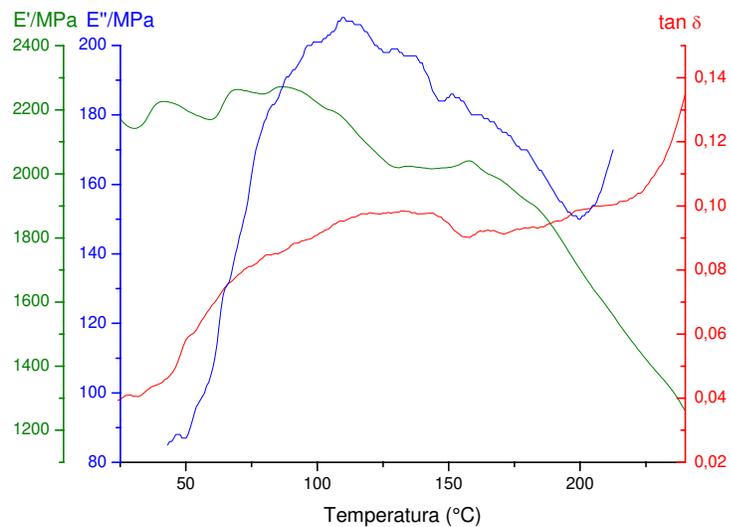


Figura A3.6 – Curvas do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan \delta$ obtidas do DMA para as membranas densas de quitosana correspondentes ao ensaio 2 do planejamento estatístico proposto neste trabalho. A amplitude utilizada foi de $7 \mu\text{m}$ e a faixa de temperatura de 25 a 250°C. A membrana não recebeu nenhum tratamento de secagem antes da realização deste ensaio.